



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORİK ASİTİN *İN VİTRO* ORTAMDA KOLON KANSER  
HÜCRE HATLARI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Murat SEVİMLİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAYRAM**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi ÖYP Koordinasyon Birimi tarafından  
ÖYP05255-DR-12 proje numarası ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik  
Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 216S650 proje numarası ile  
desteklenmiştir.**

**Tez. No: 173**

**ISPARTA-2018**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/06/2018

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAYRAM  
Süleyman Demirel Üniversitesi,  
Histoloji ve Embriyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Meral ÖNCÜ  
Süleyman Demirel Üniversitesi,  
Histoloji ve Embriyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU  
Süleyman Demirel Üniversitesi,  
Tıbbi Biyoloji AD

Üye : Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL  
Ege Üniversitesi,  
Histoloji ve Embriyoloji AD

Üye : Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK  
Akdeniz Üniversitesi,  
Histoloji ve Embriyoloji AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN  
Enstitü Müdürü


## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK


### BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Çalışmamız esnasında kullanılan malzemeleri sağlayan ve/veya üreten herhangi bir firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

“Borik Asitin *In Vitro* Ortamda Kolon Kanseri Hücre Hatları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

  
Tezi Hazırlayan  
Murat SEVİMLİ  
İmza

  
Danışman  
Dilek BAYRAM  
İmza



*Sevgili eşim Tuğba ve canım oğlum Umut'a ithaf ediyorum...*

*Saygılarımla...*

*Isparta, 2018*

## TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve geliştirilmesinde bana destek veren; bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAYRAM'a, doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım ilk danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Meral ÖNCÜ'ye;

Görüntüleme sistemleri konusunda Doç. Dr. Kanat GÜLLE'ye ve laboratuvar çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen başta Dr. Öğr. Üyesi İlkey ARMAĞAN ve Arş. Gör. Dr. Meltem ÖZGÖÇMEN olmak üzere Anabilim Dalımızdaki tüm öğretim üyelerine ve çalışma arkadaşlarıma;

Gen ekspresyon çalışmalarının gerçekleştirilmesindeki yardımlarından dolayı Metin CEYHAN'a;

Bu tez çalışmasını ÖYP05255-DR-12 proje numarası ile destekleyen S.D.Ü. ÖYP Koordinasyon Birimi'ne ve 216S650 proje numarası ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK)'na

Teşekkür ederim.

Son ve özel teşekkürlerim ise; bugünlere gelmemde büyük emekleri olan anne ve babama; beni moleküler biyolojinin muhteşem dünyası ile tanıştıran, gerek akademik hayatta gerekse yaşamımın her anında varlığı ile güç ve huzur bulduğum, en büyük destekçim, hayat arkadaşım, sevgili eşim Öğr. Gör. Dr. Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ'ye ve yaşama sevincimiz canım oğlumuz Umut'a.

Arş. Gör. Dr. Murat SEVİMLİ

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK</b> .....	<b>iii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Kanserın Moleküler Biyolojisi .....	5
2.1.2. Kanser Hücrelerinin Moleküler Özellikleri .....	7
2.1.2.1. Büyüme Sinyallerinde Öz Yeterlilik Kazanma .....	7
2.1.2.2. Çoğalma Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık .....	7
2.1.2.3. Apoptozdan Kaçış.....	8
2.1.2.4. Sınırsız Çoğalma Potansiyeli .....	9
2.1.2.5. Anjiyogenez .....	9
2.1.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz .....	10
2.1.2.7. Genomik Kararsızlık ve Mutasyon .....	10
2.1.2.8. Tümörü Teşvik Eden İnflamasyon .....	11
2.1.2.9. Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi .....	12
2.1.2.10. İmmuniteden Kaçış .....	12
2.2. Apoptozun Moleküler Biyolojisi ve Kanser .....	13
2.2.1. Apoptoz.....	13
2.2.2. Apoptozun Molekülleri.....	15
2.2.2.1. Kaspazlar .....	15
2.2.2.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri .....	17
2.2.2.3. Apoptozun İnhibitör Proteinleri (IAP'ler) .....	19
2.2.3. Apoptozun Yolakları .....	21

2.2.3.1. Ölüm Reseptörleri ve Ekstrinsik Yolak .....	22
2.2.3.2. Fas Aracılı Ekstrinsik Yolak .....	25
2.2.3.3. TNF Aracılı Ekstrinsik Yolak .....	27
2.2.3.4. TRAIL Aracılı Ekstrinsik Yolak .....	30
2.2.3.5. DR3 ve DR6 Aracılı Ekstrinsik Yolak .....	31
2.2.3.6. Mitokondri ve İntrensik Yolak .....	32
2.2.3.7. İntrensik Yolak ve JNK Sinyal Mekanizması .....	33
2.2.3.8. İntrensik Yolak ve Jak/Stat Sinyal Mekanizması .....	35
2.2.3.9. İntrensik Yolak ve PI3K/Akt Sinyal Mekanizması .....	36
2.2.3.10. İntrensik Yolak ve Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal Mekanizması .....	37
2.2.3.11. Mitokondriden Salınan Proteinler ve Aktiviteleri .....	38
2.2.4. Apoptoz Yolaklarındaki Ortak Son .....	40
2.3. Kolorektal Kanserler .....	41
2.4. Bor ve Borik Asit .....	43
2.4.1. Borik Asitin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri .....	45
2.4.2. Borik Asit ve Kanser Tedavisi .....	46
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>50</b>
3.1. Gereçler .....	50
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	50
3.1.2. Kültürde Kullanılan Hücreler .....	51
3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar .....	52
3.1.4. İmmünohistokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar .....	53
3.1.5. Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar .....	54
3.2. Yöntem .....	54
3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları .....	54
3.2.1.1. Hücre Hattının Açılması .....	55
3.2.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması .....	55
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması .....	56
3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması .....	56
3.2.1.5. Hücre Sayımı .....	56
3.2.1.6. Doz Belirleme Deneyi .....	57
3.2.1.7. Tutunma ve Canlılık Deneyi .....	59

3.2.1.8. İki Boyutlu Kültür Ortamının Hazırlanması.....	59
3.2.1.9. Üç Boyutlu Kültür Ortamının Hazırlanması, Bakımı ve Takibi.....	62
3.2.2. İmmünohistokimyasal Çalışmalar .....	66
3.2.2.1. İki Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme .....	67
3.2.2.2. İki Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu.....	68
3.2.2.3. İki Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme.....	69
3.2.2.4. İki Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme.....	69
3.2.2.5. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (brdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme .....	70
3.2.2.6. Üç Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu .....	71
3.2.2.7. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme .....	72
3.2.2.8. Üç Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme.....	73
3.2.3. Hematoksilen Eozin Boyama .....	73
3.2.3.1. Üç Boyutlu Kültürde Hematoksilen Boyama .....	73
3.2.4. Gen Ekspresyon Çalışmaları.....	74
3.2.4.1. İki Boyutlu Kültürde Gen Ekspresyon Çalışmaları için Hücrelerin Hazırlığı .....	74
3.2.4.2. Üç Boyutlu Kültürde Gen Ekspresyon Çalışmaları için Hücrelerin Hazırlığı .....	75
3.2.4.3. RNA İzolasyonu .....	75
3.2.4.4. cDNA Sentezi .....	77
3.2.4.5. Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) .....	78
3.2.4.6. Analiz.....	79
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>87</b>
4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları .....	87
4.2. Tutunma ve Canlılık Deneyi Bulguları .....	88
4.3. İki Boyutlu Kültür Çalışmaları Sonuçları .....	89
4.3.1. İki Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları.....	89
4.3.2. İki Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu Bulguları.....	92



4.3.3. İki Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları .....	95
4.3.4. İki Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları .....	98
4.4. Üç Boyutlu Kültür Çalışmaları Sonuçları .....	101
4.4.1. Üç Boyutlu Kültürde Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları ve Sferoid Morfolojisi değerlendirmesi.....	101
4.4.2. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları.....	103
4.4.3. Üç Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu Bulguları.....	105
4.4.4. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları .....	107
4.4.5. Üç Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları .....	109
4.5. Gen Ekspresyon Çalışmalarının Sonuçları .....	111
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>118</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>155</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>157</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>158</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>159</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>174</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>2B</b>	: İki boyutlu
<b>2B</b>	: Üç boyutlu
<b>5FU</b>	: 5 Fluorourasil
<b>AIF</b>	: Apoptoz indükleyici faktör
<b>APAF-1</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
<b>APC</b>	: Adenomatöz polipozis koli
<b>Asp</b>	: Aspartik asit
<b>ATF-2</b>	: Aktive edici transkripsiyon faktörü 2
<b>ATP</b>	: Adenozin 3 fosfat
<b>B</b>	: Bor
<b>BA</b>	: Borik Asit
<b>BCL-2</b>	: B hücreli lenfoma 2
<b>BIR</b>	: Bakulovirüs apoptoz inhibitörü protein tekrarları
<b>B(OH)<sub>4</sub></b>	: Borat
<b>BrDU</b>	: Bromodeoksiüridin
<b>CAD</b>	: Kaspazlarca aktive edilen deoksiribonükleaz
<b>CAM</b>	: Hücre tutunma molekülü
<b>CARD</b>	: Kaspaz bağlanma ve aktive olma yüzeyi
<b>CD</b>	: Yüzey farklılaşma antijenleri
<b>cDNA</b>	: Tamamlayıcı DNA
<b>CED-3</b>	: Hücre ölüm proteini 3
<b>CpG</b>	: Sitozin fosfat Guanin
<b>CRD</b>	: Sisteinden zengin yüzey
<b>CREB</b>	: Siklik adenozin monofosfata yanıt veren element bağlayıcı
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfosit
<b>DAB</b>	: 3,3' Diaminobenzidin
<b>DD</b>	: Ölüm bölgesi
<b>DED</b>	: Ölüm efektör bölgesi
<b>DFF45</b>	: DNA parçalanma faktörü
<b>DISC</b>	: Ölümü uyarıcı sinyal kompleksi
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	: Deoksinükleotit

<b>DR</b>	: Ölüm reseptörü
<b>ECM</b>	: Hücre dışı matriks
<b>ERK</b>	: Hücre dışı sinyallerce düzenlenen protein kinaz
<b>FADD</b>	: Ölüm bölgesi içeren Fas ilişkili protein
<b>FAK</b>	: Fokal adezyon kinaz
<b>FAS</b>	: İlk apoptoz sinyali
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>FTIRI</b>	: Fourier dönüşümlü kızılötesi görüntüleme
<b>GAS2</b>	: Büyüme durdurucu özel protein
<b>GLUT</b>	: Glukoz taşıyıcı
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>H2O2</b>	: Hidrojen peroksit
<b>H3BO3</b>	: Borik asit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HDAC</b>	: Histon deasetilaz
<b>HRP</b>	: Horseradiş peroksidaz
<b>IAP</b>	: Apoptoz inhibitör proteinler
<b>IC<sub>50</sub></b>	: İnhibe edici doz 50
<b>ICAD</b>	: Kaspazlarca aktive edilen DNaz inhibitörü
<b>ICE</b>	: İnterlökin dönüştürücü enzim
<b>IGF-1R</b>	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü
<b>IKK</b>	: İκB kinaz kompleksi
<b>Ink</b>	: Kinaz inhibitörü
<b>JAK</b>	: Janus kinaz
<b>JNK</b>	: c-Jun kinaz
<b>kb</b>	: Kilobaz çifti
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>Kip</b>	: Kinaz inhibitörü proteinler
<b>MAPK</b>	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
<b>MEKK-1</b>	: Mitojen ile aktive olan protein/ Erk kinaz kinaz 1
<b>MPT</b>	: Mitokondri geçirgenlik poru
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MSS</b>	: Multiselüler Sferoid
<b>MTT</b>	: 3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2,5 Difeniltetrazolyum Bromür
<b>NF-κB</b>	: Nüklear faktör <i>kappa B</i>

<b>NIK</b>	: NF- $\kappa$ B tarafından uyarılan kinaz
<b>NK</b>	: Doğal öldürücü hücre
<b>ODF</b>	: Osteoklast farklılaşma faktörü
<b>OPG</b>	: Osteoprotegrin
<b>p53</b>	: p53 proteini
<b>PAK2</b>	: p21 tarafından aktive edilen kinaz
<b>PARP</b>	: Çoklu ADP-riboz polimeraz
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PDGF</b>	: Platelet kökenli büyüme faktörü
<b>PIAS</b>	: Aktive STAT'ların protein inhibitörleri
<b>PIP</b>	: Fosfatidilinositol fosfat
<b>pRb</b>	: Retinoblastom proteini
<b>RAIDD</b>	: RIP ilişkili, ölüm bölgesi içeren ICH-1 proteini
<b>RIP</b>	: Reseptörle etkileşen protein
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RTK</b>	: Tirozin kinaz reseptörü
<b>qRT-PCR</b>	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SAPK</b>	: Stres tarafından aktive edilen protein kinaz
<b>SHPs</b>	: Sarkom 2 homolojisi içeren protein tirozin fosfataz
<b>SOCS</b>	: Sitokin sinyali baskılayıcıları
<b>SODD</b>	: Ölüm bölgesi susturucusu
<b>STAT</b>	: Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüleri ve aktivatörleri
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
<b>TGF<math>\beta</math></b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz edici faktör
<b>TNF-R</b>	: Tümör nekroz edici faktör reseptörü
<b>TNFRSF</b>	: Tümör nekroz edici faktör reseptör üst ailesi
<b>TNFSF</b>	: Tümör nekroz edici faktör üst ailesi
<b>TRADD</b>	: Ölüm bölgesi içeren TNFR ilişkili protein
<b>TRAF</b>	: TNFR ilişkili faktörler
<b>TUNEL</b>	: Terminal Deoksitükleotidil Transferaz (Tdt) Aracılı İşaretleme
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotel büyüme faktörü

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> BCL-2 aile üyesi proteinler.....	19
<b>Tablo 2.</b> Apoptoz inhibitör proteinler.....	20
<b>Tablo 3.</b> TNFRSF üyeleri.....	23
<b>Tablo 4.</b> TNFSF üyeleri.....	23
<b>Tablo 5.</b> Kullanılan cihazların listesi, marka-modeli ve kullanım yeri.....	50
<b>Tablo 6.</b> Hücre kültüründe kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar listesi.....	52
<b>Tablo 7.</b> İmmunohistokimyasal çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar listesi.....	53
<b>Tablo 8.</b> Gen ekspresyon çalışmalarda kullanılan sarf malzeme/kimyasal listesi.....	54
<b>Tablo 9.</b> Gerçek Zamanlı PCR cihaz protokolü.....	78
<b>Tablo 10.</b> RealTime Ready Human Apoptosis Panel 96 genler ve açık adları.....	81
<b>Tablo 11.</b> İzole edilen nükleik asitlerin konsantrasyon ve saflık değerleri.....	111
<b>Tablo 12.</b> Kat değişim değerlerinin istatistiksel analizine göre 2B kültürde, BA grubunda ekspresyonu artan genler.....	112
<b>Tablo 13.</b> Kat değişim değerlerinin istatistiksel analizine göre 3B kültürde, BA grubunda ekspresyonu artan genler.....	115

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Kanser hücrelerinin moleküler özellikleri.....	6
<b>Şekil 2.</b> Apoptotik yollar ve moleküller.....	14
<b>Şekil 3.</b> Kaspaz alt birimleri ve aktivasyonu .....	16
<b>Şekil 4.</b> IAP'lerin apoptotik yollardaki fonksiyonu.....	21
<b>Şekil 5.</b> Apoptoz yolları .....	22
<b>Şekil 6.</b> Ölüm reseptörlerinin yapısal karşılaştırması. ....	24
<b>Şekil 7.</b> FasL - Fas bağlantısı sonucu DISC oluşumu.....	26
<b>Şekil 8.</b> Tip 1 ve Tip 2 hücrelerde Fas/CD95 aracılı apoptoz yolağı.....	27
<b>Şekil 9.</b> TNF-R1'e TNF- $\alpha$ 'nın bağlanması ile DISC oluşumu .....	28
<b>Şekil 10.</b> TNF-R1 aracılı sinyal iletim yolları.....	29
<b>Şekil 11.</b> TRAIL reseptörleri ve TRAIL DISC.....	31
<b>Şekil 12.</b> JNK sinyal yolağı aracılı apoptoz.....	34
<b>Şekil 13.</b> Hemositometre sayım alanı .....	57
<b>Şekil 14.</b> Doz belirleme deneyi şeması. ....	58
<b>Şekil 15.</b> Hücre canlılık deneyi şeması .....	59
<b>Şekil 16.</b> İmmünohistokimyasal çalışmalar için iki boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması. ....	61
<b>Şekil 17.</b> Gen ekspresyon çalışmaları için iki boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması. ....	62
<b>Şekil 18.</b> İmmünohistokimyasal çalışmalar için üç boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması. ....	64
<b>Şekil 19.</b> Gen ekspresyon çalışmaları için üç boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması. ....	65
<b>Şekil 20.</b> RealTime Ready Human Apoptosis Panel 96 genlerin yerleşimi. ....	79
<b>Şekil 21.</b> SW-480 Hücreleri için borik asit doz inaktivasyon grafiğı.....	87
<b>Şekil 22.</b> Zamana bağlı hücre çoğalma verileri. ....	88
<b>Şekil 23.</b> İki boyutlu kültürde BrdU işaretlenme grafiğı. ....	89
<b>Şekil 24.</b> İki boyutlu kültürde TUNEL boyanma grafiğı.....	92
<b>Şekil 25.</b> İki boyutlu kültürde kaspaz 3 ile işaretlenme grafiğı. ....	95
<b>Şekil 26.</b> İki boyutlu kültürde AIF işaretlenme grafiğı.....	98
<b>Şekil 27.</b> Üç boyutlu kültürde BrdU işaretlenme grafiğı. ....	103
<b>Şekil 28.</b> Üç boyutlu kültürde TUNEL boyanma grafiğı.....	105
<b>Şekil 29.</b> Üç boyutlu kültürde Kaspaz 3 işaretlenme grafiğı. ....	107

<b>Şekil 30.</b> Üç boyutlu kültürde AIF işaretlenme grafiği.....	109
<b>Şekil 31.</b> 2B kültür 48. saat BA ve kontrol grupları ifade düzeyi değişimlerini gösteren saçılım grafiği (scatter plot).....	113
<b>Şekil 32.</b> 2B kültür grup kümeleme grafiği. ....	114
<b>Şekil 33.</b> 3B kültür 48. saat BA ve kontrol grupları ifade düzeyi değişimlerini gösteren saçılım grafiği (scatter plot).....	116
<b>Şekil 34.</b> 3B kültür grup kümeleme grafiği. ....	117
<b>Şekil 35.</b> TNF-BIM-BAD ilişkisi. ....	149
<b>Şekil 36.</b> JNK sinyal yolağı TNF-R1 ilişkisi (119). ....	150



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> 24. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	90
<b>Resim 2.</b> 24. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	90
<b>Resim 3.</b> 48. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	90
<b>Resim 4.</b> 48. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	91
<b>Resim 5.</b> 72. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	91
<b>Resim 6.</b> 72. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. ....	91
<b>Resim 7.</b> 24. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	93
<b>Resim 8.</b> 24. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	93
<b>Resim 9.</b> 48. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	93
<b>Resim 10.</b> 48. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	94
<b>Resim 11.</b> 72. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	94
<b>Resim 12.</b> 72. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. ....	94
<b>Resim 13.</b> 24. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	96
<b>Resim 14.</b> 24. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	96
<b>Resim 15.</b> 48. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	96
<b>Resim 16.</b> 48. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	97
<b>Resim 17.</b> 72. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	97
<b>Resim 18.</b> 72. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. ....	97
<b>Resim 19.</b> 24. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	99
<b>Resim 20.</b> 24. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	99
<b>Resim 21.</b> 48. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	99
<b>Resim 22.</b> 48. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	100
<b>Resim 23.</b> 72. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	100
<b>Resim 24.</b> 72. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. ....	100
<b>Resim 25.</b> 24. Saat H-E boyaması. ....	102
<b>Resim 26.</b> 48. Saat H-E boyaması. ....	102
<b>Resim 27.</b> 72. Saat H-E boyaması. ....	102
<b>Resim 28.</b> 24. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. ....	104
<b>Resim 29.</b> 48. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. ....	104
<b>Resim 30.</b> 72. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. ....	104
<b>Resim 31.</b> 24. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. ....	106



<b>Resim 32.</b> 48. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. ....	106
<b>Resim 33.</b> 72. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. ....	106
<b>Resim 34.</b> 24. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. ....	108
<b>Resim 35.</b> 48. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. ....	108
<b>Resim 36.</b> 72. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. ....	108
<b>Resim 37.</b> 24. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. ....	110
<b>Resim 38.</b> 48. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. ....	110
<b>Resim 39.</b> 72. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. ....	110



## 1. GİRİŞ

Kanser, üzerinde yürütölmekte olan çok sayıdaki araştırmaya rağmen halen dünya çapında önemini koruyan ölümcöl bir patolojidir (1). Kolorektal kanserler ise bütün kanser türleri arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Dünya genelinde her yıl, 1 milyon kişide kolorektal kanser gelişmektedir ve mortalite oranı yaklaşık %30 civarındadır (2). Bütün kanserler arasında görölme sıklığı bakımından 3. sırada yer alır. Kolon kanseri vakalarının %85'inde belirgin bir aile öyküsü ve kalıtsal özellik bulunmamaktadır (3). Bu vakaların büyük çoğunluğu sporadiktir ve en önemli etiyolojik faktörlerden biri beslenme alışkanlıklarıdır. Bununla birlikte fiziksel aktivite azlığı, sigara kullanımı, non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların kronik kullanımı ve bazı metabolik sendromlar diğer risk faktörleri arasında yer alır. Genetik faktörler incelendiğinde ise bunların sıklıkla polipozis ve nonpolipozis sendromları ile ilişkili olduğu görölmektedir. Bunlardan Ailesel Adenomatöz Polipozis Sendromu, Adenomatöz Polipozis Koli (APC) gen mutasyonları ile ilişkilidir. Kalıtsal non-polipozis kolorektal kanserlerde ise, DNA yanlış eşleşme onarım genlerinde, üreme hücrelerini ilgilendiren ve nesilden nesile aktarılan mutasyonlar görölmektedir (4). Kanser taraması, kolorektal kanserlerde mortaliteyi azaltmak için etkili bir yoldur. Bu amaçla gaitada gizli kan testi, kontrastlı kolon grafisi, sigmoidoskopi ve kolonoskopi kullanılabilir. Bu yöntemlerden biri 50 yaşın üstündeki kişilere, asemptomatik dahi olsa mutlaka önerilmelidir. En etkili ve ucuz korunma yöntemi yaşam tarzı değişikliğidir. Bu amaçla sigara tüketiminin sonlandırılması, fiziksel aktivitenin artırılması, vücut ağırlığının beden kitle indeksine göre uygun sınırlarda tutulması, beslenme tarzının değiştirilmesi oldukça önemlidir. Bazı genetik olgularda ise koruyucu cerrahi girişimler gerekli olabilmektedir (5).

Kolorektal kanserlerin tedavisinde temel yaklaşım cerrahi rezeksiyon olmakla birlikte; nüksleri önlemeye yönelik olarak hastalığın takibinde çoğunlukla radyoterapiye ihtiyaç duyulmaktadır. Bazı durumlarda ise bununla birlikte kemoterapi uygulamaları da tedaviye eklenmektedir. Bazı kolon kanser olgularında ise, uzun süreli kemoterapi uygulaması tek başına tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi uygulamalarında en sık kullanılan ajan, DNA ve RNA sentez inhibitörü olan fluorourasil bileşikleridir. Ancak etkileri hücre döngüsünün belirli bir fazına özgü

olan bu ve benzeri ajaların kullanımı sırasında bulantı, kusma, mukozit, diare, ciltte deskuamasyonlar, kardiyak ve nörolojik toksik etkiler gibi ciddi yan etkiler görülmektedir (6). Çünkü bu ajanlar sağlıklı hücrelerdeki, özellikle aktif olarak çoğalmakta olan hücrelerdeki süreçleri de etkilemektedir. Bu açıdan sentetik kimyasal anti kanser ilaçlar sağ kalımı artırmakla birlikte, yol açtıkları yan etkiler nedeniyle ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Bu ve benzeri nedenlerle günümüzde, başta kolorektal kanser olmak üzere birçok kanser türünün tedavisi için yan etki potansiyeli daha az olan doğal bileşikler üzerine araştırmalar yürütülmektedir. Birçok doğal bileşiğin kanser hücrelerinde DNA düzenleme mekanizmaları, hücre döngüsü ve apoptoz yolları üzerine etki etme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca bu moleküllerin, sahip oldukları anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri ile de tedaviye katkı sağladıkları görülmüştür (7).

Bor, periyodik tabloda “B” simgesi ile gösterilen, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 g/mol olan, metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Bor tabiatta hiçbir zaman serbest halde bulunmaz. Doğada başta oksijen olmak üzere çeşitli elementler ile bileşik halindedir. Borat olarak isimlendirilen bu bileşiklerden en önemlileri borik asit ve borakstır (8). Borun hayvanlarda ve insanda en yaygın bulunan formu olan borik asit ( $H_3BO_3$ ); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıdadır. Bor günlük diyetin bir parçası olarak borik asit (BA) formunda alınmaktadır. BA sindirim sistemi yoluyla absorbe edilir, vücut sıvıları ile dağılıma uğrar ve yarı ömrü yaklaşık olarak 24 saattir. Akut alımlarda BA'nın %50'si ilk 12 saatte, %90'ı ise 96 saatte vücuttan atılır. Kronik alımlarda tamamının ancak 3 haftada vücuttan atılabildiği kaydedilmiştir. Bor böbrekler tarafından atılıncaya kadar beyin, kemik, testis ve karaciğer gibi organlarda birikim göstermektedir. Bu durumda bor düşük konsantrasyonlarda tüm organlara dağılmış durumdadır (9). BA'nın kanser tedavisinde kullanılabilirliğini destekleyen bazı önemli kimyasal özellikleri de bulunmaktadır (10). BA kimyasal olarak zayıf bir Lewis asittir ve yapısal özellikleri karbon atomuna benzemektedir. Bu nedenle karbon içerikli birçok substratın yarışmalı inhibitörü olarak davranabilmektedir. Bu özelliği ile BA peptidaz, proteaz, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi birçok enzimi etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir (11). BA, fizyolojik doz aralığında, doz bağımlı olarak LNCaP ve Du 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir (12). Bununla birlikte

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında ise BA, apoptozu uyarmakta ve hücre çoğalmasını doz bağımlı bir şekilde azaltmaktadır (13). Ayrıca BA melanoma hücre hatları üzerinde apoptozu uyarak çoğalmayı engelleyici etkiler göstermektedir (14).

Bu çalışmanın amacı; dünyada ve ülkemizde sık görülen, yüksek mortalite ve morbidite oranlarına sahip kolon kanseri hücreleri üzerine *in vitro* koşullarda BA'in etkilerini hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında incelemektir. Bu amaçla bir insan kolon kanseri hücre hattı olan CCL-228-SW-480 hücrelerinde BA uygulamasının hücrelerin canlılık ve çoğalma düzeyleri üzerine olan etkileri Bromodeoksiüridin (BrdU) yöntemi, apoptoz üzerine etkileri ise kaspaz 3, Apoptoz İndükleyici Faktör (AIF) ve TUNEL metodu ile imünohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Ayrıca hem iki boyutlu hem üç boyutlu kültür ortamında BA uygulamasının apoptoz yolağında yer alan çeşitli genler üzerindeki etkileri ise kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) metodu ile incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kansere ilişkin ilk bilgiler eski Mısır, Babil ve Hint uygarlığı kayıtlarında yer almaktadır. Özellikle Antik Mısır uygarlığından günümüze ulaşan ve kemik kanseri bulguları içeren mumyalar ve bunlara ait yazıtlar bu dönemlerde de kanser vakalarının görüldüğünü ve tedavi edilmeye çalışıldığını göstermektedir. Milattan önce (M.Ö.) 1600'lerden günümüze ulaşan kansere ait bu ilk yazılı kayıtlarda, hastalığın tedavi edilemediği ve sadece kitlesel yapıların çıkarıldığı bildirilmektedir. Bir terim olarak "kanser" ilk defa Hipokrat (M.Ö. 460-370) tarafından "karkinos" adıyla iyileşmeyen yaralar için kullanılmıştır. Karkinos sözcüğü Antik Yunan mitolojisinde bir yengecin adından gelmektedir. İlk defa Galen (M.S. 130-210) tarafından; yengeç ısırığı ağrısının, kanser ağrısına olan benzerliği nedeni ile Latince yengeç anlamına gelen "cancer" kelimesi de kanseri tanımlamak için kullanılmıştır. Ayrıca Galen ilk defa tümörleri özelliklerine göre; doğaya uyan, doğaya karşı ve doğayı aşan olarak sınıflandırmıştır (15). Türk tıp tarihinde ise ilk defa 13. yy'da kanser kavramı, "seratan" kelimesi ile küçük boyutlarda, ağrılı oluşumlar ile tanımlanmıştır. Şerafeddin Sabuncuoğlu'na ait 15. yy'da yayınlanan bazı eserlerde kanserin cerrahi olarak çıkarılması gerektiğine yönelik bilgiler yer almaktadır (16). 17. yy'a gelindiğinde ilk defa Malpighi tarafından kanser dokusu üzerine mikroskopik incelemeler yapılmıştır. Yine aynı dönemde Morgagni ise günümüzdekine yakın haliyle kanser türlerini tanımlamıştır. 18. yy'a kadar kanser teorilerinde çok fazla değişim gözlenmemektedir. O döneme kadar kanser tedavisinde daha çok çeşitli metalik tuzlar, hayvansal ve bitkisel karışımlar kullanılmıştır. 19. ve 20. yy'da ise kanser oluşumu, tanısı ve tedavisi konusunda hızlı bir bilgi artışı olmuş, bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (16).

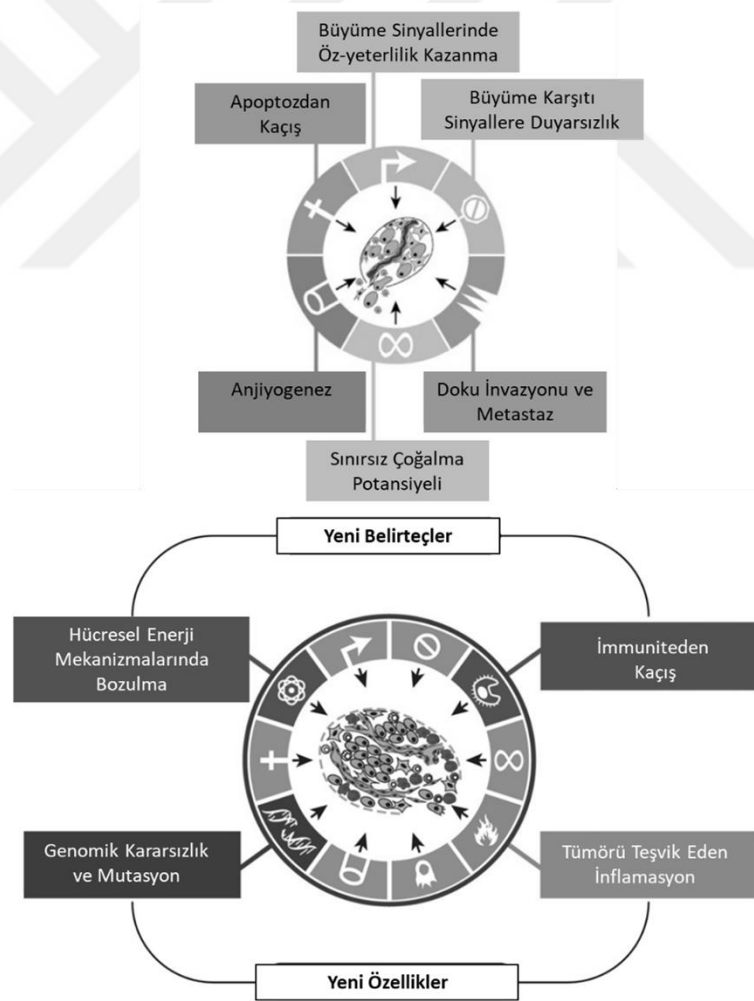
Kanser; yaşanan çevrede karşılaşılan ve/veya hücrede ortaya çıkan fiziksel ya da biyolojik etkenler nedeniyle, hücre ölüm programının bozulması ve kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması sonucu oluşan multifaktöriyel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (17). Kanseri sözcüğü yine Yunancada kök anlamındaki "genesis" kelimesiyle birleştirilip karsinogenez terimi türetilmiştir. Karsinogenez; hücre

büyümesi ve farklılaşması gibi biyolojik olayları etkileyen mutasyonların aşamalı olarak bir araya gelmesi sonucu ortaya çıkan bir süreçtir. Karsinogenez sırasında kanser hücreleri iki önemli özellik kazanmaktadırlar. Birincisi, kanser hücrelerinin normal hücre bölünmesi sınırlarını aşıp kontrolsüz olarak çoğalmalarıdır. İkincisi, bu hücrelerin diğer hücrelerin yaşam alanlarına yerleşmeleridir (18). Normal koşullarda hücrelerin hem iç hem de dış ortamla haberleşmesini sağlayan çeşitli sinyal mekanizmaları, bu hücrelerin kontrollü bir şekilde büyümelerini ve çoğalmalarını sağlar. Ancak kanser gelişim sürecinde bu mekanizmalarda meydana gelen çeşitli bozukluklar sonucunda; hücreler aşırı bölünme kapasitesi kazanır, ölüm sinyallerine duyarsızlaşmaları sonucu apoptozdan kaçır, invazyon ve metastaz yeteneği kazanarak çevre dokulara ve uzak organlara yayılabilir (19). Hücre döngüsü kontrol mekanizmalarındaki denetimlerden kaçan hücreler, çoğalmaya devam edip, anormal hücre kitlesi oluştururlar. Bu kitlelere tümör veya neoplazma denir. Bu hücreler tek bir kitle içinde kümelenmiş olarak duruyorsa iyi huylu tümör adını almaktadır. Ancak invazyon ve metastaz özelliği kazanmışsa kanser olarak kabul edilmektedir (20).

### **2.1.1. Kanserın Moleküler Biyolojisi**

Kanserın en temel özelliği olan hızlı ve kontrolsüz çoğalma, kanser hücrelerinin klonizasyon özelliğini tanımlamaktadır. Buna göre kanser tek bir hücrenin genetik değişim geçirerek kontrolsüz bölünmeye başlamasının ardından ortaya çıkan hücreler ile gelişir. Bu değişime tümör başlangıcı, değişimin gözleğildiği ilk hücreye de tümör başlatıcı hücre adı verilir. Ardından bu progenitör hücrenin çoğalması ile oluşan klonlarda farklı mutasyonlar gözlenir ve bunun sonucunda farklı özellikler gösteren hücre toplulukları oluşur (19). Klonal gelişimin en önemli kanıtlarını, tümör hücrelerinin kromozomal analizleri verir. En yaygın kanserlere ait hücreler analiz edildiğinde çeşitli kromozomal kusurlar taşıdıkları görülür (21). Kanserın tek bir hücreden köken alıyor olması aynı zamanda, hücrenin taşıdığı anormalliği kendinden sonraki hücrelere aktarabilmesini gerektirir. Bu bakımdan genetik ve epigenetik değişiklikler, kanser oluşumundaki en önemli basamağı oluşturur. Kansere yol açan birçok etkenin aynı zamanda genetik/epigenetik değişikliklere de yol açıyor olması bunun en önemli göstergelerindendir. Örneğin; kimyasal karsinojenler, nükleotid dizilerinde değişikliğe; X ışınları ve iyonlaştırıcı

radasyon, kromozom kırıkları ve traslokasyonlara; virüsler ise hücre içine yabancı genetik materyalin yerleşimine neden olurlar (22). Ancak kanser gelişimi için tek bir mutasyonun da yeterli olmadığı bilinmektedir. Çünkü bir hücrenin yaşamı süresince herhangi bir aktivitede mutasyona uğrama olasılığı yaklaşık  $10^{10}$  dur (23). Bu ise doğal olarak canlının yaşamını devam ettiremeyeceği kadar yüksek bir düzeydir. Sonuç olarak kanserin, ancak ardışık mutasyon basamakları sonucunda oluşan bir patoloji olduğu görülmektedir (24). Kanserleşme sürecini başlatan etkenler çoğunlukla mutajeniktir ve hücre DNA'sı ana hedefdir. Bu noktada oluşan hasarlar DNA tamir enzimlerince onarılmaya çalışılır. Eğer bu hasarlar onarılamaz ise tümör süpresor ve apoptotik genlerin devreye girmesi ile hücre apoptoza yönlendirilmeye çalışılır (19). Kanserleşme sürecinin daha iyi anlaşılması, ancak kanser hücrelerinin moleküler özelliklerinin iyi bir şekilde tanımlanması ile mümkündür (Şekil 1).



Şekil 1. Kanser hücrelerinin moleküler özellikleri.(20, 25).

## **2.1.2. Kanser Hücrelerinin Moleküler Özellikleri**

### **2.1.2.1. Büyüme Sinyallerinde Öz Yeterlilik Kazanma**

Hücreler çoğalabilmek için mitojenik sinyallere ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks bileşenleri veya hücre-hücre etkileşimleri yolu ile iletebilmektedir (26). Bu sinyallerden bir veya birkaçının yokluğunda normal bir hücre çoğalamaz. Bunun en tanımlayıcı örneği hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin ancak belirli büyüme faktörleri ve uygun tutunma koşulları varlığında çoğaltılabilmektedir. Birçok kanser hücresi ise kendi büyüme sinyallerini kendisi üreterek, bu konuda mikro çevreye olan bağımlılığını ortadan kaldırır. Bunu sağlamak adına muhtemel üç mekanizmayı kullandıkları düşünülmektedir; 1) Büyüme sinyallerini alan reseptörlerin aşırı ekspresyonu, 2) İntegrin gibi ekstraselüler matriks reseptörlerini, büyüme sinyali aktaran reseptörlerle değiştirme, 3) Büyüme faktörü reseptörleri ve integrinlerin hücre içi sinyal iletim mekanizmalarında değişiklik (20). Birçok mitojenik büyüme faktörü tek bir hücre tipi tarafından diğer hücrelerin çoğalmasını uyarmak için üretilir. Yani heterotipik bir sinyal mekanizması söz konusudur. Ancak kanser dokusu üzerinde yapılan araştırmalar kanser hücrelerinin kendi mitojenik büyüme faktörlerini oluşturabilme yetenekelerine sahip olduklarını göstermektedir. Bu durum otokrin bir kontrol mekanizmasının gelişerek çoğalma konusunda diğer hücelere olan bağılılığın ortadan kaldırıldığının göstergesidir (27, 28).

### **2.1.2.2. Çoğalma Karşıtı Sinyallere Duyarsızlık**

Dokularda hücre sayısındaki dengeyi korumaya yönelik olarak hücreleri sessiz konumda tutan birçok çoğalma karşıtı sinyal sistemi mevcuttur. Çoğalma karşıtı sinyaller hücreleri  $G_0$  fazına veya post mitotik faza girmeye zorlayarak etkili olabilirler. Bu mekanizmada özellikle retinablastom proteini (pRb) ve ilişkili moleküller rol oynamaktadır (27, 29). Normal hücrelerin büyüme karşıtı sinyallere verdikleri yanıtlar, çoğunlukla hücre döngüsüyle, özellikle de hücrelerin bu döngüde  $G_1$  fazına geçişini yöneten sistemlerle ilişkilidir. Hücreler bu periyotta çevresel değişiklikleri izlerler ve algılanan sinyalin özelliğine göre çoğalmaya, sessiz kalmaya



veya postmitotik faza geçmeye karar verirler. Moleküler düzeyde tüm çoğalma karşıtı sinyaller pRb ile bağlantılıdır (30). pRb hipofosforile olduğu durumda E2F isimli transkripsiyon faktörü üzerine etki ederek G<sub>1</sub> fazından S fazına geçişten sorumlu birçok genin ekspresyonunu etkiler (31). pRb yolağının bozulması sonucunda kontrol mekanizmasından yoksun kalan E2F hücreleri normalde G<sub>1</sub> fazından geçişi bloke eden büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlaştırarak hücre çoğalmasına neden olur (20, 32, 33). Ancak kanser hücrelerinin aşırı çoğalması, büyüme karşıtı sinyallerden kaçınma yeteneğinden daha fazlasını gerektirir. Çünkü dokular aynı zamanda hücre çoğalmasını sınırlandırmak üzere hücreleri geri dönüşü olmayan postmitotik veya farklılaşmış duruma sokarlar. Çeşitli kanser dokuları üzerine yapılan araştırmalar, kanser hücrelerinin bu terminal farklılaşma durumundan kendilerini korumaya çalıştıklarını göstermektedir. Terminal farklılaşmadan kaçınmadaki stratejilerden biri direkt olarak *MYC* onkogeni ile ilişkilidir (34).

### 2.1.2.3. Apoptozdan Kaçış

Kanser hücrelerinin sayısını belirleyen faktör sadece hücrelerin çoğalması sonucu sayıca artışları değildir. Buna ek olarak başta apoptoz olmak üzere değişik nedenlerle meydana gelen hücre ölümleri de önemlidir. Aslında apoptotik program temelde insan vücudunda yer alan tüm hücrelerde bulunmaktadır. Bu program sonucunda hücresel membranlar bozulur, sitoplazmik ve nükleer iskeletler yıkılır, kromozomlar ve çekirdek parçalanır. Sonuçta büzüşen hücre tipik olarak dokudaki diğer hücreler tarafından 24 saat içinde ortadan kaldırılır. Apoptotik mekanizmada, mekanizmanın işleyişinden sorumlu sensörler ve efektörler vardır. Sensörler intraselüler ya da ekstraselüler koşullardaki değişimleri takip ederek hücrenin yaşaması veya ölmesi yönünde sinyal oluşturur. Hücre içinde; DNA hasarını, hipoksiyi, onkogen aktivasyonu sonucu oluşan sinyalleri, yaşamsal faktörlerdeki azalmayı, hücre-matriks ya da hücre-hücre adezyonu bağlantılı yaşamsal sinyalleri algılayan çeşitli sensör mekanizmaları bulunur. Sonuç olarak iç veya dış koşulları takip eden bu reseptörlerin oluşturduğu sinyaller çeşitli efektör mekanizmaları harekete geçirir (20, 35).

#### 2.1.2.4. Sınırsız oğalma Potansiyeli

Bir hücre; büyüme sinyallerinde otonomi, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık ve apoptoza karşı direnç kazandığı zaman sonuç olarak hücrenin büyüme programı, çevresel faktörlerin kontrol mekanizmasının dışına çıkmış olur. Denetimden çıkan çoğalma programı ise ařırđ bölünme ve sayıca artış sonucu kanser gelişimine neden olur. Son alışmalar kanser hücrelerinin, tümör kitlesi oluşturmasında sadece hücre-hücre sinyal ileti kaybının yeterli olamayacağını, aynı zamanda hücrelerin çoğalmasını sınırlayan i programda da bir sorun olması gerektiğini ortaya koymaktadır (20). Hücre kültürü çalışmaları *in vitro* koşullarda hücrelerin sonlu bir çoğalma potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur. Hücreler, belirli sayıda bölünmenin ardından hücrenel yaşlanma ve apoptozla devam eden bir süreç sonucunda ölürler. Ancak, aynı kültür ortamında kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünme kapasitesine sahiptir. Bu limitsiz çoğalma potansiyeli, kanserleşme sürecinde meydana gelen değişimler sonucu kazanılmaktadır. Bu kazanımlardan en önemlisinin telomeraz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ında telomeraz aktivitesi ile telomerlerin korunduğu görülmektedir (36).

#### 2.1.2.5. Anjiyogenez

Hücrelerin canlılığı için yeterli besin ve oksijen desteği oldukça önemlidir. Organogenez sırasında bu durum kan damarları ve parankimin koordineli bir şekilde gelişimi ile sağlanır. Bir doku bir kere oluştuktan sonra yeni damar oluşum süreci yani anjiyogenez geçici olarak ve oldukça sıkı bir denetim altında gerçekleştirilir. Ařırđ çoğalmış bir hücrenel kitlede belirli bir süre sonra anjiyogenik yetenek kaybolur ve hücrelerin çoğalma potansiyeli sınırlanır. Kitle daha geniş boyutlara ulaşmak için mutlaka anjiyogenik yetenek kazanmak zorundadır (20, 37, 38). Pozitif ve negatif sinyaller ya anjiyogenezi uyarır ya da sınırlar. Anjiyogenezi uyarıcı sinyallerden en önemlisi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörüdür (FGF). Her ikisi de endotelial hücreler üzerindeki tirozin kinaz reseptörleri (RTK) aracılığı ile etki ederler (39). Anjiyogenezi inhibe edici bir faktör olan trombospondin-1 ise endotel hücreleri üzerinde yer alan CD36 reseptörlerine bağlanmaktadır (40). Kanser gelişiminde anjiyogenezi başlatma ve devamlılığını

sağlama süreçleri hücrelerin sonradan kazandığı becerilerdir. Kanser modelleri ile yapılan çalışmalar anjiyogenezin özellikle orta evrelerde etkin olduğunu göstermektedir (40). Kanser hücreleri temel olarak anjiyogenez aktivatörleri ve inhibitörleri arasındaki dengeyi bozarak anjiyogenez uyarmaktadır (41).

#### **2.1.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz**

Birçok kanser türünün erken ya da geç evrelerinde primer tümör kitlesinden ayrılan hücreler komşu dokulara ya da farklı yollarla uzak dokulara ulaşarak yeni odaklar oluşturabilir. Böylece sınırlı besin ve yer problemini ortadan kaldırırlar (42). Bu oldukça karmaşık bir süreçtir ve burada etkili olan biyokimyasal ve genetik faktörler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak mekanik açıdan, temelde hücrelerin mikroçevresi ile olan bağlantılarının çeşitli ekstraselüler proteazlar ile yıkımı stratejisi öne çıkmaktadır. Bu süreçte ise hücre-hücre bağlantılarını sağlayan immunglobulin ailesi üyeleri olan hücre adezyon molekülleri (CAM) ve kalsiyum bağımlı kaderin ailesi hedef alınır. Ayrıca yine hücre-ekstraselüler matriks bağlantısını sağlayan integrinler de önemli hedefler arasındadır. Birçok kanser türünde hücreler arası bağlantılarda özellikle E-kaderinlerde değişiklik görülmektedir (43). E-kaderinler, Wnt- $\beta$  katenin yolağı üzerinden büyüme karşıtı bir etki gösterir. Bazı kanser türlerinde çeşitli mutasyonlar sonucunda E-kaderinlerin inaktivasyonu görülmektedir (44). Bu durum kanser hücrelerinin daha invazif olmalarının ve metastaz kabiliyetlerinin önünü açar. Ayrıca yine CAM'ların ekspresyonunda meydana gelecek değişimler de bu süreçte önemlidir. Diğer taraftan invazyon ve metastaz gösteren kanser hücrelerinde proteaz genlerinin ekspresyonel artışı, proteaz inhibitör genlerinin ekspresyonel azalışı görülmektedir (20, 45, 46).

#### **2.1.2.7. Genomik Kararsızlık ve Mutasyon**

Genomun korunmasını sağlayan sistemler her bir hücrede düşük oranda kendiliğinden oluşan mutasyonları tespit etme ve onarma yeteneğine sahiptir. Tümör gelişimini destekleyen genlerin oluşma ihtimali kanser hücrelerinde artmıştır ve bu durum hücrelerde mutasyonların artışının bir sonucudur (47). Bu mutasyonlara yatkınlık durumu ise genomun korunmasını sağlayan mekanizmalardaki bir ya da daha

fazla komponentin saf dışı edilmesi, böylelikle mutajenik ajanlara karşı duyarlılığın artması ile gelişir (48). Ek olarak bu mutasyonların birikimi normal olarak genomik bütünlüğü izleyen ve genetik olarak hasarlı hücreleri yaşlanmaya veya apoptoza zorlayan sistemlerden ödün verilmesi ile de gerçekleşebilir. Burada p53 merkezi bir role sahiptir ve “genomun koruyucusu” olarak isimlendirilir. DNA’nın bütünlüğünü sağlayan ve “genomun bekçisi” olarak isimlendirilen mekanizmaları hedef alan çok çeşitli bozukluklar tespit edilmiştir (49). Bu bozukluklar başlıca; DNA hasarını tespit eden ve tamir mekanizmasını aktive eden, direkt olarak DNA hasarını tamir eden veya mutajenik molekülleri DNA’ya hasar vermeden önce engelleyen sistemlerde görülebilir. Genetik açıdan “genom bekçisi” genler çoğunlukla tümör baskılayıcı genler gibi davranırlar ve tümör gelişimi esnasında fonksiyon kaybına uğradıkları görülür (25, 50). İnsan kanserlerinin büyük çoğunluğunda farklı genom değişiklikleri görülmekle beraber; temel olarak genomun korunmasını ve tamirini sağlayan mekanizmalarda bozukluklar tespit edilmektedir. Bu durum ise ancak bir genomik kararsızlık varlığında söz konusu olabilir (51).

#### **2.1.2.8. Tümörü Teşvik Eden İnflamasyon**

Kanser dokusunun patolojik incelemeleri, tümörlerin büyük oranda hem doğal hem edinsel bağışıklık hücreleri ile istila edildiğini göstermektedir. Başlangıçta bu durum, neoplastik olmayan dokulardaki inflamasyonun bir yansıması olarak değerlendirilmiştir. Ancak günümüzde artık kanser dokusunun; değişen oranlarda farklı immün sistem hücreleriyle istila edildiği bilinmektedir (25, 52). Bu durum ilk olarak tümör dokusunu ortadan kaldırmak isteyen bağışıklık sisteminin bir yanıtı olarak yorumlanmıştır. Bu açıdan günümüze kadar birçok tümör tipinde, tümörü immünolojik olarak yok etmeye yönelik antitümöral cevaplar geliştiğini destekleyen bulgular da ortaya konulmuştur. Ancak son dönemde; tümörle ilişkili inflamatuvar cevabın, tümör gelişimini ve ilerleyişini uyarıcı paradoksal etkilere sahip olabileceğini gösteren veriler elde edilmiştir (53). Bu verilere göre, kanser dokusunda inflamasyon tümör mikroçevresine; çoğalma sinyalleri oluşturan büyüme faktörlerini, hücre ölümünü sınırlandıran yaşamsal faktörleri, proanjyogenik faktörleri, anjiyogenezi, invazyonu ve metastazı tesis eden çeşitli ekstraselüler matriks modifiye edici enzimleri ve epitel mezenkim geçişi aktivasyonuna neden olan uyarıcı sinyalleri sağlamaktadır.

Ayrıca inflamatuvar hücreler komşu hücreler için oldukça mutajenik olan çeşitli kimyasalları ve reaktif oksijen türlerini salarak genetik düzensizliklere neden olmaktadır (54).

#### **2.1.2.9. Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi**

Aerobik koşullar altında sağlıklı hücreler enerji üretimi için mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullanırlar. Ancak çoğu kanser hücresinde glikoliz artmış ve oksidatif fosforilasyon kapasitesi azalmıştır (55). Bu durum ilk defa Warburg tarafından tanımlanmıştır (56). Warburg etkisi adı verilen durum; kanser hücrelerinin normal düzeylerde oksijen varlığında bile, glikolizi inhibe etmek yerine artırdıkları ve aşırı oranda laktat üretimi ile seyreden bir enerji metabolizmasını tercih ettikleri durum olarak tanımlanmıştır. Bu olay, kanser hücrelerindeki mitokondriyal oksidatif fosforilasyon mekanizmalarının bozulmuş olmasıyla ilişkilendirilmiş ve uzun yıllar da bu şekilde kabul görmüştür. Ancak araştırmalar kanser hücrelerinde mitokondriyal oksidatif fosforilasyon sistemlerinin sağlam olduğunu ortaya koymaktadır (25, 57). Kanser hücreleri oksijen varlığında, glukoz metabolizmalarını ve sonuç olarak enerji üretimlerini büyük ölçüde glikoliz ile sınırlandırmak için yeniden programlayabilirler (58). Kanser hücrelerinde, ATP üretiminde daha az verimli glikolitik yol için bir şalter bulunmasının fonksiyonel gerekçesini anlamak zor olabilir. Ancak glikolitik yolda üretilen bir çok yan ürünün hücrelerce nükleotit ve amino asit üretiminde kullanıldığını ve böylelikle yeni oluşan hücreler için gerekli makro moleküllerin sağlandığı ve organellerin sentezinin desteklendiği akla getirilmelidir (55).

#### **2.1.2.10. İmmuniteden Kaçış**

Yeni başlayan bir kanserde, ileri evre tümörde ve mikro metastazlarda; tümör oluşumuna karşı immün sistemin nasıl bir rol oynadığı henüz kesin olarak anlaşılamamıştır. Uzun zamandır kabul gören bir teoriye göre, hücreler ve dokular daima aktif durumda olan bir immün sistem tarafından izlenmektedir ve bu gözetim yeni oluşan kanser hücrelerinin ve henüz oluşmaya başlayan tümörlerin büyük çoğunluğunu tanıma ve saf dışı etme yetisine sahiptir. Bu bilgilerin ışığında artık ortaya çıkmış solid tümörler, bu tümörü oluşturan kanser hücrelerinin immünolojik

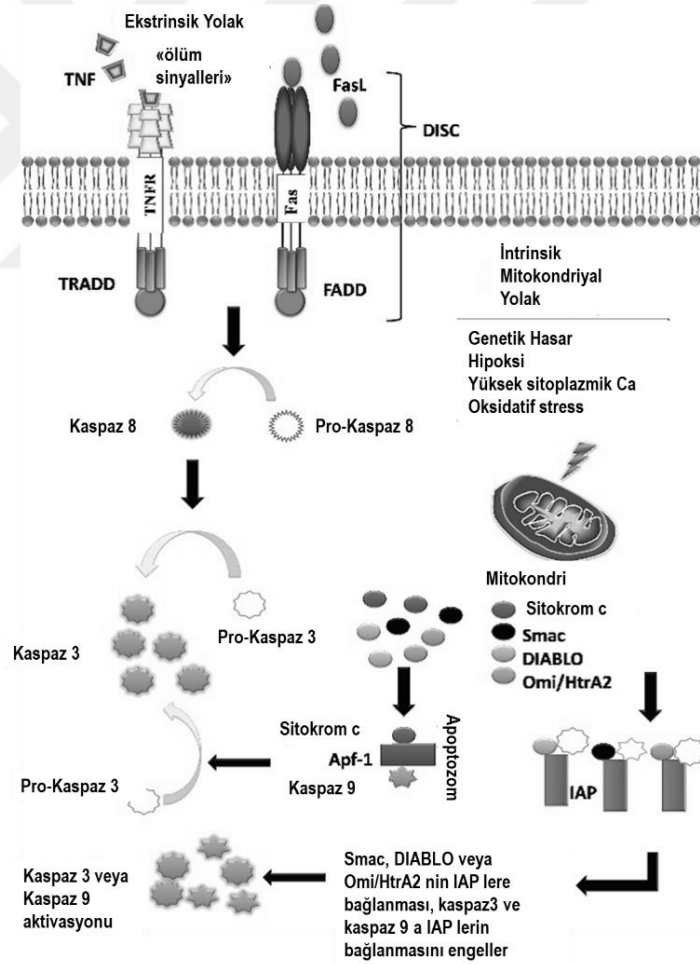
olarak ortadan kaldırma mekanizmalarından bir şekilde kaçtığını kanıtlamaktadır (25, 59). İmmün sistemi baskılanmış hastalarda sıklıkla tümör gelişimi, immünolojik gözetimin kansere karşı koruyuculuğu açısından önemini ortaya koymaktadır (60). Ayrıca, genetik mühendisliği ile üretilen bağışıklık sistemi kusurlu farelerde, bağışıklık sistemi normal olan kontrol grupları ile kıyaslandığında, tümörlerin daha sıklıkla ortaya çıktığı ve daha hızlı geliştiği görülmektedir. Özellikle CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfositlerin (CTL), CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1 yardımcı T hücrelerin ya da Doğal Öldürücü Hücrelerin (NK) gelişim veya fonksiyonları açısından kusurlu olmanın kanser gelişimine yatkınlığı daha fazla oranda artırdığı görülmektedir (61). Bu deneysel modeller sonuç olarak immünolojik gözetim ve tümörün ortadan kaldırılabilmesi için hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık sistemine ait hücrelerin katılımının gerektiğini ortaya koymaktadır (62). Kanser hücreleri ise bu immün yok ediliştin kurtulmak adına çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bunların bir kısmı tümörün, efektör bağışıklık hücrelerince tanınmasını ve ortadan kaldırılmasını engelleyecek değişiklikleri içerir. Diğer taraftan kanser hücreleri antijen işleme ve sunumu yollarında kusurlar oluşturarak da immün sistemden kaçabilirler (63).

## **2.2. Apoptozun Moleküler Biyolojisi ve Kanser**

### **2.2.1. Apoptoz**

Apoptoz kelimesi Yunanca ayrılma anlamındaki “apo” ve düşme anlamındaki “ptosis” sözcüklerinin birleşiminden oluşmaktadır ve yaprak dökümü anlamına gelmektedir (64). Apoptoz terimi tıp alanında ilk defa M.Ö. 4. yy’da Hipokrat tarafından kangrenle sonuçlanan, tedavi olmayan kırıklar için kullanılmıştır. Hücre ölümü kavramı ise ilk defa Karl Vogt tarafından tanımlanmıştır. Ancak bu konu üzerinde 18. ve 19. yy’lar boyunca farklı bilim adamları tarafından araştırmalar yürütülmüş ve değişik tanımlamalar yapılmıştır. Örneğin, Virchow hücre ölümünün iki farklı tipini tanımlamış ve bunları nekroz ve nekrobiyoz olarak adlandırmıştır. Aslında nekrobiyoz adı altında Virchow, apoptozu morfolojik olarak tanımlamaktadır. Bu dönemdeki araştırmalar arasında öne çıkanlardan biri de Flemming’in çalışmalarıdır. Flemming ilk defa hücre ölümünün sadece mekanik kuvvetler

nedeniyle olamayacağını, hücre içindeki kimyasal değişikliklerin de bu süreçte etkili olduğu fikrini ortaya koymuş, ayrıca “kromatolizis” kavramı ile ölen hücrelerdeki kromatin parçalanmasını tanımlamıştır. Bu günümüzde apoptozun karakteristik özelliği olarak bilinen DNA parçalanmasının ilk kez tanımlanmasıdır (65). Apoptoz ilk defa 1972 yılında Kerr tarafından yayınlanan çalışmada programlı hücre ölümü olarak adlandırılırken; birçok özelliği ile diğer hücre ölüm türlerinden farklı olduğu vurgulanmıştır (66). Apoptoz, hücrenin özel bir uyarıyı almasıyla başlayan ve ölümü ile sonuçlanan oldukça sıkı düzenlenen bir süreçtir. Apoptoz üzerine yapılan çalışmalar, bu süreçte yer alan mekanizmaların karmaşık bir düzenlenime sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu mekanizmalar apoptozu düzenleyen bir dizi kompleks molekül ağını ve bunların ilişkili oldukları bir dizi sinyal yolağını içermektedir (Şekil 2).



Şekil 2. Apoptotik yollar ve moleküller (67).

Apoptoz sonucunda hücrelerde kromatin yoğunlaşması, çekirdek fragmentasyonu ve hücre hacminde azalma gibi morfolojik; kaspaz aktivasyonu, DNA yıkımı, protein ve yüzey modifikasyonları gibi biyokimyasal değişiklikler gözlenir (68). Apoptoz temelde bir hücre ölümü olmasının ötesinde aynı zamanda çeşitli biyolojik süreçlerin ve biyolojik dengenin devamlılığını sağlamada, farklılaşmada, gelişmede, hücre çoğalmasının kontrolünde ve zararlı veya infekte olan hücrelerin yok edilmesinde de büyük öneme sahiptir (66). Programlı hücre ölümü olarak apoptoz organizmanın gelişiminde ve doku hemoastazisinin sağlanmasında üstlendiği roller nedeni ile evrimsel süreçte korunmuş oldukça önemli bir hücresel olaydır. Embriyo gelişim sürecinde yeni hücrelerin ortaya çıkması ve mevcut hücrelerin farklılaşması sırasında rol oynayan en önemli mekanizma apoptozdur. Özellikle morula ve blastokist evrelerinde hücre sayısının sınırlandırılmasında oldukça önemlidir (69). Ancak, kanser gibi patolojik durumlarda hücreler apoptoza gitme yeteneklerini kaybederler ve bu durum hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olur. Ayrıca, kanser hücrelerinin çoğunda apoptotik yolağın aktivasyonunu engelleyen proteinlerin aşırı ekspresyonu da görülmektedir. Bazı durumlarda ise kanser hücreleri çeşitli mekanizmalar geliştirerek, onları programlı hücre ölümünden kurtaracak olan anti-apoptotik molekülleri sentezlemektedir (70).

## **2.2.2. Apoptozun Molekülleri**

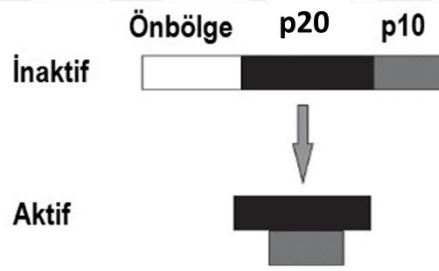
### **2.2.2.1. Kaspazlar**

1990'lı yılların başlarında; nematodlarda Ced-3 ve Ced-4 adı verilen genlerin veya bu genlere ait ürünlerin, pozitif olarak hücre ölüm programının belirlenmesinde rol aldıkları anlaşılmıştır. Sonrasında ise nematodlarda bulunan Ced-3'ün insanda bir aspartat spesifik proteaz olan interlökin 1- $\beta$  dönüştürücü enzimi (ICE) sentezleyen genle homolog olduğu tespit edilmiştir. ICE'nin ektopik ekspresyonlarının kemirgen hücrelerinde apoptoza yol açması ise kaspazların apoptozla olan ilişkilerini ortaya koymuştur (71). Kaspazlar apoptozdaki rolleri ile tanınmasına karşılık, piroptozis ve inflamasyon gibi süreçlerde de rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra eritroid farklılaşma, lens gelişimi, spermatogenez, kök hücre farklılaşması ve nöronal gelişim gibi



süreçlerde de etkindirler (72). Ayrıca bazı çalışmalar kaspazların otofajide rol oynayan çeşitli proteinleri yıkarak, bu sürece de etki ettiklerini göstermektedir (73).

Kaspazlar peptid bağlarının Asp (aspartik asit) rezidülerini, karboksil ucundan kesen proteazlardır (72). Günümüze kadar insanda 11 farklı kaspaz tipi tanımlanmıştır. Kaspazlar inaktif proenzimler olarak salınır ve tam bir katalitik aktivite için taşımış oldukları Asp rezidülerinin proteolitik yıkımı gerekir. Yapısal olarak kaspazlar bir ön alan, bir büyük alt birim (~20 kDa) ve bir küçük alt birimden (~10 kDa) oluşur. Aktivasyonla birlikte ön alan ve büyük alt birim arasındaki Asp bağlarının yıkımı ile büyük ve küçük altbirim proenzimden ayrılır. Ardından ikinci bir yıkım büyük ve küçük alt birimler arasındaki Asp bağlarını hedef alarak bu ikisini ayırır (Şekil 3). Aktif kaspazlar genellikle iki büyük ve iki küçük alt birimden oluşan bir tetramerik yapıya sahiptirler ve bu nedenle iki adet aktif bölge içerirler (74).



Şekil 3. Kaspaz alt birimleri ve aktivasyonu (74).

Kaspazları öncelikle iki ana gruba ayırmak mümkündür; apoptozda rol oynayan kaspazlar (kaspaz 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12) ve çoğunlukla sitokinlerin işlenmesinde görevli kaspaz 1 (ICE) ile ilişkili kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5, 11). Ardından apoptozda rol oynayan kaspazlar ise ön alanlarının büyüklüğüne göre; başlatıcı ve efektör kaspazlar olmak üzere iki ana gruba daha ayrılır. Burada uzun bir ön alana sahip kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10) daha çok başlatıcı kaspazlar olarak davranırlar. Çünkü bu kaspazların uzun ön alanları, kaspazları aktive eden moleküllerce (FADD, APAF-1) tanınmasını ve bağlanmasını sağlayan, kaspaz bağlanma bölgesi (CARD) veya CARD benzeri motifler taşımaktadır. Kısa ön alana sahip kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) ise efektör kaspazlar olarak adlandırılır. Bunlar kısa ön alanlarında CARD motiflerinden yoksundur ve bu nedenle daha çok apoptozun ilerleyen evrelerinde aktive olabilirler (75).

Genel olarak hücreleri apoptoza götüren sebepler bilinmekle birlikte, bu farklı koşullarda kaspazların nasıl aktive edildiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak sonuç olarak birçok uyarı başlıca üç ana yol ile kaspazları aktive eder; mitokondriyal kaspaz aktivasyonu, ölüm reseptörü aracılı kaspaz aktivasyonu ve granzim-B tarafından indüklenen kaspaz aktivasyonu (71, 75). Her ne şekilde olursa olsun sonuçta aktive olan kaspazlar hücredeki çeşitli proteinleri hedef alarak apoptozun beklenen değişikliklerine aracılık ederler. Kaspazlar tipik olarak hedef proteinlerdeki çeşitli tetra peptid motifleri tanırlar. Ancak bu motifleri içermeyen hedef substratlar da bilinmektedir. Gelsolin, fodrin, nükleer laminin A ve B, Gas2 (growth arrest specific protein 2), keratin 18 ve  $\beta$ -katenin gibi çeşitli hücre iskelet proteinleri kaspazların substratları arasındadır. Bu proteinlerin yıkımı hücre gövdesinin yeniden organizasyonuna yol açar ve apoptotik cisim gibi hücrel parçaların oluşumuna neden olur. DFF45 (DNA Fragmention Factor, 45kDa) ya da ICAD (Inhibitör of Caspase-Activated DNase) diğer önemli kaspaz substratları arasındadır. Özellikle ICAD'ın parçalanması ile CAD (Caspase Activated DNase) aktivasyonu ve apoptozun tipik DNA yıkım paterni gerçekleşir (76).

#### **2.2.2.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri**

BCL-2 ailesi üyeleri özellikle apoptozun mitokondriyal yolağında rol oynayan önemli moleküllerdir. BCL-2, apoptoz yolağı ile ilgili olarak tanımlanan ilk moleküldür. BCL-2 öncelikle insan foliküler lenfoma hücrelerinde t(14;18) translokasyonu ile tanımlanmış, ardından bir proto-onkogen olarak rolü anlaşılmıştır. Ardından bu protein ile dizi homolojisi paylaşan diğer üyeler tanımlanmıştır. BCL-2 ailesi üyeleri başlıca BH1, BH2, BH3 ve BH4 olarak adlandırılan dört alanda dizi homolojisi gösterirler. Ancak tüm üyeler bu alanların tamamını taşımaz. Bu alanlar, çeşitli moleküler fonksiyonlar ve aile üyeleri arasındaki protein etkileşimleri için gereklidir. BH1 ve BH2 alanlarının anti-apoptotik moleküllerin apoptozu baskılayıcı fonksiyonları için gerekli olduğu, BH3 alanının ise pro-apoptotik moleküllerin bu fonksiyonları için gerekli olduğu bilinmektedir. BH4 alanının ise temel olarak anti-apoptotik moleküllerde bulunması, apoptozun baskılanmasında fonksiyonel olabileceğini göstermektedir (77). Pro-apoptotik moleküller, sadece BH3 alanı taşıyan veya çoklu alana sahip moleküller olarak sınıflandırılabilir. Sadece BH3 alanına sahip

BID, BIM, BAD gibi moleküller periferik ölüm sinyallerini alan ve BAX ve BAK gibi çoklu alana sahip efektör molekülleri aktive edebilen bir özellik sergiler (78).

BCL-2 ailesi proteinleri, birbirleri ile ve bazı diğer proteinler ile etkileşebilir. Bu etkileşimler temel olarak üç şekilde olabilir. Bunlardan ilki ve en sık görüleni, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki etkileşimdir. Bu etkileşim, antagonistik bir etkiyle sonuçlanır ve hücre ölüm programının dinamik kontrolünü sağlayabilir. Ancak burada tüm pro-apoptotik moleküllerin diğer tüm anti-apoptotik moleküllerle etkileşime girmeleri söz konusu değildir. Bu konuda henüz tam olarak aydınlatılmamış bir seçicilik söz konusudur (79). İkinci tip etkileşim ise iki pro-apoptotik eleman arasında gerçekleşir. Bunlardan biri çoğunlukla sadece BH3 alanı taşıyan tipteyken, diğeri çoklu alan sahibi bir tiptedir. Böyle bir etkileşim çoklu alana sahip efektör moleküllerin aktivasyonu için önemlidir. Üçüncü tip etkileşimde ise aynı molekülün multimerizasyonu görülür. Bu hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik moleküllerde görülebilir. Burada özellikle ölüm öncülü moleküllerden BAX ve BAK'ın kendi içlerinde multimerizasyonu mitokondriden sitokrom c gibi apoptotik moleküllerin salınımına yol açan mitokondriyal kanalların oluşumunda oldukça önemlidir (80).

BCL-2 ailesi üyelerinin, hücre ölümü ve yaşamı arasındaki dengeyi sağlamadaki potansiyel etkileri nedeniyle bu moleküllerin ekspresyon ve aktiviteleri sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Bazı moleküller hücrelerde hazır halde bulunurken, bazıları ise sadece ölüm sinyali alındıktan sonra sentezlenir. Bu durum özellikle pro-apoptotik moleküller için geçerlidir. Anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonları ise hücre türüne ve zamana bağlı olarak çeşitli yaşamsal sinyaller veya inflamatuvar sinyaller aracılığı ile indüklenebilir (81). BCL-2 ailesi proteinlerinin aktivitesinin düzenlenmesindeki en önemli mekanizmalardan biri, post-translasyonel modifikasyonlardır. Bu modifikasyonlar çoğunlukla bir ölüm ya da sağ kalım sinyaline cevap olarak gelişir ve temel olarak moleküllerin proteolitik yıkımı veya fosforilasyonu şeklinde gözlenir. Posttranslasyonel modifikasyonun BAX, BID, BIM ve BAD gibi pro-apoptotik moleküllerde neden olduğu önemli sonuçlarından biri, modifiye olan moleküllerin mitokondriye translokasyonlarıdır. Böylece, BCL-2 ailesi proteinler dışı ölüm sinyallerini mitokondriye ileten sensör görevi kazanır (78, 82).

Mitokondriyal yolağın aktivasyonu; mitokondriyal disfonksiyon ve bir dizi mitokondriyal apoptotik molekülün salınımı ile karakterizedir. Her iki süreç de ölüm antagonistleri (BCL-2, BCL-XL, vd.) tarafından inhibe edilirken ölüm agonistleri (BAX, BAD, BID, BAK, vd.) tarafından desteklenir (Tablo 1). Mitokondriyal apoptotik proteinlerin salınımı dış membran geçirgenliğindeki artışla ve bu durum da mitokondriyal geçirgenlik porunun açılmasıyla mümkündür. Bu ise BAX veya BAK gibi por oluşturabilen BCL-2 ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilir (83).

**Tablo 1.** BCL-2 aile üyesi proteinler.

Fonksiyon	Üyeler	BH Alanları
Anti-apoptotik	BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, Boo/Diva, BCL-B/Bcl-2L-10/Nrh	Çoklu alan
Pro-apoptotik	BAX, BAK, BOK, Bcl-xs,	Çoklu alan
Pro-apoptotik	BAD, BID, BIK, BLK, BIM/BOD, BMF, Nip3/BNIP3, Noxa/APR, PUMA, MAP-1, Bcl-Gs	Sadece BH3

### 2.2.2.3. Apoptozun İnhibitör Proteinleri (IAP'ler)

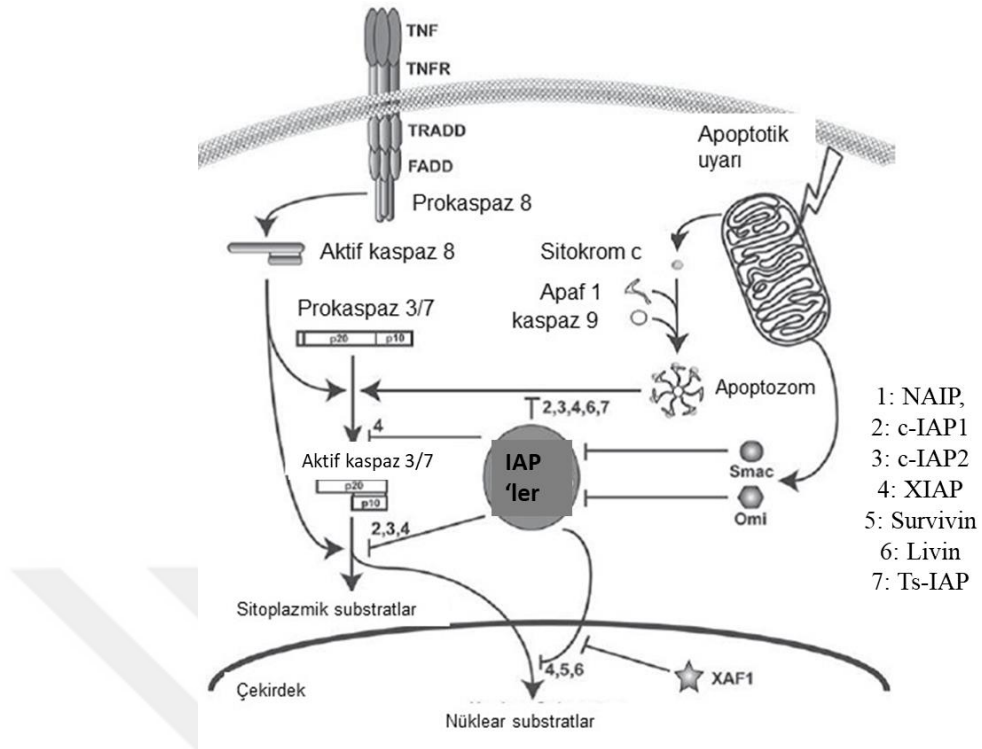
Apoptozdan, hücre proliferasyonu ve terminal farklılaşmaya kadar birçok hücrel olayda kaspaz yolağının aktivasyonu ve kontrolü büyük önem taşımaktadır. IAP'ler kaspaz yolağının temel düzenleyicileri olarak görev yapan bir grup proteindir (84). IAP'ler, BIR (Baculoviral IAP Repeat) olarak isimlendirilen bölgelerle karakterizedir. Bu proteinler bir ya da daha fazla BIR bölgesi içeren ve anti-apoptotik aktivite gösterenler ile sadece bir tane BIR bölgesi içeren ve sitokinez ile kromozom ayrışmasından sorumlu moleküller olmak üzere iki ana grupta incelenebilir (Tablo 2) (85).

**Tablo 2.** Apoptoz inhibitör proteinler.

<b>IAP</b>	<b>Diğer İsimleri</b>	<b>BIR Alanları</b>	<b>Kaspaz Özgünlüğü</b>
NAIP	BIRC1	BIR(3)	Kaspaz 3, 7
XIAP	BIRC4, API3, MIHA, ILP-1	BIR(3)	Kaspaz 3, 7, 9
c-IAP1	BIRC2, API1, MIHB, HIAP2	BIR(3)	Kaspaz 3, 7, 9
c-IAP2	BIRC3, API2, MIHC, HIAP2	BIR(3)	Kaspaz 3, 7, 9
Survivin	BIRC5, API4, TIAP	BIR	Kaspaz 3, 7
Livin	BIRC7, KIAPML-IAP	BIR	Kaspaz 3, 7, 9
Ts-IAP	BIRC8, ILP-2	BIR	Kaspaz 9

Mekanizmalardan bağımsız olarak IAP'ler apoptozun hem ekstrinsik hem de intrinsik yolağını inhibe etmektedir. IAP'lerin en önemli fonksiyonel birimi olan BIR bölgeleri kaspazların inhibisyonundan sorumlu alanlardır. Tüm BIR'ler yapısal olarak benzerlik göstermelerine karşılık, kaspazları inhibe etme mekanizmaları değişiklik göstermektedir (86).

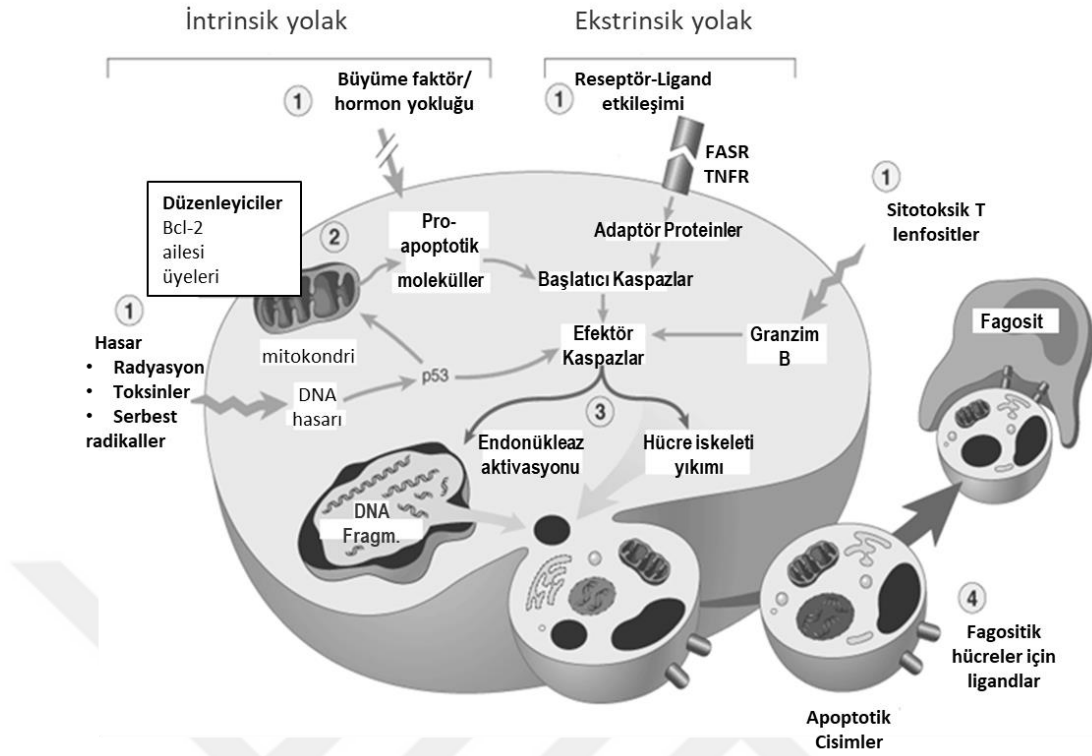
Bazı proteinler ise IAP'lere bağlanarak onların aktivitelerini doğrudan baskılayabilmektedir. Bunlar XAF1 (XIAP-Associated Factor1), SMAC (Second Mitochondrial Activator of Caspases -Diablo-) ve OMI (HTR2A) dir. XAF1 direkt olarak XIAP'ye bağlanarak XIAP aracılı kaspaz 3 aktivasyonunu engelleyebilir (Şekil 4). XIAP baskın olarak sitoplazmik bir protein olmasına karşılık, XAF1 proteini çekirdekte birikim gösterir. Ancak XAF1, XIAP'nin sitoplazmadan nükleusa geçerek yeniden yerleşimini tetikleyebilir. Çalışmalar, XAF1'in normal hücrelerde %1 kadar düşük bir oranda eksprese edilmesine karşılık; bu ekspresyon kaybının apoptoz baskısını ortadan kaldırarak malign dönüşüme neden olabileceğini göstermektedir (87). XAF1'in aksine SMAC proteini sağlıklı hücrelerde mitokondride yerleşim gösterir ve sitokrom c'ye benzer bir kinetikle apoptotik stres sonucu buradan salınır. Diğer bir mitokondriyal IAP bağlayıcı protein ise OMI'dir. SMAC gibi OMI de apoptotik hücrelerde mitokondriden salınım gösterir (88).



Şekil 4. IAP'lerin apoptotik yollardaki fonksiyonu (89).

### 2.2.3. Apoptozun Yolakları

Memelilerde iki temel apoptotik yolak vardır; ekstrinsik yolak (ölüm reseptörü aracılı) ve intrinsik yolak (mitokondri aracılı). Bunların yanı sıra endoplazmik retikulum stresi sonucu kaspaz 12 ve kaspaz 2 gibi moleküllerin aktivasyonu ile gerçekleşen veya T hücre aracılı ve perforin-granzimler rol aldıkları, daha az bilinen bazı apoptotik yollar da mevcuttur (90) (Şekil 5).



Şekil 5. Apoptoz yolları (90).

### 2.2.3.1. Ölüm Reseptörleri ve Ekstrinsik Yolak

Ölüm reseptörleri Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor (TNF/NGF) reseptör ailesinde (TNFRSF) yer alan, hücre yüzey reseptörleridir. TNFRSF ailesi 27 reseptörden oluşur (Tablo 3). Bu reseptörlerle ilişkili, 20 farklı TNF ailesi üyesi (TNFSF) ligand tanımlanmıştır (Tablo 4). Bu reseptör ve ligandlar hücre çoğalması, sağ kalımı veya apoptoz gibi olayların düzenlenmesinde rol üstlenirler.

**Tablo 3.** TNFRSF üyeleri.

Tanımlanmış bazı TNFRSF üyeleri (reseptörler)	Diğer isimlendirmeleri
TNFR1	CD120a / TNFRSF1A
TNFR2	CD120b / TNFRSF1B
LT $\beta$ R	TNFRSF3
OX40	CD13 / TNFRSF4
CD27	TNFRSF7
CD40	TNFRSF5
FAS	CD95 / TNFRSF6
DCR3	TNFRSF6B
CD30	TNFRSF8
4-IBB	CD137 / TNFRSF9
TRAIL R1	DR4 / CD26 / TNFRSF10A
TRAIL R2	DR5 / CD262 / TNFRSF10B
TRAIL R3	DCR1 / CD263 / TNFRSF10C
TRAIL R4	DCR2 / CD264 / TNFRSF10D
RANK	CD265 / TNFRSF11A
FN14	TWEAKR / CD266 / TNFRSF12A
TACI	CD267 / TNFRSF13B
BCMA	CD269 / TNFRSF17
BAFER	BR3 / CD268 / TNFRSF13C
HVEM	CD270 / TNFRSF14
GITR	CD357 / TNFRSF18
NGFR	CD271 / p75NTR / TNFRSF16

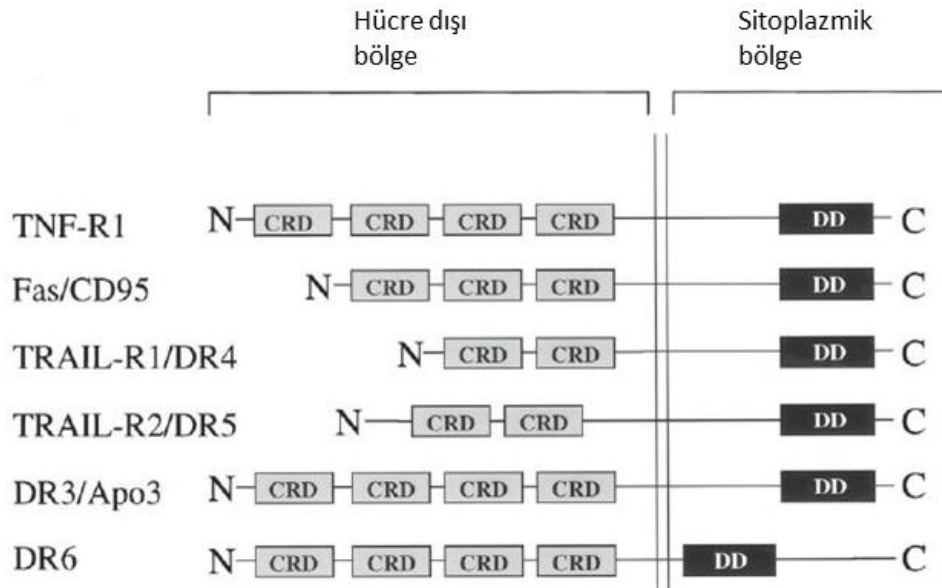
**Tablo 4.** TNFSF üyeleri.

Tanımlanmış bazı TNFSF üyeleri (ligandlar)	Diğer isimlendirmeleri
TNF	TNFSF2
LT $\beta$	TNFSF3
OX40L	CD252 / TNFSF4
CD27L	CD70 / TNFSF7
CD40L	CD154 / TNFSF5
FASL	CD178 / TNFSF6
CD30L	CD153 / TNFSF8
4-IBBL	TNFSF9
TRAIL	APO2L/ CD253 / TNFSF10
RANKL	CD254 / TNFSF11
TWEAK	TNFSF12
APRIL	CD256 / TNFSF13
BAFF	BLYS / CD257 / TNFSF13B
LIGHT	CD258 / TNFSF14
GITRL	TNFSF18
NGF	-
LT $\alpha$	TNFSF1



Çözünür veya membrana bağlı TNFSF molekülleri, TNFRSF monomerlerini organize ederler. Bu durumda TNFR ilişkili faktörler (TRAF-TNFR Associated Factors-) reseptöre tutunarak serin-treonin kinaz aktivasyonu ile sağ kalım ya da inflamatuvar sinyalleri oluştururlar. Diğer taraftan, eğer TNFSF molekülleri ölüm bölgesi (DD-death domain-) içeren TNFRSF monomerlerini organize ederlerse; DED (Dead Efeator Domain) içeren adaptör proteinler (TRADD ve FADD gibi) reseptöre bağlanarak aktive olur ve kaspazları aktive ederler. Böylelikle hücrede apoptotik sinyal oluşur (91). Bazı TNFRSF üyeleri ise, hücre ve sinyal tipine bağlı olarak hem inflamatuvar yolları hem de hücre ölüm yollarını uyarabilir (92).

TNFRSF ailesinde özellikle 6 reseptör apoptozla ilişkili bulunmuştur. DED içeren adaptör proteinler ile etkileşime geçebilme özelliğine sahip bu reseptörler ayrıca ölüm reseptörleri olarak da adlandırılmaktadır. Bunlar; Fas (CD95/APO-1), TNF-R1 (p55/CD120a), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5/APO-2/KILLER), DR3 (APO-3/TRAMP/WSL-1/LARD) ve DR6'dır (93). Bunlar yapısal olarak hücre içi bir C-terminal kuyruğu, membran boyunca uzanan bir bölge ve bir ligand bağlayan hücre dışı N-terminal bölgesi içeren birer tip 1 transmembran proteinleridir. Bu proteinler, sisteinden zengin alan (CRD) olarak isimlendirilen ekstraselüler yapılar ve sitoplazmik bölgedeki ölüm sinyalini başlatan ölüm bölgesi (DD) adı verilen yapılar içerirler (Şekil 6).

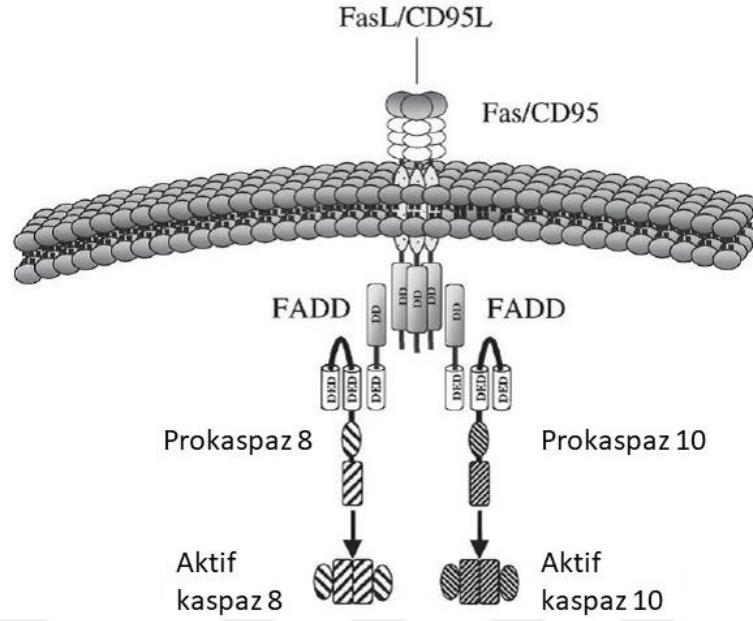


Şekil 6. Ölüm reseptörlerinin yapısal karşılaştırması (89).

Bu reseptörler, ilişkili TNFSF üyesi ligandlar tarafından aktive edilirler. Bu ligandlar çoğunlukla yapısal olarak tip 2 transmembran proteinleridir. Ancak bunlar çeşitli metalleproteazlarla kesilerek çözünür formda sitokinler olarak da bulunabilir (94). Ölüm reseptörlerince sinyal iletimi, ligandın reseptörün ekstraselüler bölgesine bağlanması sonucunda intraselüler bölgelerin yeniden düzenlenimi ile tetiklenen reseptör oligomerizasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Bu yeni düzenlenim farklı bazı adaptör proteinlerin intraselüler bölge ile etkileşime girmesine neden olarak ölüm reseptörleri ve ölüm efektörleri arasındaki bağlantıyı sağlar (95). Adaptör proteinler çoğunlukla enzimatik aktiviteye sahip olmayan ancak reseptörün DD bölgesi ile etkileşime girebilen bir DD bölgesine sahip yapıdadırlar. Ayrıca bu adaptör proteinler başlatıcı kaspazlardaki bir DED veya CARD bölgesi ile etkileşime girebilen bir DED bölgesine de sahiptir. Bu etkileşimler sonucu oluşan komplekse DISC (Death Inducing Signalling Complex) adı verilir. Reseptöre bağlanan çeşitli kaspaz moleküllerinin birbirlerine yakınlığı, bu kaspazların aktivasyonuna neden olur. Aktive olan başlatıcı kaspazlar efektör kaspazların aktivasyonu ile devam eden bir yolağı başlatır. Apoptoz tetiklendikten sonra DISC ortadan kaldırılır (96).

### **2.2.3.2. Fas Aracılı Ekstrinsik Yolak**

Fas bir hücre yüzey proteinidir ve bunun yanı sıra; dolaşımdaki Fas Ligandlarını (FasL) bağlayan ve böylece apoptoza karşı geliştirilen bir savunma mekanizmasının parçası olabileceği düşünülen çözünebilir formda da bir Fas reseptörü bulunmaktadır. FasL ise bir tip 2 transmembran proteinidir. FasL ayrıca bir metalloproteinaz tarafından ekstraselüler bölgesinden proteolitik olarak kesilerek çözünür formda salınabilir (97, 98). Fas'ın FasL ile bağlanması sonucu; bir adaptör protein olan FADD/MORT-1 (Fas Associated Protein with Dead Domain/Mediator of Receptor Induced Toxicity) reseptöre tutunarak mikroagregatlar oluşturur. FADD; DD içeren C-terminal bölgesi ve DED içeren bir N-terminal bölgesi taşıyan sitoplazmik bir proteindir. FADD, DD bölgesi ile reseptörün DD bölgesine bağlanırken, DED bölgesi prokaspaz 8 ile bağlanır. Prokaspaz 8'in DISC'e tutunup birikim göstermesi, otoproteolitik yıkım ile kaspaz 8 aktivasyonuna neden olur. Prokaspaz 10 da Fas DISC'e tutunarak benzer bir kinetikle aktive olabilmektedir (Şekil 7) (99).

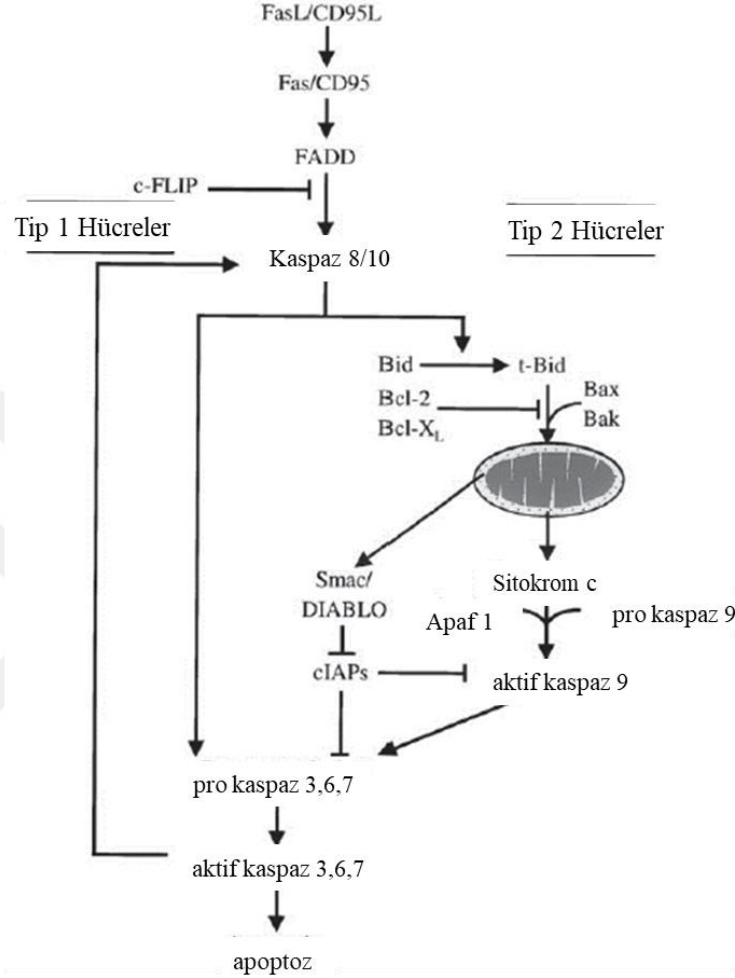


**Şekil 7.** FasL - Fas bağlantısı sonucu DISC oluşumu (89).

DISC oluşumu sonrası sinyal iletimi ise hücre tipleri arasında farklılık göstermektedir. Bu açıdan iki farklı tipte Fas aracılı apoptotik sinyal yolağı oluşmaktadır. Tip 1 hücrelerde DISC büyük ölçüde prokaspaz 8 aktivasyonuna neden olmakta bu da efektör kaspazlardan biri olan kaspaz 3'ü aktive etmektedir. BCL-2 veya BCL-X<sub>L</sub> gibi anti apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu bile bu hücrelerde apoptozdan koruyucu bir etki oluşturamamaktadır. Bu durum tamamen mitokondri bağımsız bir kaspaz aktivasyonunu işaret etmektedir. Ancak tip 2 hücrelerde ise DISC oluşumu belirgin ölçüde azalmıştır ve kaspazların aktivasyonu belirgin ölçüde mitokondriyal olaylara bağlıdır (Şekil 8). Burada Fas sinyali ile mitokondriyal yolak arasında karmaşık bağlantı bir proapoptotik BCL-2 ailesi üyesi olan BID'in kaspaz 8 tarafından yıkımı ile ortaya çıkar. BID yıkımı sonucu oluşan t mitokondriye geçer; sitokrom c, AIF, SMAC gibi apoptojenik faktörlerin salınımına neden olur (100, 101).

Apoptotik mekanizmaların tam bir uyum içerisinde işlenmesini sağlamaya yönelik Fas sinyal mekanizmasının sıkı bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Yakın zamanda viral kökenli v-FLIP (viral FLICE-inhibitory proteins) adı verilen bir grup anti apoptotik protein tespit edilmiştir. Bunlar sahip oldukları iki DED alanı ile Fas DISC'e ve diğer bazı ölüm reseptörlerine bağlanarak kaspaz 8 aktivasyonunu engelleyebilirler. Ancak bu proteinlerin henüz kaspaz 10 aktivitesini bloke edebildikleri görülmemiştir. Bu proteinin insanlarda homoloğu olan c-FLIP

(FALME-1/I-FLICE/Casper/CASH/MRIT/CLARP/Usurpin) biri kısa biri uzun olmak üzere iki izoformdan oluşur (c-FLIP<sub>S</sub> ve c-FLIP<sub>L</sub>) ve her ikisi de DISC'e bağlanarak kaspaz 8 aktivasyonunu engeller (102).

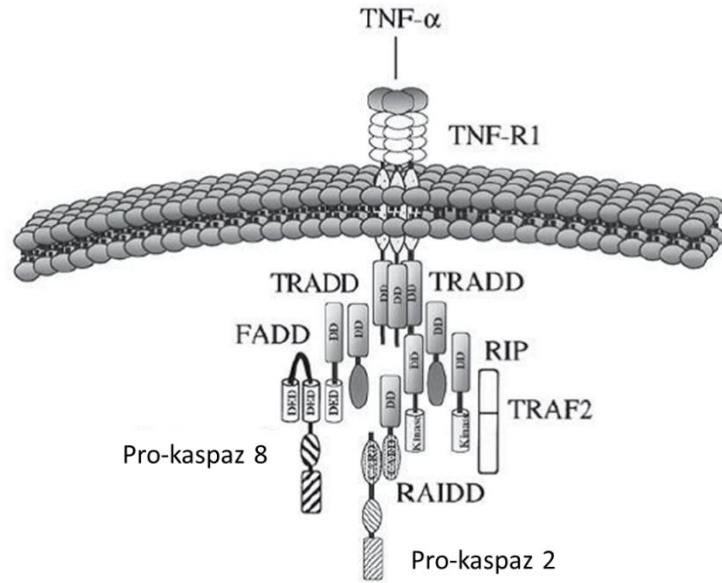


Şekil 8. Tip 1 ve Tip 2 hücrelerde Fas/CD95 aracılı apoptoz yolu (89).

### 2.2.3.3. TNF Aracılı Ekstrinsik Yolak

TNF/TNF-reseptör sinyal mekanizması iki farklı reseptöre sahiptir; TNF-R1 (p55/CD120a) ve TNF-R2 (p75/CD120b). Her ikisi de TNF bağlayan bir ekstraselüler amino ucu, bir transmembran heliks bölgesi ve sitoplazmik kuyruk içeren tip 1 transmembran proteinidir. Ancak sitoplazmik bölgede sadece TNF-R1 bir DD bölgesine sahiptir ve apoptotik sinyal iletiminin bir aracısıdır (103). Bu reseptörlerin başlıca üç ligandı bulunmaktadır; membrana bağımlı TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ ), çözünür formda TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) ve çözünür formda lenfosit kökenli sitokin (LT $\alpha$ / TNF- $\beta$ ).

mTNF- $\alpha$ , homotrimerik yapıda bir tip 2 transmembran proteindir. Bu öncüden bir metalloproteaz olan TNF- $\alpha$  dönüştürücü enzim (TACE) aracılığı ile çözünür form oluşturulur ve her iki form da biyolojik olarak aktiftir (104). TNF- $\alpha$ 'nın TNF-R1'e bağlanması reseptörün hücre içi bölgesinde DD bölgesi içeren çeşitli adaptör proteinlerin bağlanması ile sonuçlanan yapısal bir değişikliğe neden olmaktadır. Bu adaptör proteinlerin DD bölgesi ile reseptörün DD bölgesi etkileşime girmektedir. Uyarılmamış olan bir TNF-R1, SODD (Silencer of Death Domain) adı verilen ve reseptörün DD bölgelerini spontan olarak aktive olmaktan koruyan bir protein ile bağlantılıdır. Reseptör uyarıldığında zaman SODD reseptörden ayrılarak TRADD (TNFR- Associated Protein with Death Domain) adı verilen adaptör proteinin reseptörün DD bölgelerine bağlanmasına müsaade eder (105). TRADD; FADD, REL-2 (TNF Associated Factor-2), RIP (Receptor Interacting Protein) ve RAIDD (RIP Associated ICH-1 Protein with Dead Domain) gibi çeşitli sinyal moleküllerinin aktive reseptöre bağlanmasına aracılık eder. RIP haricinde bu proteinlerin enzimatik aktiviteleri yoktur. FADD prokaspaz 8'e bağlanarak onu aktive eder. RIP, RAIDD'yi bağlar ve prokaspaz 2'yi aktive eder (Şekil 9).

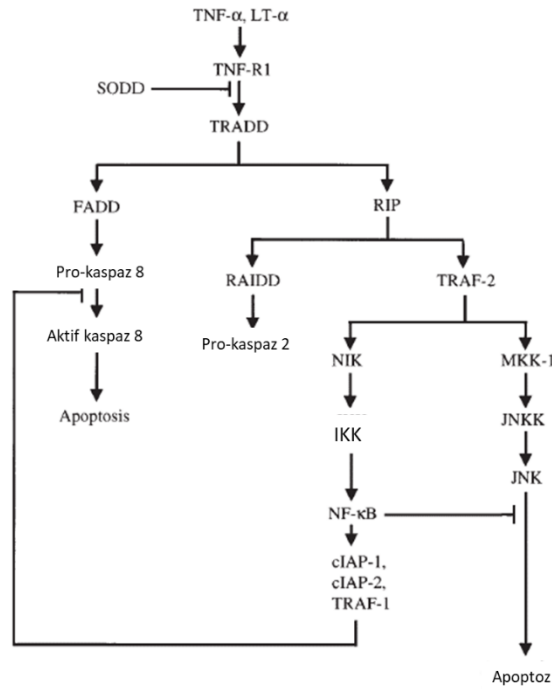


**Şekil 9.** TNF-R1'e TNF- $\alpha$ 'nın bağlanması ile DISC oluşumu (89).

RIP ayrıca TRAF-2 ile etkileşime girerek yaşamsal yolları uyarır ve immün cevapları düzenler (106). RIP ve TRAF-2 etkileşimi iki ayrı yolak üzerinden farklı sonuçlara yol açabilir. Birinci yolda, NIK (NF- $\kappa$ B Induced Kinase) adı verilen

protein kinaz aktive olur. Bu da IKK $\alpha$  (IKK1), IKK $\beta$  (IKK2) ve IKK $\gamma$  (NEMO) adı verilen, üç proteinden oluşan IKK'yi (IkB Kinase Complex) aktive eder. IKK ise NF- $\kappa$ B'yi inhibe eden I $\kappa$ B $\alpha$  proteinini fosforilleyerek yıkımına neden olur. Bunun sonucunda serbest kalan NF- $\kappa$ B çekirdeğe geçerek hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır. NF- $\kappa$ B, Rel protein ailesinin bir üyesidir. Bu proteinler kendi aralarında farklı kombinasyonlarda homodimer ya da heterodimer yapılar oluşturarak, DNA üzerinde  $\kappa$ B bölgeleri olarak adlandırılan birtakım alanlara bağlanarak gen ekspresyonunu düzenler. Bu transkripsiyon ailesi üyelerinden en fazla tanınanı NF- $\kappa$ B olarak adlandırılan p50/RelA heterodimeridir. Sonuç olarak ise NF- $\kappa$ B antiapoptotik genlerin ekspresyonunu arttırırken, apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltır (107).

İkinci yolakta ise MAP (Mitogen Activated Protein) kinazların rol oynadığı görülür. Bu yolakta sırasıyla MEKK-1 (Mitogen Activated Protein/Erk Kinase Kinase-1) ve JNKK (JNK Kinase) aktivasyonu sonucu JNK (Janus kinase) aktive olur. Aktif JNK ise; c-Jun, ATF-2 ve AP-1 gibi bir dizi transkripsiyon faktörünü aktive ederek hücreyi apoptoza götürür. Diğer taraftan TRAF-2; anti apoptotik faktörler olan c-IAP-1, c-IAP-2 ve TRAF-1 gibi moleküller üzerinden apoptotik TRADD-FADD-kaspaz 8 yolağını inhibe edebilir (Şekil 10); (108).



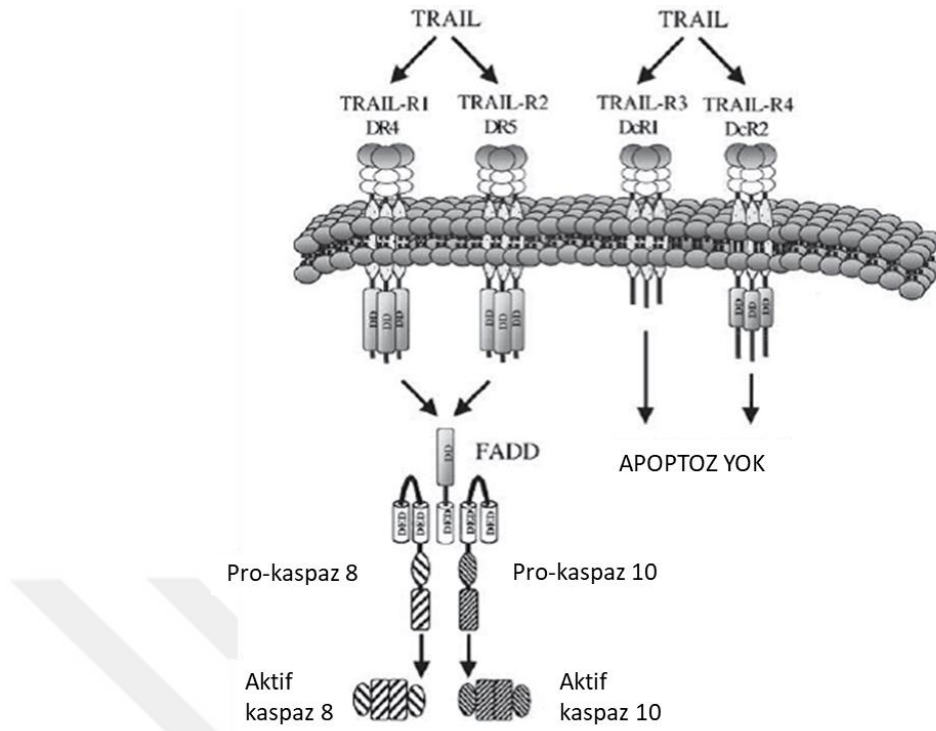
Şekil 10. TNF-R1 aracılı sinyal iletim yolları (89).

#### 2.2.3.4. TRAIL Aracılı Ekstrinsik Yolak

TNF ailesi üyelerinin tanımlanmasının ardından TNF ile ilişkili ve apoptozu indükleyen bazı ligandlar ve bunların reseptörleri de tespit edilmiştir. Bu proteinler TRAIL/APO-2L (TNF Related Apoptosis Inducing Ligand) olarak adlandırılmıştır. TRAIL yapısal olarak bir tip 2 transmembran proteindir ancak; metalloproteinazlar aracılı yıkım ile serbest formu da oluşabilir. TRAIL'in apoptozu özellikle normal hücrelerden ziyade kanser hücre hatlarında ve kanser ksenograftlarında uyardığı görülmekle birlikte, bu duyarlılığın nedeni henüz açıklanamamıştır.

TRAIL'in bağlandığı reseptörlerden ikisi TRAIL-R1(DR4) ve TRAIL-R2 (DR5/Killer/TRICK2) dir. Bu bağlanma sonrası apoptoz ile sonuçlanan bir dizi olay gelişir. Her iki reseptör de TRAIL bağlayan ekstraselüler bölgeye, bir transmembran bölgeye ve apoptotik sinyal iletimini sağlayan DD içeren bir sitoplazmik kuyruk bölgesine sahiptir (109). Diğer iki reseptör ise TRAIL-R3 (DcR1/TRID/LIT) ve TRAIL-R4 (DcR2/TRUNDD) olarak adlandırılan tuzak reseptörlerdir. Ekstraselüler ve transmembran bölgeleri açısından TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerine benzemekle birlikte, farklı olarak hücre içinde aktif bir DD bölgesi taşımazlar (Şekil 11). Beşinci TRAIL reseptörü ise çözünebilir OPG reseptörüdür (Osteoprotegerin Receptor) ve ligand olarak ODF'i (Osteoclast Differentiation Factor) bağlar. Ancak OPG de bir tuzak reseptör olarak rol oynayabilir. Çünkü aynı zamanda TRAIL'i de bağlamasına karşılık apoptozu uyarmaz. TRAIL için en yüksek afiniteye sahip reseptör TRAIL-R2'dir (110).

Fas'a benzer şekilde aktive olan TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörleri FADD'ı, kaspaz 8 ve kaspaz 10'u bağlayarak DISC yapısını oluşturur. Yine Fas yolağına benzer şekilde TRAIL tarafından indüklenen apoptoz da c-FLIP over ekspresyonu ile etkin bir şekilde baskılanabilir. Bazı çalışmalar TRAIL'in apoptozu indüklemesinin yanı sıra farklı yollar üzerinden NF- $\kappa$ B ve JNK'yı da aktive edebildiğini göstermektedir. Ancak NF- $\kappa$ B aktivasyonu TRAIL'in indüklediği apoptozu inhibe etmek için yeterli olmamaktadır (111).



**Şekil 11.** TRAIL reseptörleri ve TRAIL DISC (89).

### 2.2.3.5. DR3 ve DR6 Aracılı Ekstrinsik Yolak

DR3 reseptörü de diğer ölüm reseptörlerine benzer şekilde bir ekstraselüler N-terminal bölgesi, bir transmembran bölge ve sitoplazmik bir C-terminal bölgesinden oluşmaktadır. Reseptörün ligandlarından biri Apo3L'dir. Bu da diğer TNF ailesi ligandları gibi bir tip 2 transmembran proteinidir. DR3 aracılı sinyal iletim mekanizması TNF-R1'e benzerlik göstermektedir. Aslında DR3 TRADD, TRAF-2, RIP ve NIK üzerinden NF- $\kappa$ B'yi aktive ederken ayrıca TRADD, FADD ve kaspaz 8 aracılı bir yolak ile de apoptozu indüklemektedir (112). DR6 reseptörü de yapısal olarak diğer ölüm reseptörlerine benzemesine karşılık, DD bölgesi C-terminal ucunda değil transmembran bölgesine yakın başka bir kuyrukta yerleşmiştir. Bu reseptörün yol açtığı sinyal yolları ve ligandları konusunda yeteri kadar bilgi bulunmamaktadır (113).



### 2.2.3.6. Mitokondri ve İntrinsik Yolak

İntrinsik yolak ölüm reseptörü aracılığı olmadan bir dizi hücrel ve mitokondriyal mekanizmaları tetikleyen olaylarla düzenlenir. İntrinsik yolağı başlatan uyarılar pozitif ya da negatif tarzda olabilir. Negatif sinyaller, hücre ölüm programını baskılama yetersizliğı ile sonuçlanan belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğu olarak sınıflandırılabilir. Diğer bir ifadeyle, burada apoptozu baskılayan faktörlerin yokluğu söz konusudur. Pozitif sinyalleri ise radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral infeksiyonlar, serbest radikaller ve benzeri birçok faktörün varlığı oluşturur (114). Tüm bu uyarılar; BCL-2 proteinlerinin aktivitesini etkilemektedir. Proapoptotik BCL-2 üyeleri aktive edildikleri zaman, dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırarak sitokrom c başta olmak üzere çeşitli pro-apoptotik moleküllerin salınımına aracılık eder. Apoptotik uyarıların moleküler düzeyde hangi mekanizmalar ile BCL-2 proteinlerini aktive ettikleri tam olarak bilinmemekle birlikte, BCL-2 ailesi üyelerinin aktivasyonu sonrası gerçekleşen olaylar iyi bir şekilde tanımlanmıştır (80).

Hücrelerde, pro-apoptotik özellikteki BAX yoğun olarak monomerler halinde sitoplazmada bulunmaktadır. Apoptotik uyarının ardından BAX sitoplazmadan mitokondriye geçer. BAX'ın aktivasyonunun hem C hem de N terminal bölgelerindeki yapısal bir değişiklik ile gerçekleştiğı bilinmektedir. Bu değışim sonucu BAX oligomerler oluşturarak dış mitokondri membranına yerleşir. Anti-apoptotik özellikteki BCL-2, BAX aktivasyonunu ve oligomerizasyonunu inhibe edebilir. BAX ise normal koşullarda hücrelerin dış mitokondriyal membranına yerleşmiş halde bulunur (77). BAX'a benzer şekilde aktive olan BAK'da da yapısal değışiklikler gözlenir. Bu sonuçlar, çoklu alana sahip proapoptotik proteinlerin aktivasyonunun proteinin yapısal değışikliğı sonucu gerçekleştirdiğini göstermektedir. Sadece BH3 alanı taşıyanlar ise temel olarak çoklu alana sahip proteinler üzerinden etki göstermektedir (83). Ekstrinsik ve intrinsik yolak arasındaki bağlantıyı sağlayan ve apoptotik cevabın artışı sağlayan BID haricindeki sadece BH3 alanına sahip proteinler, çoklu alana sahip proteinleri indirekt bir yoldan aktive etmektedir. Örneğin; BAD fosforile olarak aktive olduğunda, BCL-2 veya BCL-X<sub>L</sub>'ye bağlanarak onların antiapoptotik aktivitelerini baskılar. Diğer bir sadece BH3 alanına sahip protein olan

BIK'in de benzer şekilde fosforile olarak proapoptotik etkisinin güçlendiği görülmektedir. BIM ise normal koşullarda hücrede mikrotübüllere bağlı dineinler ile etkileşim halindedir ve apoptotik uyarı ile bulunduğu yerden ayrılarak mitokondri üzerinde anti apoptotik etkiye sahip proteinlere bağlanır ve onların aktivitelerini bloke eder (78).

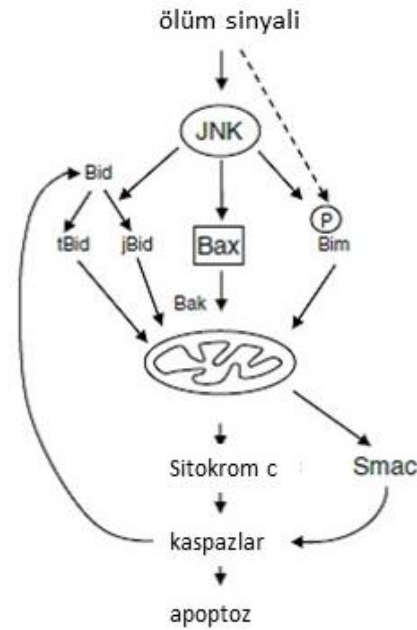
Normal olarak yaşamını sürdüren bir hücrede, sitokinler ve büyüme faktörleri çeşitli sinyal mekanizmaları aracılığı ile hücrelerin canlılığı ve çoğalması üzerine etki ederler. Bu faktörlerin yokluğunda ise hücrelerde apoptotik yollar aktive olmakta ve hücre ölümü görülmektedir. Diğer taraftan bu mekanizmalarda meydana gelen mutasyonlar ise hücrelerin apoptozdan kaçışına ve kanserleşme sürecine neden olabilmektedir. Hücre çoğalması ve dolayısı ile apoptotik süreçlerle ilişkili en önemli sinyal yolları arasında JNK, Jak/Stat, Ras/Raf/Mek/Erk ve PI3K/Akt gibi sinyal yolları gelmektedir (115-117).

#### **2.2.3.7. İntrensik Yolak ve JNK Sinyal Mekanizması**

c-Jun NH<sub>2</sub> terminal kinaz (JNK), MAP kinaz ailesinin bir üyesidir ve ilişkili sinyal yolağı bir takım sitokinler ve çevresel strese maruziyet sonucu aktive olmaktadır. JNK ailesinin 10 üyesi tanımlanmıştır ve hepsi de JNK1, JNK2 ve JNK3 olarak adlandırılan genlerin transkripsiyon ürünlerinin alternatif kesimi ile oluşturulmaktadır (118). JNK sinyal yolağının çoğalma, farklılaşma ve apoptozla ilgili süreçlerde yer aldığı bilinmektedir (119). JNK'nın apoptoz üzerine etkisi temel olarak hücre tipine, ölüm sinyalinin türüne, bu sinyalin aktivasyon süresine ve en önemlisi de diğer sinyal yollarının aktivitesine bağlı olarak gelişmektedir. Bir hücrenin, hücre dışı bir uyarıya maruziyeti sonucu hücre kaderinin belirlenmesi, tek bir sinyal yolağından ziyade birçok sinyal yolağının bütünleşik etkisine bağlıdır. JNK sinyal yolağı bunun iyi bir örneğidir (120).

Sinyal yolağının aktivasyonunu takiben JNK fosforile olur. Fosforile JNK çekirdeğe geçer ve c-Jun'u fosforilleyerek aktive eder. Bu ise aralarında *TNF-A*, *FAS-L* ve *BAK* gibi bazı genlerin yer aldığı bir grup pro apoptotik genin transkripsiyonundan sorumlu bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'i (Activator Protein 1) aktive eder (121). Pro-apoptotik genlerin ekspresyonel artışı ve anti-apoptotik

genlerin ekspresyonel azalışı yanı sıra JNK, mitokondrideki pro/antiapoptotik proteinlerin fonksiyonlarının düzenlenmesi üzerine de direkt etki göstermektedir. Apoptotik uyarıyı takiben, JNK mitokondriye kolayca geçebilir ve çalışmalar mitokondriden sitokrom c'nin salınımında rolü olabileceğini göstermektedir. Bu mekanizma tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, JNK'nun bir pro-apoptotik BCL-2 üyesi olan BID'in yıkımına aracılık ettiğini göstermektedir. Bunun sonucu oluşan t-BID ise mitokondride BAX aktivasyonuna neden olmaktadır. BAX'da apoptotik proteinlerin çıkışına olanak veren membran kanallarını oluşturmaktadır. JNK ayrıca, BIM ve BMF gibi diğer bazı sadece BH3 bölgesi içeren pro-apoptotik BCL2 proteinlerinin de aktivitesini düzenlemektedir. Bu proteinlerin fosforilasyonu ise BAK ve/veya BAX aktivasyonuna yol açmaktadır (Şekil 12). Ayrıca farklı olarak aktive olan BIM, BCL-2 ve BCL-X<sub>L</sub> gibi antiapoptotik proteinlerin aktivitelerini de baskılayabilir (119).



**Şekil 12.** JNK sinyal yolağı aracılı apoptoz (122).

JNK yolağının hücre kaderinin belirlenmesindeki rolü, bu yolağın düzenlenimdeki bozukluklar sonucu gelişebilecek patolojiler bakımından hücreleri duyarlı hale getirmektedir. Bunlar arasında kanser, Alzheimer, Parkinson, kalp hipertrofisi ve iskemisi sayılabilir (120). JNK'ların Özellikle JNK1'in kanserleşme sürecinde malign dönüşümde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır (123). Meme

kanseri, UV tarafından indüklenen cilt kanseri, beyin tümörleri, multiple miyeloma ve T-ALL tipi lösemilerde JNK yolağının rol oynadığı görülmektedir (124).

### **2.2.3.8. İntrinsik Yolak ve Jak/Stat Sinyal Mekanizması**

Normal bir hücrede, bazı hücrel fonksiyonların kontrolü sitokinler tarafından sağlanır. Bunlar birtakım reseptörler aracılığı ile hücre içi sinyal mekanizmalarını harekete geçirirler. Bu farklı reseptörler ise Janus Kinazlar (JAK'lar) olarak isimlendirilen kinaz ailesi üyelerinden bir veya birkaçı aracılığı ile etki gösterir (125). JAK'ların fosforilasyon için hedefleri STAT'lardır (Signal Transducers and Activators of Transcription). STAT'lar hücre çoğalması, apoptoz ve hücre farklılaşması gibi bir dizi hücrel olayda rol oynayan transkripsiyon faktörleridir. JAK/STAT yolağının karsinogenez sürecinde rol aldığı bilinmektedir (126).

Günümüzde STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B ve 6 olmak üzere 7 farklı STAT proteini tanımlanmıştır. JAK ailesi ise; JAK 1, 2, 3 ve Tyk 2 (Tyrosine kinase 2) olmak üzere 4 farklı üyeden oluşur. Bir hücre IL-6 veya IFN- $\gamma$  gibi bir sitokine maruz kaldığında, sitokin reseptörü ile ilişkili JAK kinazlar aktive olur ve STAT üzerindeki spesifik tirozin rezidülerini fosforiller. STAT proteinleri daha sonra farklı STAT molekülleri ile heterodimerize veya aynı STAT türleri ile homodimerize olur. Dimerizasyonu takiben STAT'lar çekirdekte lokalize olur ve hedef genlerin bulunduğu DNA bölgesine bağlanır ve bu genlerin ekspresyonu başlatılır. Bunlar arasında BCL-2 ve BCL-X<sub>L</sub> gibi anti-apoptotik proteinler de yer almaktadır. Sonuç olarak sitokinlerin dolayısı ile bu sinyalin varlığı hücreleri apoptozdan korur ve canlılığının devamını sağlar (127).

Fizyolojik koşullarda JAK/STAT yolağı bazı inhibitör proteinler ile kontrol altında tutulur. Bu inhibitörler üç farklı grupta toplanır; PIAS (Protein Inhibitors of Activated STATs), SHPs (Src Homology 2-containing protein tyrosine Phosphatases) ve SOCS (Supressors of Cytokine Signalling). SOCS proteinleri, sitokin sinyalinin hedefidir ve JAK/STAT yolağı tarafından arttırılır. Böylece, yolağın negatif geri beslemesini sağlarlar. SOCS'lar direkt olarak sitokin reseptörüne veya JAK proteinlerine bağlanarak inhibisyon yaparlar. Birçok kanser türünde bu yolakta yer

alan molekülleri etkileyen mutasyon sonucu hücre çoğalması ve apoptozdan kaçış olduğu görülmektedir (128).

### **2.2.3.9. İntrinsik Yolak ve PI3K/Akt Sinyal Mekanizması**

Hücrelerin büyük çoğunluğu yaşamlarını sürdürebilmek için çeşitli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar. Büyüme faktörü sinyallerinin büyük çoğunluğu ise PI3K ve Akt aracılığı ile etkisini gösterir (129). Çeşitli büyüme faktörlerinin reseptörü olan reseptör tirozin kinazların aktivasyonu, PI3K'ın reseptörün adaptör biriminde bulunan bir ya da daha fazla SH2 bölgesi ile temas kurmasına neden olur. PI3K'lar hücre membranında yer alan inozitol tip fosfolipidlerdeki 3'OH gruplarını fosforilleyen bir lipid kinaz ailesidir. Bu durum PI3K'ın allosterik aktivasyon ile sonuçlanır. Takiben PIP3 (phosphatidylinositol-3-trisphosphate) üretimi gerçekleşir. PIP'ler hücre içerisinde AKT gibi PH (Pleckstrin Homology) bölgesi taşıyan çeşitli sinyal araçlarını bağlarlar (130). Protein kinaz B olarak da bilinen AKT bir serin-treonin kinazdır ve PI3K aracılı sinyal yollarında temel aracısıdır (131).

Memelilerde farklı gen bölgeleri tarafından kodlanan üç ayrı AKT izoformu bulunmaktadır; AKT1, AKT2 ve AKT3. Farklı AKT formlarının benzer şekilde aktive olmasına ve aynı sinyal yollarına eşit derecede spesifite ve etkinlik göstermelerine rağmen fonksiyonel sonuçlarda farklılıklar olabilmektedir (132). AKT; apoptoz, hücre döngüsünün devamlılığı ve transkripsiyonel düzenleme gibi bir dizi hücrel olayda kritik öneme sahiptir. AKT'nin bazı hücrelerin yaşamının devamlılığını sağlamaları; BAD, BAX ve kaspaz 9 gibi pro-apoptotik araçların fosforilasyonu ve bunun sonucunda inhibisyonu ile apoptozdan koruması sonucu gerçekleşir. Diğer bazı hücrelerde ise AKT, transkripsiyon faktörü CREB'i ve NF- $\kappa$ B'nin pozitif düzenleyicisi olan I $\kappa$ B-kinazı (IKK) aktive ederek anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu düzenler ve hücre yaşamını sürdürür. Ayrıca AKT, siklin-D fonksiyonlarını etkileyerek hücre döngüsü üzerine de etki edebilir (131).

Bu yolda meydana gelen birçok patoloji hücre çoğalması/apoptoz dengesini bozmakta ve kansere neden olmaktadır. Ayrıca çalışmalar AKT'nin potansiyel bir onkogen olabileceğini de belirtmektedir. PTEN/MMAC1 (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10/ Mutated in Multiple Advanced Cancers 1)

AKT'nin fosforillediği PIP3'ü defosforilleyerek bu sinyal mekanizmasının negatif düzenleyicisi olarak fonksiyon görür. Çeşitli kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, PTEN aşırı ekspresyonunun hücre büyümesini inhibe ederek ve hücrelerin apoptoza duyarlılığını artırarak bir tümör baskılayıcı gibi davrandığını göstermektedir (130).

### **2.2.3.10. İntrinsik Yolak ve Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal Mekanizması**

Bazı büyüme faktörleri ve mitojenler ise Ras/Raf/MEK/ERK sinyal yolağı kullanarak gen ekspresyonunu düzenlerler ve hücreleri apoptozdan korur. Bu yolakların bazı üyelerinin ise çeşitli kanser türlerinde mutasyona uğradığı veya aşırı eksprese edildiği görülmektedir. Ras/Raf/MEK/ERK yolağı çeşitli hücre yüzey reseptörleri ile transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşime aracılık eder. Bu transkripsiyon faktörlerinin büyük çoğunluğunun hedefinde ise apoptoz sürecinde yer alan çeşitli proteinlere ait genler bulunmaktadır. Ayrıca, bu yolak apoptozu düzenleyen BAD, BIM, MCL-1, kaspaz 9 gibi moleküllerin post-translasyonel fosforilasyonu ile de apoptotik süreçleri inhibe etmektedir (133).

Ras, çeşitli sinyal yolaklarında rol oynayan GTP-bağlayan bir proteindir. Ki-Ras, Ha-Ras ve N-Ras olarak adlandırılan farklı tipleri bulunmakta ve bunların sinyal yolaklarındaki aktiviteleri de farklılık göstermektedir. Örneğin, Ki-Ras daha çok Raf/MEK/ERK yolağında etkinken, Ha-RAS ise çoğunlukla PI3K yolağında etkindir. Sitokin veya büyüme faktörünün ilgili reseptöre bağlanmasını takiben Ras GDP'yi fosforilleyerek GTP meydana getirir. Bu konfarmasyonel değişiklik sonucunda Ras proteini aktive olur ve Raf'ı hücre membranında bağlar. Raf bir serin/treonin kinazdır ve A-Raf, B-Raf ve C-Raf (Raf-1) olmak üzere farklı tipleri bulunur. Ras etkisi ile Raf proteininde de fosforilasyon gözlenir. MEK1 (Mitogen Activated Protein Kinase/ERK Kinase) bir protein kinazdır ve aktivitesi Raf tarafından düzenlenir. Raf MEK'i fosforilleyerek aktive eder. MEK'in ise hedefinde spesifik olarak ERK yer alır. ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) MEK tarafından fosforillenir ve direkt olarak c-Jun, c-Myc gibi birçok transkripsiyon faktörünü fosforilleyebilir. ERK1 ve ERK2 olmak üzere tanımlanmış iki ERK proteini bulunmaktadır (134). Bunun yanı sıra ERK

farklı mekanizmalar üzerinden transkripsiyon faktörü CREB'i ve indirekt mekanizmalar ile NF- $\kappa$ B transkripsiyon faktörünü aktive edebilir (135).

Raf ayrıca direkt etki ile apoptotik yolda yer alan moleküller üzerine etki edebilir. Raf, BAD'ı direkt olarak fosforilleyerek inaktive edebilir. Bu durumda BCL-2 homodimerleri oluşarak anti-apoptotik bir etki oluşur. Ayrıca Ras/Raf/MEK/ERK yolunun aktive olması ile anti-apoptotik MCL-1 ve pro-apoptotik BIM proteinleri fosforile olur. Bu durumda fosforillenen BIM; BCL-2, BCL-XL ve MCL-1'in ayrılmasına neden olur. BIM ubiquitinlenerek proteozomal yıkım için işaretlenirken, BAX'a; BCL-2, BCL-XL ve MCL-1 bağlanır. Böylece BAX homodimerleri oluşumunu engellenir ve BAX inaktive olur. Bunun sonucunda apoptoz inhibe edilir. Ayrıca Ras/Raf/MEK/ERK yolunun direkt olarak kaspaz 9'u fosforilleyerek onu inaktive edebildiği de gösterilmiştir. Bu yoldaki sapmaların birçok kanser türü ile olan ilişkisi bilinmektedir (133).

#### **2.2.3.11. Mitokondriden Salınan Proteinler ve Aktiviteleri**

Apoptotik uyarılar mitokondriyal geçirgenlik porunu (MPT) açarak iç mitokondriyal membranda değişikliğe neden olur. Bunun sonucunda mitokondriyal transmembran potansiyeli kaybolur ve iç membrandan sitozole iki grup pro-apoptotik proteinin geçişi gözlenir. İlk grup sitokrom c, SMAC/DIABLO ve bir serin proteaz olan HTRA2/OMI'yi içerir. Bu proteinler kaspaz bağımlı mitokondriyal yolağı aktive ederler. İkinci grup pro-apoptotik proteinler arasında ise AIF, endonükleaz G ve CAD vardır. Bu proteinler ise çekirdeğe geçerek kaspazlardan bağımsız olarak DNA yıkımına yol açarlar. Bu ikinci grup proteinler daha çok geç evrelerde hücre ölümü kesinleştikten sonra rol oynarlar (136).

Sitokrom c hücrelerde iç mitokondriyal membranın dış yüzeyine bağlı halde bulunmaktadır. Sitokrom c'nin mitokondriden salınımı iki basamaklı bir süreçte gerçekleşmektedir; öncelikle sitokrom c, iç membrandan ayrılmakta ve ardından serbest formdaki protein dış membrandaki geçirgenlik artışı ile mitokondri dışına geçmektedir (137). Sitoplazmada ise sitokrom c Apaf-1'e bağlanır. Apaf-1 kaspaz bağlayıcı bölge (CARD) ve nükleotid bağlayıcı bölge içeren sitozolik bir proteindir. Sitokrom c'nin bağlanması sonucu Apaf-1 de konformasyonel bir değişiklik gözlenir

ve kaspaz bağlayan CARD bölgesi açığa çıkar. Bunun sonucunda prokaspaz 9 komplekse bağlanır ve oluşan bu yapı apoptozom olarak adlandırılır. Ardından prokaspaz 9'un proteolitik olarak oto aktivasyonu gözlenir. Aktif kaspaz 9 da kaspaz 3 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazları aktive eder (138).

SMAC/DIABLO çekirdekte kodlanan, sitoplazmada sentezlenen ve mitokondride yerleşim gösteren bir proteindir. Apoptotik uyarı sonucu mitokondriden sitoplazmaya geçtiği zaman IAP'lere bağlanır. Normalde IAP'lerin sitoplazmadaki varlıkları apoptotik sinyal yolağının mitokondri hasarı sonucu gibi bir nedenle rastlantısal olarak aktive olmasını engellemektir. Ancak apoptotik uyarı sonucunda sitoplazmaya yoğun miktarda SMAC/DIABLO girişi ve bunların IAP'lere bağlanması, bu proteinlerin fonksiyonlarını engeller ve apoptik sürecin devam etmesine olanak verir (139).

HTRA2/OMI ise serin proteaz aktivitesine sahip bir proteindir. Mitokondrideki varlığının tespitinden önce bu proteinin, endoplazmik retikulum ve çekirdekte yer aldığı bilinmekteydi (140). Apoptotik uyarı ile diğer mitokondriyal proteinler gibi HTRA2/OMI de sitoplazmaya geçer ve SMAC/DIABLO'ya benzer şekilde IAP'lere bağlanarak onları inhibe eder. Ancak, bu durum proteinin sahip olduğu serin proteaz aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir ve serin proteaz aktivitesinin ek bir pro-apoptotik özellik olduğu düşünülmektedir (141).

Endonükleaz G, sitoplazmada sentezlenmesinin ardından mitokondride yerleşir. Apoptoz sırasında sitoplazmaya, ardından nükleusa geçer ve DNA fragmentasyonlarına neden olur. Klasik olarak apoptozda DNA fragmentasyonu kaspazlarca aktive edilen DNazlar (CAD) tarafından gerçekleştirilir. Normal hücrelerde CAD'lar inhibitör bir protein olan ICAD'a bağlı halde bulunur. Apoptoz esnasında ise aktif kaspaz 3 ICAD'ı keserek CAD'ın ayrılmasını sağlar. CAD'dan farklı olarak, endonükleaz G'nin kaspaz ile aktivasyona ihtiyacı yoktur (142).

AIF normalde mitokondriyal membranlar arası boşlukta bulunan bir flavo proteindir ve doğal fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Apoptoz uyarısı sonucu ise sitoplazmaya geçer, oradan da nükleusa geçer. Nükleusta DNA'yı 50-300 kb'lık parçalara bölerek DNA fragmentasyonuna ve periferel nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olur (143). AIF'in inaktivasyonunun embriyonik kök hücreleri



büyüme faktörü yokluğunca uyarılan hücre ölümüne karşı dirençli hale getirdiği görülmüştür. Bunun yanı sıra AIF embriyoid cisimlerde, kavitasyon sürecindeki programlı hücre ölümünden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu durum özellikle fare morfogenezindeki ilk dalga, kaspaz bağımsız hücre ölümünde büyük önem taşımaktadır. Tüm bu veriler, kaspaz bağımsız hücre ölümünde AIF'in çok önemli bir aracı olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak bu apoptojenik etkiye ait mekanizmalar henüz açıklığa kavuşmamıştır. İlginç bir şekilde çalışmalar AIF'in tespit edilebilir bir DNaz aktivitesi olmadığını da göstermektedir. Böyle bir proteinin ise DNA fragmentasyonuna nasıl yol açtığı bilinmemekle birlikte, muhtemelen çeşitli nükleazlar gibi başka proteinleri aktive ettikleri veya onlarla etkileşime girdikleri düşünülmektedir. AIF ayrıca apoptotik fonksiyonuyla ilişkili olmadığı düşünülen, NADH oksidaz aktivitesine de sahiptir (144).

#### **2.2.4. Apoptoz Yolaklarındaki Ortak Son**

Hem ekstrinsik hem de intrinsik yolağın birleştiği son aşama efektör kaspazların aktivasyonu ile başlar. Efektör kaspazlar; nüklear materyelin yıkımından sorumlu çeşitli sitoplazmik endonükleazları, ayrıca diğer nüklear ve hücre iskeleti proteinlerini yıkan çeşitli proteazları aktive eder. Kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 efektör kaspazlar olarak görev alırlar. Bunlar; sitokeratinler, PARP, plazma membranı hücre iskelet proteini alfa fodrin, çekirdek proteini ve diğer birçok yapının yıkımı ile apoptozun biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerine aracılık ederler. Kaspazlar çevre hücrelerle bağlantıları keser, hücre iskeletini yeniden organize eder, DNA replikasyon ve tamirini durdurur, çekirdek yapısını bozar, hücreleri fagositoz için hedef haline getirci sinyalleri eksprese etmek üzere uyarır ve hücreyi apoptotik cisimlere parçalar (68, 145).

Kaspazların apoptoz sürecindeki rollerinden biri yaşayan hücreleri apoptozdan koruyan proteinleri inaktive etmesidir. Buna CAD adı verilen ve DNA fragmentasyonundan sorumlu olan enzimin inhibitörü ICAD'ın yıkımı örnek gösterilebilir. Kaspaz 3, endonükleaz CAD aktivasyonuna neden olur. Aktif olarak çoğalmakta olan hücrelerde CAD inhibitör bir protein ile ICAD kompleksini oluşturur. Apoptotik süreçte ise kaspaz 3 ICAD'ı parçalar ve CAD serbest kalır. CAD ise, DNA

yıkımına ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur (146). Kaspazlar tarafından yıkıma uğratılan apoptozun diğer negatif düzenleyicileri BCL-2 proteinleridir. Ancak yıkım sadece bu proteinleri inaktive etmemekte fakat aynı zamanda oluşan ürünler apoptozu desteklemektedir. Kaspazların apoptozdaki diğer bir rolleri ise nükleer membranın hemen altında yer alan ve kromozom organizasyonundan sorumlu, lamin adı verilen ara filamentlerden oluşan nükleer lamina gibi hücrel yapıların parçalanmasıdır. Bunun sonucu olarak lamina çöker ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Kaspazlar ayrıca hücre iskeleti düzenleniminde görev alan çeşitli proteinleri yıkarak da hücrel yapıları dolaylı olarak yeniden düzenler (75). Bunlar arasında gelsolin, FAK (Focal Adhesion Kinase) ve PAK2 (p21 Activated Kinase 2) yer alır. Bu proteinlerin yıkımı onların aktivitelerini bozar. Örneğin gelsolin aktin bağlayan bir proteindir ve apoptoz sürecinde kaspaz 3 ile yıkılır. Yıkılan bu parçalar ise aktin filamentlerini parçalar. Bunun sonucu olarak da hücre iskeleti, hücre içi transport, hücre bölünmesi ve sinyal iletimi bozulur (147). Kaspazların hücrede önemli fonksiyonlar yürüten çeşitli proteinlerdeki düzenleyici ve efektör bölgeleri keserek ayırmaları, kaspazların etki mekanizmalarından bir diğeridir (75).

### **2.3. Kolorektal Kanserler**

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanserin türleri arasında en sık epitelden köken alan karsinomlar yer almaktadır. Karsinomlar arasında ise en sık gözlenenlerden biri kolorektal kanserdir (148). Kolorektal kanserler olarak bilinen kolon kanseri ve rektum kanseri, bu organlardaki kontrolsüz hücre çoğalması ile karakterize bir durumdur. Dünya nüfusunun %9,7'sini etkileyen bu hastalığın mortalitesi kısmen azalma eğilimi göstermekle birlikte, kanser nedenli ölümler arasında üçüncü sırada yer almaya devam etmektedir. Hastalığın tanısı; rektal kanama, anemi, iştah ve kilo kaybı, dışkılama alışkanlıklarında değişiklik gibi belirtiler ile başvuran kişilerde yapılan kolonoskopi ve bu esnada alınan biyopsiler sonucunda konulmaktadır (149). Kolorektal kanserler önemli birer mortalite ve morbidite nedenidir. Her yıl yaklaşık 1 milyondan fazla insan tanı almakta ve bunların da yaklaşık yarısı yaşamlarını kaybetmektedir. İnsidansı erkeklerde kadınlara oranla daha fazladır ve görülme sıklığı yaşla birlikte artmaktadır (150). Dünya genelinde kadınlarda 2., erkeklerde 3. sıklıkta görülen kanser türüdür. Hastaların büyük

çoğunluğu gelişmiş toplumlarda yaşayan insanlardır (151). Kolon kanserinin patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte ailesel yatkınlık, genetik değişiklikler, beslenme ve yaşam tarzı gibi birçok faktör hastalığın gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (152). Kolorektal kanserler, olguların çoğunda sporadik olarak ortaya çıkar. Geri kalanından (%5-10) ise çeşitli kanser genlerindeki kalıtsal mutasyonlar nedeniyle kolon mukozal hücrelerinde meydana gelen ilerleyici genetik bozukluklar sorumlu tutulmaktadır (153).

Kolorektal kanserlerin erken belirtileri çoğu zaman gözden kaçtığından dolayı hastalık erken evrelerde tespit edilememektedir. Hastaların çoğu ileri evrede ve sıklıkla karaciğer metastazları ile tanı almaktadır. Temel tedavi yaklaşımı cerrahi rezeksiyon ve bunu takip eden radyoterapi ve/veya kemoterapi uygulamasıdır (154). Hastalığın tedavisine yönelik uygulanacak stratejileri tümör dokusunun yerleşimi ve büyüklüğü, kanserin evresi ve hastanın genel durumu belirlemektedir. Hastalığın prognozu tanı aldığı andaki evreye bağlı olup, 5 yıllık sağ kalım oranları %40 civarındadır (149). Kolorektal kanserlerde en sık ölüm nedeni hastalığın nüksü ve metastazlardır. Cerrahi olmayan tedavi yaklaşımları duyarlı ve özgül değilken, yan etki ve toksisite oranları oldukça yüksektir (154).

Kolorektal kanserlerin tedavisinde günümüzde en sık kullanılan sitotoksik ajan 5-fluorourasildir. Tek başına veya farklı kemoterapötik ajanların kombinasyonu ile uygulanan tedavi yöntemine cevap oranları %20'lerin altındadır ve ilk aşamada tedaviye yanıt veren hastalarda ileri dönemlerde ilaç direnci gelişme oranı oldukça yüksektir (152). Kemoterapi konusunda kolorektal kanserlerde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri kemoterapötik ajanın kanser dokusuna spesifik dağılımının sağlanamamasıdır. Mevcut yaklaşımlar kolonda kimyasal ajanının yoğunlaşabilmesi amacıyla daha yüksek dozda kullanımlarını gerektirirken, bu durum ise artan yan etkiler nedeniyle sorunlar oluşturmaktadır (155). Tedaviye bağlı olarak gelişen yan etkiler yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle kolorektal kanserlerin tedavisinde başarı oranları yüksek ve yan etki potansiyeli daha düşük anti-tümöral bileşiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (152).

Günümüze kadar çok sayıda bileşik kolorektal kanserlerden korunma, bu kanserlerin tedavisi veya tekrarlama riskinin azaltılmasına yönelik olarak denenmiştir.

Tüm bu çalışmalardan elde edilen bilgiler ideal bir koruyucu veya tedavi edici ajanın kanser patogeneziindeki birden fazla moleküler mekanizmayı hedef alması gerektiğini ve kolay elde edilebilir, maliyeti düşük ve kolay uygulanabilir bir ajan olması gerektiğini göstermektedir (156). Günümüzde kolorektal kanserlerin tedavisine yönelik yaklaşımlar bu hastalığı tek ve değişmez bir patoloji olarak ele almaktadır. Ancak yakın zamanda yürütülen çalışmalar aynı evredeki farklı hastalardan alınan kolorektal kanser örneklerinin büyük ölçüde; histolojik ve moleküler düzeyde, gen ekspresyonları yönünden ve prognoz açısından farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur (157). Bu nedenlerle kolorektal kanserlerin tam olarak anlaşılabilmesi ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi adına kolon kanserindeki moleküler mekanizmalarının daha fazla oranda aydınlatılmasına da ihtiyaç duyulmaktadır (154).

#### **2.4. Bor ve Borik Asit**

Bor periyodik tabloda 3A grubunda bulunan bir yarı metaldir. Yarı metal özelliğe sahip olması nedeniyle metallere daha az fakat ametallerden daha yüksek iletkenliğe sahiptir (158). Periyodik tabloda B simgesi ile gösterilir ve atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 g/mol'dür (159). Bor kelimesinin kökenleri; Arapça buraq, baurach ve Farsça burah kelimelerinden gelmektedir. Tarihte ilk defa Babiller tarafından M.Ö. 2000 yıllarında metallerin eritilmesi işlemlerinde kullandığı yönünde verilere rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra bor Mısır, Mezopotamya ve Arap Yarımadasında birçok uygarlık tarafından tedavi, mumyalama, ilaç ham maddesi ve temizlik maddesi olarak kullanılmıştır. Yakın tarihte bor element olarak ilk defa 1808'de Fransız bilim adamı Joseph Gay-Lussac ve Baron Louis Thenard tarafından bilim tarihine kazandırılmıştır. Bor ve bileşiklerinin endüstriyel amaçlarla Avrupa Kıtasında kullanılmaya başlaması ise daha eski dönemlere, yaklaşık 13. yüzyıla uzanmaktadır (160).

Ülkemiz topraklarında ise bor madeni ilk defa 18. yüzyıl ortalarında tespit edilmiş ve işlenmeye başlamıştır. Cumhuriyet dönemiyle birlikte yapılan yatırımlar sonucunda günümüzde Türkiye, Dünya bor üretiminde önemli bir pozisyona ulaşmıştır (161). Ülkemiz dünya ülkeleri arasında, sahip olduğu bor rezervleri açısından %72' lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Başlıca bor yatakları, Batı

Anadolu ve Marmara Denizi güney kesimlerinde, özellikle Eskişehir ve Kütahya yörelerinde bulunmaktadır (162). Bor bileşikleri günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Tıpta (çeşitli ilaçların üretiminde, vitamin takviyesinde, kanser tedavisi gibi alanlarda), sterilizasyon ve temizlik alanında (çeşitli fungusit, insektisit ve antiseptik maddelerin üretiminde), tarımda (zirai mücadele ilaçlarında, gübre yapımında) ve çeşitli endüstriyel alanlarda (cam, seramik, metal, kozmetik gibi) kullanılmaktadır (163).

Doğada bor çeşitli moleküller ile bileşikler yapmış halde bulunur. Bor atomları oksijene yüksek afinite göstermektedir. Borun oksijenle yaptığı bileşikler borat olarak isimlendirilir. Bor doğada en sık borat formunda bulunur. Boratlar arasında özellikle kalsiyum ve sodyum boratlar önemli yer tutar. Boratların diğer önemli bir formu ise borik asittir ve borun insanlarda ve hayvanlarda en sık gözlenen formudur (164). Borun çözümlü formları arasında en yaygın olarak görüleni borik asittir. Borik asit ( $H_3BO_3$ ); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıda ya da beyaz granüllü toz halinde bulunan bir Lewis asittir ve özgül ağırlığı  $1.43 \text{ gr/cm}^3$  tür (165). Borik asitin bilinen üç formu vardır. Bunlar orto, tetra ve meta borik asitlerdir. Borik asit olarak bilinen ve en yaygın görülen formu ortoborik asittir. Bu formlar ısının etkisiyle oluşmaktadır. Örneğin ortoborik asit  $100^\circ\text{C}$ 'nin üzerindeki sıcaklıklarda önce metaborik asite,  $160^\circ\text{C}$ 'nin üzerinde ise tetraborik asite dönüşmektedir (166). Borik asit doğada yaygın olarak bulunan bir mineral üründür ve geleneksel tıp uygulamaları yanında tarım, sanayi ve kozmetik sektöründe de sıklıkla kullanılmaktadır. Borik asit vücuda alındıktan sonra hızla absorbe edilir ve pasif difüzyon aracılığı ile tüm vücut sıvılarına dağılır. Bazı çalışmalar hem insan hem de sıçanlarda borik asitin kan doku dağılım oranının 1:1 olduğunu göstermektedir. Borik asit vücutta metabolize edilmez ve idrar yoluyla atılır. Vücuttaki yarı ömrü yaklaşık bir gün kadardır ve yumuşak dokularda birikim göstermediği tespit edilmiştir. Ancak buna karşılık borik asitin özellikle kemik dokuya karşı artmış affinitesi bulunmakta olup burada birikim gösterebilmektedir (167).

### 2.4.1. Borik Asitin Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

İnsanda günlük alınan bor miktarı, coğrafi koşullara bağlı olarak yerleşim bölgesi tarafından belirlenmektedir. Çünkü bor çoğunlukla beslenme esnasında gıdalarla veya su ile vücuda alınmaktadır. Bunun yanı sıra solunum ve deri yoluyla da alımı mümkündür. Bor miktarının yoğun olduğu sularda ve topraklarda yetişen ürünlerin tüketimi, alınan bor miktarını doğrudan etkileyen bir faktör olarak karşımıza çıkar. Günlük olarak beslenme sonucu alınan bor miktarı yaklaşık 2 mg kadardır (12). Beslenme ile alınan bor önce bağırsak mukozasında borik asite dönüşmekte ve ardından pasif difüzyon ile absorbe olmaktadır. Bor, kan dolaşımına da borik asit şeklinde transfer edilmektedir (166). Vücuda alınan borun %83-98'lik kısmı tüm dokulara borik asit olarak dağılmakta ve 96 saat içinde idrar yolu ile metabolize olmadan atılmaktadır (12). Boratların ve borik asitin metabolize olmamasının nedeni ise bor ve oksijen arasındaki kimyasal bağların koparılması için çok yüksek düzeyde enerjiye ihtiyaç duyulmasıdır (166). Borik asitin yaklaşık yarısı alımından sonraki ilk 12 saatte, kalan kısmı ise azalan oranlarda 7 gün içerisinde böbreklerden atılmaktadır (163). İnsan böbrek tübül hücrelerinin, voltaj kapılı Na<sup>+</sup> bağımlı NaBCl taşıyıcılar içerdiği ve plazma borik asit seviyelerinin bu şekilde kontrol edildiği bilinmektedir (168). Sağlıklı bir insanda kan borik asit miktarı, borun az bulunduğu bölgelerde tespit edilebilir en düşük düzey olarak 4.7 µM (48,5 µg) ve en yüksek düzey olarak da bor madeni işçilerinde 350 µM (3600 µg) olarak tespit edilmiştir (12).

Bor bitkiler ve bazı hayvanlar için esansiyel olmakla beraber, beslenme sırasında alınan miktarı ile insan için de faydalı etkilere sahiptir. Besin takviyesi ile bor alınımının insanlarda ve hayvanlarda çeşitli metabolik ve fizyolojik sistemler üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Bor, özellikle bazı minerallerin (Ca, P), vitamin D nin, bazı enzimlerin (aldehit dehidrojenaz, ksantin oksidaz, sitokrom b5 redüktaz), çeşitli hormonların (insülin, östrojen, testosteron ve tiroid hormonları), enerji substratlarının (trigliserid, glikoz) ve reaktif oksijen türlerinin metabolizmalarını etkilemektedir. Borun bu etkilerine aracılık eden biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak borun biyokimyasal ve fizyolojik etkilerini açıklamaya yönelik olarak iki farklı hipotez ortaya konulmaktadır. Bunlardan ilki borun hücre zarında hormon yanıtlarını ve transmembran sinyal

iletimini etkileyebileceği üzerinedir. İkincisi ise borun çeşitli enzimatik sistemleri düzenleyici etkileri olabileceğine yöneliktir. Ayrıca bor bileşikleri süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz düzeyleri üzerinden antioksidan sistemlere de etki etmektedir (169). İnsan sağlığına olan yararlı etkilerinin keşfi ile son yıllarda bor ve bileşikleri üzerine yürütülen çalışmaların sayısında artış gözlenmektedir. Bor ve bileşiklerinin özellikle üreme sistemi üzerine belirgin etkileri olduğu bilinmektedir. Bu etkileri endokrin sistem üzerinden gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Sıçanlarda yapılan araştırmalarda *in vivo* koşullarda borik asitin östrojen benzeri etkileri olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, MCF7 meme kanseri hücre hatları ile gerçekleştirilen çalışmalar ile *in vitro* koşullarda bu etki doğrulanamamıştır (170).

Özellikle diyetle alınan bor, kemik sağlığını olumlu yönde etkilemekte, bazı steroid hormonlar ile etkileşmekte, dolaşımdaki 25 hidroksikolekalsiferol ve 17  $\beta$ -estradiol miktarını artırmaktadır. Bor ve bileşiklerinin inflamasyonda ve immun sistemde rol oynayan eikozonoid yolağı ile ilgili çeşitli enzimlerin *in vitro* aktiviteleri üzerine etkileri olduğu da bilinmektedir. Ayrıca, lipid metabolizması üzerine etkileri ile LDL, trigliserid ve kolesterol düzeylerini düşürdüğü HDL'yi ise artırdığı gösterilmiştir (13). Borik asit toksik olmayan bir ajan olarak sınıflandırılmaktadır. Sıçanlarda oral LD<sub>50</sub> dozu 4 g/kg'dan, subkutanöz LD<sub>50</sub> dozu ise 1 g/kg'dan fazla olarak belirlenmiştir (171). Fransa'da yetişkin sağlıklı bir insanın günde 7 mg kadar bor aldığı saptanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü günlük alınabilecek bor miktarını uzun yıllar 1-3 mg ile sınırlamıştır. Ancak son yıllarda yürütülen çalışmalara dayanarak 1996'da bu miktar 1-13 mg/gün olarak yükseltilmiştir (172). Kısa sürede çok yüksek dozda maruziyete bağlı olarak depresyon, konvulsiyon ve ataksi gibi belirtiler ortaya çıkabilir. Bununla birlikte borun özellikle üreme sistemini etkilediği ve hamilelikte yüksek dozlarda gelişimsel anomalilere neden olabileceği bildirilmiştir (12).

#### **2.4.2. Borik Asit ve Kanser Tedavisi**

Doğal bileşikler günümüzde kanser tedavisi için oldukça önemli potansiyel kaynaklardır. Bunlar arasında en önemli adaylardan biri de bor ve bileşikleridir. Bor doğal olarak meyve ve sebzelerde, ayrıca içme suyunda bulunmaktadır ve bu nedenle normal günlük bir diyetin parçasıdır. Diyet ile ortalama 15  $\mu$ M kadar borik asit alındığı

tahmin edilmektedir. Borun plazmada dolaşan formu olan borik asitin kemoterapotik olarak kullanılabilirliğini araştırmak üzerine çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmaları olumlu yönde destekleyen en önemli etken, borik asitin bazı önemli kimyasal özelliklerinin kanser tedavisinde etkili olabileceğini gösteren verilerdir. Borik asit kimyasal olarak zayıf bir Lewis asittir ve yapısal özellikleri karbon atomuna benzemektedir. Bu nedenle karbon içerikli birçok substratın yarışmalı inhibitörü olarak davranabilmektedir. Bu özelliği ile borik asit peptidaz, proteaz, proteozomaz, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi birçok enzimi etkili bir şekilde inhibe edebilmektedir. Bu farmakolojik özelliklerinin yanı sıra; kolay elde edilmesi, düşük toksisite düzeyi, kısa süre içerisinde idrar ile metabolize edilmeden atılımı gibi kanser tedavisi açısından ilgi çeken önemli özelliklere de sahiptir (11).

Bazı epidemiyolojik çalışmalara ait veriler de borik asitin anti-kanserojen etkileri olabileceğine işaret etmektedir. Örneğin, borun diyetle alınımının prostat kanserine karşı koruyucu etkileri olduğuna dair epidemiyolojik veriler bulunmaktadır. Özellikle borik asitin diyet yoluyla yoğun olarak alındığı bölgelerde prostat kanseri görülme oranlarında anlamlı bir azalma söz konusudur. Bunun yanı sıra prostat kanser hücresi enjekte edilen deney hayvanlarında borik asit kullanımının tümör oluşumunu azalttığı görülmüştür (173). Bu bulgu borik asitin nude farelere verilen LNCaP prostat kanser hücrelerinin gelişimini inhibe etmesi ile de desteklenmiştir (165). Borik asit, fizyolojik doz aralığında, doz bağımlı olarak LNCaP ve Du 145 prostat kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe etmektedir. Borik asit hücresel düzeyde bu kanser hücrelerinde siklik ADP riboz ile aktive olan, endoplazmik retikulumdan  $Ca^{+2}$  salınımını inhibe etmekte ve bu organeldeki lüminal  $Ca^{+2}$  konsantrasyonlarını düşürmektedir (12).

Alvin ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise borik asitin SK-MEL28 insan deri melanoma hücre hatlarında, hücrelerin biyokimyasal yapısını değiştirdiği gösterilmiştir. Buna göre düşük dozlarda borik asit varlığında hücrelerde nükleik asit/protein oranında bir artış görülmektedir ve bu durum hücrelerin aktif olarak replike olduğuna işaret etmektedir. Buna karşılık lipid ve protein içerikte herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Yüksek doz borik asit uygulamasında ise nükleik asit/protein oranı düşük olarak tespit edilmekte ve aktif replikasyonun olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte yüksek dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma



olmaktadır ve borik asitin melanoma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir (14). Bu etkinin ise doz bağımlı olarak, pre-mRNA kesiminin ikinci aşamasını geri dönüşümlü olarak inhibe olması ile gerçekleştiği ifade edilmektedir (14).

Bor ve bileşiklerinin sahip olduğu anti-tümorojenik etkilerin moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak üzerinde en çok durulan muhtemel etki mekanizmalarından biri, karşıt bulguların da varlığı ile birlikte; kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasıdır. Bu açıdan bakıldığında örneğin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine borik asit uygulaması ile yapılan bir çalışma bu hücrelerde borik asitin, proliferasyonu doz bağımlı bir şekilde azalttığını ve bunu da apoptozu uyararak gerçekleştirdiğini göstermektedir (13). Ancak bunun yanı sıra hem MDA-MB-231 meme kanseri hem de Du-145 prostat kanseri hücre hattı ile yapılan farklı çalışmalarda ise borik asitin hücre çoğalmasını apoptozu uyarmadan inhibe ettiği vurgulanmaktadır (13). Bu çalışmaların sonuçlarına göre hücreler borik asit etkisi ile yaşlı bir fenotipe dönüşmekte ve siklin A-E ve mitojen aktive protein kinaz proteinlerinde bir azalma görülmektedir (13). Bunun yanı sıra yine prostat kanser hücreleri ile yapılan çalışmalar borik asitin kanser hücrelerinin göçünde anahtar rol oynayan sinyal ağlarının güçlü bir inhibitörü olduğunu ortaya koymaktadır (174).

Prostat spesifik antijen (PSA) prostat dokusu tarafından üretilen kimyasal olarak tripsin benzeri bir serin proteazdır. Normalde prostat salgısına eklenen bu bileşik kanda çok düşük düzeylerde bulunur. Ancak prostat kanserinde serumdaki PSA düzeyleri belirgin oranda artmaktadır. İlginç bir şekilde PSA, IGFBP-3'ü (Insulin like Growth Factor Binding Protein 3) parçalayarak IGF (Insulin like Growth Factor) oluşumuna neden olmaktadır. IGF de prostat kanser hücrelerinde mitojenik yeteneği artırmaktadır. Özgül olmayan serin proteaz inhibitör özellikleri bilinen borik asitin, PSA aktivitesini geri dönüşümlü olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu özelliğin keşfi ile de borik asitin prostat kanser hücreleri üzerindeki etkilerine aracılık eden farklı bir mekanizma daha ortaya çıkarılmıştır (175). Yine prostat kanseri ile yapılan farklı çalışmalar da borik asitin prostat kanser hücre hatlarında hücre çoğalmasını inhibe ettiğini, ancak bu etkiyi hücre siklusunda bir değişiklik oluşturmadan ve hücre ölümüne neden olmadan ortaya çıkardığını göstermektedir (168).

Bunlardan farklı olarak borik asitin hücrelerde HDAC'ı da (Histone Deacetylase) inhibe ettiği gösterilmiştir. HDAC'lar nükelozomların ve dolayısı ile gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde önemli role sahip enzimlerdir. Histon kuyruklarındaki lizin rezidülerini deasetilleyerek transkripsiyonel baskılamaya yol açarlar. HDAC'ları inhibe eden ilaçlar ise hücre büyümesini inhibe ederken hücreleri terminal farklılaşma yönünde uyarır ve kanser gelişimini önleyici bir etki gösterir. Deneysel hayvanlar embriyoları ile yapılan çalışmalar borik asitin HDAC'ı belirgin bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu etki aynı zamanda borik asitin kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden alternatif bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir (176).

Sonuç olarak, bor ve borik asit anti-kanserojen bir ajan olarak iyi bir adaydır. Çünkü borik asit doğal olarak zaten kanda bulunmaktadır, günlük diyetin bir parçasıdır, diyetle alım sonrası hızlı bir şekilde absorbe olarak yeterli bir plazma düzeyine ulaşır ve tüm dokulara dağılım gösterir. Ayrıca hücre kültürü, hayvan deneyleri ve epidemiyolojik çalışmalar çeşitli kanser hücreleri üzerine borik asitin antiproliferatif etkileri olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır (168).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın hücre kültürü kısmı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında, immunohistokimyasal kısmı Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Gen ekspresyon çalışmaları ise Roche firması bünyesindeki Moleküler Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Cihazlar

DeneySEL çalışmalarda kullanılan cihazlar tablo 5’de belirtilmiştir.

**Tablo 5.** Kullanılan cihazların listesi, marka-modeli ve kullanım yeri.

Cihaz	Markası	Kullanım Yeri
+4 °C Buzdolabı	Siemens	Hücre Kültürü Laboratuvarı/Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
-20 °C Buzdolabı	Samsung	Hücre Kültürü Laboratuvarı
-80 °C Buzdolabı	U 410 Premium	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Binoküler Işık Mikroskopu	Olympos Cx21	Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
CO <sub>2</sub> ’li inkübatör	Hela-Force Smart Cell	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Etüv	Heareus	Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
Fotomikroskop Görüntüleme Sistemi	Nikon Eclipse/DS Ri2	Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
Hassas Terazi	Ohaus	Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
İnverted Mikroskop	Olympos CKX41	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Laminar Akım Kabini	Bilser	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Mikrodalga Fırın	MD1500	Histoloji Araştırma Laboratuvarı
Mikrotom	Leica RM2125	Histoloji Araştırma Laboratuvarı

<b>Cihaz</b>	<b>Markası</b>	<b>KullanımYeri</b>
Pipet pompası	Isolab	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Pipetörler	Eppendorf	Hücre Kültürü Laboratuvarı/Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
Real Time PCR	LightCycler 96 Real Time PCR system	Moleküler Genetik Laboratuvarı
Santrifüj	Nüve CN180	Hücre Kültürü Laboratuvarı
Spektrofotometre	Nanodrop 2200	Moleküler Genetik Laboratuvarı
Su Banyosu	Leica H11210	Hücre Kültürü Laboratuvarı/Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı
Vorteks	Nüve Nm110	Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarı

(Tablo 5 devamı)

### 3.1.2. Kültürde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda SW-480 insan kolon adenokarsinom (DSMZ no: ACC 313) hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonundan (DSMZ) sağlanmış ve dondurularak yedeklenmiştir.

SW-480 hücre hattı, 50 yaşındaki Grade 4 (Duke class B) kolon adenokarsinomu olan Kafkas bir kadından elde edilmiştir. Morfolojik olarak endotelial benzeri adherent hücreler olup monolayer kültür ortamında çoğunlukla bipolar karakterdedir. Katlanma zamanı yaklaşık olarak 25-30 saat olan hücreler, genetik olarak %12 poliploidi ile hipertriploid karyotipe sahiptir.

### 3.1.3. Hücre Kültüründe Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar tablo 6’da listelenmiştir.

**Tablo 6.** Hücre kültüründe kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar listesi.

Sarf Malzeme/Kimyasal Adı	Markası/Menşei	Katalog Numarası
0,2 µm Enjektör Filtresi	CORNING® (A.B.D.)	431219
Agar	BD® (A.B.D.)	214030
Borik Asit	SIGMA® (A.B.D.)	B6768-5006
Cryogenic Vial	CORNING® (A.B.D.)	430659
DMSO	MERCK® (A.B.D.)	1.167.431.000
1,5 ml tüp	AXYGEN® (A.B.D.)	MCT-150-C
Santrifüj Tüpü 15 ml	AXYGEN® (A.B.D.)	SCT-15ML-255
Santrifüj Tüpü 50 ml	AXYGEN® (A.B.D.)	SCT-50ML-255
Fetal Sığır Serumı	LIFE TECH® (A.B.D.)	10270106
Flask 75cm <sup>2</sup>	CORNING® (A.B.D.)	430641
Kültür Kabı 24 kuyucuklu	CORNING® (A.B.D.)	3524
Kültür Kabı 6 kuyucuklu	CORNING® (A.B.D.)	3516
Penisilin/Streptomisin	LIFE TECH® (A.B.D.)	15070063
RPMI 1640 Medyum (L-Glutaminli)	LIFE TECH® (A.B.D.)	21875034
Steril Pasteur pipeti 2,5 ml	LP® (İtalya)	L134038
Steril PBS w/o Ca/Mg	LIFE TECH® (A.B.D.)	14190094
Tek kullanımlık steril pipet 10 ml	CORNING® (A.B.D.)	4488
Tripan Mavisi	ALFA EASER® (A.B.D.)	A18600
Tripsin (% 0,25)	LIFE TECH® (A.B.D.)	15050065

### 3.1.4. İmmünohistokimyasal Çalışmalarda Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

İmmünohistokimyasal deneylerde kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar tablo 7’de belirtilmiştir.

**Tablo 7.** İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar listesi.

Sarf Malzeme/Kimyasal Adı	Markası/Menşei	Katalog Numarası
Anti AIF Primer Antikor	THERMO® (A.B.D.)	PAS-17638
Apoptag Plus Apoptosis Kit	MILLIPORE® (A.B.D.)	57101
Asetik asit	MERCK® (A.B.D.)	1000631000
BrdU Boyama Kiti	THERMO® (A.B.D.)	933943
Etanol	SIGMA® (A.B.D.)	1.009.712.500
HCl	MERCK® (A.B.D.)	1090631000
Hematoksilen	SIGMA® (A.B.D.)	MHS1-100ML
Hidrojen Peroksit	TEKKİM® (Türkiye)	TK.080220.01001
İmmünoopen lam hidrofobik işaretleme	SIGMA® (A.B.D.)	Z672548-1EA
Kapatıcı (Aqueous-Mount)	VECTOR® (A.B.D.)	H-5501-60
Anti Kaspaz 3 Primer Antikor	THERMO® (A.B.D.)	PAS-16335
Ksilol	MERCK® (A.B.D.)	130-20-7
Metanol	MERCK® (A.B.D.)	67-56-1
Metil green	MERCK® (A.B.D.)	7114-03-6
N-Butanol	MERCK® (A.B.D.)	71.36.3
Parafin	TEKKİM® (Türkiye)	TK.200661.01002
Polilizinli Lam	THERMO® (A.B.D.)	J7800AMNT
Rodajlı Lam	THERMO® (A.B.D.)	J5800AMNT
Sitrat Tamponu	SIGMA® (A.B.D.)	C9999-1000ML
Tablet PBS	INVITROGEN® (A.B.D.)	003002
Ultra Ab Diluent	LIFE TECH® (A.B.D.)	3118
Ultra V blok	SCYTEK® (A.B.D.)	AAA125
Ultravision Detection System	THERMO® (A.B.D.)	TL-060.QHD
Yuvarlak Lamel	SUPERIOR® (Almanya)	C911350

### 3.1.5. Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan sarf malzeme ve kimyasallar tablo 8’de belirtilmiştir.

**Tablo 8.** Gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan sarf malzeme/kimyasal listesi.

Sarf Malzeme/Kimyasal Adı	Markası	Katalog Numarası
“FastStart Essential DNA Probes Master”	Roche® (Almanya)	6402682001
HP RNA İzolasyon Kiti	Roche® (Almanya)	11828665001
“RealTime ready Apoptosis Panel”, İnsan 96 Gen	Roche® (Almanya)	5392063001
“Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis” Kiti	Roche® (Almanya)	4379012001

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında araştırma laboratuvarı ve hücre kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonundan (DSMZ) sağlanan CCL-228-SW-480 (DSMZ no: ACC 313) kolon kanseri hücre hattı kullanıldı.

CCL-228-SW-480 hücreleri için besi ortamı, %90 RPMI-1640 (L-glutaminli), %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin olarak hazırlanmıştır.

Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm<sup>2</sup> ve 75 cm<sup>2</sup>’lik flasklarda, iç ortamı %5 CO<sub>2</sub>, %95 hava karışımı ve nem içeren ve 37°C olan inkübatör içinde tutularak ve haftada 3 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Hücre pasajları için laminar akım kabini, hücre kültürleri incelemeleri için invert mikroskop, stokların depolanması için -80°C derin dondurucu kullanıldı.

### **3.2.1.1. Hücre Hattının Açılması**

Hücreler üretici firma tarafından soğuk zincir prosedürüne uygun olarak laboratuvarımıza ulaştı ve çözündürme işlemi uygulandı. Bunun için hücreler çözünmesi sağlanana dek 37°C'lik su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne alınarak üzerine 1-2 ml %10 serumlu medyum ilave edildi ve 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra DMSO (Dimetil Sülfoksit)'nun etkisinden kurtarmak amacıyla tekrar 1-2 ml %10 serumlu medyumla 2 defa 1500 rpm'de 1-2 dk daha santrifüj edildi. Pellete az miktar %10 serumlu medyum eklenerek yavaşça pipetajlandı ve medyum konulmuş flaslara ekim yapıldı.

Hücrelerin takibi ve dondurulması için kullanılan medyum içerikleri şu şekilde hazırlandı;

- Hücre Kültür Medyumu İçeriği;  
%90-95 RPMI-1640 (L-glutaminli), %5-10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin  
Hücre çoğalma hızı değerlendirilerek, FBS oranı hücrelerin çözündürülmesi sonrasındaki ilk pasajlar haricinde çoğunlukla %5 olarak düzenlenmiştir.
- Dondurma Medyum İçeriği;  
%70 RPMI-1640 (L-glutaminli), %20 FBS, %10 DMSO

### **3.2.1.2. Hücrelerin Çoğaltılması**

Hücreler, 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslarda 5 ml, 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslarda ise 10 ml %10 FBS ve 100 IU/ml penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 (L-glutaminli) medyumunu içerisinde %80-90 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.



### 3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Bu işlem için; flasklar içerisinde %80-90 yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırdı. Hücrelerin üzerine %0,05'lik tripsinden küçük flasklara (25 cm<sup>2</sup>) 1-2 ml, büyük flasklara (75 cm<sup>2</sup>) 3-5 ml eklenerek, 37°C'lik CO<sub>2</sub> etüvde bekletildi ve kontrollü kalkmaları sağlandı. Yüzeyden ayrılan hücelere tripsinle aynı miktarda medyum ilave edilerek tripsinin etkisi bloke edildi ve santrifüj tüpüne süspansne halde toplanan hücreler 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatantı uzaklaştırdı. Bir miktar medyumla süspansne edilen hücreler medyum konulmuş flasklara ekildi. Flasklar 37°C'lik % 5 CO<sub>2</sub>'li etüve kaldırıldı.

### 3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Dondurarak saklama işlemi, hücrelerin çoğaltılması esnasında ihtiyaç durumuna göre planlandı ve gerçekleştirildi. Pasajlama esnasındaki basamaklara benzer şekilde konfluent olan hücreler önce tripsinle kaldırıldı. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen pelet besiyeri ile homojenize edildi. Ardından canlılık kontrolü ve hücre sayımı için örnek alındı. Örneğe, tripan mavisi eklenerek hemositometre kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi. Daha önceden hazırlanmış olan ve %20 FBS, %10 DMSO içeren dondurma medyumunu ile hücreler kriyo tüplere aktarıldı. Bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Hücreleri, hızlı donma sonucu hücre içindeki suyun kristalizasyonu nedeniyle meydana gelebilecek hasarlardan korumak için yavaş dondurma prensipleri uygulandı. Daha sonra kriyo tüpler dondurma prosedürünü takiben -80°C de derin dondurucuda muhafaza edildi.

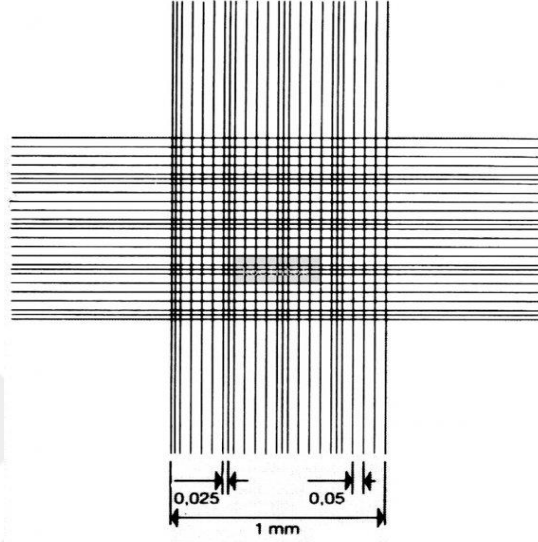
### 3.2.1.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için, elde edilen hücre süspansiyonlarından bir miktar örnek alındı ve tripan mavisi ilave edildi. Ardından hemositometreye yüklenen örnek ışık mikroskopunda sayıldı (Şekil 13). Sayım kamarasında 16 küçük kareden oluşan 4 alan sayılarak hücre sayısı formülüne edildi ve 1 ml hacimde bulunan hücre sayısı hesaplandı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu (177).

Toplam hücre sayısı/ml = Hemositometre sayım sonucu x 10<sup>4</sup> x Medyum miktarı (ml)

Daha açık bir ifadeyle;

$$\text{Toplam hücre sayısı} = \frac{\text{Sayılan Hücre}}{\text{Sayılan Kare}} \times 10^4 \times \frac{1}{\text{Seyreltme Oranı}} \times \text{toplam hacim}$$



Şekil 13. Hemositometre sayım alanı (178).

### 3.2.1.6. Doz Belirleme Deneyi

Doz belirleme deneyi için 75 cm<sup>2</sup> lik flaklarda çoğaltılan hücreler kullanıldı. Hücreler pasajlama esnasındaki basamaklara benzer uygulamalarla kaldırıldı. Ardından hücreler; santrifüj işlemi ve elde edilen pellete medyum ilavesi ile süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan alınan örnek tripan mavisi ile boyanarak sayıldı ve mililitredeki hücre sayısı tespit edildi.

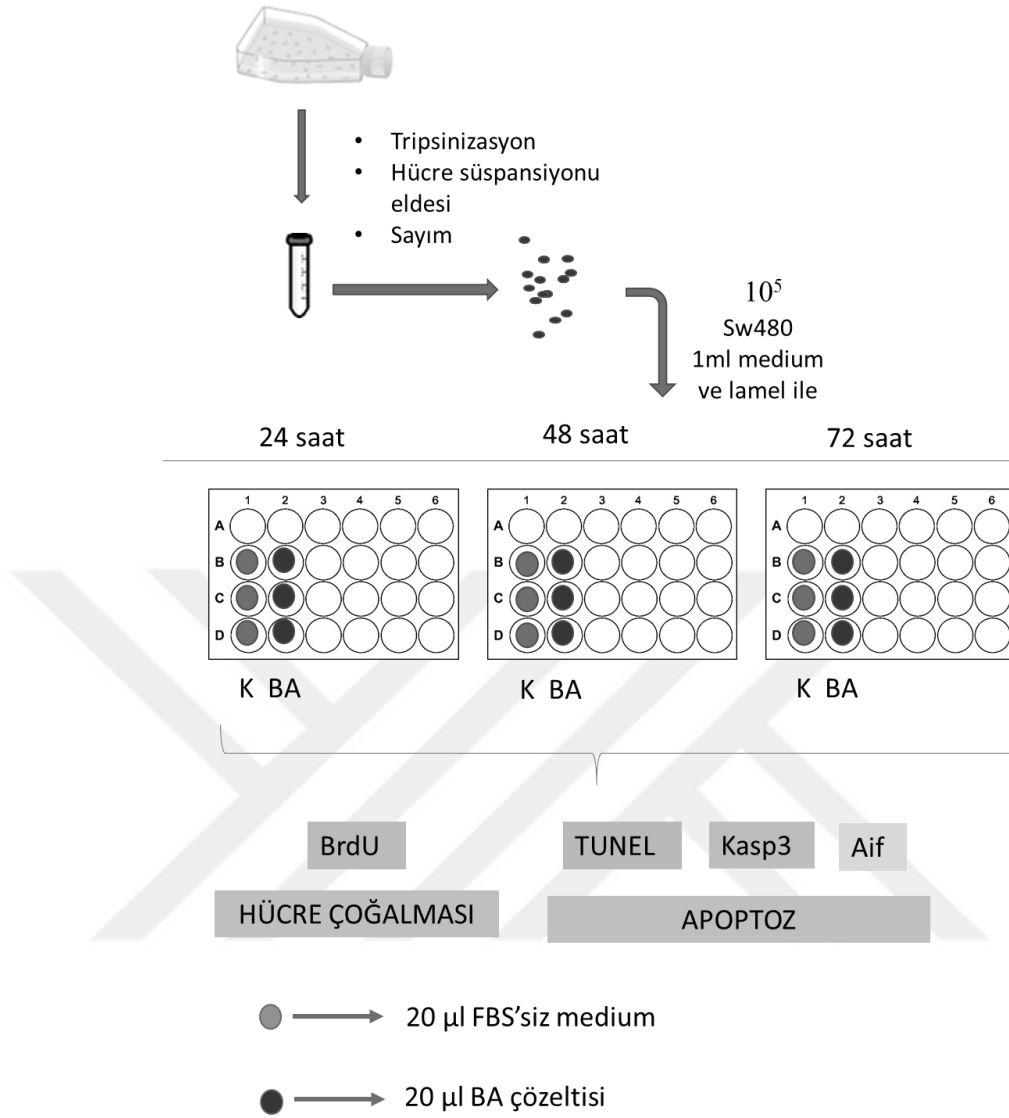
Deneyler için 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Eldeki hücre süspansiyonundan 500.000 CCL-SW-480 hücresi 5 ml RPMI 1640 medyum içeren kuyucuklara ekildi. Literatür taraması ve değerlendirmeler sonucunda borik asit için 10, 12.5, 25, 50, 75, 100 mM konsantrasyonlarında olmak üzere 6 doz aralığı belirlendi. Bu amaçla uygun miktarda borik asit, serum içermeyen medyuma çözdürüldü ve final hacmi 100 µl olacak şekilde kuyucuklara uygulandı. Her bir doz için 3'er kuyucuğa ve 24., 48. ve 72. saatler için ekilerek 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve uygun



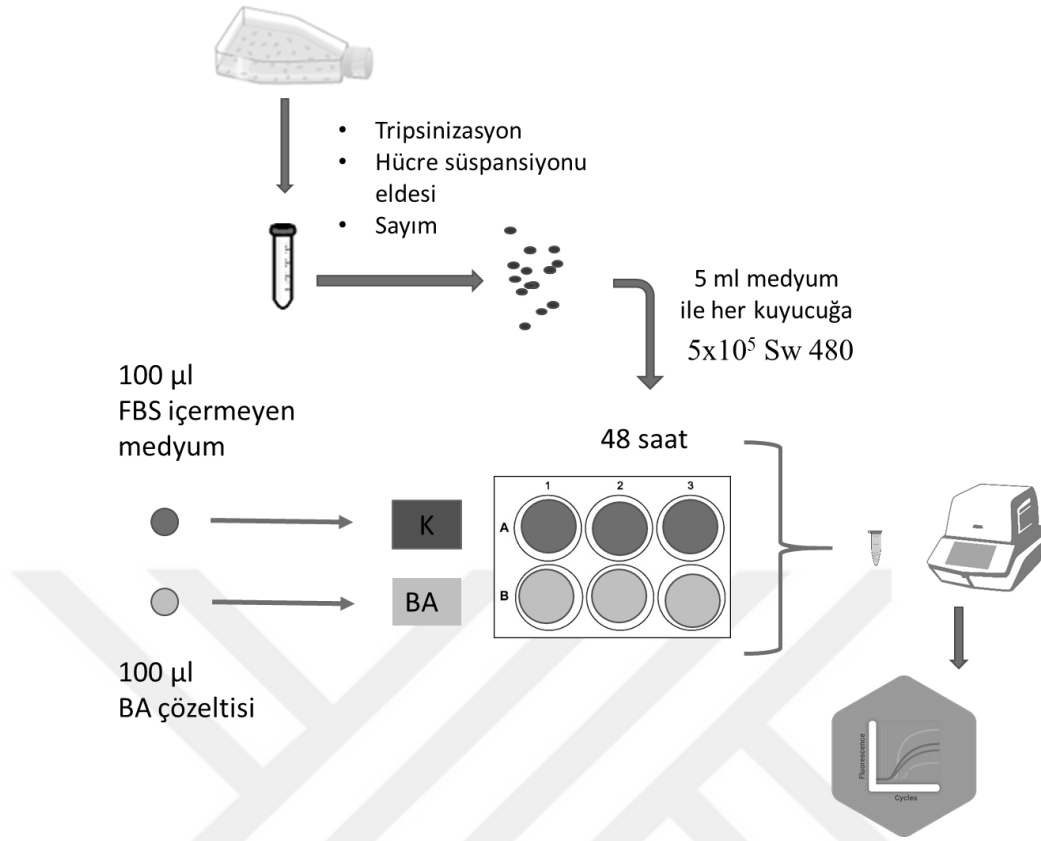


olarak belirlenen konsantrasyonda borik asit çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 20 µl, borik asit (BA) kuyucuklarına eklenirken aynı miktarda serum içermeyen medyum K (kontrol) kuyucuklarına eklendi. Deney planı 24., 48. ve 72. saatler için uygulanacak şekilde dizaynedildi. Hem K grubu hem de BA grubunda belirlenen saatler için 3'er örnek kullanıldı. İlgili deney planına ait şema şekilde görülmektedir. Ardından farklı immunohistokimya çalışmaları için ilgili süreler sonunda gerekli protokoller uygulandı (Şekil 16).

Gen ekspresyon çalışmaları için ise 6 kuyucuklu kültür kapları kullanıldı. Gen ekspresyon çalışmaları için bütçe kapsamında ve doz belirleme deneyinden elde edilen veriler ışığında sadece 48. saat örnekleri çalışılacağından dolayı tek bir kültür kabı yeterli oldu. Her biri üç örnek içeren kontrol grubu (K) ve borik asit grubu (BA) olmak üzere iki grup oluşturuldu. 5 ml besi yeri içeren kuyucuklara 500.000 hücre ekildi ve hücrelerin yapışması için beklendi. Doz belirleme deneyinde etkin doz olarak belirlenen konsantrasyonda borik asit çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 100 µl, borik asit (BA) kuyucuklarına eklenirken aynı miktarda serum içermeyen medyum K (kontrol) kuyucuklarına eklendi. 48. saatin sonunda genetik çalışma protokollerine geçildi (Şekil 17).



**Şekil 16.** İmmünohistokimyasal çalışmalar için iki boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması.



**Şekil 17.** Gen ekspresyon çalışmaları için iki boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması.

### 3.2.1.9. Üç Boyutlu Kültür Ortamının Hazırlanması, Bakımı ve Takibi

Tek tabakalı kültürdeki hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdukları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık olduğu, tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle üç boyutlu hücre kültürlerinin (sferoid) *in vivo* katı tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıttığı düşünülmektedir. Çalışmamızda SW-480 çok hücreli tümör sferoidleri üretimi için sıvı üst tabaka yöntemi kullanıldı (179). Üç boyutlu kültür ortamında oluşturulan sferoidler hem immunohistokimya çalışmaları hem de genetik çalışmalar için kullanılmıştır.

Sıvı üst tabaka yöntemi için; sıcak su içerisinde eritilmiş %3 agar solüsyonu ( $60^{\circ}\text{C}$ ) ve medyum ( $40^{\circ}\text{C}$ ) karışımı  $\frac{1}{4}$  oranında hazırlandı ve kuyucuklara (6'lı kültür kapları kullanıldı.) bu karışımdan 1 ml konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı.

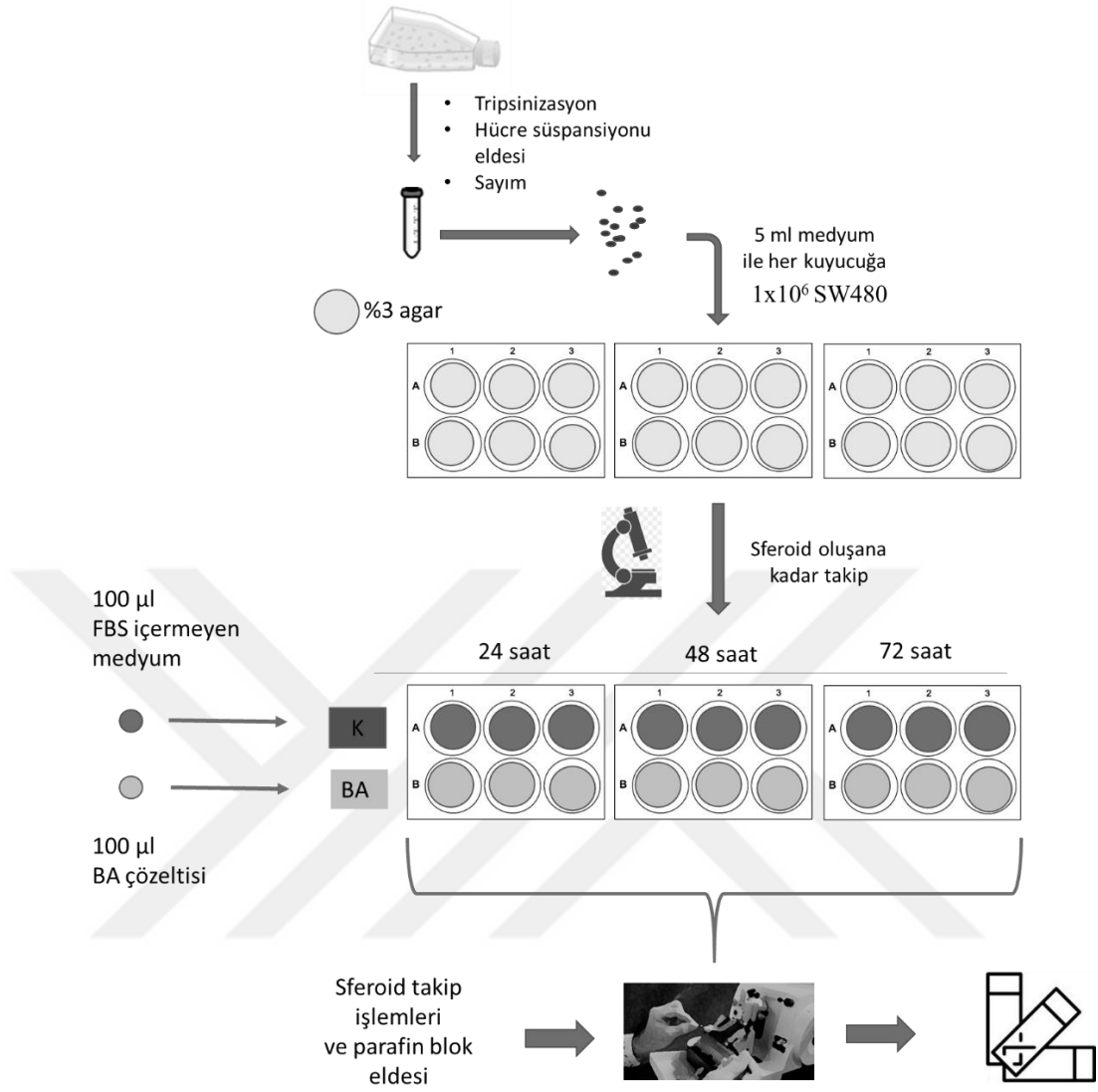
Agarın donması için kültür kapları 10 dk buzdolabında 4°C’de bekletildi. Agarın donmasını takiben üzerine 5 ml medyum eklendi.

Hücreler doz inaktivasyon deneyinde bahsedilen hücre toplama tekniğiyle toplandı ve her bir kuyucuğa 1.000.000 hücre ekildi. Hücreler daha sonra 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve uygun miktarda nem ihtiva eden inkübatöre kaldırılarak günlük ışık mikroskobu incelemeleri ile sferoid oluşum durumları takip edildi.

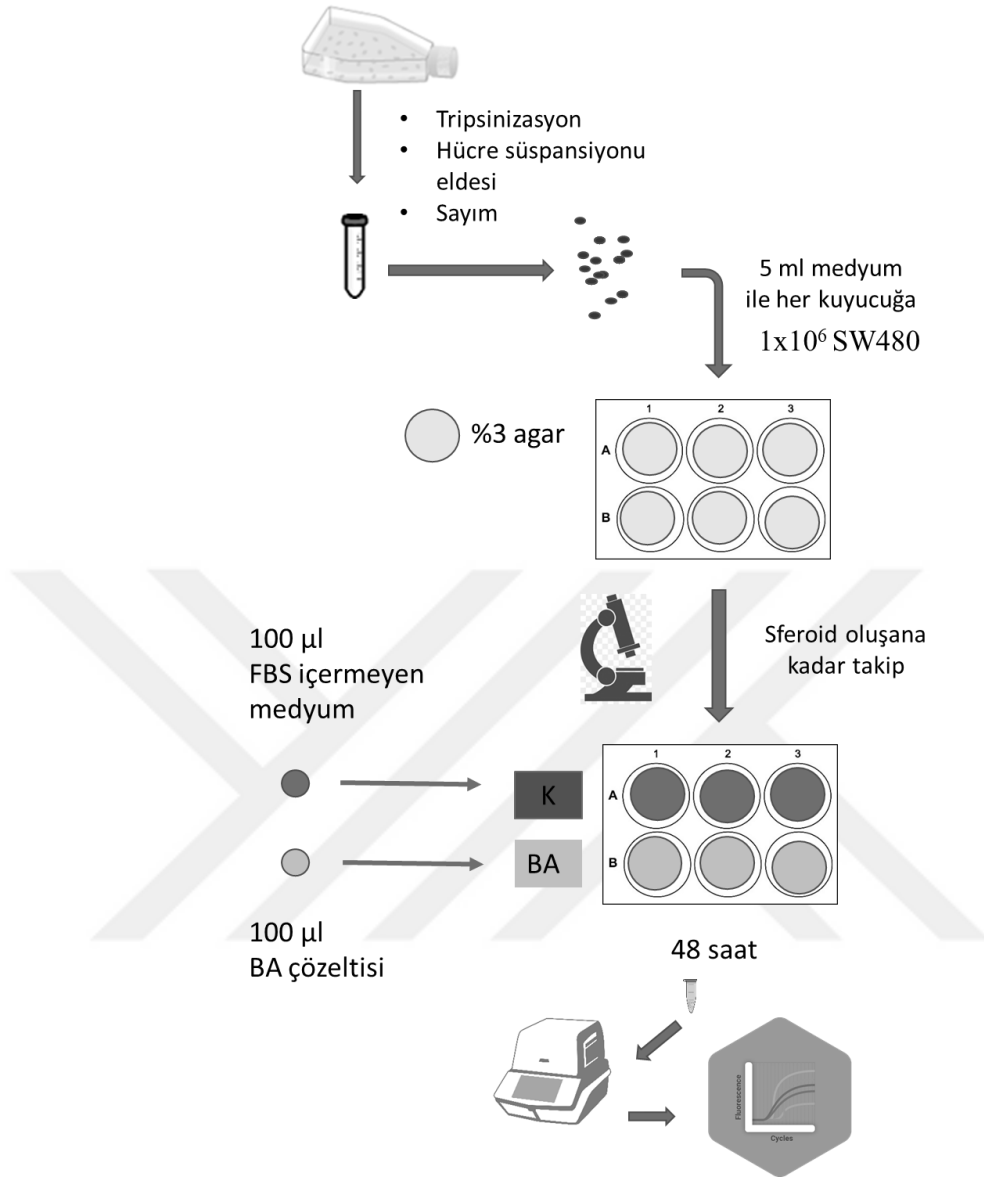
Sferoidler 100-400 mikrona ulaştıktan sonra immunohistokimyasal çalışmalar için 24., 48. ve 72. saat olarak üç aşamalı deney planları hazırlandı. Her bir aşama için hem K hem BA grubu üçer örnek olarak çalışıldı. BA grubuna 100 µl borik asit çözeltisi (doz belirleme deneyinde belirlenen konsantrasyonda), kontrol grubuna ise aynı miktarda serum içermeyen medyum uygulandı. Ardından ilgili sürelerin sonunda sferoid takip işlemleri ve farklı immunohistokimyasal boyamaların gerektirdiği işlemler uygulandı (Şekil 18). Burada da sadece BrdU çalışmasına ait örneklere takip işlemi öncesinde farklı bir prosedür uygulandı. BrdU için takip edilecek sferoidler öncelikle; ilgili sürenin sonunda kuyucuklarda 2 ml medyum kalacak şekilde fazla medyum uzaklaştırıldı. Ardından her bir kuyucuğa 100’er µl BrdU çözeltisi uygulandı ve her 15 dk da bir çalkalanarak 1 saat 37 °C inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sferoid takip işlemleri uygulandı.

Gen ekspresyon çalışmaları için ise her biri üç örnek içeren K ve BA olmak üzere iki grup oluşturuldu. BA grubuna 100 µl borik asit çözeltisi (doz belirleme deneyinde belirlenen konsantrasyonda), kontrol grubuna ise aynı miktarda medyum uygulandı. 48. saatin sonunda sferoidler toplandı, takip işlemleri uygulanmadan gen ekspresyon çalışmaları için hazırlandı (Şekil 19).





**Şekil 18.** İmmünohistokimyasal çalışmalar için üç boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması.



**Şekil 19.** Gen ekspresyon çalışmaları için üç boyutlu kültür ortamının hazırlanmasına ait deney şeması.

İmmunohistokimyasal boyamalar için sferoid takip işlemleri;

- Sferoidler toplanarak santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 rpm’da 1 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. 1 ml PBS eklendi, inkübatörde 15 dk bekletildi.
- 1000 rpm’da 1 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pelete 1 ml %10 luk formaldehit eklenerek oda ısısında 30 dk sferoidler fikse edildi.

- 1000 rpm’da 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Pelete 1 ml PBS eklendi. Pipetaj yapılarak sferoidler 1,5 ml’lik tüpe aktarıldı.
- 1000 rpm’da 1 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pelet üzerine yumurta akı eklendi ve 3000 rpm’da 5 dk santrifüj edildi.
- Pelet üzerindeki süpernatanın bir kısmı uzaklaştırılarak %70’lik etil alkol eklendi ve yapı sertleşene kadar oda ısısında bekletildi.

Yeterli süre bekletilen örnekler ışık mikroskopik inceleme yapılabilmesi için aşağıdaki işlemlerden geçirildi;

- 1,5 ml’lik tüp içerisinde sertleşen yapılar çıkarıldı. Ardından;

% 70’lik Alkolde	30 dk	} 65°C etüvde
% 90’lık Alkolde	30 dk	
% 96’lık Alkolde	30 dk	
% 100’lük Alkolde	30 dk	
% 100’lük Alkolde	30 dk	
Ksilolde	45 dk	→ oda ısısında
Parafinde	1 saat	→ 65°C etüvde bekletildi

- Erimiş parafin içerisine gömüldü ve parafin bloklar elde edildi.

### 3.2.2. İmmünohistokimyasal Çalışmalar

İki boyutlu kültürdeki immünohistokimyasal çalışmalar öncesinde yukarıda belirtilen yöntemlerle kültür ortamları hazırlandı. Her bir immünohistokimyasal boyama işlemi için aşağıda belirtilen protokoller uygulandı.

Üç boyutlu kültür çalışmalarının öncesinde ise sferoidler yukarıda anlatılan yöntemlerle oluşturuldu, takip edildi ve parafin bloklar oluşturuldu. Her bir immünohistokimyasal inceleme öncesinde ilgili parafin bloktan, 4 mikron kalınlığında kesitler elde edildi ve polilizinli lama alınarak gerekli boyama protokollerine geçildi

### 3.2.2.1. İki Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24., 48. ve 72. saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37°C’de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda aşağıdaki protokol uygulandı;

- Kuyucuklardaki medyum aspire edilerek atıldı.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı.
- Tespit işlemi için %70’lik etanol eklenerek, 4°C de 30 dk inkübe edildi.
- Endojen peroksidaz aktivitesini sonlandırmak için 10 dk metanol ile hazırlanmış %3’lük hidrojen peroksit uygulandı.
- Distile su ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı.
- Denaturasyon solüsyonundan yaklaşık 100 µl damlatılan lameller, 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkandı.
- 100’er µl “Blocking” solüsyonu uygulandı ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Yıkama yapılmadan 100’er µl biyotinli fare anti-Brdu (primer antikor) uygulandı, oda ısısında 60 dk inkübe edildi.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkandı.
- Streptavidin peroxidase ile 5 dk bekletildi.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkandı.
- DAB (3,3’-Diaminobenzidine) kromojen sıvısı hazırlanarak kesitlere uygulandı ve 3 dk karanlık ortamda oda ısısında inkübe edildi.
- Distile su ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı.
- Karşıt boyama için kit tarafından sağlanan hemotoksilen solüsyonu kullanıldı.
- Kesitler alkol serileri ile dehidrate edildi.
- Lamalar “Histamount” ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

### 3.2.2.2. İki Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu

Bu işlem için “ApopTag Plus Peroxidase in situ apoptosis kit (Millipore)” kullanıldı. 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda şu protokol uygulandı;

- Fiksasyon için kuyucuk içlerindeki medyum atıldı
  - PBS ile hazırlanan ve pH sı 7,4 olan %1’lik formaldehit eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
  - PBS ile 2 x 5 dk yıkama yapıldı.
- 2:1 oranında etanol-asetik asit karışımı ile -20°C’de 5 dk bekletildi.
- PBS ile 2 x 5’er dk yıkama yapıldı.
- Endojen peroksidaz aktivitesinin nötralizasyonu için %3’lük hidrojen peroksit ile oda ısısında 5 dk inkübe edildi
- PBS ile 2 x 5 dk yıkama yapıldı.
- Kit içeriğindeki “Equilibration Buffer” (dengeleme tamponu) 10 sn uygulandı.
- Lamellerin etrafındaki fazla sıvı aspire edildi.
- Tdt reaksiyon enzimi eklendi ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
- “Working Streght Stop/Wash Buffer” (reaksiyon sonlandırıcı yıkama tamponu) ile 10 dk inkübe edilerek reaksiyon sonlandırıldı.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı.
- Kurutma kağıdı ile fazla sıvı uzaklaştırıldı.
- Anti-digoxigenin peroksidaz ile 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı.
- Yeterli miktarda peroksidaz substrat sıvısı eklenen kesitler 5 dk oda ısısında nemli kabin içerisinde bekletildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı.
- Zıt boyama için %0,5’lik metil green ile uygulandı.
- Ksilende dehidrate edilen kesitler kapama sıvısı ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

### 3.2.2.3. İki Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24., 48. ve 72. saatlerin sonunda şu protokol uygulandı;

- Kuyucuklardaki üst medyum aspire edildi.
- 1 ml PBS eklendi, 37°C etüvde 15 dk inkübe edildi.
- PBS atıldıktan sonra %70 etanolde 4°C'de 30 dk fiksasyon yapıldı.
- Alkol uzaklaştırıldı, PBS'te 10 dk bekletildi.
- PBS atılarak metanolde hazırlanmış %0,5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de 10 dk inkübe edildi.
- 3 x 5 dk distile su ile yıkama yapıldı
- 30 dk 4 N HCl'de inkübe edildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- Ultra-V-block uygulanarak 20 dk bekletildi.
- 1 saat primer antikorda, nemli ortamda oda ısısında tutuldu.
- PBS ile 3 x 3 dk yıkama yapıldı.
- Sekonder antikor ile (Biotinylated Goat Anti-Mouse) 20 dk inkübe edildi.
- PBS ile 3 x 3 dk yıkama yapıldı.
- Streptavidin peroksidaz uygulanarak 20 dk bekletildi.
- PBS ile 3 x 3 dk yıkama yapıldı.
- Substrat-kromojende (DAB) 5 dk karanlıkta bekletildi
- Distile su ile yıkama yapıldı.
- Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldı
- Kesitler çeşme suyunda 20 dk morarmaya bırakıldı.
- Son olarak örnekler kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretleme oranları belirlendi.

### 3.2.2.4. İki Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

Bu işlem de kaspaz 3 ile boyamadaki protokole benzer şekilde gerçekleştirildi. Farklı olarak primer antikor uygulaması basamağında AIF primer antikorunu kullanıldı.

### 3.2.2.5. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (brdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı lamlara alınan kesitlere şu işlemler uygulandı;

- Deparafinizasyon işlemi için lamlar
  - 5'er dk 2 değişim ksilende tutuldu
  - %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve metanol ile hazırlanan solüsyon ile 10 dk inkübe edildi.
- 3 x 2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
- Kit içeriğindeki denaturasyon solüsyonu kesitler üzerine uygulandı, oda ısısında 30 dk inkübe edildi
- 3 x 2 dk PBS ile yıkama yapıldı
- Yine kit içeriğindeki block solüsyonu ile 10 dk inkübe edildi.
- Yıkama yapılmadan solüsyon kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı.
- Biotinli Mouse anti-Brdu antikoru damlatılarak 60 dk oda ısısında inkübe edildi
- PBS ile 3 x 2 dk yıkama yapıldı
- Streptavidin-Peroksidaz uygulanarak 10 dk oda ısısında inkübe edildi,
- PBS ile yıkama yapıldı.
- DAB kromojen-substrat karışımı ile 5 dk karanlık ortamda inkübe edildi.
- Distile su ile yıkama yapıldı
- Hematoksilen ile zıt boyaması yapıldı
- Alkol serilerinden geçirilerek kesitler dehidrate edildi
- Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldı
- Kesitler Histomount ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek işaretlenme oranları belirlendi.

### 3.2.2.6. Üç Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu

24., 48. ve 72. saatler için ayrı ayrı lamlara alınan kesitlere şu işlemler uygulandı;

- Deparafinizasyon işlemi için lamlar
  - 3 x 5 dk ksilolde bekletildi.
  - 2 x 5 dk absolu etanolde tutuldu.
  - Sırası ile %96'lık ve %70'lik etanolde 3'er dakika bekletildi.
- PBS ile 5 dk yıkama yapıldı.
- Kesitler sitrat tamponuna alınarak, mikrodalgada 600 watt gücünde 1 dk ısıtıldı, soğuması için yeteri kadar beklendi.
- Soğuyan kesitler PBS ile yıkandı.
- %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 5 dk muamele edildi.
- 2 x 5 dk PBS ile yıkama yapıldı.
- Kesitlere kit içeriğindeki "Equilibration Buffer" uygulandı.
- TdT enzimi uygulanarak 1 saat, 37°C'lik etüvde bekletildi.
- Kit içeriğindeki "working streng/ stop wash buffer" uygulandı, 10 dk oda ısısında bekletildi.
- 3 x 1 dk PBS ile yıkama yapıldı
- Antidioksijenin konjugatında 30 dk bekletildi.
- 4 x 2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
- DAB kromojen substart karışımı ile yeterli süre karanlıkta bekletildi.
- Kesitler mikroskop altında kontrol edildi.
- 3 x 1 dk distile su ile yıkama yapıldı.
- Zıt boyama için 5 dk metil green uygulandı
- 3 x 1 dk distile su ile yıkama yapıldı.
- N-bütanol ile yıkama yapıldı.
- N-bütanol de 30 sn tutuldu
- Kesitler ksilende şeffaflaştırıldı
- Lamlar "Histomount" ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek, işaretlenme oranları belirlendi.



### 3.2.2.7. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme

24., 48. ve 72. saatler için ayrı ayrı lamlara alınan kesitlere şu işlemler uygulandı;

- Deparafinizasyon işlemi için lamlar
  - 3 x 5 dk ksilol ile muamele edildi
  - 2 x 5 dk absolu etanolde tutuldu
  - Sırası ile %96'lık ve %70'lik etanolde 5'er dk tutuldu.
- PBS de 5 dk yıkandı.
- Sitrat tamponuna alınan kesitler, mikrodalgada 600 watt gücünde 1 dk ısıtıldı ve ardından soğuyana kadar oda ısısında bekletildi.
- Soğuyan kesitler, PBS ile yıkandı.
- %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metil alkol solüsyonunda, 10 dk inkübe edildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- 4 N HCl'de 30 dk bekletildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- Ultra V Blok uygulanan kesitler 20 dk bekletildi.
- Kurutma kağıdı ile lamlar kurutuldu.
- Kaspaz 3 primer antikoru uygulaması yapıldı. Primer antikor uygulanan kesitler nemli ortamda 4 °C'de 1 gece bekletildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- Sekonder antikor uygulanarak, 20 dk bekletildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- Streptavidin peroksidaz uygulanarak 20 dk bekletildi.
- 3 x 3 dk PBS ile yıkandı.
- DAB kromojen-substrat karışımı hazırlandı, kesitlere uygulandı ve 20 dk karanlık ortamda bekletildi.
- 5 dk distile su ile yıkandı.
- Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
- Boyanan kesitler çeşme suyunda yıkandı.
- Etanol serilerinde dehidrate edildi.

- Ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kesitler “Histomount” ile kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenerek işaretlenme oranları belirlendi.

### **3.2.2.8. Üç Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme**

24, 48 ve 72. saatler için ayrı ayrı lamlara alınan kesitlere kaspaz 3 ile immünohistokimyasal işaretleme işlemlerindeki protokol aynen uygulandı. Farklı olarak, primer antikor uygulaması aşamasında burada AIF primer antikor kullanıldı.

### **3.2.3. Hematoksilen Eozin Boyama**

#### **3.2.3.1. Üç Boyutlu Kültürde Hematoksilen Boyama**

24., 48. ve 72. saatler için ayrı ayrı lamlara alınan kesitlere hematoksilen-eozin boyama için şu işlemler uygulandı;

- Deparafinizasyon için (60°C’lik etüvde) 45 dk bekletildi
- Ksilol I’de 20 dk tutuldu.
- Ksilol II’de 20 dk tutuldu.
- Etano serilerlerinde bekletildi;
  - %96’lık 10 dk
  - %90’lık 10 dk
  - %80’lik 10 dk
  - %70’lik 10 dk
- Distile suda 5 dk bekletildi.
- Hematoksilende 3 dk bekletildi.
- Çeşme suyu 5 dk bekletildi, 2-3 tur akan suda yıkandı.
- %1’lik asit alkolden geçirildi.
- Çeşme suyunda 5 dk bekletildi.
- Eozinde 2 dk bekletildi
- Çeşme suyu 5 dk bekletildi; 2-3 tur akan suda yıkandı

- %70- %80- %90 etanol serisinden geçirildi,
- Ksilolde bekletildi.
- Kesitler, entellan ile kapatıldı. Işık mikroskobu altında sferoid yapıları incelendi.

### **3.2.4. Gen Ekspresyon Çalışmaları**

#### **3.2.4.1. İki Boyutlu Kültürde Gen Ekspresyon Çalışmaları için Hücrelerin Hazırlığı**

İki Boyutlu Kültür Ortamının hazırlanması başlığı altında anlatılan yöntem ve deney planı çerçevesinde 48. saatin sonunda hücrelere gen ekspresyon çalışmaları öncesindeki aşağıdaki işlemler uygulandı;

- Kültür kabı aseptik koşullarda laminar akım kabine alındı.
- Kuyucuklar içerisindeki medyum aspire edildi.
- Ca/Mg içermeyen PBS ile yıkama yapıldı.
- 3 ml tripsin EDTA solüsyonu uygulanarak, hücreler inkübatöre kaldırıldı.
- Hücrelerin zeminden ayrılışları kontrol edilerek yeterli süre inkübe edildi.
- Tripsin nötralizasyonu için 5 ml medyum eklendi.
- Kuyucuklardaki hücreler santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 4000 rpm'da 3 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Kalan pelletler üzerine 1'er ml dondurma medyumunu eklenerek ayrı ayrı 1,5 ml'lik tüplere alındı.
- Gen ekspresyon çalışmalarının yapılacağı merkeze transfer edilene kadar örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı, transfer işlemi kuru buz içerisinde gerçekleştirildi.

### **3.2.4.2. Üç Boyutlu Kültürde Gen Ekspresyon Çalışmaları İçin Hücrelerin Hazırlığı**

Üç boyutlu kültür ortamının hazırlanması, bakımı ve takibi başlığı altında anlatılan yöntem ve deney planı çerçevesinde 48. saatin sonunda hücrelere gen ekspresyon çalışmaları öncesindeki aşağıdaki işlemler uygulandı;

- Kültür kabı aseptik koşullarda laminar akım kabinine alındı.
- Sferoidler kuyucuklar içerisindeki sıvıyla birlikte aspire edilerek, santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 1000 rpm'da 1 dk santrifüj edildi.
- Supernatan uzaklaştırıldı.
- Sferoidler üzerine 1'er ml dondurma medyumuna eklenerek ayrı ayrı 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı.
- Gen ekspresyon çalışmalarının yapılacağı merkeze transfer edilene kadar örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı, transfer işlemi kuru buz içerisinde gerçekleştirildi.

### **3.2.4.3. RNA İzolasyonu**

RNA izolasyonu, High Pure RNA Isolation Kit ile yapıldı. Öncelikle kit içeriğindeki sarı etiketli solüsyonlarda ön hazırlık yapıldı. Liyofilize haldeki DNaz 0.55 ml Elution Buffer eklenerek 0.5 ml'lik tüplere paylaştırıldı. Yıkama tamponu I içine 20 ml, yıkama tamponu II içine ise 40 ml absolute etanol eklenerek hazırlandı.

RNA izolasyon protokolü aşağıdaki gibi uygulandı;

- Toplanan hücreler 200  $\mu\text{l}$  nukleaz içermeyen su ile sulandırıldı.
- Pelet hafifçe vurarak süspanse edildi.
- 400  $\mu\text{l}$  lizis/bağlayıcı tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi.
- Örnek sayısı kadar toplama ve filtre tüpleri hazırlandı, filtreli tüpler toplama tüplerine geçirildi.
- Yaklaşık 700  $\mu\text{l}$  hacmindeki tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı.

- 8000 x g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüp tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
- Ayrı bir 1,5ml lik tüpe, her örnek için 90 µl DNaz İnkübasyon Tamponu ve 10 µl DNaz eklendi ve pipetle karıştırıldı. Ardından her tüpe 100'er µl dağıtıldı.
- 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Her tüpe 500 µl yıkama tamponu I eklendi ve ardından 8000x g'de 15sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpü döküldü ve filtreli tüp aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
- Her tüpe 500 µl yıkama tamponu II eklendi ve 8000x g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpündeki sıvı döküldü ve filtreli tüp yerleştirildi.
- Wash buffer kalıntılarının gidermek için; her tüpe 200 µl Wash BufferII eklendi ve 2dk en yüksek hızda (13000x g'de) santrifuj edildi.
- Toplama tüpleri atıldı ve filtreli tüpler 1.5 ml'lik steril tüplere alındı.
- Her tüpe 50 µl ayırma tamponu eklendi. 1dk 8000 rpmi'da santrifüj edildi.
- Filtreli tüpler atıldı ve 1,5 ml'lik tüpte içinde RNA elde edildi.

İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik (Nanodrop2200) yöntemle ölçüldü. Bu amaçla; elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile tespit edildi, ideal saflıktaki kaliteli RNA'nın  $A_{260} / A_{280}$  absorban oranını 1,8-2,0 olarak belirlendi. Genel olarak reaksiyon başına 50 ng total RNA'nın ortalama düzeyde ifade edilen mRNA tespitinde yeterli olacağı düşünülmektedir.

#### 3.2.4.4. cDNA Sentezi

- cDNA sentezi için “Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit” kullanıldı.
- Her örnek için RNA+H<sub>2</sub>O’dan 10 µl konuldu ve 2 µl random heksamer primer ve 1 µl oligo dT primer eklendi.

RNA örneği	10 µl
Oligo dT primer	1 µl
Random heksamer primer	2 µl
<b>Toplam</b>	<b>13 µl</b>

- Tüpler PCR cihazına yerleştirildi.
- 65 °C’de 10 dk RNA’lar denatüre edildi.
- Ardından her bir örnek için aşağıda belirtilen miktarlar baz alınarak ana karışım hazırlandı.

	<u>Tek Reaksiyon için</u>
Reaksiyon Tamponu	4 µl
Koruyucu RNaz İnhibitörü	0,5 µl
Deksinükleotit Karşımı	2 µl
Transkriptör Ters Transkriptaz	0,5 µl
<b>Toplam</b>	<b>7 µl</b>

- PCR cihazından alınan örnekler soğutma kabına yerleştirildi.
- Her tüpe 7 µl hazırlanan karışımdan dağıtıldı ve pipetle 3-4 kez karıştırıldı.
- Tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve aşağıdaki hazırlanmış program çalıştırıldı.

25 °C’de	10 dk
50 °C’de	60 dk
85 °C’de	5 dk
4 °C’de	bekleme

- Elde edilen cDNA’lar üzerine 80 µl su eklendi.

### 3.2.4.5. Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

- Elde edilen cDNA’lar, hazır paneller kullanılarak ve aşağıdaki miks ve cihaz protokolleri ile LightCycler 480II cihazı ile çalışıldı.
- Cihaz protokolü şu şekilde düzenlendi (Tablo 9);

**Tablo 9.** Gerçek Zamanlı PCR cihaz protokolü.

Program	Denatürasyon		Amplifikasyon		Soğutma	
Parametre						
Analiz modu	Yok		Kuantifikasyon modu		Yok	
Döngü	1		55		1	
Hedef [°C]	95		95	60	72	40
Süre [sa:dk:sn]	00:10:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30	
Ramp. oranı [°C/s]	20		20	20	20	
Acquisition Mod	Yok		Yok	Yok	Tek	Yok

- Gerçek zamanlı PCR karışımı hazırlanışı;
  - “Roche FastStart Essential DNA Probes Master” ve “RealTime ready Apoptosis Panel, Human 96 Gene” kullanılarak hazırlandı.

	<u>Tek Reaksiyon için</u>	<u>96 rxn için</u>
Nükleaz içermeyen su	9.0 µl	900 µl
cDNA	1.0 µl	96 µl
<u>Enzim ve dNTP karışımı</u>	<u>10 µl</u>	<u>1000 µl</u>
<b>Toplam</b>	<b>20 µl</b>	<b>1996 µl</b>

- Reaksiyon tüpünde, tek bir reaksiyon için reaktiflerin her birinden eklendi ve reaksiyon sayısı kadar konup, reaksiyon karışımı hazırlandı.
- Karışım spin edildi ve çalışma paneline her bir kuyucuk için 20 µl reaksiyon karışımından transfer edildi. Paneldeki apoptotik yolakla ilişkili genler, referans genler, RT pozitif ve RT negatif kontrol genlerinin yerleşimleri şekil 24’de görülmektedir (Şekil 20).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	1 AKT1	2 APAF1	3 AVEN	4 BAD	5 BAG1	6 BAK1	7 BAX	8 BBC3	9 BCL2	10 BCL2L1	11 BCL2L10	12 BCL2L11
<b>B</b>	13 BCL2L13	14 BCL2L2	15 BID	16 BIK	17 BIRC2	18 BIRC3	19 BIRC5	20 BOK	21 CAD	22 CASP1	23 CASP10	24 CASP12
<b>C</b>	25 CASP14	26 CASP2	27 CASP3	28 CASP4	29 CASP5	30 CASP6	31 CASP7	32 CASP8	33 CASP8AP2	34 CASP9	35 CFLAR	36 CRADD
<b>D</b>	37 DFFA	38 DIABLO	39 endoG	40 FADD	41 FAM96A	42 FAM96B	43 FAS	44 FASLG	45 HMGB1	46 HRK	47 HSP90B1	48 HTRA2
<b>E</b>	49 LRDD	50 MCL1	51 NFKB1	52 NFKB2	53 NGFR	54 PMAIP1	55 PTEN	56 REL	57 RELA	58 RELB	59 SOCS2	60 SOCS3
<b>F</b>	61 STAT1	62 STAT5A	63 STAT5B	64 TNF	65 TNFRSF10 A	66 TNFRSF10 B	67 TNFRSF10 C	68 TNFRSF10 D	69 TNFRSF11 B	70 TNFRSF1A	71 TNFRSF1B	72 TNFRSF21
<b>G</b>	73 TNFRSF25	74 TNFSF8	75 TNFSF10	76 TNFSF11	77 TP53	78 TP53I3	79 TRAF1	80 TRAF2	81 TRAF3	82 TRAF5	83 TRAF6	84 TRAF7
<b>H</b>	85 ACTB	86 B2M	87 GAPDH	88 HPRT1	89 RPL13A	90 18S	91 YWHAZ	92 RT+	93 RT+	94 RT+	95 RT-	96 RT-

H1 - H7: Reference genes  
 H8 - H10: RT positive control  
 H11 - H12: RT minus control

**Şekil 20.** RealTime Ready Human Apoptosis Panel 96 genlerin yerleşimi.

- Hazırlanan plateler (karışım ilave edildikten sonra) soğuk bloktaki adaptörleri ile birlikte 2000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi.

### 3.2.4.6. Analiz

Gen ekspresyon düzeylerinin hesaplanabilmesi için; öncelikle örneklerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ardından RNA’lar gerçek zamanlı PCR metodunda kullanılacak olan cDNA’lara çevrildi ve gerçek zamanlı PCR çalışmasına geçildi. Gerçek zamanlı PCR işlemi esnasında cihazın yazılımı tarafından elde edilen amplifikasyon eğrileri aracılığı ile; floresan ışımının bir eşik düzeye ulaştığı “cycle time” ( $C_T$ -siklus zamanı) belirlendi. Bu  $C_T$  değeri orijinal örnekteki özel nükleik asit dizisinin miktarı ile ters orantılıdır. Hem göreceli hem mutlak gen ekspresyonunun



kantitasyonunda bu  $C_T$  değerinden yararlanır. Mükemmel etkin bir PCR sürecinde, her siklusta amplifiye edilen ürün miktarı iki katına çıkar (180). Örneklerin  $C_T$  değerleri arasındaki farkın 1 olması daha düşük  $C_T$  değerine sahip örneğin, diğer örneğe kıyasla hedef dizi miktarını iki katına çıkardığını göstermektedir. Bu  $C_T$  değerleri arasındaki fark 2 olursa 4 kat, 3 olursa 8 kat hedef dizi miktarında artış olduğunu gösterir. Yani formüleze edilirse;

$$C_T \text{ değerindeki değişim } (\Delta Ct) = 2^{-\Delta\Delta Ct} \text{ kat kadar değişim.}$$

Gerçek zamanlı PCR'dan elde edilen verinin değerlendirilmesinde mutlak veya göreceli ekspresyon düzeylerini gösteren çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Mutlak ekspresyon değerleri standart bir eğriden elde edilen verileri kesin kopya sayılarına çevirir ve veri sonuçta her bir hücre için kopya sayısı olarak verilir. Göreceli kantitasyonda ise gerçek zamanlı PCR verisi iç kontrol olarak adlandırılan bir genle kıyaslanarak verilir. Yani burada değişmez bir kontrol genine kıyasla ilgilenilen bir genin kararlı durumundaki değişiklik düzeyleri ölçülür. "Housekeeping" genler deneysel koşullara bağlı olarak değişim beklenmeyen genlerdir ve uygun birer iç standart olarak kullanılır (siklofilin, gliseraldehit-3fosfat dehidrojenaz, ribozomal protein 34B4,  $\beta$ -aktin, transferrin reseptörü vd. gibi). Göreceli gen ekspresyonunun oluşturulmasında seneler içerisinde çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.

Bunlardan en çok kullanılanı karşılaştırmalı  $C_t$  metodudur ki  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu olarak da bilinir. Bu yöntemin en önemli avantajı kullanım kolaylığı sağlaması ve ekspresyon değişim verilerini "kat değişimi" olarak sunmasıdır (181).

$$\text{Kat Değişimi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Bu denklem formu iki farklı örnekteki gen ekspresyonlarını karşılaştırmak için kullanılabilir (Örnek A, Örnek B); her örnek bir iç kontrol genine göre kıyaslandıktan sonra. Örneğin burada örnek A etken madde uygulanan grubu, örnek B ise kontrol grubu üyesi olabilir. Bu durumda formüle ayrıntılı bakacak olursak;

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct \text{ ilgilenilen gen} - Ct \text{ kontrol geni}) \text{ örnek A} - (Ct \text{ ilgilenilen gen} - Ct \text{ kontrol geni}) \text{ örnek B}]$$

Kat değişim sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile bu değişimlerin anlamlılığı belirlenir. Buna göre; elde edilen değer 2'den büyük olması gen

ekspresyonunun anlamlı derecede arttığını, 2'den küçük olması ise anlamlı derecede azaldığını gösterir.

Kitte yer alan apoptotik yolakla ilişkili genler ve referans genlere ait açıklamalar tablo 10'da görülmektedir (Tablo 10).

**Tablo 10.** RealTime Ready Human Apoptosis Panel 96 genler ve açık adları.

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
A1	<i>AKT1</i>	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	RAC-alfa serin/treonin-protein kinaz
A2	<i>APAF1</i>	Apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1).	Apoptotik proteaz-aktive edici faktör 1
A3	<i>AVEN</i>	Cell death regulator Aven.	Hücre ölüm düzenleyicisi Aven.
A4	<i>BAD</i>	BCL2 antagonist of cell death (BAD)	Hücre ölümünün BCL2 antagonisti
A5	<i>BAG1</i>	BAG family molecular chaperone regulator 1 (BCL-2-associated athanogene 1)	BAG ailesi moleküler şaperon düzenleyici 1
A6	<i>BAK1</i>	BCL-2 homologous antagonist/killer (Apoptosis regulator BAK)	BCL-2 homoloğu antagonist/öldürücü
A7	<i>BAX</i>	Apoptosis regulator BAX.	Apoptoz düzenleyici BAX.
A8	<i>BBC3</i>	BCL-2-binding component 3 (p53 up-regulated modulator of apoptosis)	BCL-2-bağlayıcı komponent 3 (apoptozun p53 tarafından up-regüle edilen düzenleyicisi)
A9	<i>BCL2</i>	Apoptosis regulator BCL-2.	Apoptoz düzenleyici BCL-2.
A10	<i>BCL2L1</i>	Apoptosis regulator BCL-X (BCL-2-like 1 protein).	Apoptoz düzenleyici BCL-X (BCL-2-benzeri protein 1).
A11	<i>BCL2L10</i>	Apoptosis regulator BCL-B (BCL-2-like 10 protein)	Apoptoz düzenleyici BCL-B (BCL-2-benzeri protein 10)
A12	<i>BCL2L11</i>	BCL-2-like protein 11 (BCL2-interacting mediator of cell death).	BCL-2-benzeri protein 11 (hücre ölümünün BCL 2 ile etkileşime giren aracısı).
B1	<i>BCL2L13</i>	BCL-2-like 13 protein (Protein MIL1)	BCL-2-benzeri protein 13 (Mil1 Proteini)
B2	<i>BCL2L2</i>	Apoptosis regulator BCL-W (BCL-2-like 2 protein).	Apoptoz düzenleyicisi BCL-W (BCL-2-benzeri protein 2).
B3	<i>BID</i>	BH3-interacting domain death agonist (BID)	BH3-etkileşim alanı ölüm agonisti (BID)
B4	<i>BIK</i>	BCL-2-interacting killer (Apoptosis inducer NBK)	BCL-2-etkileşimli öldürücü (Apoptoz uyarıcı NBK)

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
B5	<i>BIRC2</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 2 (Inhibitor of apoptosis protein 2)	Bakuloviral IAP tekrarları taşıyan protein 2 (apoptoz inhibitör protein 2)
B6	<i>BIRC3</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3 (Inhibitor of apoptosis protein 1)	Bakuloviral IAP tekrarları taşıyan protein 3 (apoptoz inhibitör protein 1)
B7	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5 (Apoptosis inhibitor survivin)	Bakuloviral IAP tekrarları taşıyan protein 5 (Apoptoz inhibitör survivin)
B8	<i>BOK</i>	BCL-2-related ovarian killer protein (Hbok).	BCL-2-ilişkili overyan öldürücü protein (Hbok).
B9	<i>CAD</i>	CAD protein	CAD proteini
B10	<i>CASP1</i>	Caspase-1 precursor	Kaspaz 1 öncüsü
B11	<i>CASP10</i>	Caspase-10 precursor	Kaspaz 10 öncüsü
B12	<i>CASP12</i>	Inactive caspase-12 (CASP-12).	Inaktif kaspaz 12 (CASP-12).
C1	<i>CASP14</i>	Caspase-14 precursor	Kaspaz 14 öncüsü
C2	<i>CASP2</i>	Caspase-2 precursor	Kaspaz 2 öncüsü
C3	<i>CASP3</i>	Caspase-3 precursor	Kaspaz 3 öncüsü
C4	<i>CASP4</i>	Caspase-4 precursor	Kaspaz 4 öncüsü
C5	<i>CASP5</i>	Caspase-5 precursor	Kaspaz 5 öncüsü
C6	<i>CASP6</i>	Caspase-6 precursor	Kaspaz 6 öncüsü
C7	<i>CASP7</i>	Caspase-7 precursor	Kaspaz 7 öncüsü
C8	<i>CASP8</i>	Caspase-8 precursor	Kaspaz 8 öncüsü
C9	<i>CASP8AP2</i>	CASP8-associated protein 2 (FLICE-associated huge protein).	CASP8-ilişkili protein 2 (FLICE-ilişkili dev protein).
C10	<i>CASP9</i>	Caspase-9 precursor	Kaspaz 9 öncüsü
C11	<i>CFLAR</i>	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator precursor (Cellular FLICE-like inhibitory protein)	CASP8 ve FADD-benzeri apoptoz düzenleyici öncü (Hücresele FLICE-benzeri inhibitör protein)
C12	<i>CRADD</i>	Death domain-containing protein CRADD (Caspase and RIP adapter with death domain)	Ölüm alanı-taşıyan protein CRADD (Ölüm alanına sahip Kaspaz ve RIP adaptörü)
D1	<i>DFFA</i>	DNA fragmentation factor subunit alpha (DNA fragmentation factor 45 kDa subunit)	DNA fragmentasyon faktör altbirimi alfa (DNA fragmentasyon faktör 45 kDa altbirimi)
D2	<i>DIABLO</i>	Diablo homolog, mitochondrial precursor (Second mitochondria-derived activator of caspase)	Diablo homoloğu, mitokondriyal öncü (ikinci mitokondri-kökenli kaspaz aktivatörü)
D3	<i>ENDOG</i>	Endonuclease G, mitochondrial precursor	Endonükleaz G, mitokondriyal öncü
D4	<i>FADD</i>	Protein FADD (FAS-associated death domain protein)	Protein FADD (FAS-ilişkili ölüm alanı proteini)
D5	<i>FAM96A</i>	UPF0195 protein FAM96A.	UPF0195 protein FAM96A.

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
D6	<i>FAM96B</i>	UPF0195 protein FAM96B.	UPF0195 protein FAM96B.
D7	<i>FAS</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6 precursor (FASLG receptor)	Tümör nekroz edici faktör reseptör üst ailesi üyesi 6 öncüsü (FASLG reseptörü)
D8	<i>FASLG</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 6 (Fas antigen ligand)	Tümör nekroz edici faktör ligand üst ailesi üyesi 6 (Fas antijen ligand)
D9	<i>HMGB1</i>	High mobility group protein B1 (High mobility group protein 1)	Yüksek mobilite grubu protein B1 (yüksek mobilite grup protein 1)
D10	<i>HRK</i>	Activator of apoptosis harakiri (Neuronal death protein DP5)	Apoptoz harakirinin aktivatörü (Nöronal ölüm proteini DP5)
D11	<i>HSP90B1</i>	Endoplasmin precursor (Heat shock protein 90 kDa beta member 1)	Endoplazmin öncülü (Isı-şok protein 90 kDa beta üyesi 1)
D12	<i>HTRA2</i>	Serine protease HTRA2, mitochondrial precursor	Serin proteaz HTRA2, mitokondriyal öncü
E1	<i>LRDD</i>	Leucine-rich repeat and death domain-containing protein (p53-induced protein with a death domain)	Lösinden zengin tekrarlar ve ölüm alanı taşıyan protein (p53- tarafından uyarılan ölüm alalına sahip proteinin)
E2	<i>MCL1</i>	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1 (BCL-2- related protein EAT/MCL1)	Uyarılmış myeloid lösemi hücre farklılaşma proteini MCL-1 (BCL-2- ilişkili protein EAT/MCL1)
E3	<i>NFKB1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit (DNA-binding factor KBF1)	Nüklear faktör NF-kappa-B p105 altbirimi (DNA-bağlayıcı faktör KBF1)
E4	<i>NFKB2</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit (DNA-binding factor KBF2)	Nüklear faktör NF-kappa-B p100 altbirimi (DNA-bağlayıcı faktör KBF2)
E5	<i>NGFR</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16 precursor (Low- affinity nerve growth factor receptor)	Tümör nekroz edici faktör reseptör üst ailesi üyesi 16 öncüsü (düşük afiniteli sinir büyüme faktör reseptörü)
E6	<i>PMAIP1</i>	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMA-induced protein 1)	Forbol-12-miristat-13-asetat-tarafından uyarılan protein 1 (PMA-tarafından uyarılan protein 1)
E7	<i>PTEN</i>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual- specificity protein phosphatase PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfataz ve çift özgüllüğe sahip protein fosfataz PTEN
E8	<i>REL</i>	-Rel proto-oncogene protein (C-Rel protein).	Rel proto-onkogen protein (C-Rel protein).

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
E9	<i>RELA</i>	Transcription factor p65 (Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit).	Transkripsiyon faktör p65 (Nükleer faktör NF-kappa-B p65 altbirimi).
E10	<i>RELB</i>	Transcription factor RelB (I-Rel).	Transkripsiyon faktörü RelB (I-Rel).
E11	<i>SOCS2</i>	Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)	Sitokin sinyalinin baskılayıcısı 2 (SOCS-2)
E12	<i>SOCS3</i>	Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3)	Sitokin sinyalinin baskılayıcısı 3 (SOCS-3)
F1	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1alpha/beta (Transcription factor ISGF-3 components p91/p84).	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 1alfa/beta (Transkripsiyon faktör ISGF-3 bileşenleri p91/p84).
F2	<i>STAT5A</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A.	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5A.
F3	<i>STAT5B</i>	Signal transducer and activator of transcription 5B.	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5B.
F4	<i>TNF</i>	Tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha)	Tümör nekroz edici faktör öncüsü (TNF-alfa)
F5	<i>TNFRSF10A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10A precursor (Death receptor 4)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 10A öncülü (ölüm reseptörü 4)
F6	<i>TNFRSF10B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B precursor (Death receptor 5)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 10B öncülü (ölüm reseptörü 5)
F7	<i>TNFRSF10C</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10C precursor (Decoy receptor 1)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 10C öncülü (Tuzak reseptör 1)
F8	<i>TNFRSF10D</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10D precursor (Decoy receptor 2)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 10D öncülü (Tuzak reseptör 2)
F9	<i>TNFRSF11B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B precursor (Osteoprotegerin)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 11B öncülü (Osteoprotegerin)
F10	<i>TNFRSF1A</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A precursor (p60)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 1A öncülü (p60)
F11	<i>TNFRSF1B</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B precursor (Tumor necrosis factor receptor 2)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 1B öncülü (Tümör nekroz edici faktör reseptör 2)
F12	<i>TNFRSF21</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 21	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 21

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
		precursor (TNFR- related death receptor 6)	öncülü (TNFR- ilişkili ölüm reseptörü 6)
G1	<i>TNFRSF25</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 25 precursor (WSL-1 protein)	Tümör nekroz edici faktör reseptör alt ailesi üyesi 25 öncülü (WSL-1 protein)
G2	<i>TNFSF8</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 8 (CD30 ligand)	Tümör nekroz edici faktör ligand alt ailesi üyesi 8 (CD30 ligand)
G3	<i>TNFSF10</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	Tümör nekroz edici faktör ligand alt ailesi üyesi 10 (TNF-ilişkili apoptoz-uyarıcı ligand)
G4	<i>TNFSF11</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11 (Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand)	Tümör nekroz edici faktör ligand alt ailesi üyesi 11 (Nüklear faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü)
G5	<i>TP53</i>	Cellular tumor antigen p53 (Tumor suppressor p53)	Hücrel tümör antijen p53 (Tümör baskılayıcı p53)
G6	<i>TP53I3</i>	Putative quinone oxidoreductase	Putatik kinon oksidoredüktaz
G7	<i>TRAF1</i>	TNF receptor-associated factor 1 (Epstein-Barr virusinduced protein 6).	TNF reseptör-ilişkili faktör 1 (Epstein-Barr virüs tarafından uyarılan protein 6).
G8	<i>TRAF2</i>	TNF receptor-associated factor 2 (Tumor necrosis factor type 2 receptor-associated protein 3).	TNF reseptör-ilişkili faktör 2 (Tümör nekroz edici faktör tip 2 reseptörü-ilişkili protein 3).
G9	<i>TRAF3</i>	TNF receptor-associated factor 3 (CD40 receptor-associated factor 1)	TNF reseptör-ilişkili faktör 3 (CD40 reseptörü-ilişkili faktör 1)
G10	<i>TRAF5</i>	TNF receptor-associated factor 5 (RING finger protein 84).	TNF reseptör-ilişkili faktör 5 (RING finger protein 84).
G11	<i>TRAF6</i>	TNF receptor-associated factor 6 (Interleukin-1 signal transducer)	TNF reseptör-ilişkili faktör 6 (İnterlökin-1 sinyal dönüştürücü)
G12	<i>TRAF7</i>	E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7	E3 ubikuitin-protein ligaz TRAF7
H1	<i>ACTB</i>	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Aktin, sitoplazmik 1 (Beta-aktin)
H2	<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin precursor	Beta-2-mikroglobulin öncüsü
H3	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz
H4	<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
H5	<i>RPL13A</i>	60S ribosomal protein L13a	60S ribozomal protein L13a
H6	<i>RN18S1</i>	18S ribosomal RNA	18S ribosomal RNA

Pozisyon	Sembol	Gen Açık Adı	Türkçe karşılığı/çevirisi
H7	<i>YWHAZ</i>	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1)	14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinaz C inhibitör proteini 1)

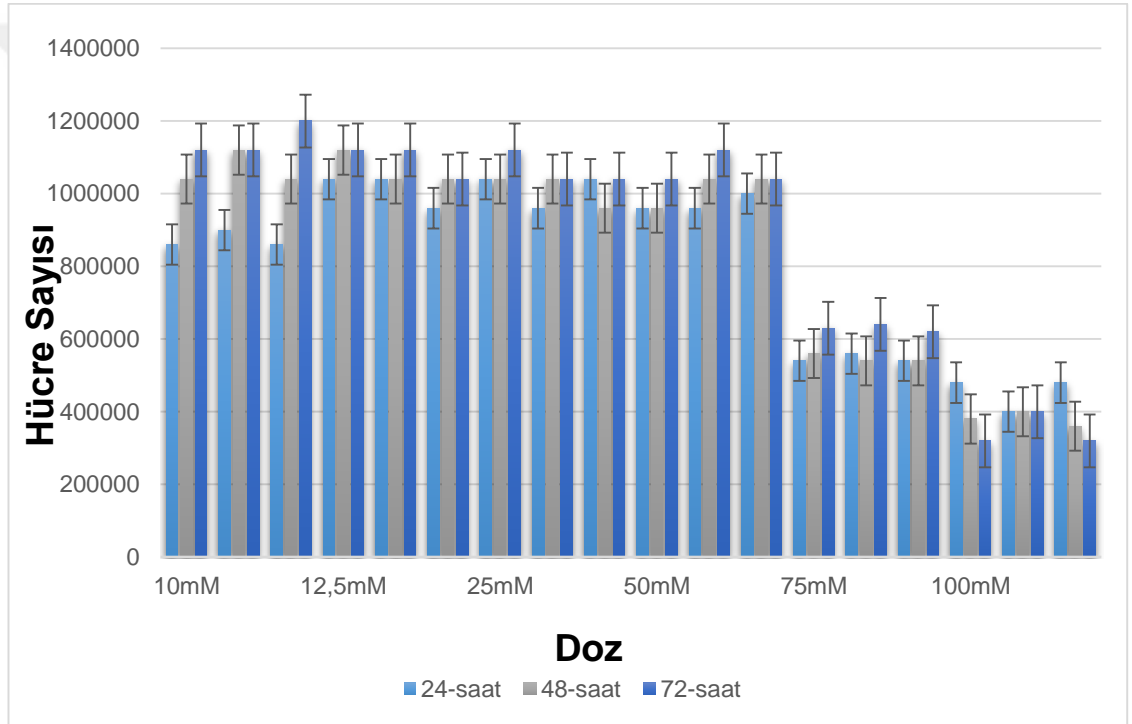
(Tablo 10 devamı)



## 4. BULGULAR

### 4.1. Doz Belirleme Deneyi Bulguları

Doz belirleme deneyi kapsamında; deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda hücreler toplanarak sayıma hazır hale getirildi. Elde edilen hücre süspansiyonlarındaki canlı hücre sayısı tripan mavisi ile boyama ve ardından hemositometrede sayım yöntemi ile belirlendi. Toplam hücre sayıları kaydedilerek yapılan değerlendirme sonrasında; borik asit için %50'sinin ölümüne yol açan ortalama doz değeri olan IC<sub>50</sub> değeri 75 mM olarak belirlendi (Şekil 21).

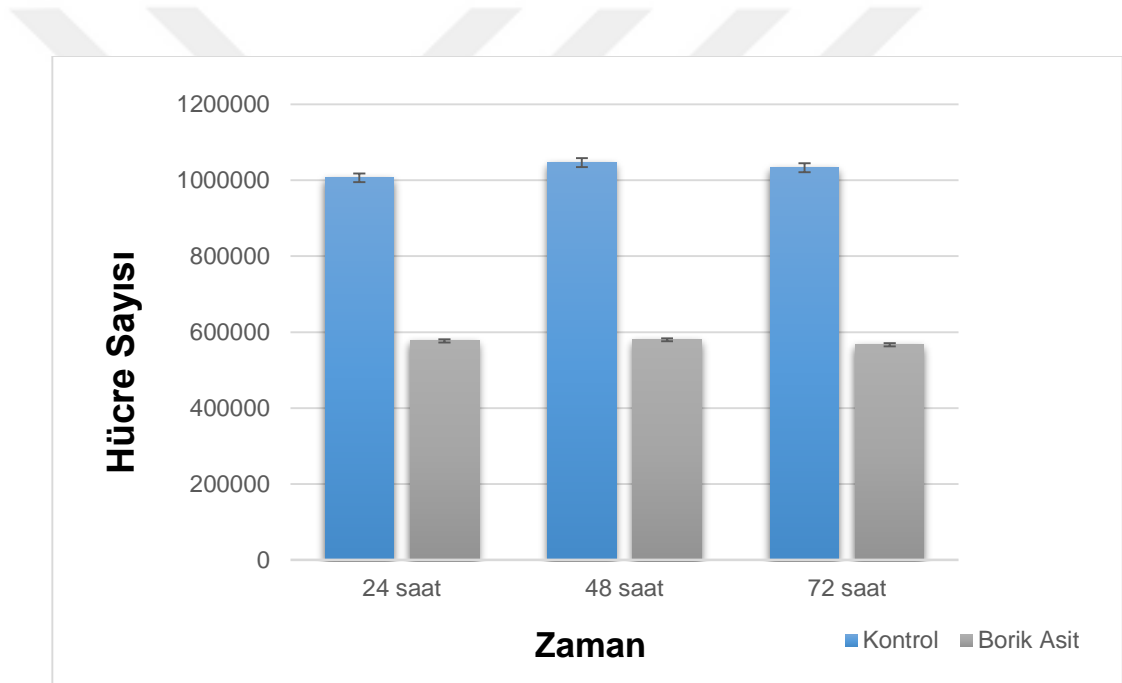


Şekil 21. SW-480 Hücreleri için borik asit doz inaktivasyon grafiği.



## 4.2. Tutunma ve Canlılık Deneyi Bulguları

Borik asit grubuna IC<sub>50</sub> değeri olarak belirlenen 75 mM borik asit ve kontrol grubuna da eşit hacimde FBS içermeyen medyum verilmesinin ardından 24., 48. ve 72. saatler sonunda yapılan hücre sayımlarında; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla BA grubunda hücre sayısında belirgin bir azalma olduğu görülmüştür (p <0,05). Kontrol gruplarındaki hücreler normal olarak çoğalmaya devam ederken, borik asit SW-480 kolon kanser hücrelerinin çoğalma ve canlılık yeteneklerini belirgin olarak azaltmaktadır. (Şekil 22)



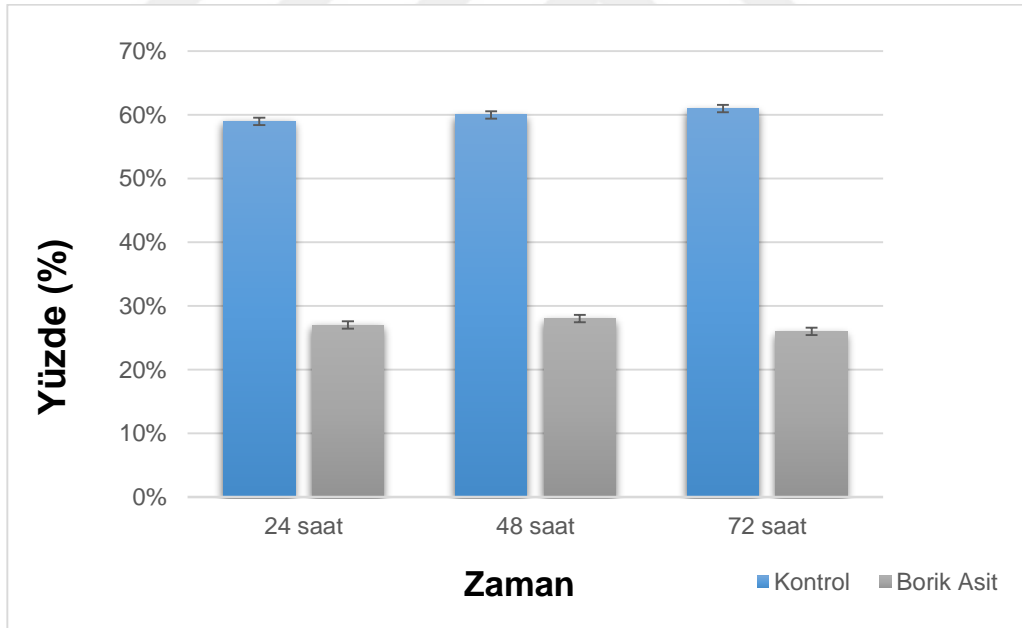
Şekil 22. Zamana bağlı hücre çoğalma verileri.

### 4.3. İki Boyutlu Kültür Çalışmaları Sonuçları

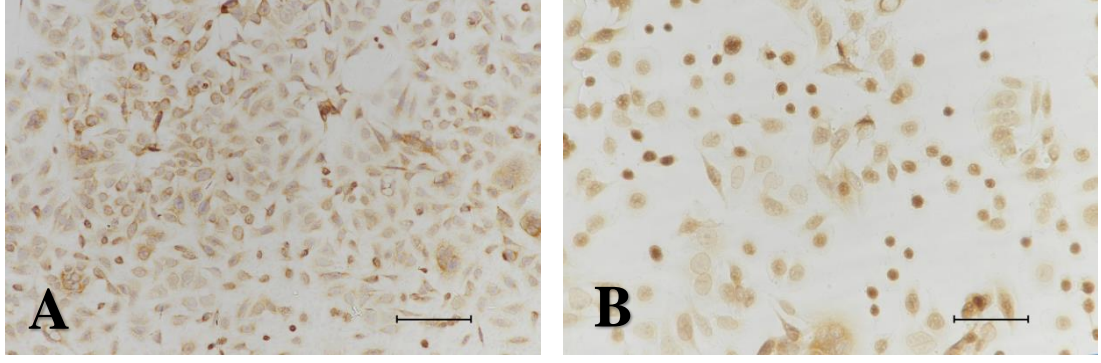
#### 4.3.1. İki Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

$10^4$  SW-480 hücrelerinin 24 kuyucuklu kültür kaplarına lamelli ekimi sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda BrdU ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada; tüm saatlerde kontrol grubunda çok sayıda, hücre döngüsünün S fazında bulunan hücrenin BrdU ile işaretlendiği görüldü (Resim 1, 3, 5) (Şekil 23).

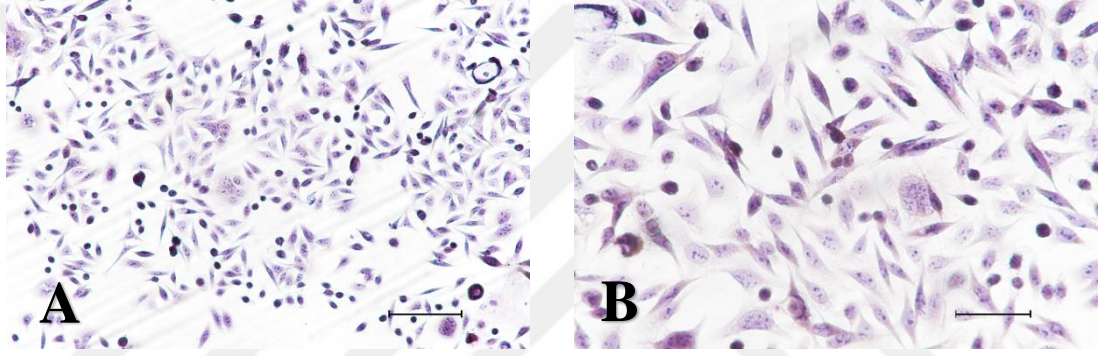
75 mM BA uygulanan BA gruplarında ise, tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla BrdU işaretleme indekslerinde anlamlı bir azalma ( $p < 0,05$ ) olduğu tespit edildi (Resim 2, 4, 6) (Şekil 23).



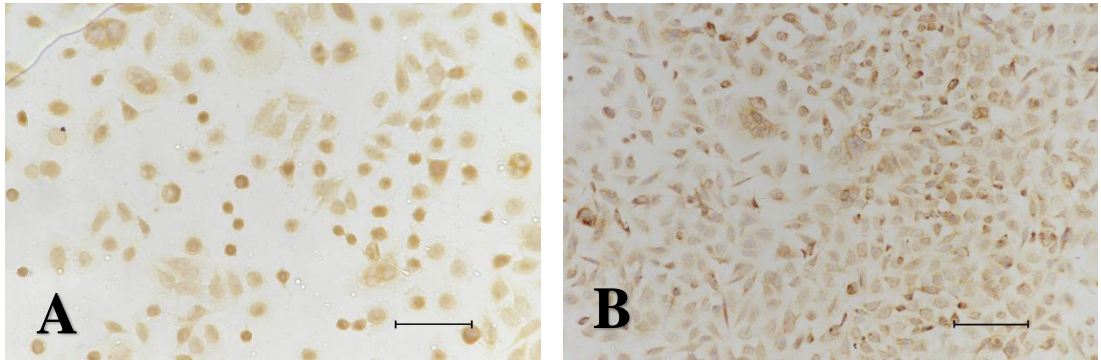
Şekil 23. İki boyutlu kültürde BrdU işaretleme grafiği.



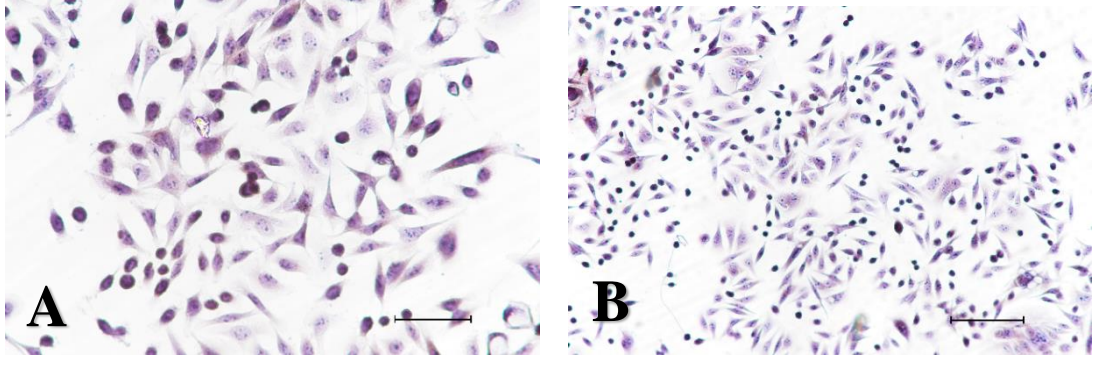
**Resim 1.** 24. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



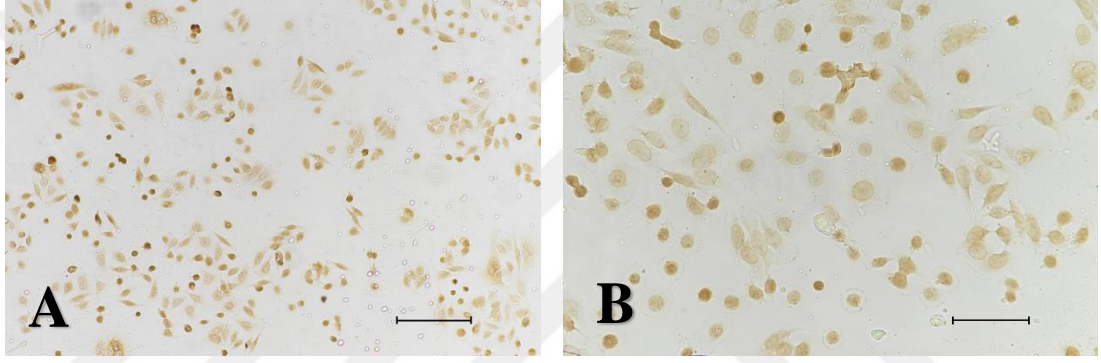
**Resim 2.** 24. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



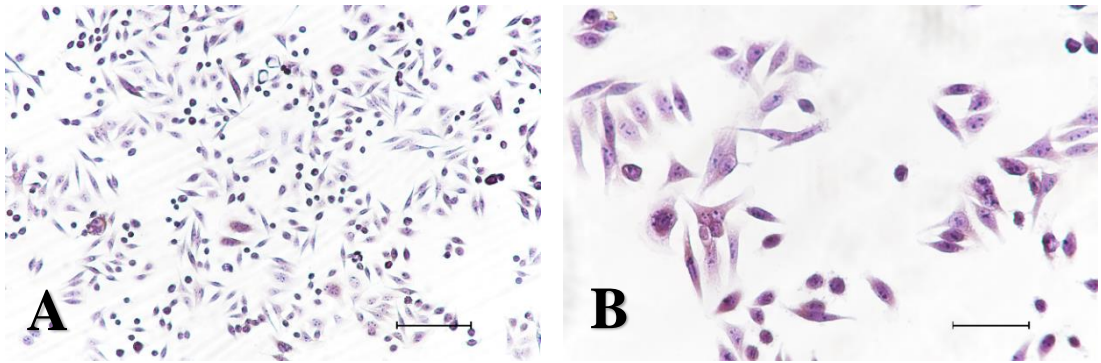
**Resim 3.** 48. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 4.** 48. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 5.** 72. saat kontrol grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

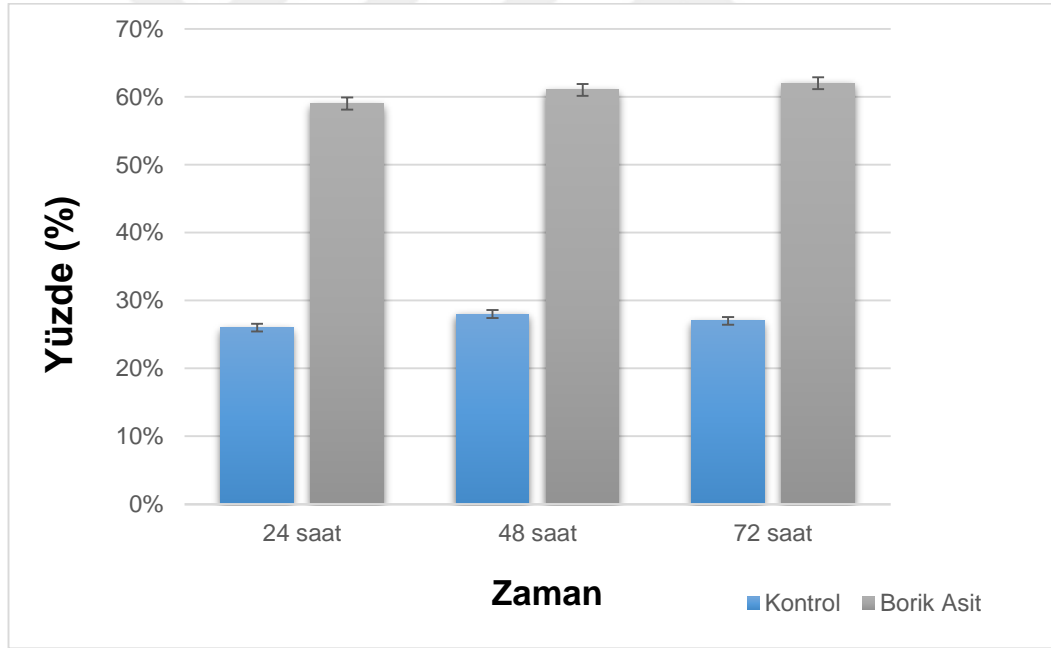


**Resim 6.** 72. saat BA grubu BrdU immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

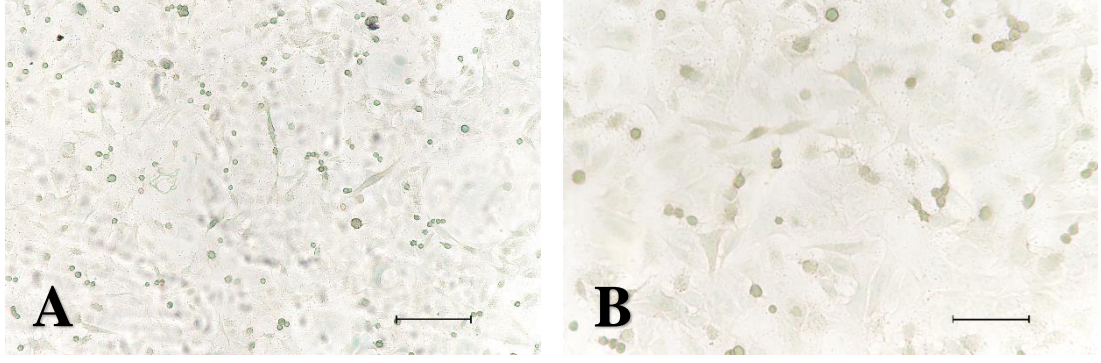
#### 4.3.2. İki Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu Bulguları

$10^4$  SW-480 hücrelerinin 24 kuyucuklu kültür kaplarına lamelli ekimi sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda TUNEL ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada; tüm saatlerde kontrol grubunda çok zayıf bir boyanmanın olduğu, yani az sayıda hücrenin apoptoza gittiği görüldü (Resim 7, 9, 11); (Şekil 24).

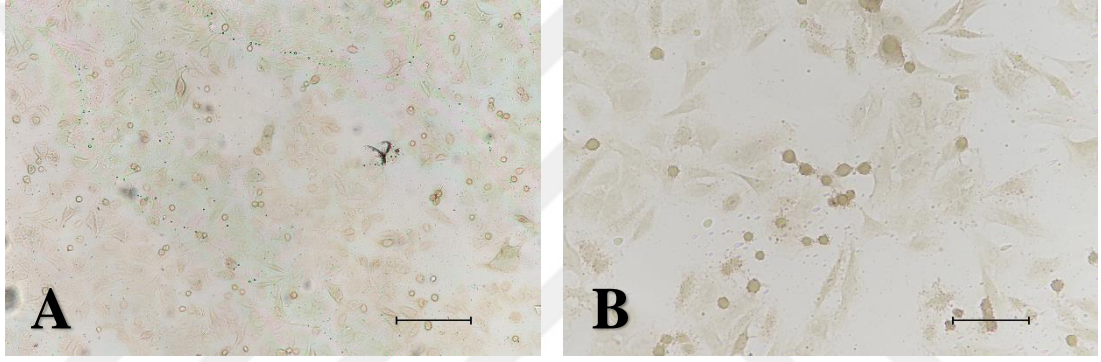
75 mM BA uygulanan BA gruplarında ise; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda hücrenin TUNEL ile işaretlendiği yani, çok sayıda hücrenin apoptoza gittiği ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (Resim 8, 10, 12); (Şekil 24).



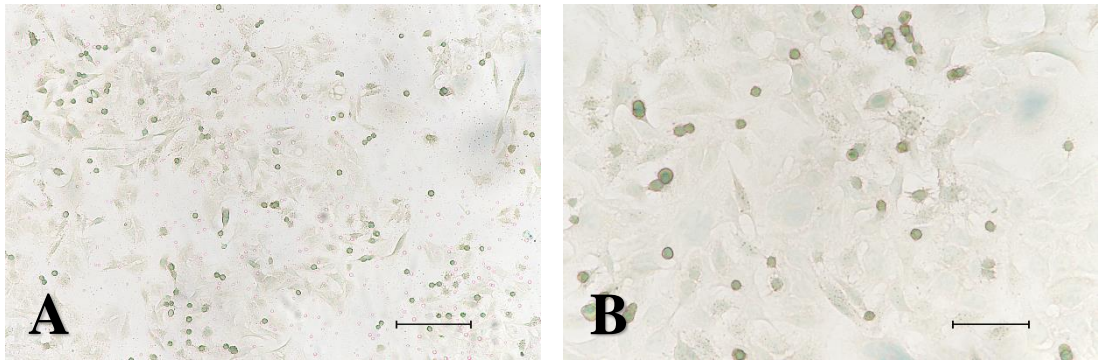
Şekil 24. İki boyutlu kültürde TUNEL boyanma grafiği.



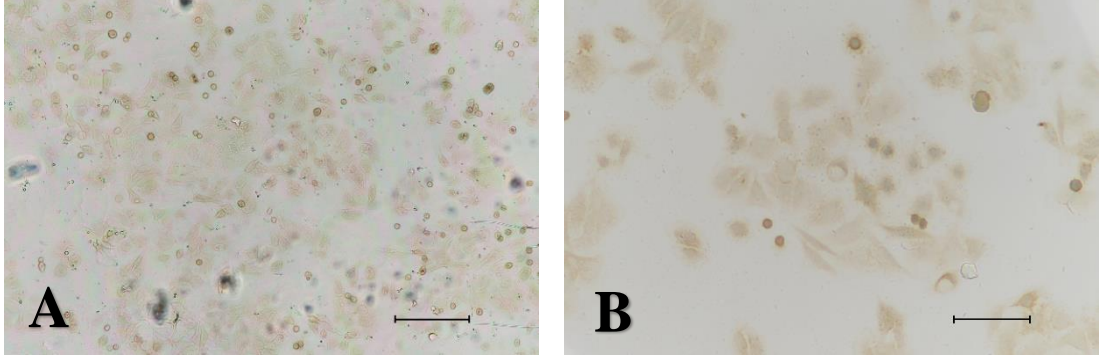
**Resim 7.** 24. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması.(A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



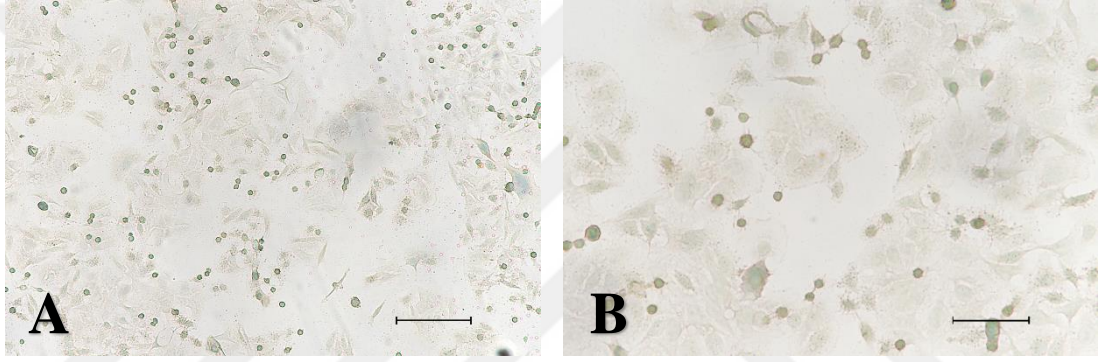
**Resim 8.** 24. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



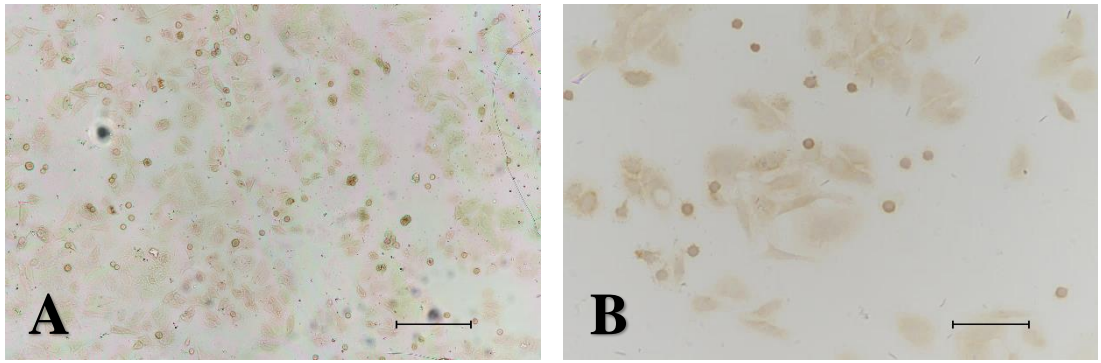
**Resim 9.** 48. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 10.** 48. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 11.** 72. saat kontrol grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

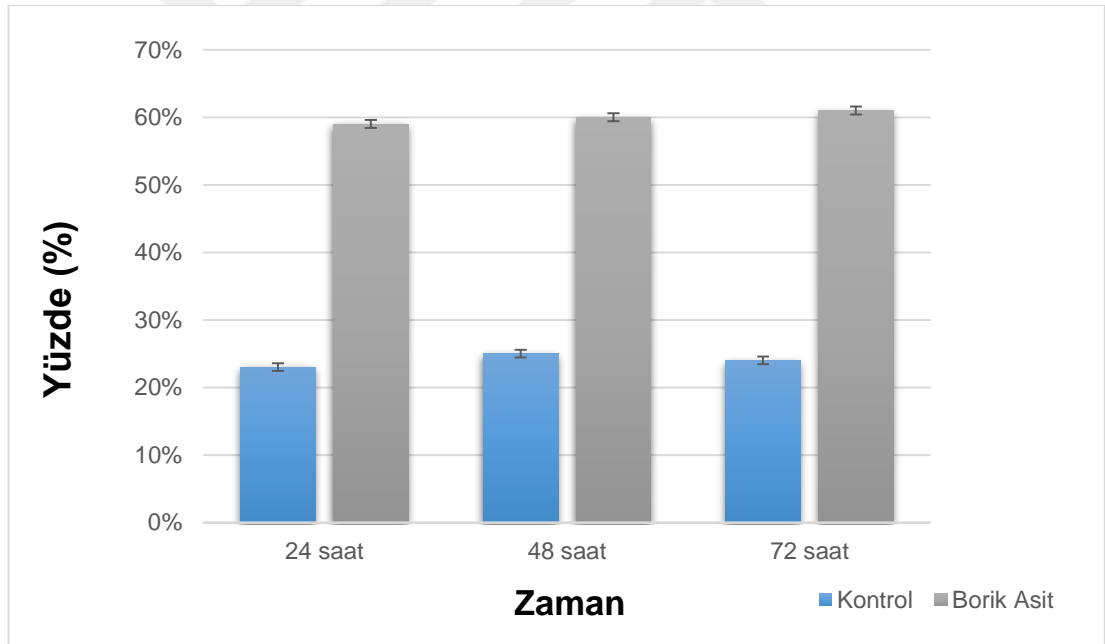


**Resim 12.** 72. saat BA grubu TUNEL immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.3.3. İki Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

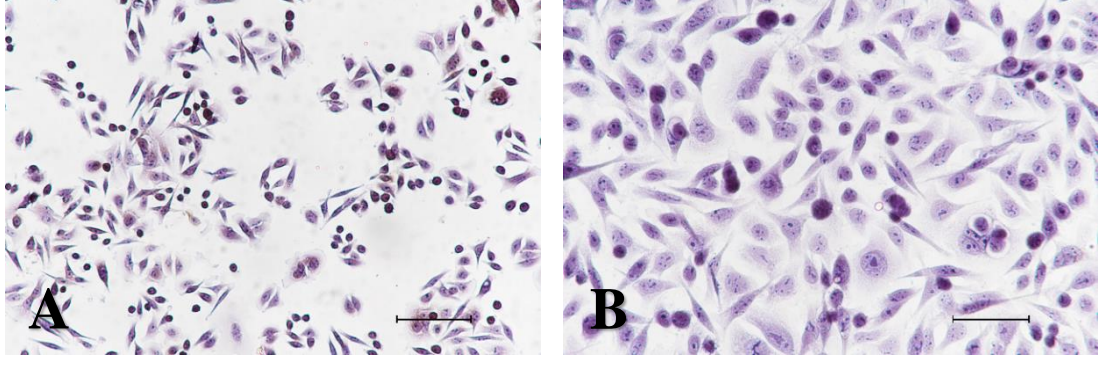
$10^4$  SW-480 hücrelerinin 24 kuyucuklu kültür kaplarına lamelli ekimi sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda kaspaz 3 ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada; tüm saatlerde kontrol grubunda kaspaz 3 ile işaretlenmenin çok zayıf olduğu görüldü (Resim 13, 15, 17); (Şekil 25).

75 mM BA uygulanan BA gruplarında ise; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla çok fazla sayıda hücrenin kaspaz 3 ile işaretlendiği ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (Resim 14, 16, 18); (Şekil 25).

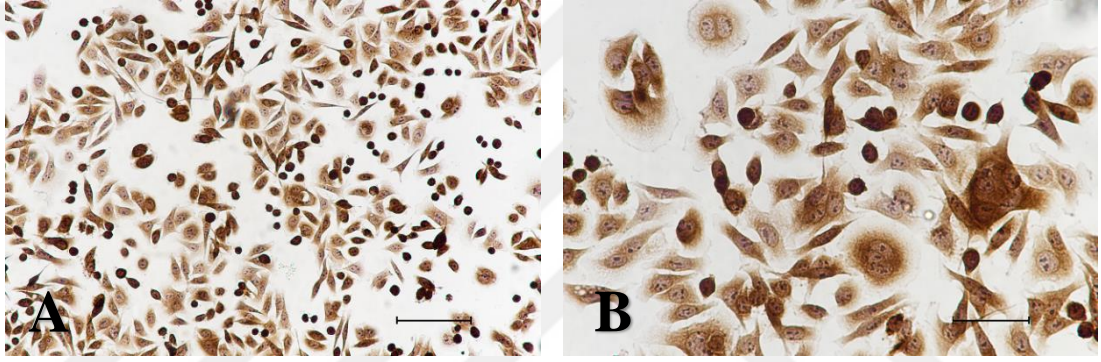


Şekil 25. İki boyutlu kültürde kaspaz 3 ile işaretlenme grafiği.

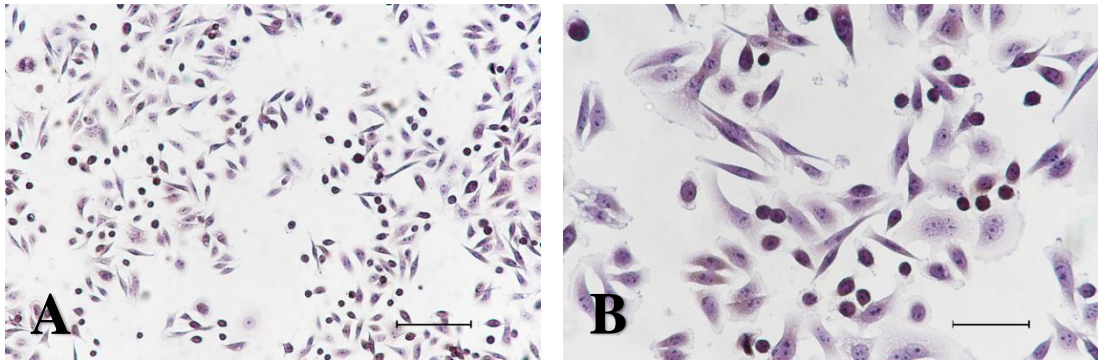




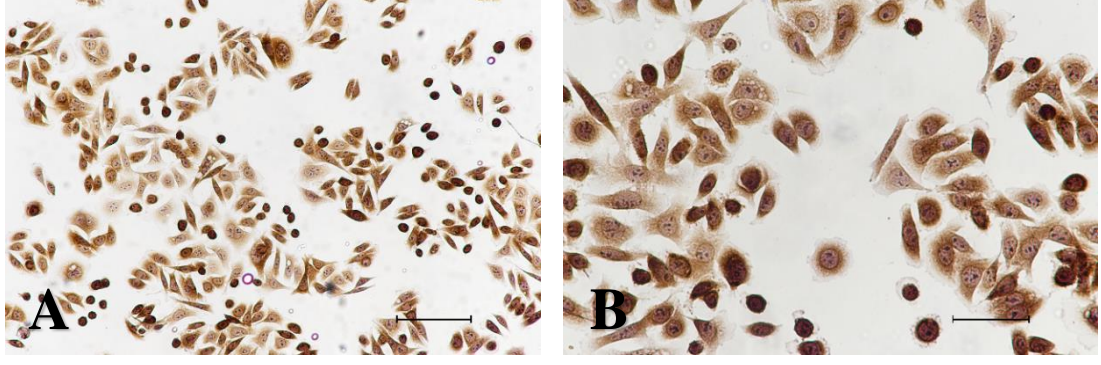
**Resim 13.** 24. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.



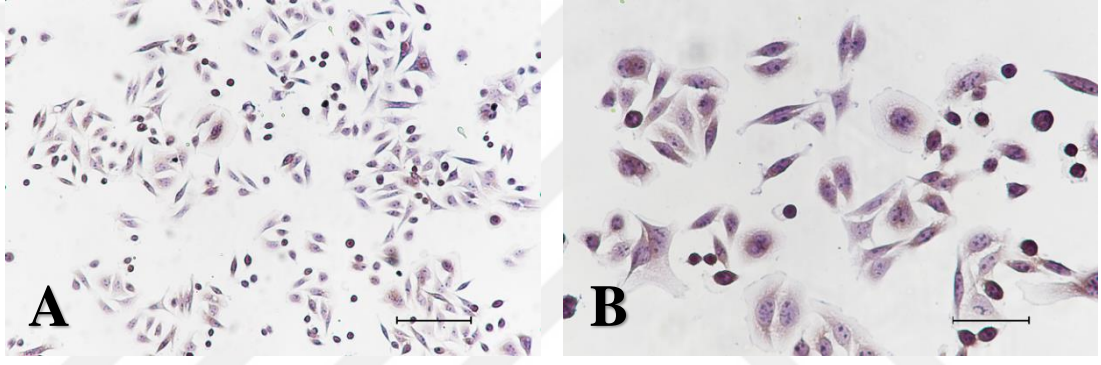
**Resim 14.** 24. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.



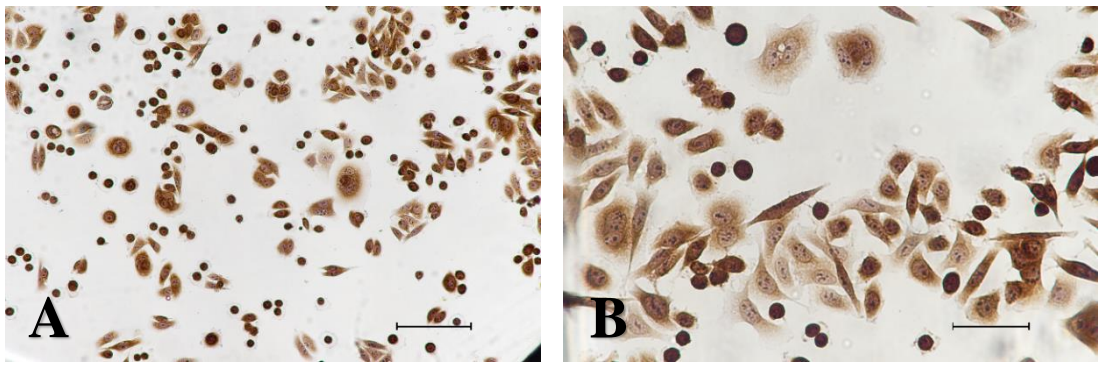
**Resim 15.** 48. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.



**Resim 16.** 48. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 17.** 72. saat kontrol grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

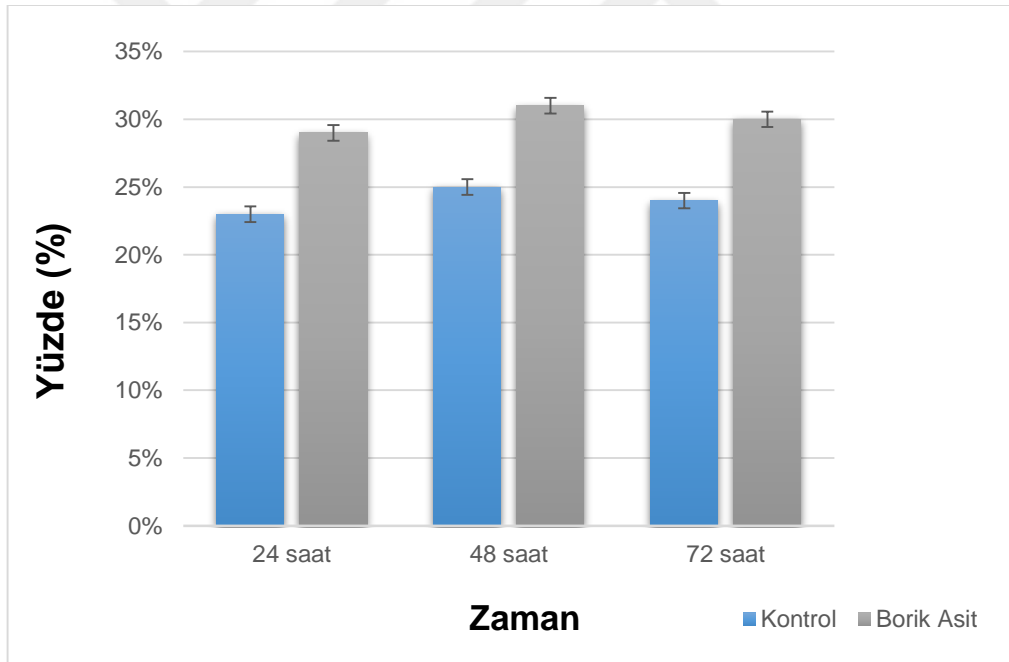


**Resim 18.** 72. saat BA grubu kaspaz 3 immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

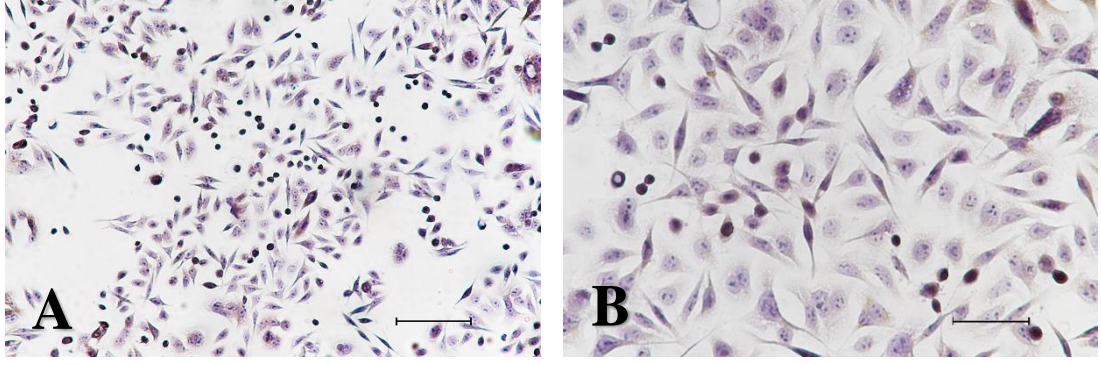
#### 4.3.4. İki Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

$10^4$  SW-480 hücrelerinin 24 kuyucuklu kültür kaplarına lamelli ekimi sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda AIF ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada; tüm saatlerde kontrol grubunda çok az sayıda hücrenin AIF ile işaretlendiği görüldü (Resim 19, 21, 23); (Şekil 26).

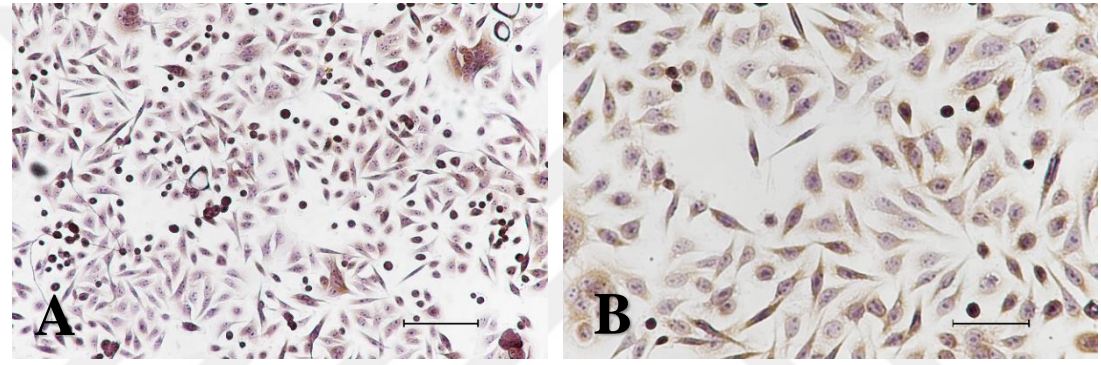
75 mM BA uygulanan BA gruplarında ise; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda hücrenin AIF ile işaretlendiği ( $p < 0,05$ ) tespit edildi (Resim 20, 22, 24); (Şekil 26).



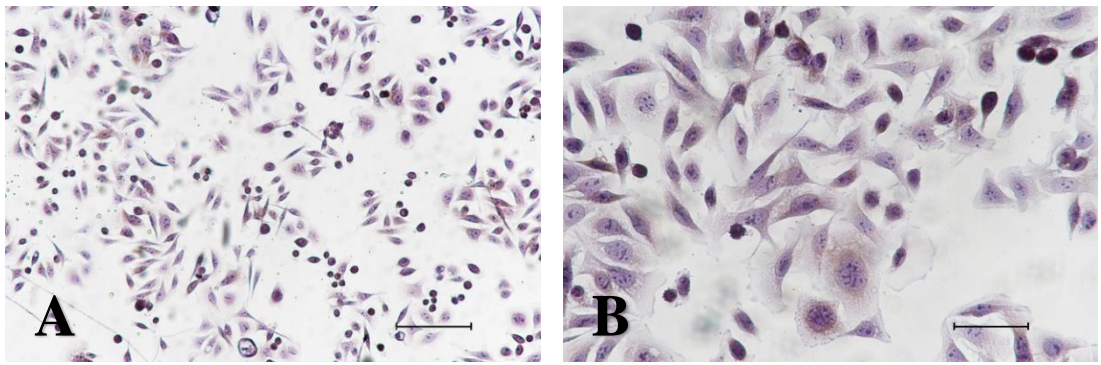
Şekil 26. İki boyutlu kültürde AIF işaretlenme grafiği.



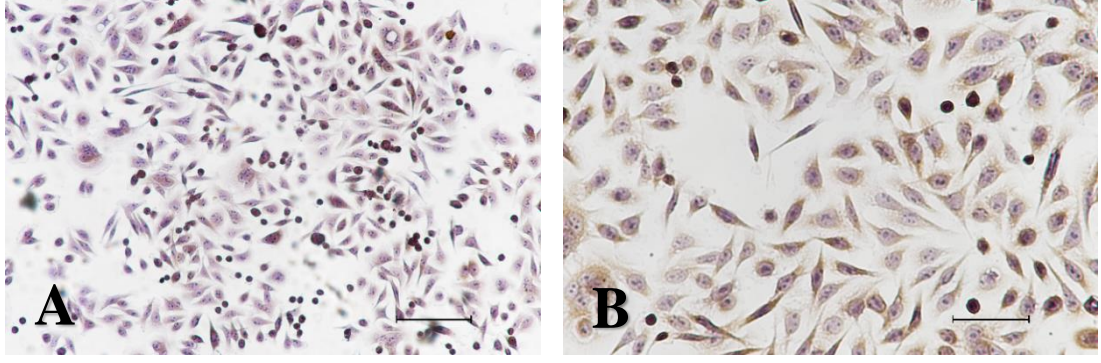
**Resim 19.** 24. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



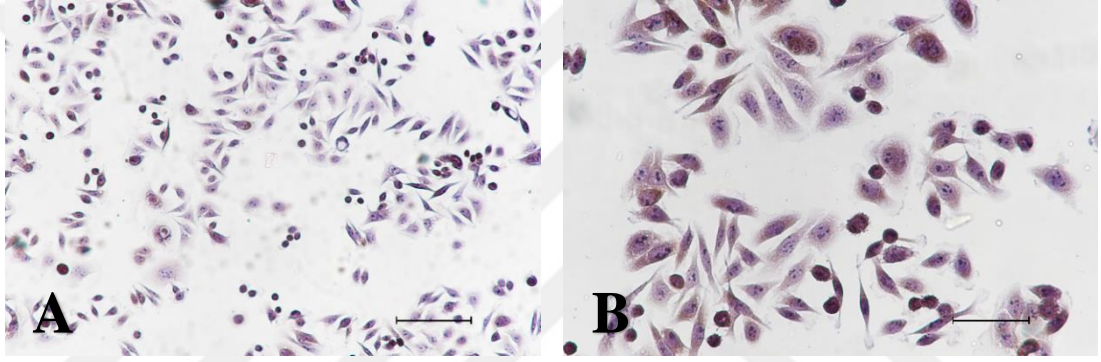
**Resim 20.** 24. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



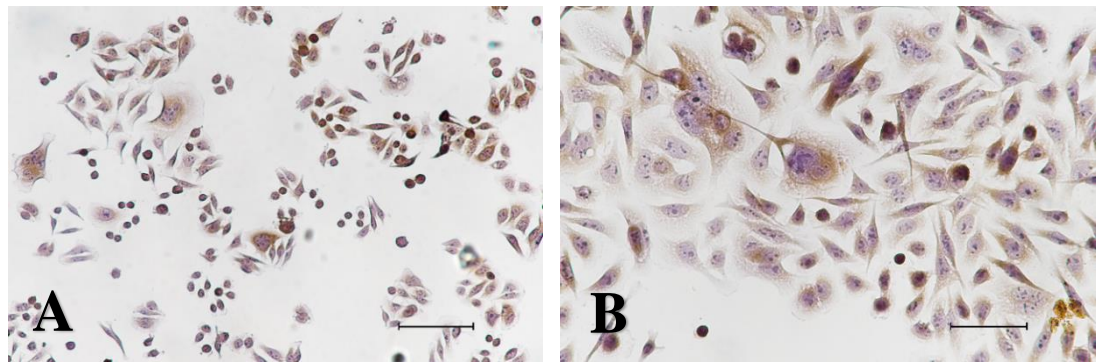
**Resim 21.** 48. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A)  $\times 20$ , ölçüm çubuğu = 100  $\mu\text{m}$ ; (B)  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 22.** 48. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.



**Resim 23.** 72. saat kontrol grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.



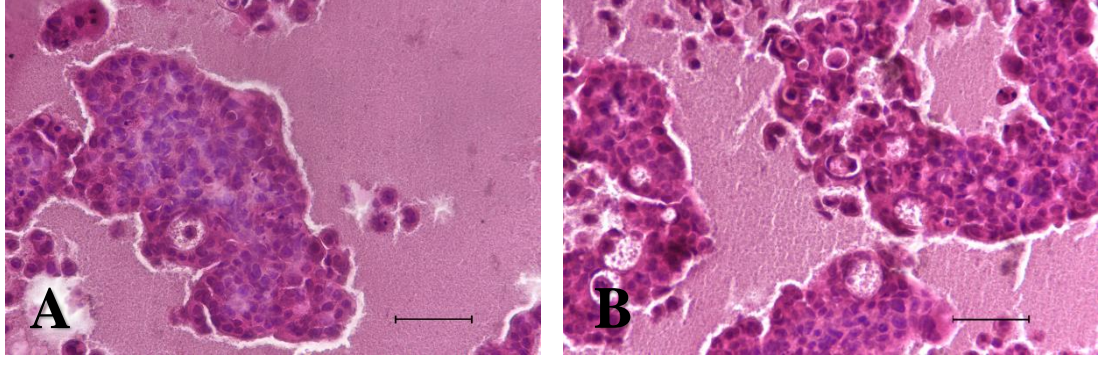
**Resim 24.** 72. saat BA grubu AIF immunohistokimyasal boyaması. (A) ×20, ölçüm çubuğu = 100 µm; (B) ×40, ölçüm çubuğu = 50 µm.

#### 4.4. Üç Boyutlu Kültür Çalışmaları Sonuçları

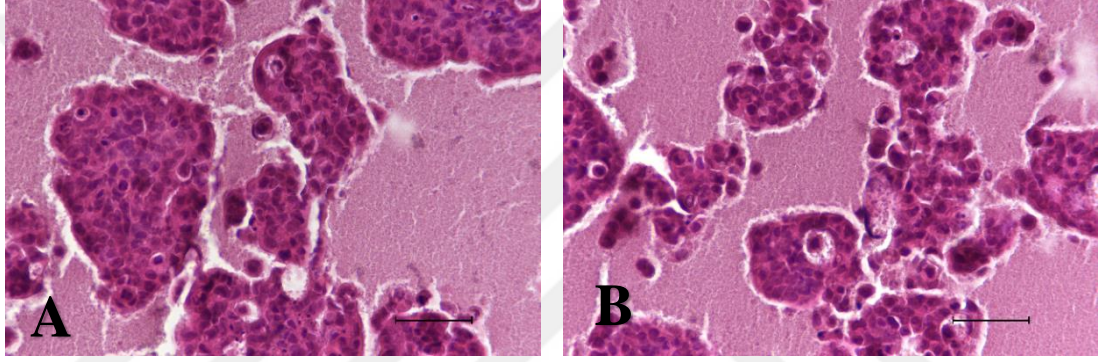
##### 4.4.1. Üç Boyutlu Kültürde Hematoksilen-Eozin Boyama Bulguları ve Sferoid Morfolojisi Değerlendirmesi

10<sup>6</sup> SW-480 hücresinin, agar ile tutunma yüzeyi ortadan kaldırılan 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi ve ardından; sferoid oluşumu sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda takibi yapılarak kesit alınan örnekler hematoksilen-eozin yöntemi ile boyanarak incelendi. Sferoidlerin morfolojik olarak yapılan değerlendirmesinde; tüm saatlerde kontrol grubunda sferoid morfolojilerinin oldukça düzgün olduğu görüldü (Resim 25A, 26A, 27A).

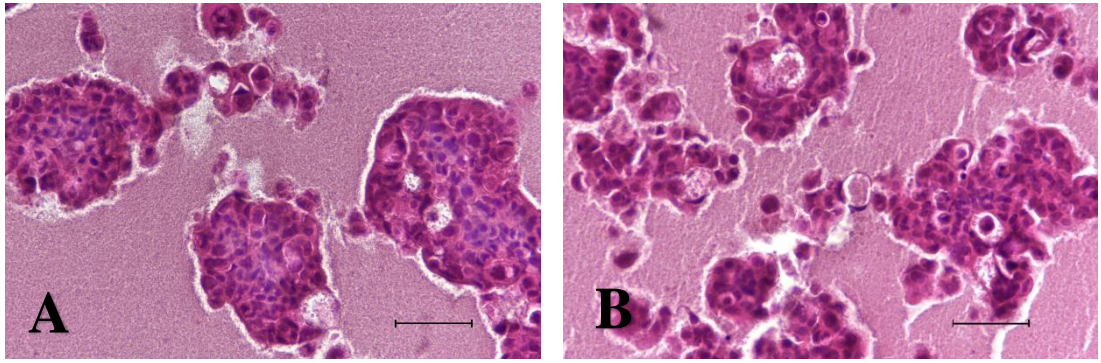
75 mM BA gruplarında ise; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla birçok sferoidin morfolojik olarak bozulduğu ve sferoidlerde daha fazla dejenerasyon alanlarının bulunduğu tespit edildi (Resim 25B, 26B, 27B).



**Resim 25.** 24. Saat H-E boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 26.** 48. Saat H-E boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

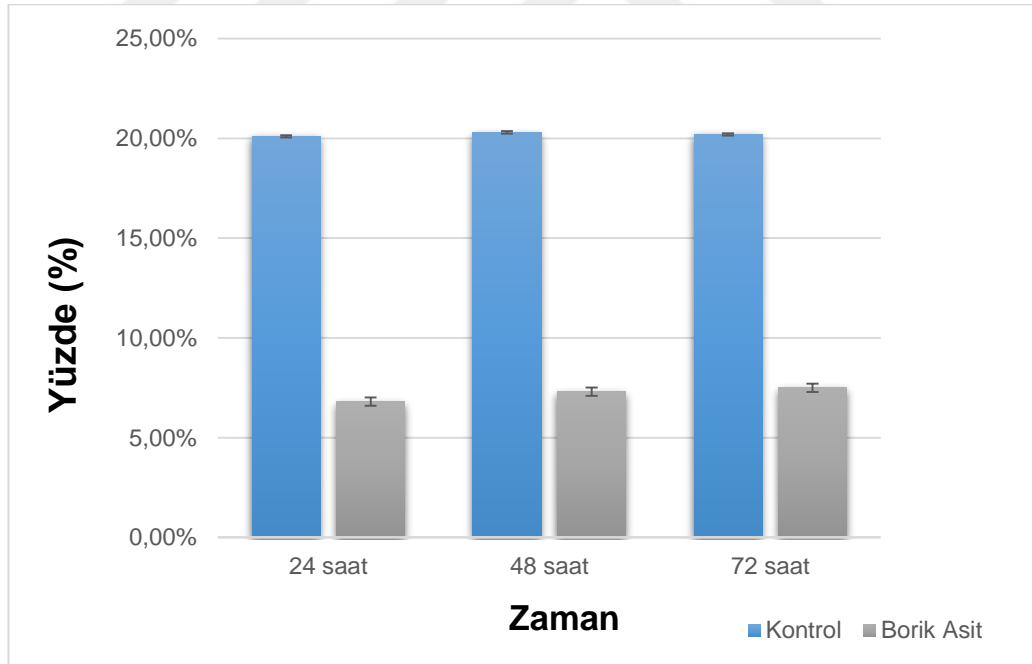


**Resim 27.** 72. Saat H-E boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4.2. Üç Boyutlu Kültürde 5-Bromo-2-Deoksiüridin (BrdU) ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

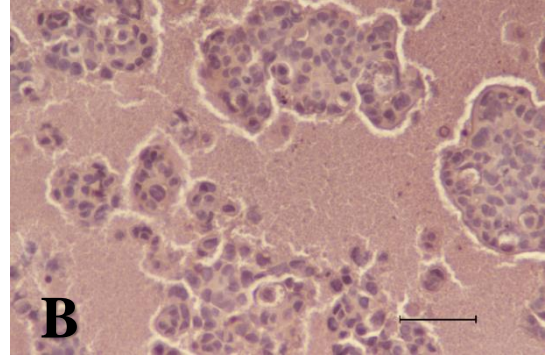
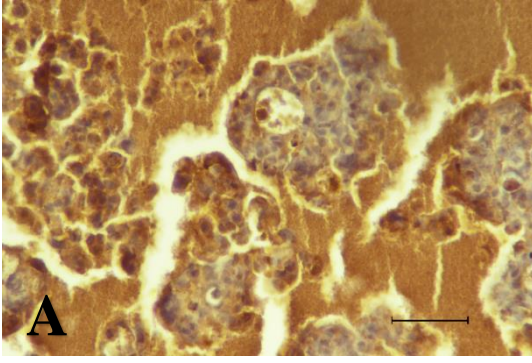
$10^6$  SW-480 hücrelerinin, agar ile tutunma yüzeyi ortadan kaldırılan 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi ve ardından; sferoid oluşmu sonrası deney planına uygun olarak 24, 48 ve 72. saatler sonunda takibi yapılarak kesit alınan örnekler BrdU yöntemi ile boyanarak, immünohistokimyasal işaretleme değerleri açısından incelendi. Yapılan değerlendirmede iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak; tüm saatlerde kontrol grubunda, özellikle sferoidlerin perifer kısımlarındaki hücrelerde daha yoğun olmak üzere çok sayıda hücrenin BrdU ile işaretlendiği görüldü. (Resim 28A, 29A, 30A); (Şekil 27).

75 mM BA gruplarında ise iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda hücrenin BrdU ile işaretlendiği tespit edildi (Resim 28B, 29B 30B); (Şekil 27).

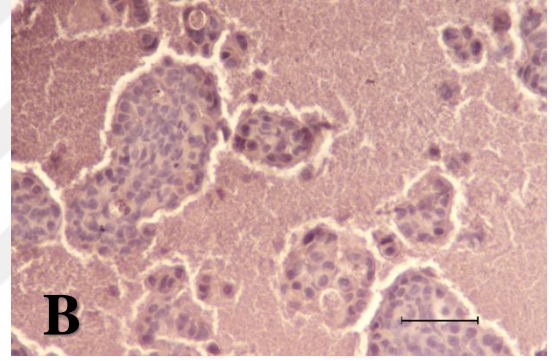
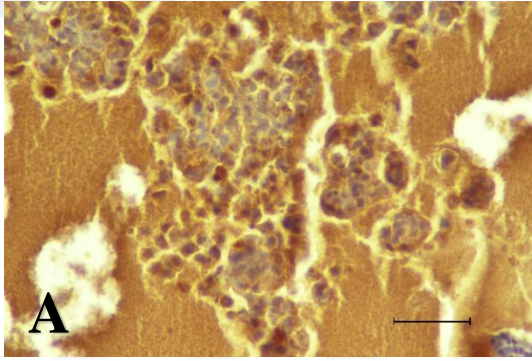


Şekil 27. Üç boyutlu kültürde BrdU işaretleme grafiği.

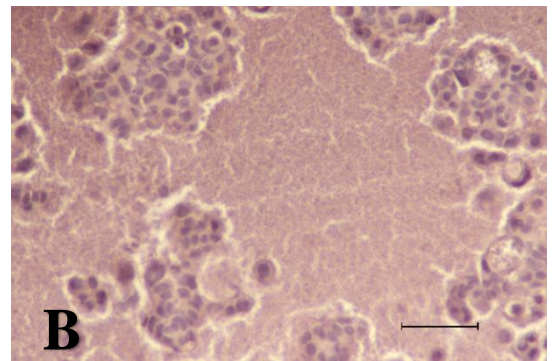
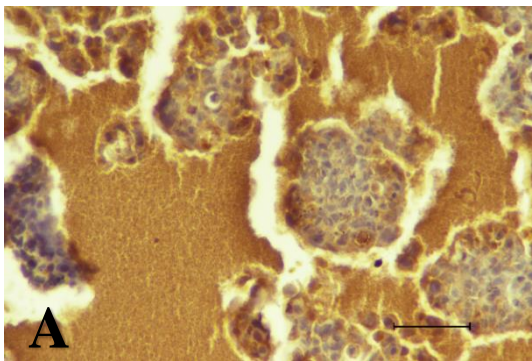




**Resim 28.** 24. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 29.** 48. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

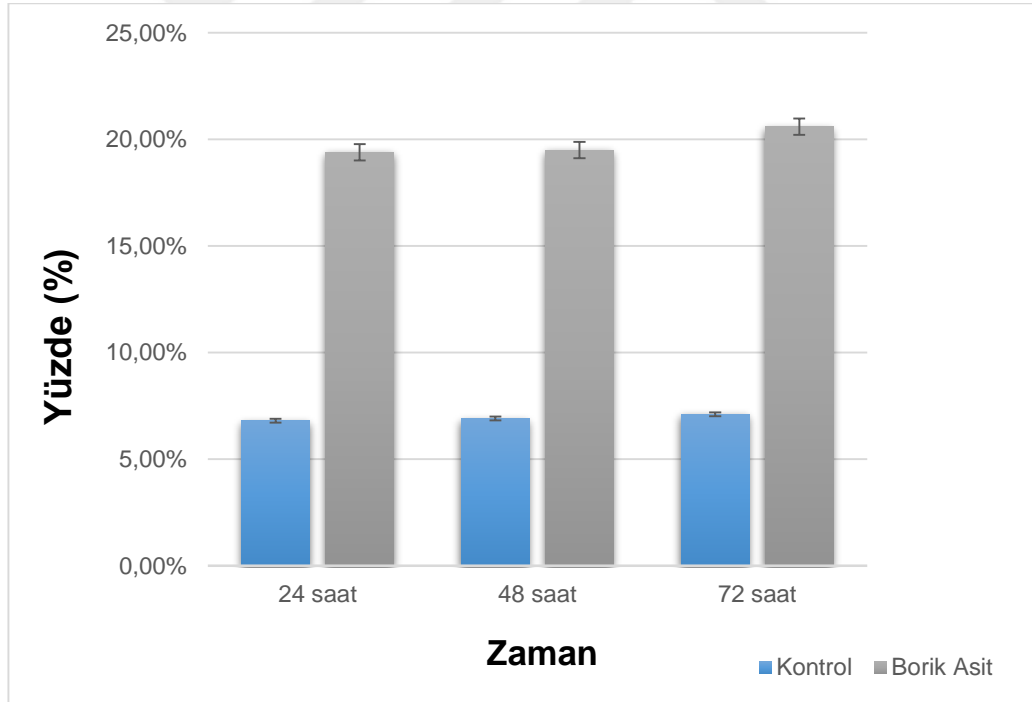


**Resim 30.** 72. Saat BrdU immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

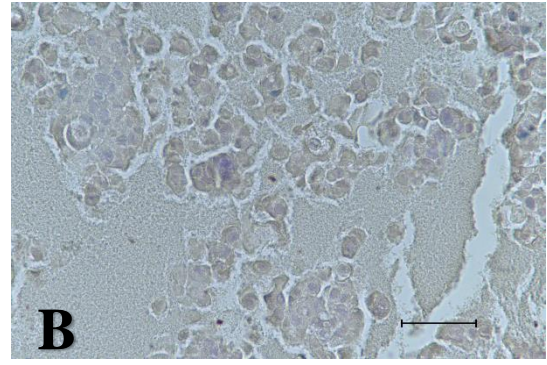
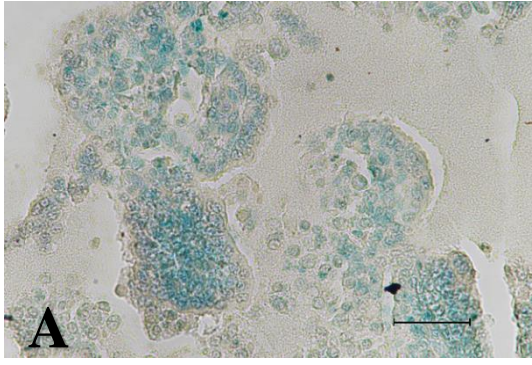
#### 4.4.3. Üç Boyutlu Kültürde Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Mediated Nick-End-Labeling (TUNEL) Metodu Bulguları

$10^6$  SW-480 hücrelerinin, agar ile tutunma yüzeyi ortadan kaldırılan 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi ve ardından; sferoid oluşmu sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda takibi yapılarak kesit alınan örnekler TUNEL yöntemi ile boyanarak, işaretlenme değerleri açısından incelendi. Yapılan değerlendirmede iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak kontrol gruplarında; tüm saatlerde çok az sayıda hücrenin TUNEL ile işaretlendiği görüldü (Resim 31A, 32A, 33A); (Şekil 28).

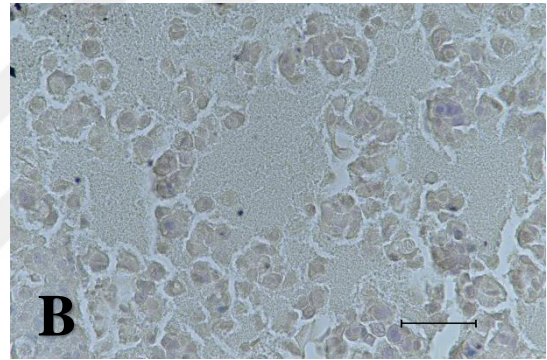
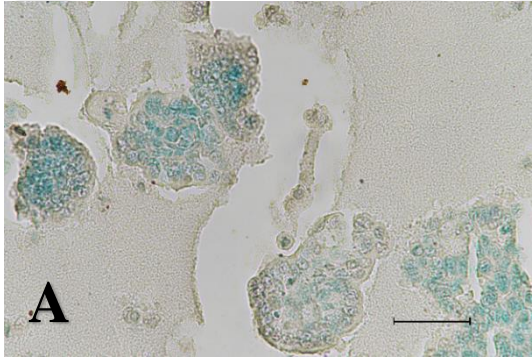
75 mM BA gruplarında ise iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla özellikle sferoidlerin perifer kısımlarındaki hücrelerde daha yoğun olmak üzere çok sayıda hücrenin TUNEL ile işaretlendiği tespit edildi (Resim 31B, 32B, 33B); (Şekil 28).



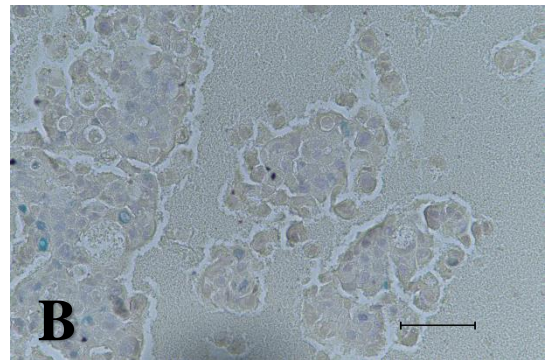
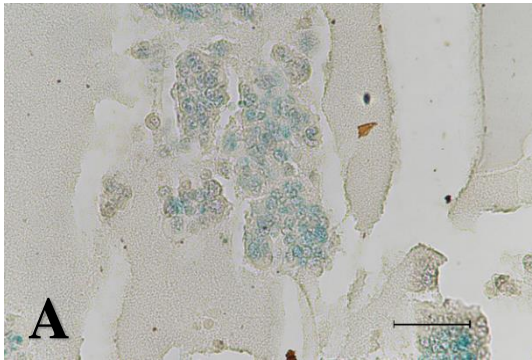
Şekil 28. Üç boyutlu kültürde TUNEL boyanma grafiği.



**Resim 31.** 24. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 32.** 48. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

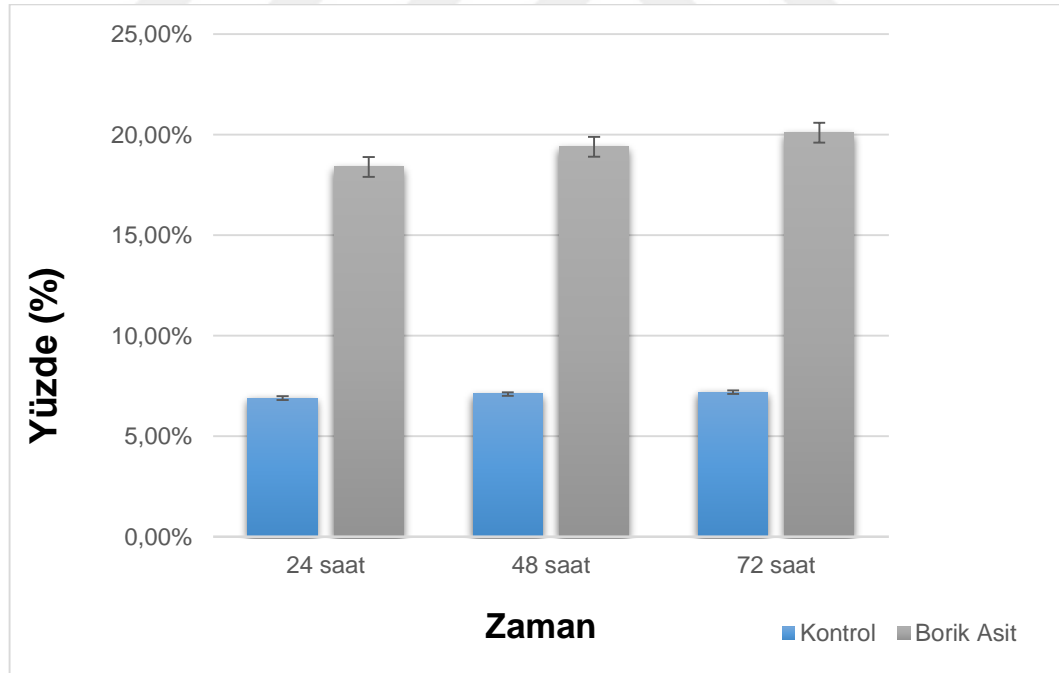


**Resim 33.** 72. Saat TUNEL immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

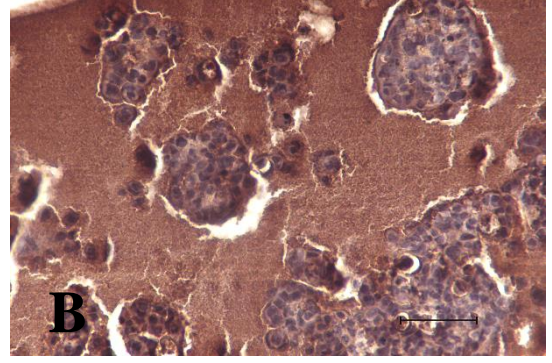
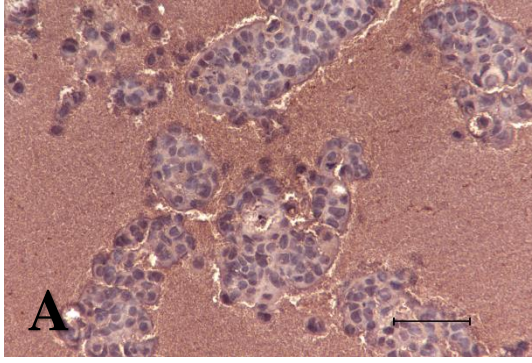
#### 4.4.4. Üç Boyutlu Kültürde Kaspaz 3 ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

$10^6$  SW-480 hücrelerinin, agar ile tutunma yüzeyi ortadan kaldırılan 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi ve ardından; sferoid oluşmu sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda takibi yapılarak kesit alınan örnekler kaspaz 3 ile immünohistokimyasal olarak boyanarak, işaretlenme değerleri açısından incelendi. Yapılan değerlendirmede iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak kontrol grubularında; tüm saatlerde çok az sayıda hücrenin kaspaz 3 ile işaretlendiği görüldü (Resim 34A, 35A, 36A); (Şekil 29).

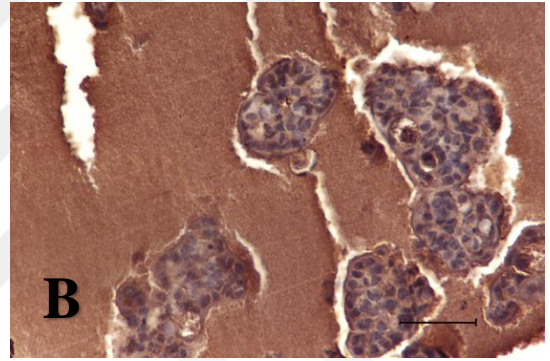
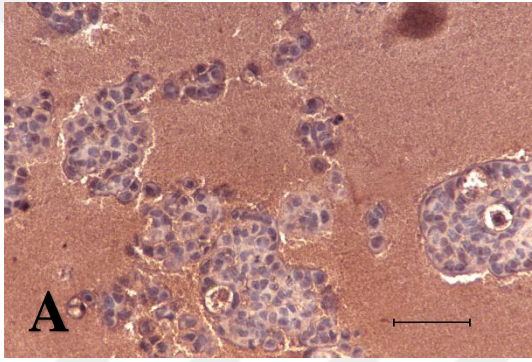
75 mM BA gruplarında ise iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla özellikle sferoidlerin perifer kısımlarındaki hücrelerde daha yoğun olmak üzere çok sayıda hücrenin kaspaz 3 ile işaretlendiği tespit edildi (Resim 34B, 35B, 36B); (Şekil 29).



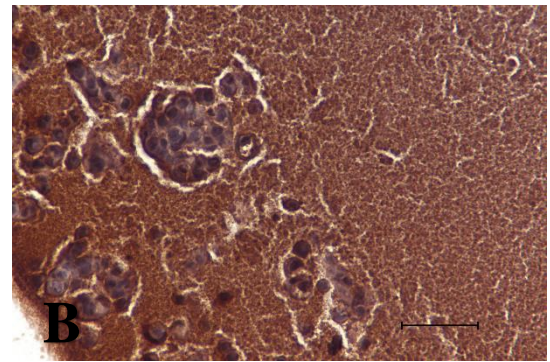
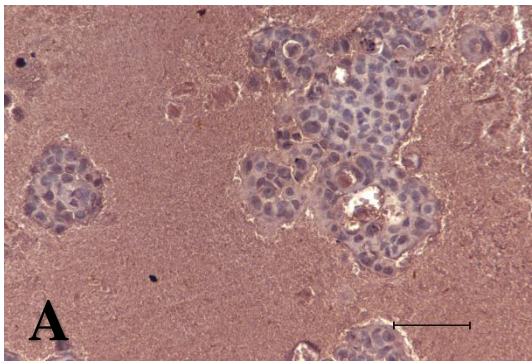
Şekil 29. Üç boyutlu kültürde Kaspaz 3 işaretlenme grafiği.



**Resim 34.** 24. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 35.** 48. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

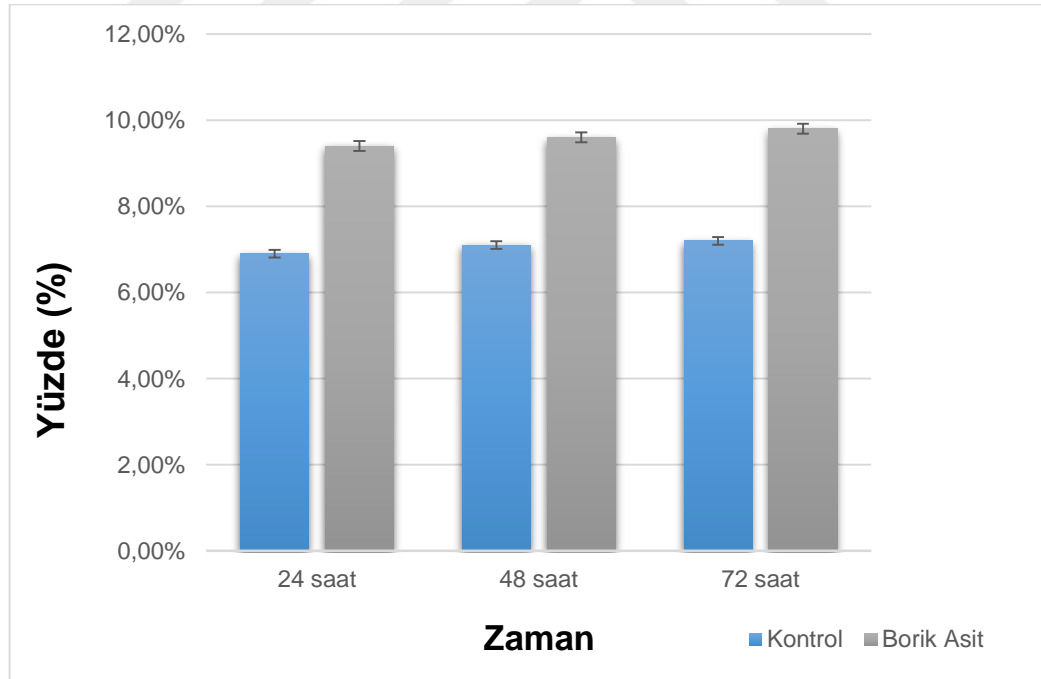


**Resim 36.** 72. Saat kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

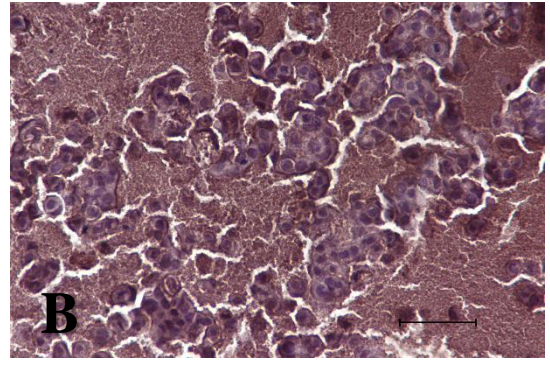
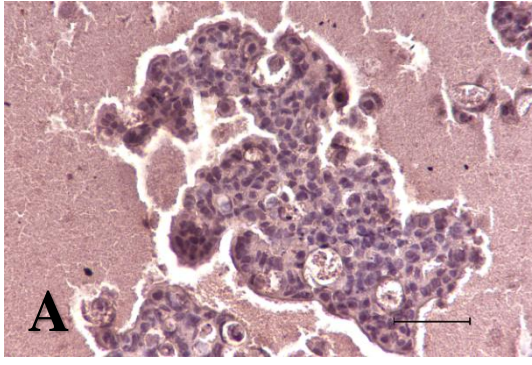
#### 4.4.5. Üç Boyutlu Kültürde AIF ile İmmünohistokimyasal İşaretleme Bulguları

$10^6$  SW-480 hücrelerinin, agar ile tutunma yüzeyi ortadan kaldırılan 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekimi ve ardından; sferoid oluşmu sonrası deney planına uygun olarak 24., 48. ve 72. saatler sonunda takibi yapılarak kesit alınan örnekler AIF ile immünohistokimyasal olarak boyanarak, işaretleme değerleri açısından incelendi. Yapılan değerlendirmede iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak kontrol grubularında; tüm saatlerde çok az sayıda hücrenin AIF ile işaretlendiği görüldü (Resim 37A, 38A, 39A); (Şekil 30).

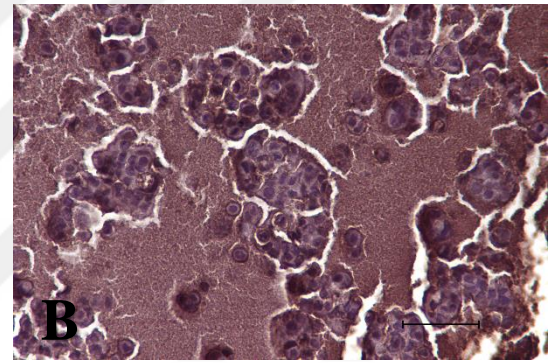
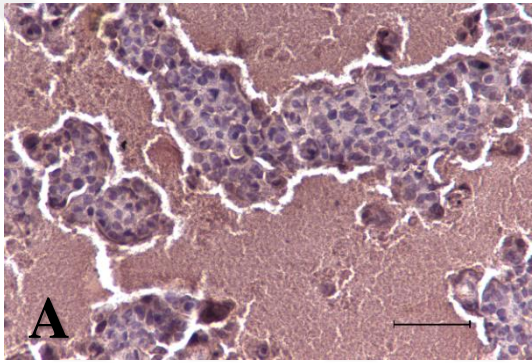
75 mM BA uygulanan BA gruplarında ise iki boyutlu kültür sonuçları ile uyumlu olarak; tüm saatlerde kontrol grubuna kıyasla özellikle sferoidlerin perifer kısımlarındaki hücrelerde daha yoğun olmak üzere çok sayıda hücrenin AIF ile işaretlendiği tespit edildi (Resim 37B, 38B, 39B); (Şekil 30).



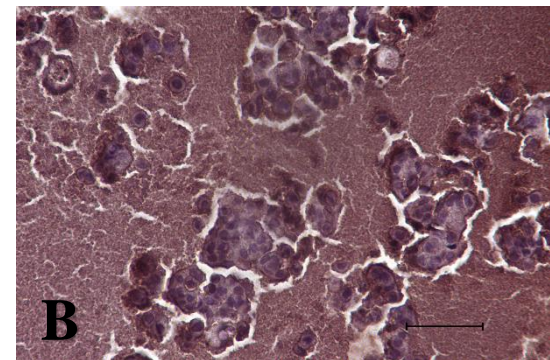
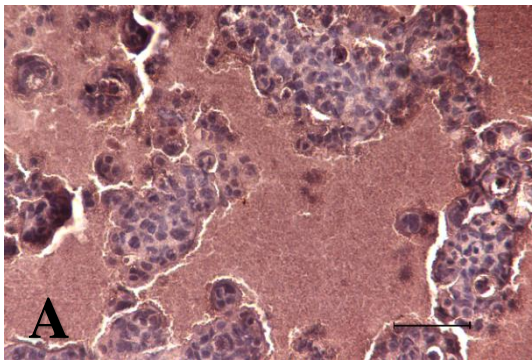
Şekil 30. Üç boyutlu kültürde AIF işaretleme grafiği.



**Resim 37.** 24. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 38.** 48. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .



**Resim 39.** 72. Saat AIF immünohistokimyasal boyaması. (A) kontrol, (B) BA grubu.  $\times 40$ , ölçüm çubuğu = 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5. Gen Ekspresyon Çalışmalarının Sonuçları

Kit ile yapılan RNA izolasyonu takiben elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek spektrofotometrik olarak belirlendi. İzole edilen nükleik asitlerin tüm örneklerde yeterli konsantrasyonda ve ideal saflıkta olduğu görüldü ( $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ ); (Tablo 11).

**Tablo 11.** İzole edilen nükleik asitlerin konsantrasyon ve saflık değerleri.

ÖRNEK	NÜKLEİK ASİT KONSANTRASYONU	260/280
K 2B-1	130,3	1,86
K 2B-2	190,5	1,82
K 2B-3	130,6	1,83
BA 2B-1	150,9	1,95
BA 2B-2	170,6	1,95
BA 2B-3	260,7	1,92
K 3B-1	270,9	1,92
K 3B-2	280,8	1,94
K 3B-3	273,5	1,93
BA 3B-1	266,6	1,94
BA 3B-2	241,2	1,92
BA 3B-3	259,2	1,95

Genetik analiz, doz belirleme deneyleri sırasında borik asitin SW-480 hücreleri üzerine en etkin olduğu tespit edilen 48. saat için yapıldı. Çeşitli apoptotik yollarda yer alan birçok gen (7'si referans gen, 3'ü RT pozitif kontrol, 2 si RT negatif kontrol olmak üzere toplam 96 gen); "RealTime Ready Apoptosis Panel, Human 96 Gene" kiti ile 2 boyutlu (2B) kültür ve 3 boyutlu (3B) kültür için ayrı ayrı çalışıldı. Hem 2B hem 3B kültürde kontrol ve borik asit gruplarına ait örneklerden elde edilen sayısal Ct değerleri;  $2^{\Delta\Delta CT}$  yöntemi ve *Student t* testi kullanılarak analiz edildi.

Kat değişimi ( $2^{\Delta\Delta CT}$ ) deney grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarının ( $2^{\Delta CT}$ ), kontrol grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarına ( $2^{\Delta CT}$ ) bölünmesiyle elde edilir. Kat değişimi değerinin istatistiksel analizi sonrası ortaya çıkan değer 1'den büyük olması o genin ekspresyonundaki artışı, 1'den küçük olması ise ilgili genin ekspresyonundaki azalmayı gösterir. Bu analizler sonucunda;

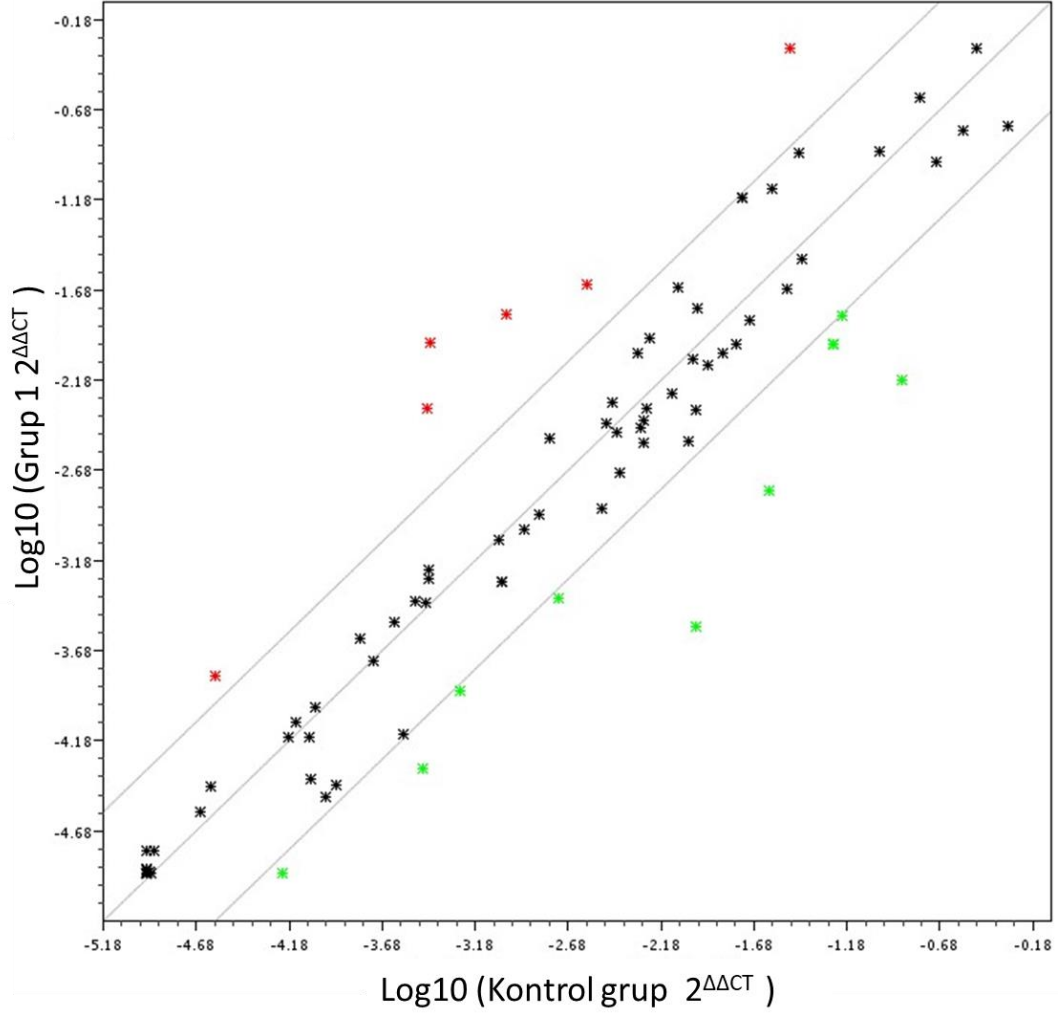


2B kültürde kat değişim değerleri ve istatistiksel analizleri incelendiğinde, kitte yer alan apoptotik yollarla ilgili genlerden borik asit grubunda kontrol grubuna kıyasla 6 adet genin ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (Tablo 12).

**Tablo 12.** Kat değişim değerlerinin istatistiksel analizine göre 2B kültürde, BA grubunda ekspresyonu artan genler.

<b>Kontrol Grubuna Kıyasla Borik Asit Grubunda Ekspresyonu Artan Genler</b>		
<b>Pozisyon (Kitteki Yerleşimi)</b>	<b>Gen Sembolü</b>	<b>Kat değişimi istatistiksel analiz değeri</b>
<b>A4</b>	<i>BAD</i>	15,8711
<b>A11</b>	<i>BCL2L10</i>	27,7612
<b>A12</b>	<i>BCL2L11</i>	5,6896
<b>D12</b>	<i>HTRA2</i>	12,7139
<b>F4</b>	<i>TNF</i>	8,388
<b>G2</b>	<i>TNFSF8</i>	14,2379

Saçılım grafiğinde x ekseninde deney (borik asit grubu) ve y ekseninde kontrol grubundaki hedef genin ekspresyon değerleri belirtilmektedir. Paralel çizgilerin yukarısında kalan ve kırmızı olarak işaretlenen genler deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde ekspresyonu artan genleri göstermektedir (Şekil 31).



**Şekil 31.** 2B kültür 48. saat BA ve kontrol grupları ifade düzeyi değişimlerini gösteren saçılım grafiği (scatter plot).

Kontrol grubu ve deney grubu arasında ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini gösteren kümeleme analizinde de borik asit grubunda çok sayıda genin kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeylerinin arttığı ancak sadece *BAD*, *BCL2L10*, *BCL2L11*, *HTRA2*, *TNF* ve *TNFSF8* genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 32).

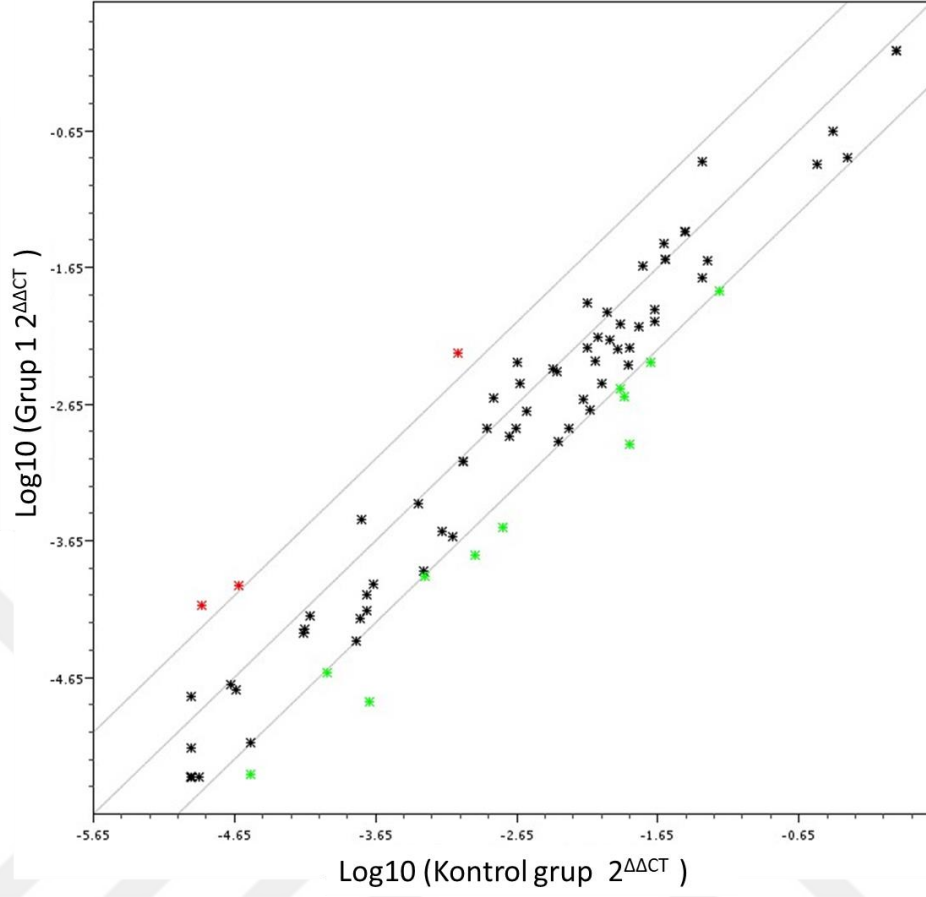


3B kültürde ise, kat düzenlemesi değerleri incelendiğinde; kitte yer alan apoptotik yollarla ilgili genlerden borik asit grubunda, kontrol grubuna kıyasla 3 adet genin ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (Tablo 14).

**Tablo 13.** Kat değişim değerlerinin istatistiksel analizine göre 3B kültürde, BA grubunda ekspresyonu artan genler.

<b>Kontrol Grubuna Kıyasla Borik Asit Grubunda Ekspresyonu Artan Genler</b>		
<b>Pozisyon (kitteki yerleşimi)</b>	<b>Gen Sembolü</b>	<b>Kat değişimi istatistiksel analiz değeri</b>
<b>E2</b>	<i>MCLI</i>	4,3822
<b>E8</b>	<i>REL</i>	6,1546
<b>F5</b>	<i>TNFRSF10A</i>	5,7958

Saçılım grafiğinde x ekseninde deney (borik asit grubu) ve y ekseninde kontrol grubundaki hedef genin ekspresyon değerleri belirtilmektedir. Paralel çizgilerin yukarısında kalan ve kırmızı olarak işaretlenen genler deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde ekspresyonu artan genleri göstermektedir (Şekil 33).



**Şekil 33.** 3B kültür 48. saat BA ve kontrol grupları ifade düzeyi değişimlerini gösteren saçılım grafiği (scatter plot).

Kontrol grubu ve deney grubu arasında ilgili genlerin ekspresyon seviyelerini gösteren kümeleme analizinde de borik asit grubunda çok sayıda genin kontrol grubuna kıyasla ekspresyon düzeylerinin arttığı ancak istatistiksel olarak sadece *MCLI*, *REL* ve *TNFRSF10A* genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 34).



## 5. TARTIŞMA

Kanser ile olan savaş, bireysel tıp ve immunoterapi gibi gelecek vaad eden çalışmaların da dahil olduğu çok sayıdaki araştırmaya rağmen halen kazanılamamıştır. Genel olarak dünya nüfusundaki yaşlanma ve artan risk faktörleri ile birlikte kanser prevalansı ve insidansı da artış göstermektedir. Kanser 2015 yılında, dünya çapında 8,7 milyon insanın ölümüne neden olduğu ve ölüm nedenleri arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer aldığı görülmektedir. Dünya genelinde görülme sıklığı açısından bakıldığında meme kanseri, akciğer kanseri ve kolorektal kanserler ilk üç sırada yer alır (182). Bütün kanser türleri arasında kolorektal kanserler önemli derecede mortalite ve morbiditeye sahiptir. 2015 yılı dünya kanser verileri incelendiğinde 1,7 milyon insanın kolon kanserine yakalandığı, 832 bin kişinin ise bu hastalıktan dolayı hayatını kaybettiği görülmektedir. 1990'lı yılların ortasından başlayarak kolorektal kanser insidansı giderek artmakta ve 2035 yılı itibari ile bu artışın %80 oranında olması beklenmektedir (183). Dünya verilerine paralel olarak, ülkemizde de benzer bir tablo görülmektedir. 2014 yılı verilerine göre, ülkemizde hem kadın hem de erkeklerde en sık gözlenen kanser türleri arasında kolorektal kanserler üçüncü sırada yer almaktadır. Yine bu verilere göre kadınlarda ve erkeklerde özellikle 50'li yaşlardan itibaren kolon kanseri görülme oranlarında hızlı bir artış görülmektedir (184). Bu tez çalışması da önemli bir sağlık sorununun tedavisinde kullanılabilecek, yeni ve doğal bir ajanı araştırmayı ve aynı zamanda bu patolojinin moleküler biyolojisini aydınlatacak verileri ortaya koymayı hedeflemektedir.

Kolorektal kanser olgularının çoğu sporadiktir. Ancak %5-10'luk bir kısmında, bilinen birtakım kanser ilişkili gende mutasyonlara rastlanmaktadır. Bununla birlikte bu hastaların yaklaşık %25'inde kolorektal kanser ile ilişkili bir aile öyküsü bulunmaktadır (153). Günümüze kadar kolorektal kanser patogeneğinde rol oynayan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak normal kolon epitelinin önce adenoma, sonra da karsinoma dönüşümünde; kromozomal kararsızlık, mikrosatellit kararsızlığı ve epigenetik kararsızlık gibi üç farklı mekanizmanın etkili olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan en sık görüleni kromozomal kararsızlıktır. Bu durum kromozomal anormalliklere neden olan çok sayıda yapısal değişiklik nedeniyle gerçekleşir. Sonuçta tümör baskılayıcı genlerde kayıp (*APC*, *PTEN*, *TP53* gibi), temel

onkogenlerde (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK* gibi) değişiklikler ve bazı önemli sinyal yollarında aktivasyon (*Wnt/β* katenin, *TGF β*, *EGFR*, *MAPK*, *PI3K* gibi) gözlenebilir. İkinci sıklıkta görülen mikrosatellit kararsızlığı ise DNA yanlış eşleşme onarım genlerinde meydana gelen mutasyonlar nedeni ile olur. Bu mutasyonlar sonucunda genom içerisinde yüzlerce defa tekrarlayan kısa diziler (mikrosatellit) birikir. Mikrosatellit kararsızlığı kalıtsal ya da sporadik bir zeminde gelişebilir. Son olarak epigenetik kararsızlıkta ise hücre genomunun metilasyon durumunda değişiklikler görülmektedir. Kanseröz olmayan hücre genomu promoter olmayan bölgelerde yaklaşık %80-85 oranında metillenmiş CpG adaları içermektedir. Aksine kanser hücrelerinde promoter olmayan alanlarda genel bir hipo metilasyon ve özellikle tümör baskılayıcı genlerin promoter alanlarında ise hiper metilasyon görülür (150).

Sporadik olarak görülen kolon kanser vakalarında başlıca risk faktörleri; yaş, erkek cinsiyet, kolonik polip öyküsü ve çevresel faktörlerdir (fazla kırmızı et tüketimi, yüksek yağlı diyet, yetersiz lif alımı, obezite, sedanter yaşam tarzı, sigara, aşırı alkol tüketimi gibi). Kalıtsal vakalarda ise en sık Lynch sendromu olarak adlandırılan herediter non-polipozis kolorektal kanser ve daha az sıklıkta ailesel adenomatöz polipozis sendromu risk faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Lynch sendromundan DNA yanlış eşleşme onarım genlerinde, sıklıkla da *MSH2* ve *MLH1* genlerinde meydana gelen kalıtsal mutasyonlar söz konusudur. Ailesel Adenomatöz Polipozis Sendrom'larında ise *APC* tümör baskılayıcı genlerinde kalıtsal mutasyonlar söz konusudur. Bu sendromları taşıyan bireylerde, normal bireyle kıyaslandığında kolorektal kanser gelişme riski yaklaşık iki-üç kat kadar artmaktadır (185).

Kolon kanserinde tanı çoğunlukla çeşitli semptomlarla başvuran hastalarda yapılan incelemelerde veya kanser taraması sırasında konulmaktadır. Tıkayıcı ya da perforan edici kanser vakaları haricinde semptomların süresi prognoz ile ilişkili değildir. Çünkü erken evrelerde kolorektal kanserler çoğunlukla semptomatik değildir ve dışkılama alışkanlıklarında değişiklik, abdominal rahatsızlık hissi, nedeni bilinmeyen kilo kaybı, sürekli yorgunluk gibi görülen genel semptomların çoğu da özgül değildir. Bunlar haricinde fizik muayene sırasında palpe edilebilen bir kitle sağ kolon kanserlerinde görülebilir. Kanama çoğunlukla akut formda olup, dışkıya bulaşık kırmızı kan şeklinde görülmektedir. Ayrıca kronik olarak devam eden kanama ve buna bağlı olarak demir eksikliği anemisi de sıklıkla görülmektedir. Bu hastalar kronik



yorgunluk ve konjestif kalp yetmezliği semptomları ile başvurabilirler. Daha az oranlarda meydana gelen kanamalar ancak gaitada gizli kan testleri ile ortaya çıkarılabilir. İleoçekal valfin etkilendiği olgularda ise abdominal distansiyon ve kabızlık semptomları görülebilir. Lokal olarak yayılmış rektal tümörlerde ise tenesmus, üriner semptomlar ve perineal ağrı gözlenebilir (4).

Kolorektal kanserlerin kesin tanısı semptomlardan şüphelenilen kişilere veya kanser taraması sırasında bulgu tespit edilen bireylere uygulanan kolonoskopi veya sigmoideskopi ve bu esnada şüpheli lezyonlardan alınan biyopsilerinin patolojik incelemesi sonucunda konulur. Bu yöntem ile kesin tanı koyulabilmesine karşın şüpheli olgularda öncelikle baryum enema grafisi, bir ön araştırma yöntemi olarak veya kolonoskopi yapılamayacak durumdaki hastalarda tanısız amaçlı uygulanabilir (185). Bunlar haricinde tanı amaçlı serolojik bir belirtecin geliştirilmesi konusunda çalışmalar yürütülmüş ancak, kolorektal kanserler için özgün bir belirteç bulunamamıştır. CEA bu çalışmalarda en çok üzerinde durulan belirteçlerden biridir. Asemptomatik hastalarda kolon kanserini tespit etme konusunda düşük bir özgünlüğe sahip olsa da özellikle hastalığın evrelemede ve tedavi sonrası takipte yararlıdır. Son çalışmalar karbonhidrat yapıda bir antijen olan CA19-9'un da özellikle preneoplastik ve erken neoplastik lezyonlar için önemli bir belirteç olabileceğini göstermektedir (4).

Kolon kanserine yakalanan hastaların sağ kalım oranlarında son zamanlarda kısmi bir artış söz konusudur. Bu durum bir ölçüde erken tanı oranlarındaki artışa ve yeni geliştirilen tedavi yöntemlerinin başarısına bağlıdır. Ancak bu tabloya rağmen tanı alan hastaların 5 yıllık sağkalım oranları hala %60'ın altındadır. Mevcut risk faktörleri tanımlanmış olmasına rağmen tanı alan hastaların yaklaşık %75'inde ileri yaş haricinde belirgin bir risk faktörü tespit edilememektedir. Bu nedenle kolorektal kanserler için popülasyon taraması mortalite oranlarını düşürebilecek en önemli seçenek olarak görülmektedir (185). Tarama prosedürü gaitada gizli kan testi, sigmoideskopi, çift kontrast baryum enema grafisi ve kolonoskopi aracılığı ile gerçekleştirilebilir. Bu seçeneklerden biri 50 yaşın üstündeki asemptomatik bireylere önerilmelidir. Bunlar arasından hangisinin tercih edileceği kararı ise risk, maliyet ve etkinlik değerlendirmesi sonucunda verilmelidir. Örneğin total kolonoskopi tüm kolonu gözden geçirdiği ve şüpheli lezyonlardan biyopsi alma olanağını sağladığı için

daha avantajlı gözükmetedir, ama aynı zamanda oldukça invazif bir işlemdir. Gaita gizli kan taraması buna göre daha az efektif olabilir ama tarama amaçlı kullanılabilir kadar az invazif bir testtir (5).

Kolorektal kanser tedavisinde ilk tercih edilecek tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyon ile primer tümör dokusunun çıkarılmasıdır. Çoğunlukla cerrahi yöntemle ek olarak çeşitli tedavi seçenekleri hastalığın relapsını önleme ve sağ kalım sürelerini artırmaya yönelik olarak uygulanır. Hastalığın nüks etme ihtimali patolojik evreleme ile belirlenebilir. İyi bir cerrahi teknik ve doğru hasta seçimi sonucunda tek başına cerrahi uygulamayla başarılı sonuçlar elde etmek mümkündür. Metastatik ileri evre hastalarda ise çoğunlukla ilk tedavi seçeneği beklenen yaşam süresini ve yaşam kalitesini artırmak amacıyla kemoterapi uygulaması olmaktadır. Cerrahi tedavideki başarıyı ve bunun sonrasında sağkalımı belirleyen başlıca faktörler; rezeksiyon sınırlarının temizliği (mikrometastaz durumu), lenf nodlarının durumları ve organ dışı venöz invazyon durumudur. Bu nedenle çoğunlukla cerrahi sonrası radyoterapi uygulaması ile kalan tümör dokusu ve buradan kaynaklanacak nüklere karşı mücadele edilir. Çoğu durumda ileri evre hastalarda cerrahi sonrası ek tedavi veya cerrahi uygulanamayan hastalarda tek tedavi seçeneği olarak kemoterapi uygulaması yapılmaktadır (4, 5, 185). Günümüzde 5FU kolorektal kanser kemoterapisinde en sık kullanılan ajandır (186).

5FU'in standart olarak kolorektal kanser tedavisinde kullanıldığı dönemden günümüze; kapesitabin, irinotekan ve oksaliptatin gibi yeni ajanlar geliştirilmiştir. Ancak tüm bu ajanlara rağmen tedavi başarısı hastada mevcut olan kanser hücrelerinin moleküler profiline bağlıdır. Örneğin, çeşitli hastalardan toplanan kolorektal kanser örneklerinin moleküler analizini içeren bir çalışma; 5FU temelli adjuvan kemoterapinin, özellikle yüksek oranda mikrosatellit kararsızlığı taşıyan hücrelerde daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra kemoterapideki etkinliği belirleyen diğer bir önemli faktör ilacın verildiği hastalarda toksisite düzeyini belirleyen farmako-genetik özelliklerdir. Örneğin dihidropirimidin dehidrogenaz geninde mutasyona sahip hastaların, 5FU tedavisinin ardından ciddi derecelerde toksisite bulguları gösterdikleri bilinmektedir (187). Bu nedenle sadece hastalığın tedavisinde kullanılabilir yeni ajanların keşfi yeterli değildir. Buna ek olarak kanserin moleküler patogenezi hakkında daha fazla bilgiye ve kritik yolakları hedef

alabilecek yenilikçi moleküllerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında da kolon kanseri tedavisinde kullanılabilecek yeni bir potansiyel ajan araştırılırken, aynı zamanda bu ajanın kanser hücreleri üzerine olan etkileri moleküler ve genetik yollar üzerinden değerlendirilmiş; kolon kanserinin moleküler biyolojisini aydınlatmaya yönelik önemli veriler elde edilmiştir.

Sentetik kemoterapotik ilaçların sebep oldukları yan etkiler ve bu yan etkilerin hastaların tedaviye katılımları üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler nedeniyle çeşitli doğal bileşikler ve fitokimyasallar, başta kolon kanseri olmak üzere birçok kanserin tedavisi için araştırılmaktadır. Bu amaçla kullanılacak ideal bir ajanda aranan başlıca özellikler; kanser hücreleri haricinde çok az toksik olması ya da hiç toksik etkilerinin olmaması, birçok mekanizmayı etkileyen yüksek etkinliğe sahip olması, oral kullanım seçeneğinin bulunması, etki mekanizmalarının büyük ölçüde bilinmesi, düşük maliyetli olması ve hastalar tarafından kabul edilebilir olmasıdır. Bunların da ötesinde çeşitli doğal bileşikler zaten binlerce yıldır kanser ve daha birçok hastalığın tedavisinde geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. Birçok çalışma doğal bileşiklerin; immün sistemi uyarıcı, antibakteriyal, antiviral, anti-hepatotoksik, anti-ülser, anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-mutajenik ve anti-kanserojen etkiler gibi çok geniş spektrumda biyolojik aktiviteleri olduğunu göstermektedir (188). Bu tez çalışmasında da kolon kanserinin mümkün olan en az yan etki potansiyeline sahip doğal bir bileşik ile tedavisini sağlayacak molekülün araştırılması hedefler arasında yer almaktadır. Bu nedenle bu çalışma güncel tedavi yaklaşımlarının ihtiyaçları ile uyumludur. Ayrıca belirlenen ajan (borik asit), literatür verilerine göre yan etki oranı düşük, oral olarak kullanılabilecek, düşük maliyetli ve hastalar tarafından kabul edilebilir olması ile de ideal bir kemoterapötik ajanın sahip olması gereken özellikleri taşıyan doğal bir bileşiktir.

Özellikle son dönemde kemoterapi alanında kullanılmak üzere çeşitli bioaktif bor bileşikleri üzerindeki araştırmalar sürmektedir. Bor ve bileşikleri, kendilerini medikal alanda yararlı birer molekül haline getiren önemli özelliklere sahiptir. Dış yörüngesinde 3 elektron taşıyan bor, herhangi bir etkileşimde proton vermez, fakat hidroksil iyonlarını kabul eder ve bu nedenle zayıf bir Lewis asit özelliği gösterir. Hem metal hem de ametal karaktere sahip bir elementtir. Bor hidroksil grupları ile kimyasal reaksiyona girerek borat ( $B(OH)_4^-$ ) ve borik asit ( $H_3BO_3$ ) yapılarını oluşturur. Bor,

çoğunlukla yüksüz zayıf bir asit olan borik asit formunda bulunur. Sahip olduğu özellikleri sayesinde bor hidroksil grubu içeren çeşitli metabolitler ve enzimler gibi organik moleküllerle kolaylıkla etkileşime girebilir, karbon atomuyla kovalent bağlar kurabilir ve hücrel süreçleri etkileyebilir (189).

Bor ve borik asit bileşikleri oldukça yaygın ve kolayca hazırlanabilen sentetik organik bileşiklerdir. Bunların çoğu zaten doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve günümüze kadar bunların kullanımlarını engelleyecek kadar toksik olduğunu bildiren bir çalışma olmamıştır. Bor, çoğunlukla borik asit formunda veya borat tuzları halinde toprakta bulunur ve bitkiler için esansiyel bir elementtir. Memelilerde borun herhangi bir spesifik biyolojik fonksiyonu henüz tanımlanmamıştır. Ancak diyetle alınan bor takviyesinin plazma steroid hormon düzeyini artırdığı, plazma lipid metabolitlerinde değişikliğe neden olduğu, kemik dayanıklılığını artırdığı bilinmektedir. Bunun dışında borun beyin fonksiyonları açısından gerekli olduğu yönünde veriler de bulunmaktadır (190).

Bor günlük beslenme sürecinin bir parçası olarak içme suyundan ve besinlerden alınmaktadır. İnsan dokularında ve vücut sıvılarında bor; borik asit formunda (%98,4) bulunur. Çünkü borun emilebilmesi için barsaklarda öncelikle borik asit formuna dönüşmesi gerekmektedir (191). Bu nedenle bu tez çalışmasında borun plazmada bulunan formu olan borik asit ile çalışılması kararlaştırılmıştır. Bor gastrointestinal sistem epitelinden kolayca absorbe olabilmektedir. Bunun haricinde ağız, gözler, vajina ve anüs gibi mukozal membranlardan da absorbe olmaktadır. Vücuda alınan inorganik borun yaklaşık tamamı absorbe edilmektedir (192). Borun insandaki biyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmediği için günlük alınması gereken bor miktarı da kesin olarak bilinmemektedir. Fakat dünya sağlık örgütü, tolere edilebilir alım miktarı olarak günlük 0,4 mg/kg borun herhangi bir sağlık riski taşımayacağını bildirmektedir (191). Bor, yoğun olarak idrar yoluyla atılır. Daha az oranlarda ise dışkı, safra, ter ve solunum yoluyla kaybedilir. Dokulardaki bor konsantrasyonları çeşitli mekanizmalarla belirli bir düzeyde tutulur. Bu mekanizmaların başında da idrar ile atılım gelmektedir. Bu nedenle yüksek doz bor alımı eğer renal bir problem yoksa plazma düzeylerini etkilememektedir (192). Hayvan deneyleri bor yokluğunda büyümede yavaşlama, serum steroid hormon konsantrasyonlarında azalma, plazma-organ kalsiyum ve magnezyum düzeylerinde

değişiklikler gözlemlendiğini ortaya koymaktadır. Bu durum da borun vücuttaki biyolojik süreçler üzerinde olumlu etkileri olduğunu kanıtlar niteliktedir. Dahası borun kemik oluşumunda vitamin D, kalsiyum ve magnezyum ile etkileşime girdiği; östrojen metabolizmasını etkilediği ve bilişsel fonksiyonlar üzerinde rol oynadığı bilinmektedir (191).

Bor ve bileşikleri hayvanlarda, bitkilerde, hücre kültüründe çoğaltılan hücrelerde ve çeşitli kimyasal reaksiyonlarda yer alan birçok enzimin aktivitesini etkilemektedir. Bu enzimlerden bir kısmı enerji metabolizması, insülin salınımı ve bağışıklık sisteminde yer alan çeşitli yollarda düzenleyici fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca, borun serin proteazların veya oksidoredüktazların rol oynadığı belirli yolların kontrolünde gerekli olduğu bilinmektedir. Borun *iv vitro* çalışmalarda glikolitik enzim aktivitesini de inhibe edebildiği görülmüştür. NADPH metabolizmasını etkileyerek hücre membran dinamiklerinde değişikliklere neden olmakta ve böylece de insülin salınımını artırmaktadır. Ayrıca pentoz fosfat yolunun kilit enzimi olan glikoz 6 fosfat dehidrojenaz da borun inhibe ettiği önemli enzimler arasında yer alır. Borun diğer taraftan çeşitli enzimler üzerine olan etkiler ile hücrelerde oksidatif hasarı azalttığı ve hücre membranından iyon transportunu düzenlediğine yönelik veriler de bulunmaktadır (192).

Borun fizyolojik aktivitesi sodyum bağlı borat ortak taşıyıcısı olarak da adlandırılan ve hücre içine bor taşıyan anyon taşıyıcısına bağlıdır. Fizyolojik pH düzeylerinde borik asit hücre içerisine pasif difüzyonla geçer ve hücre içinde anyonlarına ayrılır. Ekstraselüler borik asit konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda (1 mM'dan) hücre içine pasif difüzyonla geçen ve anyonlarına ayrılan bor miktarı artar ve hücre içi pH düzeyi düşer. Bu koşullarda önce hücresel süreçler inhibe olur ardından apoptoz gerçekleşir. Bu durum özellikle kanser hücrelerinde belirgin olarak gözlenir. Çünkü kanser hücrelerine kıyasla normal hücreler metabolik faaliyetlerinde daha az oranda bor kullanmaktadır. Bu nedenle bor ve bileşikleri çeşitli kanser tipleriyle savaşmak için oldukça yararlıdır. Bor, hücrelerde birçok farklı süreçte yer almaktadır. Örneğin bazen bir sinyal molekülü gibi fonksiyon görürken, diğer taraftan bazı enzimlerin kofaktörü olarak rol oynadığı, bazı reaksiyonlarda ise enzimatik olmayan kofaktör olarak yer aldığı, elektron transferini de içeren yapısal ve

fonksiyonel çeşitli süreçlere katıldığı ve hücre iskeleti yapısının devamlılığının sağlanması sürecine dahil olduğu bilinmektedir (189).

Birçok çalışma, farklı kaynaklardan elde edilen doğal bileşiklerin çeşitli mekanizmalar aracılığı ile kolon kanser hücrelerinde başarılı bir şekilde hücre çoğalmasını inhibe ettiğini, hücre döngüsünde duraklamaya neden olduğunu ve pro apoptotik yolları aktive ettiğini ortaya koymaktadır (193-205). Bu tez çalışmasında da; insan kolon kanser hücre hattı olan SW-480 hücreleri üzerine borik asitin etkileri araştırıldı. Bu amaçla borik asit uygulamasının SW-480 hücrelerinde; hücre canlılığı ve proliferasyon düzeyleri üzerine olan etkileri bromodeoksiüridin (BrdU) yöntemi; apoptoz üzerine etkileri ise aktif kaspaz 3, AIF ve TUNEL metodu ile imünohistokimyasal olarak araştırıldı. Bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde; bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin, hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine yapılan araştırmalarda sıklıkla tercih edilen yöntemler olduğu görülmektedir. Bunlara ek olarak bu çalışmada farklı apoptotik yollarda yer alan çok sayıda genin borik asit etkisine bağlı olarak ekspresyon düzeylerindeki değişimleri ise qRT-PCR metodu ile incelenmiştir. Bu alanda bu tez çalışmasının kolon kanser hücreleri üzerine borik asitin etkilerini inceleyen ilk çalışma olduğu görülmektedir. Ayrıca bu tez çalışmasında, literatürde yer alan ve çeşitli etken maddelerin etkilerini sadece monolayer kültür ortamında araştıran çalışmalardan farklı olarak borik asitin SW-480 kolon kanser hücrelerinin hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerine olan etkileri monolayer kültüre ek olarak, üç boyutlu kültür ortamında da incelemiş; monolayer kültürde uygulanan tüm deneyler üç boyutlu kültür ortamında da gerçekleştirilmiştir.

Giderek artan sayıda anti-kanser ajanın, kanser tedavisi için araştırıldığı günümüzde; bu ajanlarla klinik deneylere başlamadan önce etkilerinin incelenebileceği model sistemler büyük önem taşımaktadır. Anti-kanserojen ajanların geliştirilmesinde kullanılan iki önemli sistem iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) kanser kültürleridir. Hücrelerle yapılan ilk kültür çalışmaları dokulardan elde edilen 3B parçalar yolu ile yapılmıştır. Ardından bu hücrelerin zemine tutunup çoğaldıklarının görülmesi ile 2B kültür sistemleri geliştirilmiştir. İlk defa 3B kültür fikri 1912 yılında Carrel tarafından ortaya atılmış Leighton tarafından geliştirilmiştir (206). 3B kültürler 2B kültürler ile kıyaslandığında önemli üstünlüklere sahiptir. 3B kültür ortamı, *in vivo* tümör çevresindeki benzer bir hücre-hücre etkileşimi

sağlamaktadır. Ayrıca 2B kültürde olmayan stromaya ve yapısal düzenlenime sahiptirler. Bu durum hem yapısal olarak hem de transport gradyenti açısından *in vivo* tümör mikroçevresini en iyi taklit eden *in vitro* sistemdir. Dahası 3B kültürde hücreler doğal ortamlardakine benzer hücre morfolojisi ve hücre kutuplaşması gösterir. 2B kültürlerde hücreler düz bir yüzey üzerinde tek tabakalı bir yapıda, tümörün yaşayan bir organizmada sahip olduğu hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinden yoksundur. Ayrıca burada hücreler ortam koşulları nedeniyle gerçekte sahip olmadıkları bir hücre iskeleti düzenlenimi oluştururlar. Bu durum ise anormal gen ve protein ekspresyonlarına neden olur. Buna karşılık 3B kültür sistemleri kanser hücrelerinin tek başlarına veya başka hücre tipleri ile birlikte hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinde bulunabilmesine olanak sağlar. Bu etkileşimler sayesinde hücreler *in vivo* koşullardakine benzer şekilde morfolojik ve hücresel karakteristikler sergiler (207).

Bor ve bileşiklerinin kanser tedavisinde kullanılabilir bir ajan olabileceğine dair hipotezlerin ilk olarak bazı epidemiyolojik çalışmaların sonucunda ortaya çıktığı görülmektedir. Bu epidemiyolojik veriler sonrasında bor üzerine yoğunlaşan araştırmalar, borun bir antikanser ajan olarak sahip olduğu önemli özellikleri tanımlamaya başlamıştır. Bu açıdan bor ve bileşiklerinin kanser tedavisinde kullanılabilirliğini araştırmaya yönelik yapılan çalışmaları iki grup altında toplamak mümkündür. Bunlardan ilk grup; epidemiyolojik çalışmalar olup bor maruziyeti ve farklı kanser türlerinin sıklığı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Diğer grupta yer alan çalışmalar ise hücre kültürü veya deney hayvanları üzerindeki çalışmalar ile bor ve bileşiklerinin farklı kanser türleri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir.

Bor madeni işçilerinde prostat kanserinin daha az sıklıkta görülüyor olması, bor ve bileşikleri üzerine epidemiyolojik çalışmaların çıkış noktasını oluşturmuştur. Cui ve ark. bu ilişkiyi Amerika Birleşik Devletleri 3. Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları anketinden elde edilen verilerin incelendiği bir kesitsel vaka kontrol çalışması ile araştırmışlardır. Bu araştırmaya 17 yaşından büyük toplam 9401 erkek kabul edilmiştir. Bunlardan prostat kanseri olan 95'i deney grubunu, kanser taşımayan 8720 erkek ise kontrol grubunu oluşturmuştur. Deney grubunda 76, kontrol grubunda ise 7450 bireyin diyetlerinde bor maruziyeti olduğu değerlendirilmiştir. Yaş, ırk, eğitim durumu, sigara kullanımı, vücut kütle indeksi, diyetle alınan kalori ve alkol

miktarları kontrol edildikten sonra prostat kanseri olan bireylerde bor alımının daha az olduğu görülmüştür. Ardından alınan bor miktarına göre yapılan analizler, diyetle alınan bor miktarındaki artışın doz bağımlı bir şekilde prostat kanser riskini azalttığını göstermiştir (208).

Korkmaz ve ark. ise Türkiye'deki zengin bor içeriğine sahip bölgelerden biri olan Balıkesir ve çevresindeki yerleşim yerlerinde yaşayan 1059 kadın üzerinde, bor maruziyeti ve servikal kanser insidansını araştırmışlardır (209). Bu çalışmaya dahil edilen bireyler; yaşadıkları bölgedeki içme suyu bor miktarına göre iki gruba ayrılmıştır. 472 bireyin yüksek oranda bor ihtiva eden bölgede, 587 bireyin ise düşük oranda bor ihtiva eden bölgede yaşadığı tespit edilmiştir. Yüksek oranda bor içeren içme suyu bulunan bölgede günlük alınan ortalama bor miktarının 8,41 mg olduğu, düşük oranda bor içeren içme suyuna sahip bölgede ise günlük ortalama 1,26 mg bor alındığı tespit edilmiştir. Bu bireylerden servikal smear alınmış ve örnekler servikal kanser bulguları açısından değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda yüksek bor bölgesinde yaşayan hiçbir bireyde servikal patolojiye rastlanmamış, ancak düşük bor bölgesindeki 15 bireyde servikal kansere ait sitopatolojik bulgular görülmüştür. Bu sonuçlar içme suyu ile alınan borun servikal kanser ilişkili sitopatolojik bulgu insidansını azalttığını göstermektedir (209).

Mahabir ve ark. yeni akciğer kanseri tanısı almış 736 kadını ve herhangi bir kanser öyküsü bulunmayan 838 sağlıklı kadını içeren vaka-kontrol çalışmasında diyetle bor alımının akciğer kanseri üzerine olan etkilerini incelemişlerdir (210). Bu çalışma sonucunda bor alımındaki azalma ile akciğer kanser sıklığında artış arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür. Diyetle alınan borun akciğer kanserinden hangi mekanizma ile koruma sağladığı kesin olarak bilinmemekle birlikte, bu durumun borun sahip olduğu antioksidan ve anti-inflamatuvar etkiler ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (210).

Borik asitin kanser hücreleri üzerine olan etkilerini inceleyen deneysel çalışmalarda başta prostat kanseri olmak üzere; meme kanseri, melanom ve karsinom hücreleri üzerine yoğunlaştıkları görülmektedir. Bazı araştırmacıların sadece hücre kültürü veya deney hayvanları çalışmasını tercih ederken, bunlardan bazılarının ise her iki yöntemi birlikte kullandıkları görülmektedir.



Gallardo ve ark. immun sistemi baskılanmış farelere; kültür ortamında çoğalttıkları ve daha sonra matrigel ile bir araya getirdikleri LNCaP prostat kanser hücrelerini cilt altına enjekte etmişlerdir. Ardından borik asitin tümör doku gelişimi üzerine etkilerini incelemek üzere hayvanlara yaklaşık 70 gün boyunca belirli dozlarda (en az 1,7 mg/kg- en çok 10,3 mg/kg) borik asit içeren içme suyu ile gavaj uygulamışlardır. Takip sırasında tümör boyutları değerlendirilmiş deney sonunda ise tümör dokularının histopatolojik incelemeleri yapılmıştır. Buna göre tümör dokusu büyüklüğü açısından kontrol grubu ve deney grubu (borik asit uygulanan grup) arasında belirgin bir fark olduğu tespit edilmiştir. Borik asit, hayvanlara tümör dokusunun naklinden önce de verilmeye başlanmasına rağmen kanser hücreleri tutunmuş; ancak, borik asit uygulanan grupta bu hücrelerin büyüme hızı ve tümörün morfolojisi belirgin derecede etkilenmiştir. Borik asit alan gruplarda tümör hacmi kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca bu tümörlerin kontrol grubuna kıyasla daha az agresif olduğunu gösteren morfolojik bulgulara da rastlanmıştır. Histopatolojik incelemelerde; hücre proliferasyonunun bir göstergesi sayılan mitotik figürlere borik asit grubunda daha az oranda rastlanmış ve hücre çoğalmasının olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Kontrol grubundan elde edilen tümörlerde hücrelerin daha sıkı paketlenmiş ve çok sayıda damarsal yapı içerdiği; oysa borik asit grubundan elde edilen tümörlerin boyut olarak daha küçük olmasının yanı sıra hücrelerin daha gevşek paketlenmiş olduğu ve geniş nekrotik alanlar içerdiği tespit edilmiştir (173).

Borik asitin prostat kanser hücreleri üzerine etkilerini araştıran bir başka çalışmada ise DU-145, LNCaP ve PC-3 hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücreler 8 gün boyunca borik asit (0-1000  $\mu$ M) içeren medyum ile takip edilmiştir. Takip sonunda ise hücreler proliferasyon, hücre döngüsü, apoptoz ve mitokondriyal aktivasyon açısından değerlendirilmiştir. Tüm kanser hücre hatlarında doz bağımlı bir şekilde borik asit uygulamasının hücre proliferasyonunu belirgin şekilde azalttığı gözlenmiştir. Bunlar arasında borik asite en duyarlı olduğu görülen DU-145 hücreleri; propidiyum iyodid DNA boyaması ile akım sitometrik incelemeye alınarak hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Bu analizde hücre döngüsünde belirgin bir sapma tespit edilememiştir. Yine Western blot analizinde de kaspaz 3 tespit edilememiştir. Ayrıca DNA fragmentasyon analizinde hücrelerde herhangi bir fragmentasyon bulgusuna da

rastlanmamıştır. Borik asitin hücre proliferasyonunu azaltması ancak buna karşılık hücre döngüsünde bir sapmaya neden olmaması; bu etkinin apoptozdan bağımsız bir mekanizma ile gerçekleştiği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Çünkü apoptoz varlığında mutlaka hücre döngüsünde bir sapmaya rastlanmaktadır. Ayrıca bu durum Western blot analizinde kaspaz 3'ün tespit edilememesi ve DNA fragmentasyon analizinde herhangi bir bulguya rastlanılmaması ile de desteklenmektedir (165).

Barranco ve ark. yukarıdaki çalışmanın devamı niteliğindeki başka bir çalışmada ise borik asitin DU-145 hücreleri üzerine etkilerini; hücre morfolojisi değişiklikleri ve proliferasyon, hücre yaşlanma, motilite, metastazın moleküler belirteçleri açısından incelemiştir (168). Bu amaçla, hücreler 8 gün süreyle değişen konsantrasyonlarda (0-1000  $\mu$ M) borik asit içeren medyum ile takip edilmiştir. Ardından hücreler morfolojik değerlendirme amacıyla akım sitometri analizine sokulmuştur. Bu araştırma sonucunda doz bağımlı bir şekilde borik asit etkisiyle hücre granülaritede artış ve hücre boyutlarında bir azalma tespit edilmiştir. Hücre boyutlardaki azalma ve hücre şeklinde meydana gelen yapısal değişiklikler, hücrelerin çoğalma yetilerinde kayıpla ilişkilendirilmiştir. Hücrelerde  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesi hücre yaşlanmanın bir belirtici olarak kabul edilmektedir. DU-145 hücrelerinde de borik asit uygulaması sonrasında bu enzim düzeyleri araştırılmıştır. Borik asitin hücrelerde  $\beta$ -galaktosidaz enzim aktivitesini doz bağımlı bir şekilde artırdığı yani hücre yaşlanmaya benzer özellikler kazandırdığı görülmüştür. Ayrıca hücre proliferasyon durumunun tespiti için hücrelerdeki siklin A, B1, C, D1, E ve MAPK sinyal yolağının fosforillenmiş aracı proteini MEK düzeyleri Western blot analizi ile incelenmiştir. Borik asitin herbiri hücre döngüsünde önemli roller üstlenen bu siklinlerin ekspresyonunu ve fosforile MEK düzeylerini doz bağımlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Normalde Ras/Raf yolağında fosforile olan MEK nükleusa geçmekte ve burada hücre çoğalmasını uyarıcı genlerin transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Borik asitin DU-145 hücrelerinde çoğalmayı baskılayıcı etkisine aracılık eden mekanizmalardan birinin de bu nedenle fosforile MEK düzeylerindeki azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Borik asitin prostat kanser hücrelerinde; hücre iskeleti, tutunma ve migrasyon üzerine olan etkileri de bu çalışmada incelenmiştir. Bunun sonucunda borik asitin doz bağımlı bir şekilde filopod gibi hücre uzantıları ile hücre içi bağlantıyı sağlayan F-aktin filamentlerini azalttığı

immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu durum, hücre iskeletindeki yapısal değişiklik ve hücre migrasyonundaki azalmanın göstergesi olarak yorumlanmıştır. Ayrıca tutunma deneylerinde de hücre tutunma kabiliyetinde doz bağımlı bir azalma görülmüştür (168).

Barranco ve ark. Texas Kanser Merkezindeki prostat kanser insidans ve mortalite bilgilerini bölgedeki içme suyu bor oranları ile birlikte değerlendirmişler ve içme suyu bor oranları ile prostat kanser insidansı arasında bir azalma tespit etmişlerdir (211). Bu epidemiyolojik çalışmanın ardından DU-145 prostat kanser hücrelerinde borik asitin hücre proliferasyonu üzerine ve hücrelerin iyonize radyasyona cevapları üzerine olan etkileri incelemişlerdir. Bu amaçla hücreler değişen dozlarda (0-500  $\mu$ M) borik asit ile 8 gün muamele edilmiş ve ardından hücre proliferasyonunda azalma ve iyonize radyasyona karşı duyarlılıkta artış gözlenmiştir. Ayrıca, Western blot analizinde BCL-2 protein ekspresyonlarında doz bağımlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bir anti-apoptotik protein olan BCL-2'nin kanser hücrelerindeki radyoterapi direncinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Borik asitin bir taraftan BCL-2 düzeylerini azaltırken, diğer taraftan kanser hücrelerinde radyasyona duyarlılığı artırması bu etkinin BCL-2 haricindeki farklı bir yolak üzerinden gerçekleştirdiği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Hatta hücrelerin BCL-2 antisense oligonükleotitlerle muamele edildiği durumlarda bile borik asitin hücre ölümü olmasa da proliferasyonu baskılaması bu görüşü destekler niteliktedir (211).

McAuley ve ark. da DU-145 prostat kanseri hücre hatları ile yaptıkları çalışmada borik asitin hücre proliferasyonu, hücresel yaşlanma ve apoptoz üzerine etkisi konusunda daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu bulgular elde etmişlerdir (174). Bunun yanı sıra immünflorosan boyama sonucu borik asitin kanser hücrelerinde morfolojik değişikliklere ve primer olarak hücre iskeletindeki aktinleri hedef alarak onların polimerizasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Bu etkiye ait mekanizmaları ortaya çıkarmak için yaptıkları qRT-PCR çalışmasında ise borik asit nedeniyle kanser hücrelerinde RhoA, Rac1 ve Cd42 gibi hücre iskeleti yapısındaki aktinlerin aktivitelerini düzenleyen protein düzeylerinde bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (174).

Borik asitin prostat kanser hücreleri üzerine olan etkilerinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik bir çalışmada ise; borik asitin doz ve zaman bağımlı olarak endoplazmik retikulum (ER) yapısında ve sitoplazmik yapılarda değişikliğe neden olduğu görülmüştür. DU-145 prostat kanser hücreleri ile yürütülen bu çalışmada, değişen dozlarda (10-250  $\mu\text{M}$ ) uygulanan borik asitin 24 saat sonunda doz bağımlı bir şekilde ER hacminde, sitoplazmik granülaritede ve sitoplazmik vakuol oluşumunda artışa neden olduğu elektron mikroskopik olarak gösterilmiştir. Ayrıca, immün blot analizlerde eIF2 $\alpha$  fosforilasyonunda borik asit uygulaması sonrası belirgin bir artış gözlenmiştir. Bilindiği üzere, hücreler çevresel değişikliklere uyum sağlayabilmek adına genetik ifadelenmeyi yeniden programlamaktadır. Buna aracılık eden mekanizmalardan biri de içerisinde eIF2 $\alpha$ 'nin de yer aldığı eIF2-GTP-tRNA<sup>iMet</sup> sistemidir. Bu sistem translasyonun ve protein sentezinin başlayabilmesi için başlatıcı metiyonini mRNA'nın ilk kodonuna yerleştirmektedir. eIF2 $\alpha$ 'nin fosforilasyonu ise bu kompleksin oluşumu ve dolayısıyla genel bir translasyonu inhibe etmektedir. Bu durumda ortaya çıkan kusurlu başlatıcı kompleksler ise sitoplazmik sters granülleri haline dönüşmektedir. Yapılan akım sitometrik incelemelerde ise 50  $\mu\text{M}$  dozda, 24 saatlik maruziyetin hücrelerin hücre döngüsü üzerinde çok az etkili olduklarını ve apoptotik hücre ölümüne neden olmadıkları görülmüştür (12).

DU-145 ve LNCaP prostat kanser hücre hatları ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise borik asit uygulamasının hem mekanik olarak hem de kimyasal olarak uyarılan ER'dan Ca<sup>+2</sup> salınımını farklı düzeylerde bloke ettiği görülmüştür. Ca<sup>+2</sup> sinyal mekanizmasının hücrelerin çevresel koşullara uyum sağlamada önemli olduğu bilinmektedir. ER'dan depolanmış haldeki Ca<sup>+2</sup> iyonlarının sitoplazmaya serbest bırakılmasının ardından Ca<sup>+2</sup> iyonları hızlı bir şekilde ve geçici olarak kalsiyum bağlayıcı proteinler olarak bilinen proteinlere bağlanırlar. Bu proteinler ise çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan düzenleyici proteinlerdir. Bu süreçlerden en önemlisi ise hücre proliferasyonunun düzenlenmesidir. Örneğin troponin C, kalmodulin, anneksin II ve kalpain gibi kalsiyum bağlayıcı proteinler hücre döngüsünün ilerleyişinin düzenlenmesinde aracı görevler üstlenmektedir. Bu çalışmada kanser hücreleri farklı konsantrasyonlarda (100-1000  $\mu\text{M}$ ) borik asit ile 8 gün muamele edilmiştir. Ardından immunfloresan yöntemlerle, hem kimyasal olarak hem de mekanik olarak uyarılan ER'dan Ca<sup>+2</sup> serbestleşmesinin engellendiği ve Ca<sup>+2</sup> içeren

veziküllerin hücre periferinde biriktiği tespit edilmiştir (212). Henderson ve ark. da benzer şekilde borik asitin prostat kanser hücrelerinde  $Ca^{+2}$  hareketleri üzerine olan etkilerini DU-145 ve LNCaP hücre hatları üzerinde incelemiştir (213). Borik asitin bu hücrelerde hücre proliferasyonunu baskıladığı ve reseptör aracılı depolanmış kalsiyumun salınımını inhibe ettiği görülmüştür. Özellikle kalsiyum bağlayıcı proteinlerin transkripsiyon, hücre çoğalması, vezikül sekresyonu ve apoptoz süreçleri üzerindeki etkilerine vurgu yapan araştırmacılar; borik asitin doz bağımlı bir şekilde hücre depolarından  $Ca^{+2}$  salınımını engellemesi sonucu oluşan etkinin çeşitli yollardaki mekanizmalar üzerinden tümör karşıtı etkiler oluşturabileceğini belirtmişlerdir (213).

Bradke ve ark. ise borik asitin etkilerini hem Du-145 ve PC-3 prostat kanser hücre hatlarında hem de ZR-75-1 meme kanser hücre hatlarında araştırmıştır (11). Bu çalışmada farklı dozlarda uygulanan borik asitin (100-1000  $\mu$ M) özellikle yüksek dozda DU-145 hücrelerinde hücre migrasyonunu engellediği görülmüştür. Ancak kemotaktik hücre migrasyonu üzerine herhangi bir etkisi saptanamamıştır. Ayrıca bu hücrelerin fibronektine tutunma kabiliyetleri üzerinde de herhangi bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür) ile hücre canlılık analizlerinde ise ilk 24 saatte borik asitin hücreler üzerinde tespit edilebilir bir etkisi olmadığı, 8 günün sonunda ise hem prostat hem de meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir. Akım sitometrik incelemeler ise borik asitin ilgili dozlarında ve bu kanser hücreleri üzerinde hücre döngüsüne etki etmediğini ortaya koymuştur (11).

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise borik asitin ve fruktoboratin kanser hücreleri üzerine olan etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Değişen dozlarda uygulanan borik asit ve fruktoboratin (0,45–22,5 mM) 24 saat sonunda hücrelerin canlılığı üzerine olan etkileri MTT ile incelenmiştir. Her iki molekülün de doz bağımlı bir şekilde sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Birçok sitotoksik ajan, kemoterapötik olarak kanser tedavisinde apoptotik programdaki kilit unsurları aktive ederek etki göstermektedir. Buradan hareketle araştırmacılar borik asitin ve fruktoboratin apoptotik etkilerini TUNEL metodu ile araştırmışlar; borik asitin daha az olmakla beraber her iki molekülün de apoptoz üzerine etki ettiğini göstermişlerdir. Bilindiği üzere hücre ölüm yolağında en önemli

kontrol noktası pro-apoptotik ve anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri arasındaki orandır. BCL-2 proteinleri düzeyinde, Western blot analizi fruktoborat ile BCL-2 ekspresyonlarının azaldığı ancak borik asitin herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. Mitokondriyal apoptotik yolda mitokondriyal membranlar arası boşluktan salınan sitokrom-c'nin ELISA ile ölçülmesi sonucunda ise fruktoboratin sitoplazmik sitokrom c düzeylerini artırırken bu dozlarda borik asitin belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür. Ancak, her iki apoptotik yolağında birleştiği son aşamada görevli kaspaz 3 üzerine yapılan incelemeler hem borik asitin hem de fruktoboratin kaspaz 3 aktivasyonunu artırdığını göstermektedir. Western blot analizi de henüz aktive olmamış yeni sentezlenen pro-kaspaz 3 düzeylerinin de arttığını ortaya koymaktadır (13).

Acerbo ve ark. SK-MEL28 insan melanom hücre hatları üzerine dört farklı borik asit dozunun (5, 12.5, 25, 50 mM) altı farklı zaman biriminde (1, 2, 3, 5, 7, 10 gün) etkilerini incelemiştir (14). Bu çalışmada tripan mavisi boyama yöntemi ile hücre canlılığı araştırılmış; doz ve zaman bağımlı bir şekilde borik asitin hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Aynı süreçte hücre boyutlarının mikroskopik incelemeleri ilk 24 saat gibi erken dönemlerde hücre boyutlarında herhangi bir değişiklik ortaya koymazken, takip eden günlerde doz bağımlı bir şekilde hücre hacimlerinde artış gözlenmiştir. Hücrelerin biyokimyasal içeriklerinin analizi için ise FTIR (Fourier Transform Infrared Imaging) yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemden elde edilen sonuçlara göre borik asitin melanom hücrelerinin kimyasal bileşimini etkilediği görülmektedir. Düşük dozlarda borik asit konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde; nükleik asit/protein oranında bir artış gözlenmektedir. Bu durum ise hücrelerin aktif olarak çoğalmakta olduklarını göstermektedir ve bu durum hücre canlılık analizleri ile de uyumludur. Yüksek dozda borik asit uygulanan gruplarda ise nükleik asit/protein oranı zamanla düşmekte ve bu durum hücrelerin proliferasyon yeteneklerini kaybettiğine işaret etmektedir. Dahası burada apoptozun varlığını kanıtlayan amid I spektral kayma ve  $\beta$  tabaka komponentinin yükselmesi gibi FTIR bulguları gözlenmektedir (14).

Carper ve ark. borik asitin etkilerini hem DU-145 ve PC-3 prostat kanser hücre hatlarında, hem de ZK-75-1 ve SK-BR-3 meme kanser hücre hatlarında incelemiştir. Borik asitin adı geçen tüm kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiği

görülmüştür. Ayrıca borik asitin doz bağımlı bir şekilde kanser hücrelerinde zeminden ve birbirlerinden ayrılmaya neden olduğu görülmüş, ardından yapılan akım sitometrik inceleme ile bu hücrelerin apoptoza gittiği gözlenmiştir. Apoptotik süreç kaspaz 3 çalışmasıyla da ayrıca onaylanmıştır. Hücrelerin tutunma kabiliyetlerinin integrin adı verilen proteinlerce kontrol ediliyor olması nedeniyle araştırmacılar; bu hücrelerde borik asitin integrinlere bağlanarak tutunma kaybına ve apoptoza neden olduğunu düşünmüştür (214). Bu çalışmanın devamında araştırmacılar DU-145 prostat kanser hücreleri üzerine incelemelerini yoğunlaştırmışlardır. Burada daha önceki çalışmalarla uyumlu olarak üç günlük borik asit maruziyetinin doz bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca akım sitometrik incelemede borik asitin; hücrelerde, hücre döngüsünün S fazında duraklamaya neden olduğu görülmüştür. Apoptozun varlığı anneksin V yönetimiyle ve floresan görüntüleme ile de onaylanırken; burada mitokondriyal yolağının aktive olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan immunohistokimyasal çalışmalar kaspaz 3 aktivasyonunu göstermektedir (215). Bazı meme kanseri hücre hatları ile yapılan başka bir çalışmada ise borik asitin çalışılan tüm hücre hatlarında olmasa da birçok hücre hattında östrojen reseptör aktivitesinden bağımsız olarak apoptozu uyarmadığı görülmektedir. Çalışmaya dahil edilen östrojen reseptör negatif meme kanseri hatları olan MD-MB-231 ve MDA-MB-435 hücrelerine uygulanan 1 mM borik asit herhangi bir büyüme inhibisyonu yapmamıştır. Buna karşılık östrojen reseptörü pozitif ZR-75-1 ve östrojen reseptörü negatif SK-BR-3 hücrelerinde hücre çoğalmasında baskılama tespit edilmiştir. İleri araştırma amacıyla yapılan akım sitometrik incelemede bu hücrelerin apoptoza gitmekte oldukları görülmüştür. Hücrelerin apoptotik durumları floresan mikroskopik inceleme ile de desteklenmiştir (216).

Borik asitin sahip olduğu farklı etki mekanizmaları gün geçtikçe ortaya çıkarılmaktadır. Örneğin Renzo ve ark., borik asitin histon deasetilaz enzimini inhibe ettiğini çalışmalarında ortaya çıkarmışlardır (176). Bilindiği üzere histon deasetilaz nükleozom düzenlenimini değiştirerek gen ekspresyon durumunu değiştirebilir. Histonların asetilasyon durumlarını etkileyen histon deasetilaz inhibitörü gibi ilaçlar; hücrelerde terminal farklılaşmayı uyararak hücre büyümesini baskılayabilirler ve böylelikle kanser gelişimini engelleyebilirler. Farklı kimyasal sınıflardan histon deasetilaz inhibisyon özelliğine sahip bazı moleküller günümüzde malign hastalıkların

tedavisinde kullanılmaktadır (176). Günümüzde kutanöz T-hücreli lenfomada histon deasetilaz inhibitörü kullanımı yasal olarak onay almış durumdadır. Lenfoma, lösemi ve bazı solid tümörlerde ise farklı histon deasetilaz enzimleri ile klinik çalışmalar sürmektedir (217). Bu bakımdan borik asitin sahip olduğu histon deasetilaz inhibitör özelliği de kanser tedavisinde kemoterapötik olarak önemli bir ajan olduğunu destekler niteliktedir (176).

Literatürde yer alan araştırmalara bakıldığında birbirinden farklı cevapların ortaya çıktığı görülmektedir. Bu farklılıkların çalışılan hücrede borun çekirdeğe kadar mı ulaştığı yoksa hücresel membranlarda mı bağlı kaldığı durumlara bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu açıdan borik asit bazı hücre türlerinde hücrelerin proliferasyonunu baskılamakta, bazı hücre türlerinde ise sitotoksik etkilere ve apoptoza da neden olmaktadır. Bu durum, bir taraftan da borik asitin biyokimyasal özelliği ile de ilişkilidir (167).

Bu tez çalışmasında borik asitin SW-480 kolon kanser hücreleri üzerine etkilerini hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamlarında incelenmiştir. Çalışma öncesi yapılan doz belirleme deneyi için literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde çok farklı doz aralıklarının kullanıldığı görülmektedir. Örneğin prostat kanser hücreleri ile yürütülen çalışmaların çoğunda borik asitin 1000  $\mu\text{M}$ 'a kadar olan farklı doz aralıkları kullanılmıştır (165, 168). Yine prostat kanseri ile yapılan bir çalışma da ise en yüksek doz olarak 250  $\mu\text{M}$ ; başka bir çalışmada ise 500  $\mu\text{M}$  olarak bildirilmiştir (12, 211). Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada en yüksek doz 22,5 mM olarak, melanom hücre hatları ile yapılan başka bir çalışmada ise 50 mM olarak belirtilmiştir (13, 14). Doz belirleme deneyi için SW-480 hücre hattının moleküler özellikleri literatür verileri ışığında değerlendirildiğinde; bu hücrelerin yüksek proliferasyon özelliğine sahip olduklarını ve genetik olarak çok sayıda mutasyon taşıdıkları görüldü. Bu nedenle doz aralıkları; 10, 12,5, 25, 50, 75, 100 mM olarak belirlendi. 24, 48 ve 72. saatler sonunda yapılan hücre sayımları değerlendirildiğinde inhibisyon 50 ( $\text{IC}_{50}$ ) dozu 75 mM olarak tespit edildi ve deneylerde bu doz esas alındı. Farklı hücre hatlarında aynı ajan için etkin dozların farklı olmasının nedeni, kanser hücrelerinin sahip olduğu moleküler biyolojik özellikler arasındaki farklılıklarla ilişkili olabileceği şeklinde yorumlandı.



Kanser ve apoptoz arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmaların sayısının arttığı ve kanser hücrelerinde apoptozu uyarıcı moleküllerin geliştirilmeye çalışıldığı günümüzde apoptozun etkili bir şekilde tespit edilebilmesi de büyük önem taşımaktadır. Apoptoz; hücre canlılığının belirlenmesi, morfolojik inceleme, plazma membran değişikliklerinin, sitoplazmik değişikliklerin, mitokondriyal değişikliklerin ve çekirdek değişikliklerinin tespiti gibi farklı yöntemlerle belirlenebilir. Ancak apoptoz araştırmalarındaki biyokimyasal ve moleküler gelişmelere rağmen mikroskopik inceleme altın standart tanı yöntemidir (89). En basit şekilde bir ışık mikroskopu ile apoptozun özgün morfolojik bulguları kolaylıkla tespit edilebilir. Ne zaman ve nasıl gerçekleştiğinden bağımsız olarak apoptoz bir hücre ölümüdür ve apoptoz giden bir hücrede canlılık belirteçleri olan metabolizma yetenekleri ve ayrıca çoğalma belirtileri kaybolur. Bu nedenle hücre canlılığının değerlendirilmesi, apoptozun tespitindeki en önemli kriterlerden biridir. Bir hücrenin canlılık durumu genel olarak üç yaklaşımla değerlendirilebilir. İlk yaklaşım yaşayan hücrelerin membran bütünlüğünü koruduğu esasına dayanır. İkinci yaklaşım hücrelerin belirli metabolik fonksiyonları sürdürebilme yeteneğine dayanır. Üçüncü yaklaşım ise hücrelerin bölünme ve çoğalma kapasitelerinin ölçümünü esas alır. Bu amaçla hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri veya kültür ortamında tutunma ve çoğalabilme yetenekleri değerlendirilir. Bu tez çalışmasında borik asitin SW-480 hücreleri üzerine etkili olan dozunu belirledikten sonra; bu doza maruziyet sonucunda hücrelerin çoğalma durumları, hücre sayımı ile araştırıldı. Buna göre 75 mM borik asitin SW-480 hücrelerinde çoğalma ve canlılık yeteneklerini 24., 48. ve 72. saatler sonunda belirgin olarak azalttığı tespit edildi.

Dokularda yer alan hücrelerin çoğu aktif olarak hücre siklusuna girmezler ve sessiz faz olan G<sub>0</sub> fazında bulunurlar. Epitel ve kemik iliğinde yer alan kök hücreler ve transit amplifiye hücre hattında yer alan hücreler gibi bazı hücreler aktif olarak bölünmektedir ve hücre siklusunun farklı evrelerinde gözlenebilmektedir. Kanser hücreleri de aktif olarak çoğalan, hücre siklusuna giren hücrelerdir. Bu özellikleri aynı zamanda bu hücrelerin çeşitli yöntemler aracılığı ile tespit edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bunlardan en basit ve kullanışlı olanlarından biri bromodeoksiüridin (BrdU) ile immunohistokimyasal boyama yöntemidir. BrdU bir timidin analogudur ve DNA replikasyonu olan hücrelerde (S fazındaki hücrelerde) timidin yerine bağlanır.

Ardından immunohistokimyasal olarak BrdU'nun gösterilmesi ile kanser hücreleri gibi aktif olarak çoğalan hücreler tespit edilmiş olur (218). Bu tez çalışmasında da iki boyutlu ve üç boyutlu kültür ortamında hücre proliferasyon durumu BrdU işaretleme indeksi ile immünohistokimyasal olarak araştırıldı. İki boyutlu kültürde BrdU çalışmasının sonuçlarına bakıldığında kontrol grubundaki hücrelerde 24, 48 ve 72. saatler sonunda BrdU ile işaretlenen çok sayıda hücre tespit edilirken, BA grubunda ise BrdU işaretleme indeksinde belirgin bir azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ). Üç boyutlu kültürde de benzer şekilde kontrol grubundaki hücreler, özellikle sferoidlerin periferinde yerleşen hücrelerde daha belirgin olmak üzere, tüm saatlerde BrdU ile BA grubuna kıyasla anlamlı şekilde daha fazla oranda işaretlendiğini tespit edildi ( $p<0,05$ ). Bu durum kontrol grubundaki SW-480 hücrelerinin çoğalmaya devam ettiklerini, ancak 75 mM borik asitin hücre proliferasyonunu iki boyutlu kültürde daha belirgin olmak üzere her iki kültür ortamında da anlamlı bir şekilde azalttığını göstermektedir.

Apoptotik süreçte çekirdekte önemli değişiklikler gözlenir. Morfolojik değişikliklerin ötesinde nükleozomlar arası kesimi de içeren DNA kırıkları apoptozun önemli biyokimyasal belirteçlerinden biridir. Nükleus yoğunlaşması ve fragmentasyonu ışık veya elektron mikroskopik yöntemlerle tespit edilebilir. Alternatif olarak nükleus ve fragmanları DNA'ya bağlanan floresan boyalarla boyanabilir. Apoptotik süreçte DNA kesimi nükleozomlar arası bölgelerde gerçekleşir. Bu kesimden apoptoza özgü DNA fragmentasyon faktörü (DFF) veya kaspazlarca aktive edilen DNaz (CAD) gibi endonükleazlar sorumludur. DNA'nın bu endonükleazlarca kesimi sonucunda yaklaşık 180-200 bp uzunluğunda apoptoza özgü DNA fragmanları oluşur. Bu fragmanlar ise elektroforezde tipik DNA merdiveni görüntüsü ile kolaylıkla tespit edilebilir. Histokimyasal olarak ise TUNEL metodu ile DNA kırıklarının tespiti mümkündür. TUNEL yani terminal deoksinükleotid transferaz (TdT) aracılı dUTP-biyotin ile etiketleme yönteminde; TdT enzimi biyotinlenmiş dUTP'leri DNA fragmanlarının 3' uçlarına ekler. Ardından biyotinlenmiş dUTP'ler avidine bağlı horse radish peroksidaz (HRP) ve HRP substratı olan 3' diamino benzidin tetrahidroklorid (DAB) ile tespit edilebilir (219). Bu nedenle bu tez çalışmasında da apoptozu göstermek için tercih edilen yöntemlerden biri TUNEL ile immünohistokimyasal işaretleme yöntemi olmuştur. İki boyutlu kültür

ortamındaki TUNEL çalışmasında 24., 48. ve 72. saatlerin sonunda 75 mM borik asit uygulanan BA grubundaki çok sayıda TUNEL ile işaretlenen hücre gözlemlenirken kontrol grubunda TUNEL işaretleme indeksinin anlamlı ( $p<0,05$ ) oranda azaldığı görüldü. Üç boyutlu kültürde de benzer şekilde tüm saatlerde BA gruplarında TUNEL ile özellikle sferoidlerin periferinde yer alan hücrelerde belirgin bir işaretlenme söz konusu iken kontrol gruplarında TUNEL işaretlenme indeksinde anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma gözlemlendi. Bu durum hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında 75 mM borik asitin SW-480 hücrelerinde apoptotik DNA fragmentasyonlarına dolayısı ile apoptoza neden olduğunu göstermektedir.

Sitoplazmada apoptoza bağlı olarak birçok değişiklik meydana gelmektedir. Bunlar arasındaki en önemli olay ise kaspazların aktivasyonu ve çeşitli hücrel proteinlerin yıkımıdır. Kaspazların aktivasyonu tartışmasız apoptozun en temel biyokimyasal belirteçidir. Kaspaz aktivasyonu çeşitli yöntemler ile tespit edilebilir. Bunların başında anti-kaspaz antikorları kullanarak Western blot ile veya immunohistokimyasal yollarla tespiti gelmektedir. Alternatif olarak kaspazın hedef substratlarının miktarları da ölçülebilir. Tüm bu yöntemler arasında kaspaz aktivasyonunu belirli bir lokalizasyonda tespit edebilecek yöntem immunohistokimyasal veya immunofloresan yöntemlerdir. Burada parafin kesitlerde veya hücre kültürü çalışmalarında aktif kaspazlara karşı kullanılan antikorlar ile başarılı sonuçlar alınmaktadır. Günümüzde yaygın olarak aktif kaspaz 3, 7 ve 9'a karşı geliştirilmiş antikorlar sıklıkla kullanılmaktadır. Buradaki prosedür genel bir immunohistokimyasal prosedürden farklı değildir. Primer antikor anti-aktif kaspaz ve sekonder antikor ise horse radish peroksidazdır. Apoptozun moleküler biyolojisi incelendiğinde ise hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağın hedef aldığı kilit molekülün efektör kaspazlardan biri olan kaspaz 3 olduğu görülmektedir. Hücrenin kullandığı apoptotik yolağın tipinden bağımsız olarak kaspaz 3'ün immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi bu açıdan apoptozun gösterilmesi açısından oldukça değerlidir. Bu tez çalışmasında, iki boyutlu kültürde yapılan kaspaz 3 ile immunohistokimyasal işaretlemeye; 24., 48. ve 72. saatler sonunda BA grubundaki çok sayıda hücrede belirgin bir işaretlenme görülürken, kontrol grubunda işaretlenme indeksinde anlamlı ( $p<0,05$ ) bir azalma gözlemlendi. Üç boyutlu kültürde de benzer şekilde tüm saatlerde BA gruplarında çok sayıda hücre, özellikle sferoidlerin periferinde yerleşen hücreler,

kaspaz 3 ile işaretlenirken, kontrol gruplarında işaretlenme indeksinde anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Bu sonuçlar hem iki boyutlu hem üç boyutlu kültür ortamında 75 mM borik asitin SW-480 hücrelerinde kaspaz 3 aktifleşmesine neden olduğu yani apoptozun ortak son yollarının aktive olduğunu, apoptozun gerçekleştiğini göstermektedir.

Apoptozun başlaması veya düzenlenmesindeki en önemli organel ise mitokondridir. Apoptoz süresince mitokondriyal fizyoloji ve morfolojide belirgin değişiklikler gözlenir. Genel olarak apoptotik değişiklikler iki kategoriye ayrılır; apoptotik proteinlerin salınımı ve mitokondriyal fonksiyonlarda değişiklik. Mitokondriden sitokrom c, SMAC/DIABLO, HTRA2/OMI, endonükleaz G ve AIF gibi apoptotik proteinlerin yanı sıra bazı non apoptotik proteinler de salınmaktadır. Bu proteinlerin dağılımındaki değişikliğin immunohistokimyasal, immunfloresan yöntemlerle veya Western blot yöntemi ile tespiti mümkündür. Apoptozla ilişkili mitokondriyal fonksiyonların bu yöntemlerden biri ile tespiti, apoptoz çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Normal koşullarda mitokondriyal membranlar arası boşlukta bulunan AIF apoptotik uyarı ile sitoplazmaya, oradan da nükleusa geçer. Nükleusta DNA fragmentasyonuna ve periferik nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olur. Bu açıdan sitoplazmada AIF'in varlığı hücrede intrinsik (mitokondriyal) apoptotik yolağın aktive olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında iki boyutlu kültürde gerçekleştirilen AIF ile immunohistokimyasal işaretlemede; 24., 48. ve 72. saatler sonunda BA grubundaki çok sayıda hücrede işaretlenme görülürken, kontrol grubunda işaretlenme indeksinde anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir azalma gözlemlendi. Üç boyutlu kültürde de benzer şekilde tüm saatlerde BA gruplarında çok sayıda hücre, özellikle sferoidlerin periferinde yerleşen hücreler, AIF ile işaretlenirken, kontrol gruplarında işaretlenme indeksinin oldukça zayıf olduğu gözlemlendi. Ayrıca her iki kültür ortamında da AIF ile olan işaretlenme indekslerinin kaspaz 3 ile olan işaretleme indeksine oranla daha düşük olduğu da tespit edildi. Bu bulgular; apoptotik süreçte bir şekilde sitoplazmaya AIF geçişi olduğunu gösterirken; bu verinin, etkin yolağın mitokondriyal yolak olup olamayacağını tek başına kanıtlama konusunda yetersiz kaldığı yönünde değerlendirildi.

BrdU, TUNEL, kaspaz 3 ve AIF ile olan immunohistokimyasal çalışmaların sonuçları 2B ve 3B kültürler arasında karşılaştırıldığında; üç boyutlu kültürde

boyamaların özellikle sfreoidlerin periferinde yer alan hücrelerde yoğun olduğu görülmektedir. Ayrıca, 2B ve 3B kültürler, immunohistokimyasal işaretlenme indeksleri açısından karşılaştırıldığında, 3B kültürdeki işaretlenme indekslerinin genel olarak daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, sfreoid modelin biyolojik özelliği ile uyumlu bir sonuç olduğu değerlendirilmektedir. İki boyutlu kültürlerde hücreler tutunma yüzeyleri boyunca tek bir tabaka oluşturduğundan; besin maddelerine erişim, metabolitleri uzaklaştırma ve aynı zamanda uygulanan etken maddeye maruziyet açısından benzer koşullara sahiptir. Bu nedenle bir ajan eğer hücreler üzerinde apoptotik etkiye sahipse, kültür kabındaki tüm hücrelerde yaklaşık benzer etki düzeyleri ve bununla ilişkili olarak benzer immunohistokimyasal işaretlenme düzeyleri beklenebilir. Bu tez çalışmasının iki boyutlu deneylerinde de bu durum gözlenmiştir.

Multiselüler sferoid (MSS) kültür modellerinde ise hücreler salgılamış oldukları ECM proteinleri aracılığı ile kendi kendilerine agregre olarak yüksek derecede organize üç boyutlu doku benzeri yapılar meydana getirirler (220). MSS'lerin oluşumunun; kaderin ve integrinlerin bloke edildiği çalışmalar incelendiğinde, üç aşamalı bir süreçte gerçekleştiği görülmektedir. Öncelikle hücre yüzeyindeki integrinler ile uzun zincirli ECM liflerinin bağlanması dağılmış hücrelerde hızlı bir agregasyona neden olmaktadır. Bunu takiben hücrelerde kaderin ekspresyonunun arttığı bir gecikme fazı izlenmektedir. İlerleyen aşamada ise kaderinlerin etkileşime girdiği gözlenmektedir. Burada homofilik kaderin-kaderin bağlantıları güçlü hücreler arası bağlar oluşturmaktadır. Hücre içinde ise integrinler ECM'ten aldıkları mekanik sinyalleri aktin filamentlerine iletmekte ve bunun sonucunda yapışma aşamasında hücreler komşu hücreleri kısmen ya da tamamen psödopod benzeri uzantılar ile sararak bir kitle oluşturmaktadır (221).

Burada oluşan bu üç boyutlu yapı avasküler tümör dokusunu veya solid tümörlerin mikroagregatlarının; kanser hücrelerinin büyüme kinetikleri, mikroçevre etkileşimi ve *in vivo* morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini taklit etmesi açısından önemli avantaja sahiptirler (220). Sferoidlerin periferinde yerleşmiş olan hücreler, *in vivo* tümör dokusunda kapillerlere yakın olan ve aktif olarak çoğalmakta olan hücrelere karşılık gelmektedir. Daha merkezde yer alan hücreler ise nekroza uğrayan sessiz hücreleri temsil eder. Bu durum ise sferoidden içe ve dışa doğru olan difüzyonun

kısıtlı olması nedeniyledir. Bunun negatif etkileri yanında olumlu etkileri de bulunmaktadır. Kısıtlı difüzyon nedeniyle merkez hücreler oksijen, besin maddeleri, sitokinler, büyüme faktörlerine erişim ve metabolik atıkları uzaklaştırma konusunda sıkıntı yaşamaktadır. Aynı difüzyon kısıtlamasına kemoterapötik ajanlar da maruz kalmakta, merkezdeki hücelere uygulanan etken maddeler de daha az oranda ulaşmaktadır (222).

Genel olarak 2B ve 3B kültürler arasında, kanser hücrelerinin kemoterapötik ajanlara cevapları konusunda bu tez çalışmasında elde edilen sonuçları destekleyen bulgular görülmektedir. Örneğin Mellor ve ark. nın yaptığı bir çalışmada 5FU, vinblastin-doksorubisin ve sisplatin gibi ajanlar DLD-1 kolon adenokarsinom hücrelerine verilmiş; ilaç etkinlikleri araştırılmıştır (223). Bu çalışmada tek tabaka kültür ve üç boyutlu kültür arasında belirgin oranda farklı sonuçlar elde edilmiştir (223). Benzer şekilde HT-29 ve HCT116 kolon kanser hücreleri ile yapılan başka bir çalışmada ilaç etkinliği ve IC<sub>50</sub> değerleri; 5FU, irinotekanın kullanıldığı tek tabaka ve sferoid kültürlerde 24 ve 72 saat aralıklarında araştırılmıştır ve farklılıklar gözlenmiştir (222). Orlandi ve ark. ise farklı ajanlarla benzer bir çalışmayı MCF-7 meme kanser hücre hattında gerçekleştirmişler; IC<sub>50</sub> değerinin 24. saat sonunda sferoid kültürde hafifçe daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışma ayrıca sferoidlerde ilaç direncinin maruziyet zamanı ile ilişkisini ortaya koymasından da önemlidir (224). Ayrıca, kolon kanserinde sferoid model ile direkt kolon kanserli hastaların tümör dokusundan alınan hücrelerin; hücre yüzey belirteçleri, genetik parmak izleri, mutasyon profili açısından incelendiği bir çalışmada; üç boyutlu tümör sferoidlerinin tümör dokusu ile büyük oranda benzerlikler taşıdığı görülmektedir (225). Bu açıdan bu tez çalışmasındaki 2B ve 3B kültür sonuçları arasında görülen farklılıkların literatür bulguları ile de uyumlu olduğu düşünülmektedir.

HücreSEL büyümenin uygun bir şekilde kontrolü hücre yüzeyinden başlayan ve nükleusa ulaşan bir dizi karmaşık sinyal yolağı ağı ile gerçekleştirilir. Bu yollarda yer alan birçok gen ise insan kanserlerindeki potansiyel mutajenik hedefler olarak kabul edilmektedir. Normalde hücre büyümesini uyaran onkogenlerin anormal aktivasyonu, normal hücreSEL büyüme sinyallerine cevap verme yeterliliklerini bozarak aşırı çoğalmaya neden olur (226). Bu tip mutasyonlar tümör baskılayıcı aktiviteyi aktive edebilir ve hücrelerde apoptotik yolları uyarabilir. Eğer tümör

baskılayıcı aktivitelerin düzenlenmesinde kayıp meydana gelirse, bu durum tümör oluşumu ile sonuçlanabilir. Geliştirilmekte olan bir kanser tedavisinin tümörü yok edebilmesi için sağlam bir apoptotik yolağın gerekli olduğu, bu alanda yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır (89). Kanserle ilişkili olduğu tespit edilen genlerin sayısı arttıkça, potansiyel tedavi hedeflerinin sayısı da artmaktadır. Onkogenler, tümör baskılayıcılar ve apoptotik düzenleyiciler hakkındaki bilgi düzeyi arttıkça, kanser tedavilerinin etkinliğinin de artması beklenmektedir. Bu açıdan hem kolon kanser hücrelerinde borik asit etkisiyle, apoptotik yolaklarla ilgili genlerde meydana gelen değişimleri aydınlatmak; hem de immunohistokimyasal olarak çeşitli yöntemlerle gösterilmiş olan apoptozun moleküler yolaklarla bağlantısının kurulabilmesi amacıyla, bu tez çalışması kapsamına gen ekspresyon çalışması da dahil edilmiştir. Bu amaçla 75 mM borik asitin; SW-480 hücrelerinde apoptotik yolaklarda farklı mekanizmalarda yer alan 84 genin ekspresyon düzeylerine etkileri qRT-PCR metodu ile incelendi.

Apoptozun moleküler biyolojisi incelendiğinde, apoptozun belirli noktalarda birbiri ile ilişkili de olabilen çok farklı sinyal yolakları ve moleküler mekanizmalarla gerçekleştiği görülmektedir. Rutin olarak, basit bir şekilde apoptoz için yapılan intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolak ayrımı bile; her bir yolağı uyaran faktörler, sinyal mekanizmaları, görev alan moleküller ve tüm bu etkenler arasındaki etkileşimler ele alındığında yeterince karmaşık olabilmektedir. Gen ekspresyon çalışmaları hariç, bu tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen diğer deneyler ile apoptozun varlığı tespit edilmesine rağmen, sorumlu moleküler mekanizma ile ilgili kesin bir çıkarım yapma olanağı bulanamamıştır. Bu nedenle gen ekspresyon çalışmaları, apoptozdaki birçok farklı mekanizmayı hedef alacak şekilde geniş kapsamlı olarak planlandı. Bu amaçla qRT-PCR çalışmasında “Roche® Real-Time Ready Human Apoptosis Panel 96” kiti kullanıldı. Bu kit, insan hücrelerinde apoptotik süreçte kilit role sahip çeşitli genlerin ekspresyon proflini ortaya koymak üzere tasarlanmış olması nedeniyle bu tez çalışmasının ihtiyaçlarına cevap verecek niteliktedir. Panelde; pro-apoptotik/anti-apoptotik protein aileleri olarak ve ayrıca apoptozda yer aldıkları yolaklara göre sınıflandırılacak 84 adet apoptoz ilişkili gen yer almaktadır. 2B ve 3B kültürde SW-480 hücrelerinin BA uygulamasının 48. saatinde toplanan hücreler, uygun koşullarda çalışmanın yapılacağı merkeze sevk edilerek gen ekspresyon çalışmaları gerçekleştirildi.

qRT-PCR sonuçları incelendiğinde 2B kültürde SW-480 hücrelerinde BA grubunda kontrol grubuna kıyasla; *BAD*, *BCL2L10*, *BCL2L11*, *HTRA2*, *TNF* ve *TNFSF8* genlerinin ekspresyonlarının arttığı görüldü. 3B kültürde ise BA grubunda kontrol grubuna kıyasla; *MCL-1*, *REL* ve *TNFRSF10A* genlerinin ekspresyonlarında artış tespit edildi.

Sonuçlar 2B ve 3B kültürler arasında değerlendirildiğinde aynı hücre hattında, aynı süre boyunca, aynı dozda etken maddeye maruziyet sonucunda gen ekspresyon değişimlerinin farklı olduğu görülmektedir. Bu durumun 3B kültür ve 2B kültür arasındaki moleküler biyolojik farklılıkla ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. 2B kültür sistemlerinde hücrelerin gerek hücreler arası ve gerekse mikro çevre ile olan etkileşimlerindeki eksiklikler ya da hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi nedeniyle ortaya çıkan durumlar, hücrelerin çeşitli sinyal mekanizmalarına karşı oluşturulan hücrel yanıtarda değişikliğe neden olabilir. Örneğin HER2 pozitif meme kanser hastalarında ve 3B kültürlerinde hücre büyümesi, Trantuzumab tarafından inhibe edilmekte iken 2B kültürlerde bu durum gerçekleşmemektedir. Çünkü 2B kültürlerde HER2/HER3 heterodimerizasyonu görülür. Ancak 3B kültürde HER2 homodimerleri oluşur ve MAPK sinyal yolağı aracılığı ile etki gösterirken 2B kültürde reseptörde meydana gelen heterodimerizasyon nedeniyle PI3K yolağı aktive olur (227).

Bir başka örnekte ise; mezotelyoma hücrelerinin 3B kültürde çoğaltıldıklarında apoptoza karşı ek bir direnç kazandıkları görülmüş ve bu özellik “multiselüler direnç” olarak adlandırılmıştır (228). Bu ve benzeri sonuçlar hücrelerin in vitro koşullarda 2B mikro çevrede kültüre edildiklerinde fonksiyonel ve fenotipik karakteristiklerini kayb ettiklerini göstermektedir. Hücreleri 3B, ECM oluşturan sitemlerde kültüre etmek; protein ekspresyonlarında, hücre morfolojisinde ve klinik çıkarımlar için gen cevaplarının tahmininde doğru sonuçlara yönlendirebilir (229). Çünkü tüm normal hücrelerin ve malign epitelyal hücrelerin ortak özelliği ECM ile fizyolojik olarak sıkı bir ilişki içinde olmasıdır. ECM; çeşitli fibröz proteinlerden ve glikozaminoglikanlardan oluşan, epitelyal hücreleri ve hücre dışı boşluklarını çevreleyen ve onlara bazal membran oluşturan bir yapıdır. Bu yapı hücrelere sadece fiziksel destek sağlamaz, aynı zamanda hücre kutuplaşması ve büyümesi için anahtar nitelikte biyokimyasal yapılar ve sinyaller içerir (230).



Hücreler birçok çalışmada çoğunlukla düz yüzeyler üzerine tek tabaka halinde kültüre edilmektedir. Ancak bu koşullar hücrelerin *in vivo* ortamda sahip oldukları doku yapılanmasının ve hücre hücre bağlantılarının kaybı nedeniyle gerçek koşulları taklit etme konusunda yetersizdir. Birçok çalışma 3B kültürdeki hücrelerde tedaviye yanıt olarak gen ekspresyon profillerinin 2B kültürdeki hücrelerden farklı olduğunu ve *in vivo* koşullardakine daha yakın olduğunu göstermektedir. İnsan tümörlerine benzer şekilde; çoğalmakta olan, sessiz ve ölmekte olan hücreler; 3B sferoidlerin normoksik, hipoksik veya nekrotik alanlarında bulunmaktadır. *In vivo* koşullarda karsinoma hücreleri sadece 3B yapı oluşturmazlar; aynı zamanda onları çevreleyen ECM ve stromal tümör hücreleri ile de etkileşime girerler. Bu etkileşimlerin tümörün gelişimi ve ilerlemesi açısından oldukça gerekli olduğu bilinmektedir. Çünkü bu etkileşimler hem tümör hücrelerinde hem de stromal hücrelerde çeşitli sinyal yollarında değişikliğe neden olmaktadır (231). Bu nedenlerle 3B modellerin tümör biyolojisinin anlaşılmasında ve ilaç cevaplarının araştırılmasında 2B modeller ve hayvan deneyleri arasındaki boşluğu dolduran değerli çalışmalar olduğu düşünülmektedir (206).

Bu tez çalışmasındaki 2B kültür gen ekspresyon sonuçları kendi içerisinde değerlendirildiğinde; *BAD*, *BCL2L11*, *HTRA2*, *TNF*, *BCL2L10* ve *TNFSF8* genlerinin ekspresyonunda borik asit gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Bu artışların biyolojik sonuçlarının anlaşılabilmesi için öncelikle ilgili gen ürünlerinin apoptotik yollardaki yerleşimlerinin ve fonksiyonlarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir.

*BAD*; tam ismiyle “*BCL2 associated agonist of cell death*” insan genomunda 11. kromozomda yer alan bir gendir. Bu gen tarafından kodlanan protein BCL-2 ailesinin bir üyesidir. Bilindiği üzere apoptozun düzenleyici molekülleri olarak bilinen bu moleküllerin hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik özellikte olanları vardır ve mitokondriyal yollarda etkin olarak rol oynarlar. Bazı BCL-2 ailesi üyeleri ise ekstrinsik yolak ve mitokondriyal yolak arasında bağlantıyı kurmaktadır. *BAD* bu protein ailesinin bir üyesi olarak BCL-XL ve BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinler ile heterodimerler oluşturarak apoptozu pozitif olarak düzenler.

*BCL2L11*; tam ismiyle “*BCL2 Like 11*” ya da “*BCL-2 Interacting Mediator of Cell death*” insan genomunda 2. kromozomda yer alır. Bu gen tarafından kodlanan

protein de BCL-2 ailesinin bir üyesidir ve BAM, BIM veya BOD olarak da adlandırılır. BIM normal koşullarda hücrede mikrotübüllerde dinein hafif zincirlerine bağlı olarak bulunur. Apoptotik uyarı sonucu fosforile olduğunda ise bulunduğu yerden ayrılır ve mitokondriye geçerek BCL-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin etkilerini bloke eder.

*HTRA2*; tam ismiyle “*HTRA serine peptidase 2*” insan genomunda 2. kromozomda yer alır. Bu gen tarafından kodlanan HTRA2 proteini bir serin proteazdır. Bu protein endoplazmik retikulum içerisinde ve mitokondride lokalizedir. Apoptotik uyarı sonucu mitokondriden sitoplazmaya geçer ve burada IAP'lere bağlanarak apoptozu indükler. Bilindiği üzere IAP'ler hem başlatıcı hem efektör kaspazlar üzerinden etki gösterebilirler. HTRA2 ve benzeri bazı moleküller ise bunları inhibe ederek kaspazlar üzerindeki baskılamayı ortadan kaldırır.

*TNF*; tam ismiyle “*Tumor Necrosis Factor*” insan genomunda 6. kromozomda yer alır. Bu gen tarafından kodlanan protein TNF üst ailesinin üyesi, çok fonksiyonlu bir sitokindir. İlgili reseptörleri ile etkileşime geçerek hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz, lipid metabolizması ve pıhtılaşma gibi çeşitli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynar.

*BCL2L10*; tam ismiyle “*BCL2 Like 10*” insan genomunda 15. kromozomda yer almaktadır. Genin protein ürünü BCL-2-L-10, BCL-B, Diva veya Boo olarak isimlendirilir. Bu protein BCL-2 ailesini bir üyesidir. BCL-B; BCL-2, BCL-XL ve BAX gibi ailenin üyesi diğer proteinler ile etkileşime girebilir. BCL-B'nin BAX tarafından indüklenen apoptozu baskılayabildiği, ancak aynı etkiyi BAK tarafından indüklenen apoptoz üzerinde göstermediği bilinmektedir. Diğer taraftan bu proteinin farelerdeki karşılığı olan proteinin Apaf1 ile etkileşime girdiği ve kaspaz 9'un da yer aldığı bir protein kompleksi oluşturduğu ve böylece kaspaz 9 aracılı apoptotik yolda yer aldığı görülmektedir.

*TNFSF8*; tam ismiyle “*TNF superfamily member 8*” insan genomunda 9. kromozomda yer alır. Gen protein ürünü ayrıca CD153, CD30L, CD30LG veya TNLG3A olarak da bilinir. Bu protein TNF ligand ailesinin üyesi bir sitokindir. Bu sitokin TNFRSF8/CD30 hücre yüzey antijeni için bir ligandır. Aynı zamanda Hodgkin lenfoma ve ilişkili hematolojik malignitelerde bir belirteçdir. Bu sitokin bazı lenfoma

hücrelerinde hücre proliferasyonunu artırdığı gözlenirken, bazı lenfoma hücrelerinde ise hücre proliferasyonunu azalttığı ve hücre ölümüne neden olduğu görülmektedir.

2B kültür için bahsedilen genlerin ekspresyonlarındaki artış bir bütün olarak ve immunohistokimyasal bulguların ışığında değerlendirildiğinde bazı önemli noktalar göze çarpmaktadır. Öncelikle immunohistokimyasal çalışmalarda; borik asit gruplarında, kontrol grubuna kıyasla TUNEL ve kaspaz 3 işaretlenme indeksindeki anlamlı yükseklik, bu hücrelerin apoptoza gittiğini göstermektedir. Ayrıca BrdU ile yapılan immunohistokimyasal çalışmada borik asit gruplarında işaretlenme indeksinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük olması; hücrelerin proliferasyonundaki azalmanın bir göstergesi olarak TUNEL ve kaspaz 3 sonuçlarını desteklemektedir. AIF ile olan immunohistokimyasal boyamada ise borik asit gruplarında kontrol gruplarına göre işaretlenme indeksinde anlamlı bir artış olmasına karşın, genel olarak zayıf bir işaretlenme olduğu görülmektedir. Bu durum borik asit etkisiyle gelişen apoptotik durumdan mitokondriyal yolağın sorumlu olamayacağını düşündürmektedir. Çünkü AIF normalde mitokondriyal membranlar arasında bulunan bir proteindir ve intrinsik apoptotik yolağın etkisiyle buradan salınarak; bir taraftan DNA fragmentasyonuna, bir taraftan da mitokondriyal membranların geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bu tez çalışmasındaki immunohistokimyasal bulgularda, hücrelerde zayıf AIF boyanmasının tespit edilmesi; intrinsik yolağın tam olarak aktif olmadığını ve henüz yeteri kadar AIF'in sitoplazmaya geçmediğinin göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Kuvvetli kaspaz 3 boyanmasına karşı zayıf AIF boyanması apoptozun ekstrinsik yolak üzerinden başladığı ancak daha geç aşamalarda mitokondriyal yolağın da devreye girmeye çalıştığı ve ilerleyen aşamalarında ekstrinsik yolağa ek olarak intrinsik yolağın da aktive olabileceğine dair bir bulgu olarak yorumlanmaktadır. Bir başka değerlendirme ile ise bu durum; ekstrinsik yolağın etkin olmasına karşılık, mitokondriyal yolağı aktive edecek yeterli uyaran veya yeterli miktarda sinyal molekülü olmadığından; intrinsik yolağın aktive olamadığı ve kuvvetli bir AIF boyanmasına neden olacak kadar mitokondriyal membran bütünlüğünde bozulma meydana gelmediği şeklinde yorumlanmaktadır.

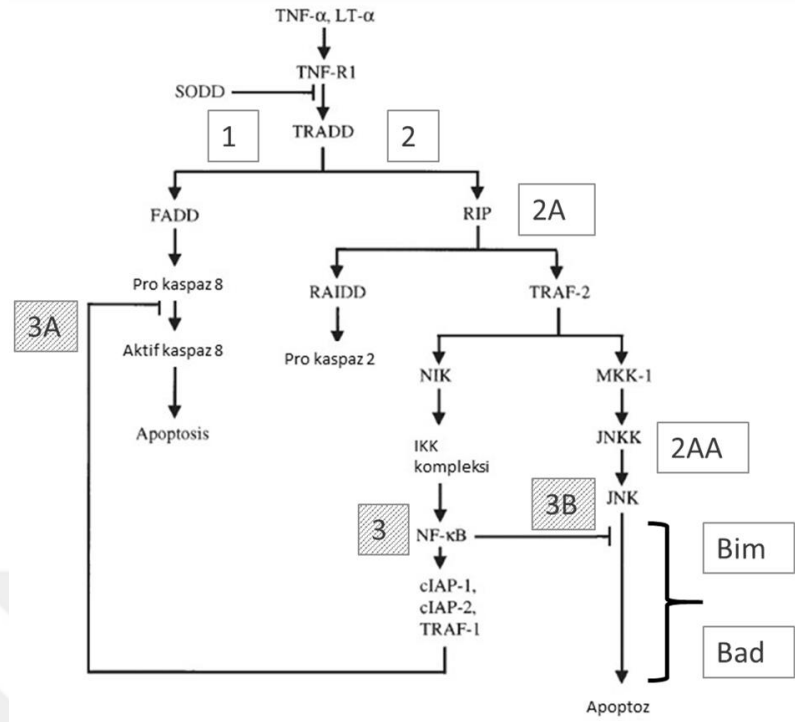
Genetik sonuçların verileri ile birlikte değerlendirme yapıldığında da benzer çıkarımlar elde edilmiştir. Öncelikle borik asitin etkisiyle TNF ekspresyonunda artış olduğunu görülmektedir. Bilindiği üzere TNF ekstrinsik apoptotik yolağın en önemli

ligandlarından biridir ve TNF reseptörleri üzerinden apoptozu indükler. Bu durum borik asitin hücrelerde TNF bağımlı bir mekanizma ile ekstrinsik yolak üzerinden apoptoza neden olabileceğini göstermektedir. Borik asit etkisiyle hücre kaderi apoptotik ölüm olarak belirlenmiş ve bunu uygulamak üzere gen ekspresyonları değiştirilerek *TNF* ekspresyonları artırılmıştır. Artan TNF ligandlarının da immünohistokimyasal bulgularla da uyumlu olarak apoptoza neden olduğu görüşü ağırlık kazanmaktadır. Ama aynı zamanda hücrelerde BIM ve BAD gibi mitokondriyal yolakla ilgili bazı proteinlerin ekspresyonlarında da artış olduğu görülmektedir. Bu durum immünohistokimyasal olarak zayıf AIF boyaması ile birlikte değerlendirildiğinde farklı çıkarımlara ulaşmak mümkündür. Borik asit etkisiyle hücrede muhtemelen apoptotik süreci kuvvetlendirmek için ya da ikinci bir etki yolu olarak intrinsik apoptotik yolağın, üstelik TNF reseptörü ile ilişkili mekanizmalarda yer alan bir intrinsik yolağın, sürece katılmaya çalışıldığı, ancak henüz yeterli bir aktivasyon düzeyine erişmediği şeklinde yorumlamak mümkündür. Çünkü TNF ligand-reseptör etkileşimi sonrası mekanizmalar aynı zamanda kendi kendini inhibe edebilecek, apoptozdan kaçış noktalarına sahip bir yoldur. Bu inhibisyonun önüne geçmek için ekstrinsik apoptozun yanında intrinsik mekanizmaları da aktive ederek apoptozu garanti altına almak oldukça anlamlı görülmektedir. Üstelik ekstrinsik yolda etkin olduğu düşünülen TNF mekanizması aynı zamanda intrinsik mekanizmayı uyarıcı bir yan yolağa da sahiptir. Zayıf Aif boyanmasıyla ilgili olarak yapılabilecek diğer bir değerlendirme de; intrinsik yolda bir takım proteinlerin birbirlerinin inhibisyonu ile seyreden aşamalı bir mekanizmaya sahip olması nedeniyle TNF aracılı ekstrinsik yolak kadar hızlı bir cevap gelişmiyor olabileceği şeklindedir. Çünkü bilindiği üzere BIM de BAD da mitokondriyal yolağın aktivitesini negatif olarak düzenleyen yani mitokondriyal yolak üzerinden gerçekleşecek olan apoptozu baskılayacak BCL-2 ve BCL-XL gibi proteinlerin etkisini inhibe eden proteinlerdir ve burada aşamalı bir süreç bulunmaktadır.

Burada ayrıca borik asitin etkisi ile hücrede *HTRA2* ekspresyonlarının da arttığı görülmektedir. Bilindiği üzere *HTRA2* sitoplazmada hem efektör kaspazları hem de başlatıcı kaspazları inhibe eden inhibitör proteinleri bloke etmektedir. Bu durumu hücrelerde borik asit nedeniyle gerçekleşecek olan apoptotik süreci kuvvetlendirmek, süreç üzerinde inhibisyona neden olabilecek proteinleri bloke edebilmek adına

HTRA2 ekspresyonunun artırıldığı şeklinde yorumlamak mümkündür. Çünkü; intrinsik yolak üzerine etki eden apoptotik stress pro-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerinin ekspresyonunu veya aktivasyonunu tetikler. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik BCL-2 üyeleri arasındaki denge ilk karar noktasıdır. Eğer yeteri kadar apoptotik uyarım alınmışsa pro-apoptotik BCL-2 proteinleri dış mitokondriyal membranda kanal yapısı oluşturarak sitokrom-c salınımını uyarır. Sitokrom c'nin tetiklenmesi ikincil bir karar noktasıdır ve buradaki belirleyici rol IAP'ler düzeylerine bağlıdır. Önceden apoptotik strese maruz kalma veya daha önceden var olan yüksek IAP ekspresyon düzeyi, yeni aktive olmuş kaspaz 9 düzeyini ya da aktive olmuş herhangi bir efektör kaspazı baskılayabilir. Ancak yeterli düzeyde kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşirse, kaspaz 3 ve/veya kaspaz 7'yi aktive ederek IAP'ler üzerindeki kaspaz 9 bağlanma bölgeleri ortadan kaldırılır. Ayrıca aktive olan kaspazlar mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak AIF, SMAC ve OMI'nin salınımına neden olur. AIF çekirdeğe geçerek kromatin yoğunlaşmasına neden olurken; SMAC ve OMI, IAP'lerden geriye kalanları inhibe ederek kaspazların önündeki kısıtlamayı ortadan kaldırır (232). IAP'lerin apoptozun kontrolünde üstlendikleri merkezi rol, birçok primer tümör dokusunda ve kanser hücre hattında IAP ekspresyon seviyelerinin artmış olması ile kanıtlanmaktadır (233).

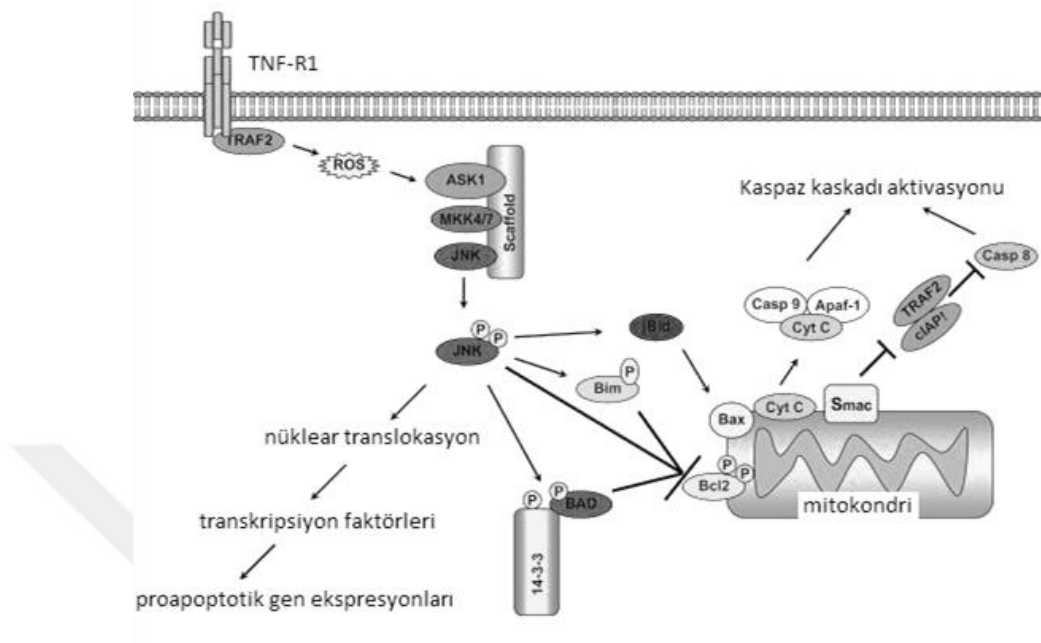
Elde edilen sonuçlarda ayrıca ilginç bir detay dikkat çekmektedir. Daha önce bahsedildiği üzere TNF resptörü aracılı sinyal yolağı karmaşık bir mekanizma ağına sahiptir. Şekilde de görüldüğü üzere (Şekil 35) reseptör ligand etkileşimi sonrası TRADD; FADD ile etkileşime girerse (Şekil 35, 1 nolu yön) klasik ekstrinsik yolağın bir şekli olan moleküler süreçler devreye girmektedir. Ancak TRADD; önce RIP sonra da TRAF2 ile etkileşime girer (Şekil 35, 2A ve devamındaki yön) ve MKK-1 üzerinden JNK sinyal yolağı aktive olursa apoptozun mitokondriyal yolağında görülen moleküler olaylar gerçekleşmektedir. Üstelik JNK aracılı bu yolak BIM ve BAD'ın, sinyal yolağı tarafından aktive edilmesi ve bu proteinlerin de BCL-2 ve BCL-XL'yi inhibe etmeleriyle gerçekleşmektedir. Yani gen ekspresyon artışıyla ilgili elde edilen sonuçlardan üçü de aynı mekanizma üzerinde birleşebilmektedir.



**Şekil 35.** TNF-BIM-BAD ilişkisi.

Sinyal yolağının aktivasyonunu takiben JNK fosforile olur (Şekil 36). Fosforile JNK aynı zamanda çekirdeğe geçer ve c-Jun'u fosforilleyerek aktive eder. Bu ise aralarında TNF- $\alpha$ , FAS-L ve BAK gibi bazı genlerin yer aldığı bir grup pro-apoptotik genin transkripsiyonundan sorumlu bir transkripsiyon faktörü olan AP-1'i (Activator Protein 1) aktive eder (121). Yine burada JNK aracılı TNF transkripsiyonunun artıyor olması da bu tez çalışmasında elde edilen bulgular açısından da oldukça dikkat çekicidir. Ancak ilginç bir şekilde TNF-TRADD-RIP-TRAF2 yolağında apoptozdan kaçışa neden olabilecek yan yollar da mevcuttur. Eğer TRAF2 etkisiyle MKK-1 değil de NIK aktivasyonu olursa, NF- $\kappa$ B sinyal yolağı aktive olmakta ve bu sinyal yolağı da hem JNK sinyal yolağı aracılı intrinsik apoptotik yolağı direkt etki ile baskılayabilmekte (Şekil 35, 3B yönü), hem de anti-apoptotik faktörler olan c-IAP-1, c-IAP-2 ve TRAF-1 gibi moleküllere bağlanarak bir sinyal kompleksi oluşturup TNF-TRADD-FADD-kaspaz 8 aktivasyonu ile giden ekstinsik mekanizma üzerinden apoptozu baskılayabilmektedir (Şekil 35, 3A yönü). Hücrelerde borik asit etkisiyle BIM ve BAD gibi mitokondriyal yolakla ilgili proteinlerin yanı sıra TNF gibi ekstrinsik yolakla ilgili bir proteinin de ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde TNF reseptör-ligand etkileşiminin farklı adaptör proteinler

aracılığı ile hem ekstrinsik hem intrinsik yolak üzerinden apoptoza neden olabilme yeteneği bu açıdan oldukça anlamlıdır.



**Şekil 36.** JNK sinyal yoluğu TNF-R1 ilişkisi (119).

3B kültür gen ekspresyon sonuçlarını kendi içerisinde değerlendirildiğinde; *MCL1*, *REL*, *TNFRSF10A* genlerinin ekspresyonunda borik asit gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış olduğu görülmektedir. Bu artışların biyolojik sonuçlarının anlaşılabilmesi için öncelikle ilgili gen ürünlerinin apoptotik yollardaki yerleşimlerinin ve fonksiyonlarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir

*MCL1*; tam adıyla “*MCL1, BCL2 family apoptosis regülatör*” insan genomunda 1. kromozomda yer almaktadır. Genin protein ürünü MCL1; BCL-2 ailesi üyesi anti-apoptotik bir proteindir. Ancak alternatif kesim sonucu farklı transkript tipleri ortaya çıkmaktadır. İzoform 1 olarak isimlendirilen en uzun gen ürünü apoptozu inhibe ederek hücre sağ kalımını desteklerken, izoform 2 ve izoform 3 olarak isimlendirilen daha kısa kesilmiş gen ürünleri apoptozu uyarmaktadır.

*REL*; tam adıyla “*REL proto-oncogene, NF-kB subunit*” insan genomunda 2. kromozomda yer almaktadır. Bu aile üyeleri apoptoz, inflamasyon, immun cevaplar, ve onkojenik süreçlerle ilgili genleri düzenler. Bu protoonkogen, özellikle B lenfositlerin çoğalmasında önemli bir rol oynar. Ancak bazı hücrelerde apoptotik

cevaplara da neden olmaktadır ve Rel/NF-kB' nin apoptozu uyarması veya inhibe etmesi, hücre ve uyaran tipine göre değişebilmektedir.

*TNFRSF10A*; tam adıyla “*TNF receptor superfamily member 10a*” insan genomunda 8. kromozomda yer alır. Bu gen tarafından kodlanan protein TNF reseptör üst ailesinin bir üyesidir ve DR4, APO2, CD261 veya TRAILR1 olarak da isimlendirilir. Bu reseptör TNF ilişkili apoptoz indükleyici ligand tarafından aktive edilir (TNFSF10/TRAIL), bunun sonucunda apoptozu uyarıcı sinyal oluşur.

3B kültür için bahsedilen genlerin ekspresyonlarındaki artış bir bütün olarak ve immunohistokimyasal bulguların ışığında değerlendirildiğinde; immunohistokimyasal çalışmalarda, borik asit gruplarında, kontrol grubuna kıyasla TUNEL ve kaspaz 3 işaretlenme indeksindeki anlamlı yükseklik hücrelerin apoptoz gittiğini göstermektedir. Ayrıca BrdU ile yapılan immunohistokimyasal çalışmada Borik asit gruplarında işaretlenme indeksinin kontrol gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük olması; hücrelerin proliferasyonundaki azalmanın bir göstergesi olarak TUNEL ve kaspaz 3 sonuçlarını desteklemektedir. AIF ile olan immunohistokimyasal boyamada ise borik asit gruplarında kontrol gruplarına göre işaretlenme indeksinde anlamlı bir artma olmasına karşın, genel olarak zayıf bir işaretlenme olduğu görülmektedir. Bu durum borik asit etkisiyle gelişen apoptotik durumdan kesin olarak mitokondriyal yolağın sorumlu olup olmadığını değerlendirme konusunda yetersiz olduğu şeklinde değerlendirilmektedir. 3B kültürdeki tüm immunohistokimyasal işaretlenme indeksleri, 2B kültürdekilere kıyasla daha düşük olmakla birlikte; sonuçlar 2B kültür sonuçları ile benzerlikler gösterdiği görülmektedir. 3B kültürde ekspresyonu artan *TNFRSF10A* (TRAILR1/DR4) ekstrinsik yolağın önemli reseptörlerinden biridir. Bilindiği üzere TRAIL özellikle normal hücrelerden ziyade kanser hücre hatlarında apoptozu uyarmaktadır. Aktive olan TRAIL-R1 reseptörü FADD'ı ve kaspaz 8 bağlayarak DISC yapılarını oluşturur ve ekstrinsik apoptotik yolağı aktive edebilmektedir. MCL-1 embriyonik gelişim ve birçok yetişkin hücre serisinde yaşamsal fonksiyonlara sahiptir. Normal koşullarda MCL-1 dış mitokondriyal membran üzerinde yerleşmiştir ve burada BAX ve BAK aktivasyonunu engelleyerek mitokondriyal bütünlüğün bozulmasını ve dolayısı ile mitokondriyal apoptotik yolağın aktivasyonunu engeller. Birçok kanser türünde MCL-1 yüksekliği kemoterapötik direnç ve nükslerle ilişkilendirilmiştir. Bu açıdan bakıldığında MCL-1 anti apoptotik



yolakta önemli bir yere sahiptir. REL/NF- $\kappa$ B ailesi proteinler bilindiği gibi, çeşitli ekstraselüler uyarılara cevap olarak post-translasyonel olarak düzenlenen ve çeşitli hücrel cevaplara aracılık eden bir ağ oluştururlar. Birçok çalışma REL/NF- $\kappa$ B hem apoptozu uyarabileceğini hem de apoptozdan koruyucu etkiler gösterebileceğini vurgulamaktadır. Örneğin birçok hücre türünde; farklı REL/NF- $\kappa$ B proteinleri dimer oluşturma konusunda,  $\kappa$ B bölgelerine bağlanma afinitesi açısından ve uyarıldığı sinyal mekanizmaları açısından farklılık gösterse de sonuç olarak NF- $\kappa$ B anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırırken, apoptotik genlerin ekspresyonlarını azaltmaktadır. Ancak osteoblastlarda ve myeloid hücrelerde NF- $\kappa$ B apoptoza aracılık etmektedir. Ayrıca endotelial hücrelerde oksidatif stres bağımlı apoptozun da NF- $\kappa$ B aracılığı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında ise kesin olan NF- $\kappa$ B nin apoptozda rol oynadığı ancak tek başına apoptozu düzenleme yeterliliği olmadığı; bu konuda hücre ve uyaran tipinin belirleyici rol oynadığıdır. Bu tez çalışmasındaki 3B kültür gen ekspresyon bulguları bu açıdan immunohistokimyasal sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde, TRAIL aracılı bir ekstrinsik yolağın etkin olabileceği değerlendirilmektedir. Diğer ekspresyonu artan iki gen ise MCL-1'de olduğu gibi alternatif kesim sonucu oluşan proteinleri ile veya NF- $\kappa$ B' de olduğu gibi pro-apoptotik veya anti-apoptotik özellikler gösterebilmektedir. Bu tez çalışmasında ise apoptozu destekledikleri veya engelleyeceklerse bile yeterli bir etki düzeyi ortaya çıkaramadıkları değerlendirilmektedir.

Gen ekspresyon çalışmalarının sonuçları bazı sinyal yolları ile muhtemel bağlantılar kurmuş olmakla birlikte bu anlamda kesin sonuçlara ulaşabilmek için daha geniş kapsamlı ileri araştırma tekniklerine ihtiyaç vardır. Her şeyden önce qRT-PCR çalışması sadece ilgili genlerin ekspresyonlarındaki değişimleri göstermektedir. Ancak qRT-PCR çalışmasında ekspresyonunda artış tespit edilen genlerin proteine dönüşüp dönüşmediği hatta proteine dönüşmüş olsa bile bunların aktif olup olmadığı bu yöntemle tespit edilememektedir. Bu açıdan daha net sonuçlara ulaşabilmek adına, ileri araştırmalarda ilgili protein ürünlerinin miktarları ve tespit edilen sinyal yollarının aktivite durumları da değerlendirilmelidir. Yapılan çalışmalarda apoptozun belirlenmesi kadar, ilgili apoptotik yolakla ilgili sinyal yolları hakkında bilgi edinebilmek de büyük önem taşımaktadır. Çünkü birçok doğal bileşik önemli bir

etki mekanizması olarak, kanser hücrelerindeki çeşitli sinyal iletim yollarını hedef almakta ve böylelikle hücre sağ kalımı ve çoğalması üzerine etki etmektedir.

Hem kanser patogeneziindeki birçok mekanizma hem de kanser tedavisi için araştırılan birçok ajan apoptotik yolları hedef almaktadır (67). Uygun apoptotik sinyallerin varlığı hücre ölümü ve yaşamı arasındaki dengenin ve aynı zamanda genomik bütünlüğün korunması açısından gereklidir (234). Kanser hücreleri apoptotik yolları transkripsiyonel, translasyonel ve post-translasyonel olarak düzenleyebilir. Bazı durumlarda kanser hücreleri anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu artırarak veya pro-apoptotik genlerin ekspresyonunu azaltarak apoptozdan kaçabilir. Bazı durumlarda ise bunu pro-apoptotik proteinleri stabilize, anti-apoptotik proteinleri ise destabilize ederek başarırlar. Dahası kanser hücreleri anti apoptotik veya proapoptotik proteinlerin fonksiyonlarını fosforilasyon gibi post translasyonel olaylarla değiştirerek apoptozdan kaçabilir. Bu olayların biri veya bir kaçını aynı anda kanser hücrelerinde mevcut bulunabilir (35). Kanser hücreleri temel olarak; pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesini bozarak, kaspaz aktivitesini azaltarak ve ölüm reseptör sinyal mekanizmalarını bozarak apoptozu etkiler (68).

Bu tez çalışması ve benzeri çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile borun kimyasal özelliklerinin aydınlatılması sonucu elde edilen veriler, borun medikal alanda kullanımı önündeki bariyerleri yavaş yavaş ortadan kaldırmaktadır. Bu alanda daha fazla araştırma yapılmakta ve bu araştırmalar meyvelerini vermeye başlamaktadır. Örneğin bor içerikli klinik kullanımdaki tek ilaç olan proteozom inhibitörü etkiye sahip bortezomib (Velcade®) 2003 yılından beri başarılı bir şekilde multiple myelom ve Hodgkin's lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır. Diğer bazı bor içerikli ilaçlar ise klinik çalışmaların farklı fazlarında bulunmaktadır (235).

Bu tez çalışmasından elde edilen veriler; hem 2B hem 3B kültürde, borik asit gruplarında BrdU ile işaretlenme indekslerinin anlamlı olarak azaldığını; buna karşılık TUNEL, kaspaz 3 ve AIF ile işaretlenme indekslerinin ise anlamlı derecede arttığını göstermektedir. Bu durum her iki kültür ortamında da borik asitin SW-480 kolon kanser hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve apoptozu uyardığını göstermektedir. Yine her iki kültür ortamında gerçekleştirilen gen ekspresyon

alışmaları da immunohistokimyasal sonuçları destekler nitelikte bazı önemli genlerde ekspresyon artışlarını göstermektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda tıp ve moleküler biyoloji alanlarında yaşanan gelişmelere rağmen kanserle olan savaş henüz kazanılamamıştır. Ancak kanser üzerine yapılan çalışmaların sayısı arttıkça; hem kanserleşme sürecinde sorumlu moleküler yolaklar hem de tedavide hedef alınabilecek yolaklar üzerinde elde edilen bilgiler bilim insanlarının elini güçlendirmektedir. Tüm kanser türlerinde olduğu gibi kolorektal kanserlerin tedavisinde de daha etkili ve güvenilir ajanların keşfine ihtiyaç vardır ve günümüz bilimsel çalışmaları bu yönde ilerlemektedir. Çünkü artık kanseri tedavi etmek için tek başına kanser hücrelerini öldürmenin yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Günümüz tıp anlayışında, kanser hücreleri ile olan savaşın; sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek kadar seçici olması ve artık varlığı kanıtlanmış olan kanser kök hücrelerini hedef alacak kadar da akılcı olması gerektiği kabul edilmektedir. Seçici olmayan moleküller nedeniyle gelişen toksik etkilerin hasta konforunu ve tedaviye devamlılığı olumsuz etkilediği görülmüştür. Kanser kök hücrelerini hedef alan akılcı moleküllerin olmaması ise nüklere neden olan klinik tablolara yol açmaktadır. Bu anlamda birçok kanser araştırması, artık hücreler üzerinde hem moleküler hem genetik düzeyde etki profillerini incelemekte ve sorumlu yolakları ortaya çıkarmaya çalışmaktadır.

Bu bilimsel gerçeklere uygun olarak bu tez çalışmasında borik asitin SW-480 insan kolon adenokarsinom hücreleri üzerine olan etkileri araştırıldı. Borik asitin bu hücrelerin proliferasyonu üzerine olan etkileri BrdU, apoptoz üzerine olan etkileri ise TUNEL, kaspaz 3 ve AIF ile immunohistokimyasal olarak incelendi. Apoptotik moleküler yolakların aydınlatılabilmesi amacıyla ise; apoptozun çeşitli yolaklarında görev alan 84 genin ekspresyon profili qRT-PCR metodu ile araştırıldı. Bu alanda yapılan birçok çalışmadan farklı olarak; tüm deneyler hem iki boyutlu hem de üç boyutlu kültür ortamında tekrarlandı. Bu tez çalışması borik asitin kolon kanser üzerine etkilerini inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır.

Bu kapsamda yapılan deneyler sonucunda hem iki boyutlu hem üç boyutlu kültürde, tüm deney saatlerinde; borik asit gruplarında BrdU ile işaretlenme indekslerinin anlamlı olarak azaldığı, buna karşılık TUNEL, Kaspaz 3 ve AIF ile işaretlenme indekslerinin ise anlamlı dercede arttığı görüldü. Ayrıca her iki kültür

ortamında gerçekleştirilen qRT-PCR çalışması sonucunda da immunohistokimyasal sonuçları destekler nitelikte bazı önemli genlerde ekspresyon artışlarını tespit edildi. Bu bulgular; 75 mM borik asitin SW-480 kolon kanser hücrelerinde, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu uyardığı sonucunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca yapılan deneyler, iki boyutlu ve üç boyutlu kültür sonuçları arasında hem immunohistokimyasal hem de gen ekspresyonları açısından farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Bu bakımdan; üç boyutlu kültür sistemlerinin tümör biyolojisinin anlaşılmasında ve ilaç cevaplarının araştırılmasında sadece iki boyutlu kültür sonuçlarının yetersiz olabileceği ve bunların iki boyutlu modeller ve hayvan deneyleri arasındaki boşluğu dolduran değerli çalışmalar olduğu sonucu da ortaya çıkmaktadır.

Sonuç olarak günlük diyetin bir parçası ve toksik etki yönünden güvenilir bir ajan olan borik asit SW-480 kolon kanser hücre hatlarında hücre proliferasyonunu baskılamakta ve apoptozu uyarmaktadır. Bu özellikleri ile kolon kanseri tedavisi için potansiyel bir anti-kanser ajan adayıdır. Yine de kolon kanserinin moleküler patogeneziyle ilgili birçok bilinmeyen vardır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda hem kolon kanserinin erken öngörüsü, tanısı ve tedavisi için, bu kanser türünün gelişimine neden olan moleküler mekanizmaların hem de borik asitin kolon kanseri hücrelerine etkisinin daha tedaylı yolaklar ile aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir.

## ÖZET

### **Borik Asitin İn Vitro Ortamda Kolon Kanser Hücre Hatları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**

Kolorektal kanserler; bütün kanser türleri arasında görülme sıklığı bakımından; erkeklerde 3. kadınlarda 2. sırada yer alır. Kansere bağlı ölümler arasında ise 3. sırada yer alan önemli bir mortalite nedenidir. Kolorektal kanser tedavisinde mevcut tedavi yöntemleri ile başarı oranları oldukça düşüktür

Günlük diyetimizin bir parçası olan borik asit; bor elementinin en sık görülen formlarından biridir. Bor vücuda daima borik asit olarak alınmakta ve plazmada bu formda bulunmaktadır. Bazı epidemiyolojik veriler borik asitin erkeklerde prostat kanseri; kadınlarda serviks ve akciğer kanseri görülme oranlarını azalttığına dikkat çekmektedir. Ayrıca borik asitle yapılan deneysel çalışmalar; doz bağımlı bir şekilde borik asitin bazı prostat, melanom ve meme kanseri hücre hatlarında, hücre proliferasyonunu azalttığını ve apoptozu uyardığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında borik asitin, SW-480 insan kolon adenokarsinom hücre hatları üzerine olan etkileri hem 2B hem de 3B kültür ortamında BrdU, TUNEL, kaspaz 3 ve AIF immunohistokimyasal çalışmaları ile araştırıldı. Ayrıca apoptotik süreçte kilit role sahip genlerin ekspresyon profilini ortaya koymak üzere qRT-PCR çalışması gerçekleştirildi.

Sonuç olarak; hücre canlılık analizlerimizde 75 mM borik asitin hücre proliferasyonunu 24., 48. ve 72. saatler sonunda belirgin olarak azalttığı gözlemlendi. Ardından her iki kültür ortamında da tüm saatlerde TUNEL, kaspaz 3 ve AIF işaretlenme indekslerinde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış olduğu; BrdU işaretlenme indekslerinde ise anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Ancak özellikle AIF de belirgin olmak üzere genel anlamda 3B kültürde işaretlenme indekslerinin 2B kültüre kıyasla daha düşük olduğu görüldü. Gen ekspresyon çalışmalarında da immunohistokimyasal bulgularla uyumlu sonuçlar elde edildi. Yine 3B kültür ve 2B kültür koşulları arasında gen ekspresyonları açısından belirgin bir farklılık tespit edildi.

Borik asit her iki kültür ortamında da SW-480 hücrelerinin proliferasyonunu baskılamakta ve apoptozu neden olmaktadır. 3B modeller bir bakıma tümör biyolojisinin anlaşılmasında ve ilaç cevaplarının araştırılmasında 2B modeller ve hayvan deneyleri arasındaki boşluğu dolduran değerli çalışmalardır.

**Anahtar Sözcükler:** Borik Asit, Kolon Kanseri, Apoptoz

## ABSTRACT

### **Investigating the Effects of Boric Acid on Colon Cancer Cell Lines in In vitro Conditions**

Among all cancer types; colorectal cancers are the third most common cancer in males and the second in females. As an important cause of mortality; it is the third most common cause of cancer related deaths. With the current treatment methods the success rates with colorectal cancer treatment are very low.

Boric acid, which is part of our daily diet; one of the most common form of boron. Boron is always taken as boric acid in the body and is in this form in the plasma. Some epidemiological data suggest that boric acid reduces the incidence of prostate cancer in men; cervical cancer and lung cancer in women. In addition, experimental studies with boric acid shows, boric acid reduces cell proliferation and stimulates apoptosis in some prostate, melanoma and breast cancer cell lines; with a dose dependent manner.

In this study, the effects of boric acid on human colon adenocarcinoma cell line SW-480 with BrdU, TUNEL, caspase-3 and AIF immunohistochemical studies in both 2D and 3D culture systems was investigated. Also a qRT-PCR study conducted to determine the expression profile of genes that have a key role in apoptosis.

As a result, in cell viability analysis; at the end of the 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>th</sup> hours it is observed that 75 mm boric acid was significantly reduced the cell proliferation. Then in both culture environments there was a significant increase in TUNEL, caspase-3 and AIF marking indexes at all hours compared to control groups; a significant decrease in BrdU index was detected. However, in general agreement, especially in AIF, marking indexes in 3D culture were found to be lower than in 2B culture. In gene expression studies, we obtained compatible results with immunohistochemical findings. Again, there was a significant difference between 3D culture and 2D culture conditions in terms of gene expression.

Boric acid suppresses the proliferation of SW-480 cells in both culture conditions and causes apoptosis. In a sense, 3D models are valuable studies that fill the gap between 2D models and animal experiments in understanding tumor biology and investigating drug responses.

**Key Words:** Boric Acid, Colon Cancer, Apoptosis

## KAYNAKLAR

1. Liu X, Song M, Gao Z, Cai X, Dixon W, Chen X, et al. Stereoisomers of Astaxanthin Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth by Inducing G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(41):7750-9.
2. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-JJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
3. Jaferian S, Negahdari B, Eatemadi A. Colon cancer targeting using conjugates biomaterial 5-fluorouracil. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;84:780-8.
4. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Critical reviews in oncology hematology*. 2010;74(2):106-33.
5. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet*. 2005;365(9454):153-65.
6. Midgley RS, Al-Salama HM, Merrie A, Mortensen N, Kerr DJ. Colorectal cancer: a multidisciplinary approach. In: *Textbook of Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Hawkey C. J., Bosch J. Eds., Second Edition. USA: Wiley-Blackwell, 2005, p. 444-54.
7. Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Ichwan SJA, Soundharrajan I, Govindan N. Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: a review. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2014;4(3):173-81.
8. Farfán-García E, Castillo-Mendieta N, Ciprés-Flores F, Padilla-Martínez I, Trujillo-Ferrara J, Soriano-Ursúa M. Current data regarding the structure-toxicity relationship of boron-containing compounds. *Toxicology Letters*. 2016;258:115-25.
9. Yılmaz S, Ustundag A, Cemiloglu Ulker O, Duydu Y. Protective Effect of Boric Acid on Oxidative DNA Damage In Chinese Hamster Lung Fibroblast V79 Cell Lines. *Cell journal*. 2016;17(4):748-54.
10. Ayodele OT. Boron Complexes as Anticancer Agents and Recent Advances. 2016. 2016;2(2):3.
11. Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell adhesion & migration*. 2008;2(3):153-60.
12. Henderson KA, Kobylewski SE, Yamada KE, Eckhart CD. Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2 $\alpha$  phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells. *BioMetals*. 2015;28(1):133-41.
13. Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu CM, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D. Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological trace element research*. 2008;122(3):197-205.
14. Acerbo AS, Miller LM. Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*. 2009;134(8):1669-74.



15. Sudhakar A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science and therapy*. 2009;1(2):1-4.
16. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*. 2007;22(4):197-204.
17. Weinberg R. *The Biology of Cancer*. Second Edition, USA: Taylor & Francis Group; 2013, p. 31-71.
18. Vogelstein B, Kinzler KW. *The Genetic Basis of Human Cancer*. Second Edition, USA: McGraw-Hill Medical Pub. Division; 2002, p. 43- 57.
19. Lüleyap HÜ. *Moleküler Genetiğin Esasları*. Adana: Nobel Kitapevi; 2008, s. 88-120.
20. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell*. 2000;100(1):57-70.
21. Alberts B., Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell*. 5th edition, USA: Garland Science; 2008, p. 435-58.
22. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.
23. Jackson AL, Loeb LA. The Mutation Rate and Cancer. *Genetics*. 1998;148(4):1483-90.
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition, USA: Garland Science; 2002 p. 565-83.
25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
26. Antebi YE, Nandagopal N, Elowitz MB. An operational view of intercellular signaling pathways. *Current Opinion in Systems Biology*. 2017;1:16-24.
27. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001;411(6835):342-8.
28. Pietras K, Östman A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research*. 2010;316(8):1324-31.
29. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*. 2002;2(2):103-12.
30. Duronio RJ, Xiong Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(3):a008904.
31. Kasten MM, Giordano A. pRb and the cdks in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ*. 1998;5(2):132-40.
32. Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.
33. Massagué J. TGF $\beta$  in cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
34. Lazebnik Y. What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(4):232-3.

35. Fernald K, Kurokawa M. Evading apoptosis in cancer. *Trends in cell biology*. 2013;23(12):620-33.
36. Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(17):4960-3.
37. Tsimberidou A-M, Kurzrock R, Anderson KC. The role of angiogenesis in cancer. *Target Ther Transl Cancer Res*. 2015;5:64.
38. Sevimli TS, Sevimli M, Özçelik N. Tümör anjiyogenezinde mikroRNA (miRNA)'ların rolü. *SDÜ Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2015;6(1):43-6.
39. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in pharmacological sciences*. 2001;22(4):201-7.
40. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*. 2006;2(3):213-9.
41. Prager G, Poettler M. Angiogenesis in cancer. *Hämostaseologie*. 2012;32(2):105-14.
42. Acharyya S, Matrisian L, Welch DR, Massagué J. Invasion and metastasis. In *The Molecular Basis of Cancer*. Mendelsohn J., Gray W. Eds, Fourth Edition, USA: Elsevier Inc.; 2014, p. 269-285.
43. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Molecular Biology of the Cell*. 2016;27(21):3233-44.
44. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 2008;27(55):6920-9.
45. Jiang WG, Sanders AJ, Katoh M, Ungefroren H, Gieseler F, Prince M, et al., Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. *Seminars in cancer biology*; 2015; 35: 44–75.
46. Sevimli M, Sevimli TS. Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2016;30(1):45-54.
47. Yao Y, Dai W. Genomic Instability and Cancer. *Journal of carcinogenesis and mutagenesis*. 2014;5:1000165.
48. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(1):1-3.
49. Deininger P. Genetic Instability in Cancer: Caretaker and Gatekeeper Genes. *The Ochsner Journal*. 1999;1(4):206-9.
50. Abbas T, Keaton MA, Dutta A. Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(3):a012914.
51. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(3):220-8.
52. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.

53. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
54. Bondar T, Medzhitov R. The origins of tumor-promoting inflammation. *Cancer cell*. 2013;24(2):143-4.
55. Zheng J. Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Oncology letters*. 2012;4(6):1151-7.
56. Warburg O, Wind F, Negelein E. The Metabolism of Tumors in The Body. *The Journal of general physiology*. 1927;8(6):519-30.
57. Dell'Antone P. Energy metabolism in cancer cells: how to explain the Warburg and Crabtree effects? *Medical hypotheses*. 2012;79(3):388-92.
58. Locasale JW, Cantley LC. Altered metabolism in cancer. *BMC Biology*. 2010;8:88-90.
59. De Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews cancer*. 2006;6(1):24-37.
60. Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2009;24(3):369-76.
61. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Frontiers in immunology*. 2014;5:197.
62. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology*. 2011;29:235-71.
63. Prestwich RJ, Errington F, Hatfield P, Merrick A, Ilett EJ, Selby PJ, et al. The immune system—is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clinical oncology*. 2008;20(2):101-12.
64. Duque-Parra JE. Note on the origin and history of the term “apoptosis”. *The Anatomical Record*. 2005;283(1):2-4.
65. Diamantis A, Magiorkinis E, Sakorafas GH, Androutsos G. A brief history of apoptosis: from ancient to modern times. *Oncology Research and Treatment*. 2008;31(12):702-6.
66. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2014;16(6):2129-44.
67. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2011;30(1):87.
68. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):2942-55.
69. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Tıp Kitapevi; 2014, s.121-34.
70. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu H-Y, Lin L-T, et al., Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in cancer biology*; 2015;35:78-103.

71. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003; 22(53):8543-67.
72. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1380-9.
73. Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ*. 2017;24(8):1369-79.
74. Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998;17(25):3237-45.
75. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
76. Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(10):388-93.
77. Birkinshaw RW, Czabotar PE. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. *Seminars in cell & developmental biology*. 2017;72:152-62.
78. Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(2):1-22.
79. Volkmann N, Marassi F, Newmeyer D, Hanein D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 2014;21(2):206-15.
80. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences*. 2014;39(3):101-11.
81. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ*. 2018;25(1):46-55.
82. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(9):647-56.
83. Aouacheria A, Baghdiguian S, Lamb HM, Huska JD, Pineda FJ, Hardwick JM. Connecting mitochondrial dynamics and life-or-death events via Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int*. 2017;109:141-61.
84. Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators. *Methods in enzymology*. 2014;545:35-65.
85. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biology*. 2001;2(7):1-10.
86. Budhidarmo R, Day CL. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;39:80-90.
87. Finlay D, Teriete P, Vamos M, Cosford NDP, Vuori K. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins. *F1000Research*. 2017;6:587-94.
88. Berthelet J, Dubrez L. Regulation of apoptosis by inhibitors of apoptosis (IAPs). *Cells*. 2013;2(1):163-87.

89. Yin XM, Dong Z. Essentials of Apoptosis: A Guide for Basic and Clinical Research. USA: Humana Press; 2009, p. 223-35.
90. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 10th Edition, USA: Elsevier Health Sciences; 2017, p. 315.
91. Croft M, Benedict CA, Ware CF. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(2):147-68.
92. Silke J, Brink R. Regulation of TNFRSF and innate immune signalling complexes by TRAFs and cIAPs. *Cell Death Differ.* 2010;17(1):35-45.
93. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
94. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in biochemical sciences.* 2002;27(1):19-26.
95. Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. *Advances in immunology.* 2013;119:135.
96. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cellular signalling.* 2012;24(6):1297-305.
97. Caulfield AJ, Lathem WW. Disruption of Fas-Fas ligand signaling, apoptosis, and innate immunity by bacterial pathogens. *PLoS pathogens.* 2014;10(8):e1004252.
98. Scott FL, Stec B, Pop C, Dobaczewska MK, Lee JJ, Monosov E, et al. The Fas–FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature.* 2009;457(7232):1019-22.
99. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling.* 2003;15(11):983-92.
100. Hao Z, Mak TW. Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *Journal of molecular cell biology.* 2009;2(2):63-4.
101. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002;296(5573):1635-6.
102. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cellular signalling.* 2004;16(2):139-44.
103. Pozniak PD, White MK, Khalili K. TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling in the CNS: possible connection to EPHB2. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.* 2014;9(2):133-41.
104. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S-i, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology.* 2010;49(7):1215-28.
105. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation.* 2003;10(1):45-65.
106. Chu W-M. Tumor necrosis factor. *Cancer letters.* 2013;328(2):222-5.

107. Aggarwal BB, Takada Y. Pro-apoptotic and anti-apoptotic effects of tumor necrosis factor in tumor cells. Role of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Cancer treatment and research*. 2005;126:103-27.
108. Wagner EF, Nebreda ÁR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(8):537-49.
109. So J, Pasculescu A, Dai AY, Williton K, James A, Nguyen V, et al. Integrative analysis of kinase networks in TRAIL-induced apoptosis provides a source of potential targets for combination therapy. *Science Signaling*. 2015;8(371):rs3-rs.
110. LeBlanc H, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death & Differentiation*. 2003;10(1):66-75.
111. Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003;14(3):337-48.
112. Xu L-X, Grimaldo S, Qi J-W, Yang G-L, Qin T-T, Xiao H-Y, et al. Death receptor 3 mediates TNFSF15-and TNF $\alpha$ -induced endothelial cell apoptosis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;55:109-18.
113. Yang X, Shi B, Li L, Xu Z, Ge Y, Shi J, et al. Death receptor 6 (DR6) is required for mouse B16 tumor angiogenesis via the NF-kappaB, P38 MAPK and STAT3 pathways. *Oncogenesis*. 2016;5:e206.
114. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
115. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annual review of immunology*. 2000;18(1):143-64.
116. Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms. *Science*. 1999;286(5443):1358-62.
117. Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*. 1997;88(4):435-7.
118. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal*. 2004;23(8):1889-99.
119. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*. 2008;27(48):6245-51.
120. Lin A. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the brake on apoptosis. *Bioessays*. 2003;25(1):17-24.
121. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology*. 2007;19(2):142-9.
122. Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, et al. The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS letters*. 2006; 580(5):1320-6.

123. Chen F. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer research*. 2012;72(2):379-86.
124. Bubici C, Papa S. JNK signalling in cancer: in need of new, smarter therapeutic targets. *British journal of pharmacology*. 2014;171(1):24-37.
125. Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature*. 1995;377(6550):591-4.
126. Siddiquee KAZ, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell research*. 2008;18(2):254-67.
127. O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell*. 2002;109(2):S121-S31.
128. Dutta P, Li WX. Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. *Life Sciences*. 2013;6:1-9.
129. Zhou H, Li X-M, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of cell biology*. 2000;151(3):483-94.
130. Vara JÁF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*. 2004;30(2):193-204.
131. Jeong S-J, Dasgupta A, Jung K-J, Um J-H, Burke A, Park HU, et al. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells. *Virology*. 2008;370(2):264-72.
132. Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*. 2003;22(56):8983-98.
133. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2007;1773(8):1263-84.
134. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16(1):103-19.
135. McCubrey JA, Bertrand FE, Steelman LS, Chang F, Terrian DM, Franklin RA. Critical roles of the Raf/MEK/ERK pathway in apoptosis and drug resistance. In: *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases*, Srivastava R. Eds, Second Edition. USA: Springer; 2006. p. 101-34.
136. Kilbride S, Prehn J. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. *Oncogene*. 2013;32(22):2703-11.
137. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Analysis of cytochrome c release by immunocytochemistry. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016;2016(12):pdb. prot087338.
138. Zhou M, Li Y, Hu Q, Bai X-c, Huang W, Yan C, et al. Atomic structure of the apoptosome: mechanism of cytochrome c-and dATP-mediated activation of Apaf-1. *Genes & development*. 2015;29(22):2349-61.

139. Fulda S. Smac mimetics as IAP antagonists. *Seminars in cell & developmental biology*. 2015;39:132-8.
140. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001;8(3):613-21.
141. Kang S, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. A novel role for the mitochondrial HTRA2/OMI protease in aging. *Autophagy*. 2013;9(3):420-1.
142. Zhdanov DD, Fahmi T, Wang X, Apostolov EO, Sokolov NN, Javadov S, et al. Regulation of apoptotic endonucleases by EndoG. *DNA and cell biology*. 2015;34(5):316-26.
143. Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and biophysical research communications*. 2010;396(1):95-100.
144. Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84(2):215-22.
145. Harada H, Grant S. Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003;7(2):117-38.
146. Sánchez-Osuna M, García-Belinchón M, Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guiñón E, Casanelles E, Yuste VJ. Caspase-activated DNase is necessary and sufficient for oligonucleosomal DNA breakdown, but not for chromatin disassembly during caspase-dependent apoptosis of LN-18 glioblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2014;289(27):18752-69.
147. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000;407(6805):770-6.
148. Irani S, Shahmirani Z, Atyabi SM, Mirpoor S. Induction of growth arrest in colorectal cancer cells by cold plasma and gold nanoparticles. *Archives of medical science: AMS*. 2015;11(6):1286.
149. Aakif M, Balfe P, Elfaedy O, Awan FN, Pretorius F, Silvio L, et al. Study on colorectal cancer presentation, treatment and follow-up. *International journal of colorectal disease*. 2016;31(7):1-3.
150. Mohammed AA, El-Tanni H, El-Khatib HM, Mirza AA, El-Kashif AT. Molecular classification of colorectal cancer: Current perspectives and controversies. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2016;28(1):91-99.
151. Aykan NF. Red meat and colorectal cancer. *Oncology reviews*. 2015;9(1):38-44.
152. Tseng A, Yang C-H, Chen C-H, Chen C-H, Hsu S-L, Lee M-H, et al. An in vivo molecular response analysis of colorectal cancer treated with *Astragalus membranaceus* extract. *Oncology reports*. 2016;35(2):659-68.
153. Yamagishi H, Kuroda H, Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*. 2016;35:4-12.
154. Cai Y, Ma W, Huang X, Cao L, Li H, Jiang Y, et al. Effect of survivin on tumor growth of colorectal cancer in vivo. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(10):13267-72.



155. Gulbake A, Jain A, Jain A, Jain A, Jain SK. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):582-99.
156. Wakeman C, Keenan J, Eteuati J, Hollington P, Eglinton T, Frizelle F. Chemoprevention of colorectal neoplasia. *ANZ J Surg.* 2017;87(12):228-32.
157. Mørch LS, Lidegaard Ø, Keiding N, Løkkegaard E, Kjær SK. The influence of hormone therapies on colon and rectal cancer. *European journal of epidemiology.* 2016:1-9.
158. Alkan M. Baz bor minerallerinin kükürt dioksitli sulardaki çözünürlükleri. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Erzurum, (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Sabri Çolak), 1985; 2-6.
159. Ishii Y, Fujizuka N, Takahashi T, Shimizu K, Tuchida A, Yano S, et al. A fatal case of acute boric acid poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology.* 1993;31(2):345-52.
160. Woods WG. An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environ Health Perspect.* 1994;102 Suppl 7:5-11.
161. Sızmaç O, Yıldız G. Effects of dietary boric acid and ascorbic acid supplementation on performance, some blood and bone parameters in broilers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013;20(1):65-71.
162. Yenmez N. Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi. *Coğrafya Dergisi.* 2009(19):59-94.
163. Ayrancı DFE. Akut Borik Asit Uygulanan Sıçanlarda Testis, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokuları Üzerinde Gözlenen Histopatolojik Değişimler. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir, (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ünal Özelmaz), 2005; 4-12.
164. Boncukçuoğlu R, Kocakerim M, Yılmaz E, Yılmaz T. Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi. Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyum Bildiri Kitabı, 2004; s.83-89.
165. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer letters.* 2004;216(1):21-9.
166. Kalaçay D. Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Ratlarda Borik Asitin Total Oksidan Kapasite Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri ve Paraoksonaz Aktivitesine Etkisi. Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kars, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Onur Atakişi), 2013;4-6.
167. Qureshi S, Al-Shabanah O, Al-Harbi M, Al-Bekairi A, Raza M. Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. *Toxicology.* 2001;165(1):1-11.
168. Barranco W, Eckhert C. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British journal of cancer.* 2006;94(6):884-90.
169. Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A. The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2010;24(3):161-4.

170. Wang Y, Zhao Y, Chen X. Experimental study on the estrogen-like effect of boric Acid. *Biological trace element research*. 2008;121(2):160-70.
171. Dieter MP. Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect*. 1994;102 Suppl 7:93-7.
172. Şayli BS. Low frequency of infertility among workers in a borate processing facility. *Biological trace element research*. 2003;93(1-3):19-29.
173. Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Moser GJ, Goldsworthy TL, Morrison JP, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic pathology*. 2004;32(1):73-8.
174. McAuley EM, Bradke TA, Plopper GE. Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(5):382-6.
175. Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE. Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*. 2003;54(1):44-9.
176. Di Renzo F, Cappelletti G, Broccia ML, Giavini E, Menegola E. Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: a suggested mechanism to explain boric acid-related teratogenicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;220(2):178-85.
177. Bilir A, Eralp Y, Cabioglu N, Agizhali B, Camlica H, Aydiner A. Thymidine labeling index: prognostic role in breast cancer. *American journal of clinical oncology*. 2004;27(4):400-6.
178. Uysal O, Sevimli T, Sevimli M, Gunes S, Eker Sariboyaci A. Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. In: *Omics Technologies and Bio-Engineering* Barh D, Azevedo V, Eds. USA: Academic Press; 2018. p. 391-429.
179. Ahışhalı B, Bilir A. Tümör Hücrelerinin Multiselüler Tümör Sferoid Modelinde Üretilmesi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002;65(1):39-46.
180. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Advances in physiology education*. 2005;29(3):151-9.
181. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*. 2008;3(6):1101-8.
182. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology*. 2017;3(4):524-48.
183. Douaiher J, Ravipati A, Grams B, Chowdhury S, Alatise O, Are C. Colorectal cancer—global burden, trends, and geographical variations. *Journal of Surgical Oncology*. 2017;115(5):619-30.

184. Gültekin M, Boztaş G. Türkiye kanser istatistikleri. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2014 (<https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2009kanseraporu-1.pdf>). Erişim tarihi: 18.07.2018)
185. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010;375(9719):1030-47.
186. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll H-J, et al. A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer*. 2015;14(1):1-10.
187. Gill S, Thomas R, Goldberg RM. Colorectal cancer chemotherapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2003;18(7):683-92.
188. Rajamanickam S, Agarwal R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug development research*. 2008;69(7):460-71.
189. Park M, Li Q, Shcheynikov N, Muallem S, Zeng W. Borate transport and cell growth and proliferation: not only in plants. *Cell Cycle*. 2005;4(1):24-6.
190. Groziak MP. Boron therapeutics on the horizon. *American journal of therapeutics*. 2001;8(5):321-8.
191. Dinca L, Scorei R. Boron in human nutrition and its regulations use. *Journal of Nutritional Therapeutics*. 2013;2(1):22-9.
192. Devirian TA, Volpe SL. The Physiological Effects of Dietary Boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003;43(2):219-31.
193. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(25):9329-39.
194. Gossé F, Guyot S, Roussi S, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, et al. Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2005;26(7):1291-5.
195. Kaur M, Singh RP, Gu M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*. 2006;12(20):6194-202.
196. Park J-W, Woo KJ, Lee J-T, Lim JH, Lee T-J, Kim SH, et al. Resveratrol induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human colon cancer cells. *Oncology reports*. 2007;18(5):1269-73.
197. Fuggetta M, Lanzilli G, Tricarico M, Cottarelli A, Falchetti R, Ravagnan G, et al. Effect of resveratrol on proliferation and telomerase activity of human colon cancer cells in vitro. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*. 2006;25(2):189-93.
198. Hogan FS, Krishnegowda NK, Mikhailova M, Kahlenberg MS. Flavonoid, silibinin, inhibits proliferation and promotes cell-cycle arrest of human colon cancer. *Journal of Surgical Research*. 2007;143(1):58-65.

199. Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA, et al. Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells. *Oncogene*. 2003;22(51):8271-82.
200. Sang S, Ju J, Lambert JD, Lin Y, Hong J, Bose M, et al. Wheat Bran Oil and Its Fractions Inhibit Human Colon Cancer Cell Growth and Intestinal Tumorigenesis in Apc min/+ Mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(26):9792-7.
201. Jenab M, Thompson LU. Phytic acid in wheat bran affects colon morphology, cell differentiation and apoptosis. *Carcinogenesis*. 2000;21(8):1547-52.
202. Su C-C, Lin J-G, Li T-M, Chung J-G, Yang J-S, Ip S-W, et al. Curcumin-induced apoptosis of human colon cancer colo 205 cells through the production of ROS, Ca<sup>2+</sup> and the activation of caspase-3. *Anticancer research*. 2006;26(6):4379-89.
203. Hsu Y-C, Weng H-C, Lin S, Chien YW. Curcuminoids—cellular uptake by human primary colon cancer cells as quantitated by a sensitive Hplc assay and its relation with the inhibition of proliferation and apoptosis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007;55(20):8213-22.
204. Sriram N, Kalayarasan S, Ashokkumar P, Sureshkumar A, Sudhandiran G. Diallyl sulfide induces apoptosis in Colo 320 DM human colon cancer cells: involvement of caspase-3, NF- $\kappa$ B, and ERK-2. *Molecular and cellular biochemistry*. 2008;311(1-2):157-65.
205. Druesne N, Pagniez A, Mayeur C, Thomas M, Cherbuy C, Duée P-H, et al. Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21 waf1/cip1 expression in human colon tumor cell lines. *Carcinogenesis*. 2004;25(7):1227-36.
206. Benien P, Swami A. 3D tumor models: history, advances and future perspectives. *Future Oncology*. 2014;10(7):1311-27.
207. Shin CS, Kwak B, Han B, Park K. Development of an in vitro 3D tumor model to study therapeutic efficiency of an anticancer drug. *Molecular pharmaceutics*. 2013;10(6):2167-75.
208. Cui Y, Winton MI, Zhang Z-F, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB, et al. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology reports*. 2004;11(4):887-92.
209. Korkmaz M, Uzgören E, Bakırdere S, Aydın F, Ataman OY. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental toxicology*. 2007;22(1):17-25.
210. Mahabir S, Spitz M, Barrera S, Dong Y, Eastham C, Forman M. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American journal of epidemiology*. 2008;167(9):1070-80.
211. Barranco WT, Hudak PF, Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes & Control*. 2007;18(1):71-7.

212. Barranco WT, Kim DH, Stella Jr SL, Eckhert CD. Boric acid inhibits stored Ca<sup>2+</sup> release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell biology and toxicology*. 2009;25(4):309-20.
213. Henderson K, Stella Jr SL, Kobylewski S, Eckhert CD. Receptor activated Ca<sup>2+</sup> release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PloS one*. 2009;4(6):e6009.
214. Carper S, Elegbede A, Hall C, Shen S, Meacham S. Boric acid induces apoptosis in both prostate and breast cancer cell lines. *AAO; 2007;97(9):4220*.
215. Carper SW, Hall C, Adebayo J, Vo V, Meacham SL. Boric acid induces apoptosis in the prostate cancer cell line DU-145 via a caspase 3 dependent mechanism. *The FASEB Journal*. 2006;20(4):A194.
216. Meacham SL, Hall C, Tharkar S, Elegbede A, Carper S. Boric acid induces apoptosis in some breast cancer cell lines. *The FASEB Journal*. 2006;20(4):A194.
217. Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(32):5459-68.
218. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *The Journal of pathology*. 2012;226(2):352-64.
219. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis: Methods and Protocols*. 2012:41-7.
220. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics*. 2016;163:94-108.
221. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal*. 2008;3(9-10):1172-84.
222. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids—old hat or new challenge? *International journal of radiation biology*. 2007;83(11-12):849-71.
223. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*. 2010;148(1):3-15.
224. Hoffmann OI, Ilmberger C, Magosch S, Joka M, Jauch K-W, Mayer B. Impact of the spheroid model complexity on drug response. *Journal of biotechnology*. 2015;205:14-23.
225. Lee S-H, Hong JH, Park HK, Park JS, Kim B-K, Lee J-Y, et al. Colorectal cancer-derived tumor spheroids retain the characteristics of original tumors. *Cancer letters*. 2015;367(1):34-42.
226. Sever R, Brugge JS. *Signal Transduction in Cancer*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2015;5(4):a006098.
227. Thoma CR, Zimmermann M, Agarkova I, Kelm JM, Krek W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;69:29-41.

228. Barbone D, Van Dam L, Follo C, Jithesh PV, Zhang S-D, Richards WG, et al. Analysis of gene expression in 3D spheroids highlights a survival role for ASS1 in mesothelioma. *PloS one*. 2016;11(3):e0150044.
229. Zschenker O, Streichert T, Hehlhans S, Cordes N. Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. *PloS one*. 2012;7(4):e34279.
230. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer K-L, et al. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PloS one*. 2013;8(3):e59689.
231. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci*. 2017;130(1):203-18.
232. Silke J, Meier P. Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins–Modulators of Cell Death and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(2):1-19.
233. Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis*. 2007;12(9):1543-68.
234. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology*. 2011;3(4):279-96.
235. Das BC, Thapa P, Karki R, Schinke C, Das S, Kambhampati S, et al. Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future*. 2013;5(6):653-76.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı:</b>	Murat	<b>Soyadı:</b>	Sevimli
<b>Doğum Yeri:</b>	Adana	<b>Doğum Tarihi:</b>	05.04.1983
<b>Uyruğu:</b>	TC	<b>Tel:</b>	0506 882 58 42
<b>E-posta:</b>	drmuratsevml@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi	2018
<b>Lisans</b>	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi	2007
<b>Lise</b>	Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi	2001

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre</b>
<b>Pratisyen Hekim</b>	Afyon 2 Nolu Sağlık Ocağı Tabipliği	3 Yıl
<b>Kıta Tabipliği</b>	Şırnak/Uludere Andaç 7. Jandarma Sınır Tabur Komutanlığı	1 Yıl

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>ÜDS Puanı</b>	<b>(Diğer) Puanı</b>
İngilizce	86,25	-