

**ÇEŞİTLİ BOR BİLEŞİKLERİNİN
GLİOMA VE NÖROBLASTOMA KANSERLİ
HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİLERİN
İN VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Selda ARIÇELİK ARSLAN
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2011

Bu tez çalışması Türkiye Bor Araştırmaları Enstitüsü (BOREN) tarafından “Bazı Bor Minerallerinin Antimikrobiyal, Antikanserojenik ve Bakteri Yaşamına Etkilerinin Araştırılması” isimli, 2009-Ç-0214 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ BOR BİLEŞİKLERİNİN GLİOMA VE NÖROBLASTOMA KANSERLİ HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ETKİLERİN İN VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Selda ARIÇELİK ARSLAN

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yard. Doç. Dr. Emel ERGENE

2011, 98 sayfa

Türkiye, dünyadaki bor madeni rezervlerinin % 72'sini topraklarında bulundurmaktadır. Borun öneminin artmasıyla bu büyük rezerv çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri kuşkusuz, kanser tedavilerinde büyük umut vaat eden sağlık alanındaki çalışmalardır.

Bu tez çalışmasında, fare nöroblastoma (NS20Y) ve rat glioma (C6) kanser hücreleri üzerinde susuz boraks, sodyum perborat, potasyum perborat'ın apoptotik etkisi '*in vitro*' yöntemlerle araştırılmıştır. Bor bileşenlerinin sitotoksik etkisi MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ve Nötral kırmızı alımı testiyle belirlenmiş, apoptotik etkisi ise kaspaz 3 ve 8 enzim aktivitesinin ölçümü, mitokondri zar geçirgenliğindeki değişim ve DNA kırılması analizi yapılarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; test edilen bor bileşiklerinin NS20Y hücre hattında apoptotik etkiye yol açtığı, C6 hücre hattında ise hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bor, Kanser, Apoptoz

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECT OF BORON COMPOUNDS ON NEUROBLASTOMA AND GLIOMA CANCER CELL LINES USING BY IN VITRO METHODS

Selda ARIÇELİK ARSLAN

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. EMEL ERGENE

2011, 98 page

Turkey has 72 % of the worlds boron reserves. The growing importance of boron reserves have been used in various fields. One of these, of course, researchs in field of health care that is promising in the treatment of the cancer.

In this study, apoptotic effect of anhydrous borax, sodium perborate and potassium perborate on mouse neuroblastoma (NS20Y) and rat glioma(C6) cancer cell lines was analysed with “*in vitro*” methods. The cytotoxic effects of boron compounds was investigated with the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the neutral red uptake assays. Apoptotic effects of boron compounds were determined by measuring the activations of the caspase 3 and 8 enzymes, changes in mitochondrial membrane permeability and DNA fragmentations in nucleus.

As a result, boron compounds that have been tested leads to apoptotic effects on NS20Y cell lines. On the other hands, each of the three boron compounds inhibited the proliferation of the C6 cell lines.

Key Words: Boron, Cancer, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bana sağladığı akademik desteği, yakın ilgisi ve tüm emekleri için danışman hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE'ye teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim ve laboratuvar çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım sevgili hocam Doç. Dr. Hülya SİVAS'a ve Doç. Dr. Tansu KOPARAL'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve uyum içinde çalıştığım değerli arkadaşım Tuğba TUNCAY'a, lisansüstü eğitimim sırasında her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen bütün arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Attığım her adımda bana destek ve yardımcı olan, varlıklarıyla hayatıma anlam katan, beni hep mutlu eden başta canım annem ve canım babam olmak üzere tüm aileme yürekten teşekkür ederim.

Ayrıca bu eğitim sürecinde sürekli yanımda olan, sabrını, maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen canım eşim, hayat arkadaşım M. Fatih ARSLAN'a, var olduğundan bu yana bana şans getiren biricik oğlum Ömür Yusuf ARSLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Selda ARIÇELİK ARSLAN

Ağustos 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII

1. GİRİŞ

1.1. Bor	1
1.1.1. Borun tarihçesi	1
1.1.2. Borun fiziksel ve kimyasal özellikleri	2
1.1.3. Bor ürünlerinin başlıca kullanım alanları	3
1.1.4. Deneyde kullanılan bor bileşikleri ve özellikleri	7
1.1.4.1. Susuz boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	7
1.1.4.2. Sodyum perborat (NaBO_3)	8
1.1.4.3. Potasyum perborat ($\text{K}_2\text{B}_2\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	9
1.1.5. Bor ve kanser	9
1.2. Kanser	10
1.2.1. Kanser gelişimi, fizyolojisi	11
1.2.2. Beyin kanseri	14
1.2.2.1. Rat glioma (C6) kanser hücresi	15
1.2.2.2. Fare nöroblastoma (NS20Y) kanser hücresi	16
1.3. Apoptoz	17
1.3.1. Apoptoz morfolojisi	17
1.3.2. Apoptoz mekanizması	19
1.3.3. Apoptozun moleküler düzenlenmesi	21
1.3.3.1. Kaspazlar	22
1.3.3.2. Bcl-2 ailesi	24
1.3.3.3. p53 geni	26
1.3.4. Apoptoz yolları	27

1.3.4.1. Ölüm reseptörü yolağı (Dış yolak).....	27
1.3.4.2.Mitokondriyel yolak (İç yolak)	29
1.3.5. Apoptoz belirlemede kullanılan yöntemler	31
1.3.5.1.Sitotoksikite testleri	32
1.3.5.2.Morfolojik görüntüleme yöntemleri.....	33
1.3.5.3.Biyokimyasal yöntemler	34
2. MATERYAL VE YÖNTEM	
2.1. Materyal	37
2.1.1. Alet, cihaz ve sarf maddeler	37
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	37
2.1.3. Çalışmada kullanılan hücreler	37
2.1.4. Denede kullanılan solüsyonların hazırlanmaları	38
2.1.5. Bor bileşenleri ve hazırlanması	41
2.2. Yöntem	41
2.2.1. Hücre kültürü	41
2.2.2. Sitotoksik testleri	42
2.2.2.1. MTT testi.....	42
2.2.2.2.Nötral kırmızısı alımı testi	43
2.2.3. Apoptoz belirleme testleri.....	43
2.2.3.1.Mitokondriyel zar bütünlüğü analizi.....	43
2.2.3.2.Kaspaz -3/ -8 aktivasyon testi	44
2.2.3.3.DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile .analizi	45
3. BULGULAR	46
3.1. Sitotoksik Etkiler.....	46
3.1.1 Susuz boraks	46
3.1.2 Sodyum perborat.....	48
3.1.3 Potasyum perborat	50
3.2. Mitokondriyel Zar Bütünlüğü Testi	55
3.2.1. Bor bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde mitokondriyel zar bütünlüğü üzerine etkileri	55

3.2.2. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde mitokondriyel zar bütünlüğü üzerine etkileri	58
3.3. Kaspaz 3/ 8 Aktivasyon Belirleme Testleri.....	60
3.4. DNA Fragmentasyonu Analizi.....	61
TARTIŞMA VE SONUÇ	64
4. KAYNAKÇA.....	74

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

1.1. Bor elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	2
1.2. Ham bor ürünleri.....	5
1.3. Rafine bor ürünleri.....	6
1.4. Susuz boraks fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	7
1.5. Apoptozun düzenlenmesinde görev alan genler	22
1.6. Kaspazlar ve rolleri.....	23
1.7. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması.....	25
3.1. NS20Y hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşenlerinin yüzde apoptoz oranları.....	56
3.2. C6 hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşiklerinin yüzde apoptoz oranları	58
3.3. Bor bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi.....	60
3.4. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi	61
3.5. Bor bileşenlerinin NS20Y ve C6 kanserli hücre hattında sitotoksik ve apoptotik etkilerinin genel tablosu.....	63
4.1. Prokaryot ve ökaryot canlılarda çeşitli bor bileşiklerinin genotoksik ve mutajenik etkileri.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları.....	12
1.2. Apoptotik hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler	18
1.3. <i>C.Elegans</i> ile insan apoptotik modülatörlerin karşılaştırılması	20
1.4. Apoptozun dış yolak mekanizması	28
1.5. Apoptotun iç yolak mekanizması.....	30
1.6. Apoptozun iç ve dış yolak mekanizmasının kesiştiği noktalardaki moleküler düzenleyiciler.....	31
3.1. Susuz boraksın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT ve Nötral kırmızısı alım testi ile değerlendirilmesi.....	46
3.2. Susuz boraksın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi ile değerlendirilmesi.....	47
3.3. Sodyum perboratın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin..... MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi ile değerlendirilmesi	49
3.4. Sodyum perboratın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi ile değerlendirilmesi.....	50
3.5. Potasyum perboratın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi ile değerlendirilmesi	51
3.6. Potasyum perboratın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi ile değerlendirilmesi.....	52
3.7. NS20Y hücrelerinde kontrol, susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perboratın 48. saat inkübasyon sonrasındaki IC ₅₀ doz etkisinin inverted mikroskop görüntüleri.....	53
3.8. C6 hücrelerinde kontrol, susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perboratın 48. saat inkübasyon sonrasındaki IC ₅₀ doz etkisinin inverted mikroskopta ki görüntüleri.....	54
3.9. NS20Y hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşenlerinin yüzde apoptoz oranları... ..	56
3.10. NS20Y hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşenlerinin mitocapture boyama ile apoptotik etkisinin değerlendirilmesi	57
3.11. C6 hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşenlerinin yüzde apoptoz oranları... ..	58

3.12. C6 hücrelerinde 48 saat sonra bor bileşenlerinin mitocapture boyama ile apoptotik etkisinin değerlendirilmesi	59
3.13. Bor bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi	60
3.14. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi	61
3.15. NS20Y hücrelerine, C6 hücrelerine bor bileşenlerin DNA fragmentasyonuna etkisi.....	62
4.1. Apoptotik iç yolda PARP'ın aktivasyonu ile DNA kırılması olmaksızın gerçekleşen apoptoz mekanizması.....	70

1. GİRİŞ

1.1. BOR

1.1.1. Borun Tarihçesi

Çoğunlukla metal karakteri sergileyen bor elementi Arapça “Buraq/Baurach” ve Farsça “Burah” kelimelerinden köken almaktadır (Abd-El-Aziz 2007). İlk kez 1808 yılında Gay-Lussac, Jacques Thenard ve Humphry Davy isimli kimyagerler tarafından bor oksit'in potasyum ile ısıtılmasıyla sadece % 50 saflıkta bor elde edilmiştir. 1909 yılında ise Weintraub E. Bor triklorür (BCl_3)'ü elektrik akımında ayrıştırılarak % 99 saflıkta hazırlamıştır (Habashi 2009; Oganov ve Solozhenko 2009).

Bor ve türevleri binlerce yıldan beri bilinmekte ve en eski bor kaynağında Tibet gölü olduğuna inanılmaktadır (Woods 1994). Çinliler tarafından MÖ. 800 yıllarında porselen cilasası olarak (Adair 2007), eski Mısır ve Mezopotamya uygarlıklarında ise bazı hastalıkların tedavisinde ve ölümlerin mumyalanmasında kullanıldığı bilinmektedir (Kaup ve ark. 2003; Gentz ve Grace 2006). Dört bin yıl önce Babil'liler, altın işlemede ve kuyumculukta kullanmak üzere Himalaya'lardan bor (Tinkal, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) ithal etmişlerdir (Gentz ve Grace 2006).

Türkiye'deki bor madenlerinin Doğu Roma İmparatorluğu devrinden beri var olduğu ve kullanıldığı tahmin edilmektedir. İlk bor minerali yataklarına Balıkesir ili, Susurluk ilçesinin Sultançayırı bölgesinde rastlanmıştır. Yurdumuzda ilk işletme, 1861 yılında çıkarılan “Maadin Nizannamesi” uyarınca, Fransız bir şirkete verilmiş ve alçıtaşı olarak işletilmiştir (Eti Maden 2011). 1978 yılında bor madenlerinin devlet tarafından işletilmesine karar verilmiştir. Günümüzde Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü borun üretimi, yatırımı ve pazarlanması konusundaki tüm aktiviteleri yerine getirmektedir. Dünya bor rezervlerinin % 72'sine sahip olan Türkiye'nin bor talebi yaklaşık 400 yıl karşılayacağı tahmin edilmektedir (Christogerou ve ark. 2009).

1.1.2. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Metalle ametal arası, yarı iletken özelliğe sahip olan bor elementi, amorf ve kristal olmak üzere iki allotropik yapı göstermektedir (Habashi 2009). Peryodik cetvelin 3A grubunun ilk ve en hafif üyesidir. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10,8 g/mol olan bu element “B” simgesi ile gösterilmektedir (Çizelge 1.1). Bor elementi anyonik özelliğiyle birlikte çok yüksek iyonizasyona sahiptir (Shibli ve Srebnik 2006).

Bor elementi ^8B , ^{10}B , ^{11}B , ^{12}B , ^{13}B izotoplarından oluşur ve sadece % 19,10-20,31 oranında bulunan ^{10}B ve % 79,69-80,90 oranında bulunan ^{11}B kararlı izotoplardır. Türkiye’deki bor cevheri yataklarında ^{10}B izotop oranı yüksektir (Boren 2011).

Çizelge1.1. Bor elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (Eti Maden 2011)

Özellik	Değeri
Atom Numarası	5
Atom ağırlığı (g/mol)	10,811±0,005 veya 0,007
Yoğunluk (kg/m ³)	2,84
Molar Hacim (cm ³)	4,39
Ergime noktası °C	2300
Mohs sertliği (elmas-15) °C	9,3
Kaynama noktası °C	3660

Bor elementinin kimyasal özelliği morfolojisine ve tane büyüklüğüne göre değişkenlik gösterir. Mikron ebadındaki amorf bor kolaylıkla ve bazen şiddetli olarak reaksiyona girerken kristal bor kolay reaksiyon vermez (Şahin ve Ağırtaş 2008).

Doğada yaklaşık 200 çeşit bor minerali olduğu (Mergen ve Demirhan 2009) bilinmekle beraber diğer elementlere olan yüksek kimyasal ilgisi nedeniyle bor doğada serbest halde bulunmaz. Yaklaşık 150 adet bor minerali içeren element vardır ve bu bor içeren minerallere borat ismi verilir (Özkan ve ark. 1997).

Yerkabuğunda en çok bulunan 51. element olan bor, tatlı sularda 0,01-1,5 ppm, deniz suyunda 0,5-9,6 ppm ve toprakta 10-20 ppm aralığındaki konsantrasyonlarında, kristal ya da amorf yapıda bulunmaktadır (Woods 1994).

Bor genellikle; volkanik ve hidrotermal aktivitesi fazla olan kurak bölgelerde görülmektedir. Konsantrasyonun fazla olduğu bu yerlerde, bor kaynağının oluşumunda volkanik aktivite etkilidir. Bu bölgeler çözünmek için göl gibi su kütesinin ve evaporasyon koşullarının oluşması (çökeltme noktasında çözeltiyi konsantre eden) kolay çözünebilen bor minarelerinin korunması için koruyucu tortul tabaka oluşumuna gereksinim duymaktadır (Helvacı 2004; Meacham ve ark. 2007; Gmeling ve ark. 2007).

1.1.3. Bor Ürünlerinin Başlıca Kullanım Alanları

21. yüzyılın elementi olan borun, temizlik maddelerinden uzay teknolojisine kadar uzanan geniş bir yelpazede 500'e yakın kullanım alanı bulunmaktadır.

Tarımda, bitkilerin gelişebilmesi için gereksinim duydukları temel besin maddelerinin yanı sıra mikroblesleyicilere de ihtiyaç duymaktadırlar. İlk kez 1910 yılında borun, yüksek bitkiler için önemli mikroblesleyici olduğu keşfedilmiş (Dembitsky ve ark. 2002) ve ardından 1923 yılında Warington, bakla bitkisinin sağlıklı büyümesi için düşük konsantrasyonlarda bora ihtiyaç olduğunu rapor etmiştir (Josten ve Kustchera 1999). Bu yönüyle gübre olarak 1 ppm oranında toprağa uygulanan bor bileşenlerinin mera bitkileri hasatında % 13 artış sağladığı görülmüştür (Demirtaş 2006).

Ahşap yapı malzemesinin; yangından, haşere ve mantar gibi zararlı faktörlerden korunması için ön korumaya alınması gerekmektedir. Ahşabın ön korumasında bor bileşenleri karışımı (boraks ve borik asit) kullanılmaktadır (Sivrikaya ve Saraçbaşı 2004). Borun yangın geciktirici özelliği kumaş ve kağıt üzerinde çalışmalar yapılmış ve bor katkılı maddelerin tekstil ürünlerinde başarılı şekilde uygulandığı görülmüştür (Doğan ve Bayramlı 2010; Marney ve Russell 2008; Yalınkılıç ve ark. 1998). Özellikle itfaiye, polis, asker kıyafeti gibi fonksiyonel elbiselerde bor katkılı elyafların yanmaya direnç oluşturacağı düşünülmektedir (Ayrılmış 2007).

Bor, enerji alternatifi konusunda da öne çıkmaya başlamıştır. Geleceğin yakıtı olarak görülen hidrojenin depolanması konusunda avantaj sağlayan sodyum bor hidrür, yakıt pilleri üretiminde kullanılmaya başlanmıştır (Çelik ve ark. 2008; Uslu 2007). Hu (1998) ve Yu (2003) adlı bilim adamlarının yapmış oldukları çalışmalarda, farklı alaşımlara ilave edilen borun, hidrojen depolama performansını arttırdığı rapor edilmiştir (Fakıoğlu ve ark. 2004).

Borun insan sağlığı için önemli bir element olduğu yapılan yeni araştırmalarla gösterilmeye başlanmıştır. Magnezyum, kalsiyum ve fosfor'un, D vitamini metabolizması için önemli olduğu bilinmekle beraber osteoporoz, eklem iltihabı, depresyon, halsizlik, bazı sinir hastalıkları gibi şikayetlerin tedavisinde de bor aktif olarak kullanılmaktadır (Chapin ve ark. 1997; Bronner 2008; Hakkı ve ark. 2010). Ayrıca, D vitamini ve kalsiyumun, kolorektal (kalınbağırsak ve sonu) kanser gelişimini baskıladığına yönelik bir çalışma referans alınarak bor elementinin bu mineral ve vitamin üzerindeki mekanizmasıyla kolorektal kanser oluşumunu dolaylı da olsa engelleyebileceği düşünülmektedir (Lamprecht ve Lipkin 2001). Ayrıca kesinleşmiş bir tedavi yöntemi olmamakla birlikte beyin (Nagakawa 2009), meme (Yanagie ve ark. 2009), prostat (Yasui ve ark. 2010), kolon (Dagrosa ve ark. 2011), troid kanseri (Dagrosa ve ark. 2007) gibi çeşitli kanser türlerinde Bor Nöron Yakalama Tedavisi (BNCT; Boron Neutron Capture Therapy) uygulaması yeni bir umut olmuştur. Ayrıca bor; bakteri, maya ve küflere karşı bakteriyostatik, bakteriosidal, fungistatik ve fungisidal özelliklerinden dolayı antibakteriyel ve antifungal madde olarak kullanmak üzere ilaç endüstrisinin ilgi alanı haline gelmiştir (Porter ve ark. 1969; Van Slyke ve ark. 1981; Kahyaoğlu ve ark. 2009).

Borun antioksidan madde olduğu da bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Geyikoğlu; insan lenfositlerinde yaptığı çalışmada, vanadyum tetraoksitin DNA üzerindeki zararlı etkisinin çeşitli bor bileşenleriyle engellendiğini ortaya koymuştur (Geyikoğlu ve Türkez 2008). Diğer yandan, Türkez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada da, kandaki ağır metallerin (arsenik trioksit, kadmiyum klorid, civa klorür) genotoksit etkilerine karşı bor bileşenlerinin (borik asit, boraks, kolemanit, üleksit) antioksidan özelliği sergilediği gösterilmiştir (Türkez ve ark. 2010).

Bor bileşikleri çeşitli endüstrilerdeki üretim aşaması ve kullanım alanları göz önüne alınarak 3 gruba ayrılmıştır. Bu gruplar: ham bor, rafine bor ve uç ürünlerdir (Acarkan 2002; Mergen ve Demirhan 2009).

Ham bor ürünleri

Ham bor dünyada üretilen bor rezervlerinin zenginleştirme işleminden sonraki halidir. Ham bor ürünleri % 90 dolayında borik asit, boraks penta ve dekahidrat gibi rafine bor ürünleri üretiminde kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra cam elyafı, borosilikat cam, borlu çelik, metalürji ve nükleer uygulamalarda kullanılmaktadır (Acarkan, 2002) (Çizelge 1.2).

Çizelge1.2. Ham bor ürünleri (Batar ve ark. 1998; Acarkan 2002)

Ürün	Formül
Tinkal konsantre	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Üleksit konsantre	$\text{Na}_2\text{CaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$
Kolemanit konsantre	$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Öğütülmüş kolemanit	
Hidroborasit konsantre	$\text{CaMgB}_6\text{O}_{11} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Szaybelit konsantre	$\text{Mg}_2\text{B}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Rafine Bor Ürünleri

Bor mineralleri genel olarak rafine bor bileşenlerine (Çizelge 1.3) dönüştürülerek kullanılmaktadır. Rafine bor üretimi için kullanılan boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), tinkalin işlenmesiyle elde edilmektedir. Geçiş ürünleri şeklinde sıralanan; boraks pentahidrat, boraks dekahidrat, susuz boraks ve sodyum perborat da borakstan üretilmektedir (Simon ve Smith 2000; Güyagüler 2001).

Rafine bor ürünlerinin temel kullanım alanları olarak, cam ve cam elyafı, sabun ve deterjan, seramik, yangın geciktirici gereçler, gübre, ilaç, kozmetik ve diş beyazlatma ürünlerinin üretimi, nükleer uygulamalar ile metalürji, elektronik ve bilgisayar sanayi dalları sayılabilir (Woods 1994; Bourbigot ve Salvesen 2007; Kurama ve ark. 2007; Öner 2007).

Çizelge1.3. Rafine bor ürünleri (Uslu 2007)

Ürünün Adı	Formülü
Borakspentahidrat	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Boraks dekahidrat	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
Susuz boraks	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
Borik asit	H_3BO_3
Susuz borik asit	B_2O_3
Sodyum perborat	NaBO_3
Sodyum metaborat	NaBO_2

Uç Ürünler

Uç ürünler ileri teknoloji gerektiren uygulamalarla ham ve rafine bor ürünlerinden elde edilmektedir. Belli başlı uç ürünleri arasında elementer bor, bor karbür, bor nitür ve bor alaşımları (demirli, nikelli ve kobaltlı) sayılabilir (Acarkan 2002). *Elementer bor*, potasyum klorür ve potasyum florürün erimiş karışımında çözünen potasyum floroborattan üretilmiştir (Jain ve ark. 2008). *Bor karbürün* B^{10} izotopunca zengin bor bileşiğidir. Yüksek sıcaklığa dayanıklıdır ve nötron absorpsiyon yeteneği vardır. Ayrıca maliyetinin düşük olması bor karbür uygulamalarına imkan sağlamaktadır (Chen ve ark. 2005). *Bor nitürün* kristalize hali olan kübik boron nitür, en çok kullanılan formudur ve elmastan sonra ikinci en yüksek sertliğe sahiptir (Ronning ve ark. 2000). Uç ürünler çoğunlukla endüstri, mekanik, elektronik uygulamalarda ve askeri araçlara dayanıklılık kazandırması amacıyla kullanılmaktadır (Bello ve ark. 2005; Eichler ve Lesniak 2008)

Bor ayrıca;

- Fiber Optik
- Patlayıcı Maddeler (havai fişek vb.)
- Antifrizler, hidrolik yağlar
- Petrol Boyaları, yanmayan ve erimeyen boyalar, tekstil boyaları
- Zımpara ve aşındırıcılar
- Kompozit malzemeler
- Manyetik cihazlar
- İleri Teknoloji Araştırmaları (moleküler biyoloji vb.) gibi alanlarda da

kullanılmaktadır (Irmak 2006; Öner 2007) .

1.1.4. Deneyde Kullanılan Bor Bileşenleri ve Özellikleri

1.1.4.1. Susuz boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)

Susuz boraksın (Çizelge 1.4) üretiminde kullanılan ham madde borakstır ve Türkiye’de en büyük boraks üretimi Kırka (Eskişehir) ilçesinde yapılmaktadır (Kurama 2007). Susuz boraks (disodyum tetraborat), boraks hidratlar olarak bilinen boraks dekahidrat ve boraks pentahidrat bileşiklerinden elde edilmektedir (Bıyıkoğlu ve Yeksan 2008; Şahin ve ark. 2005).

Çizelge1.4. Susuz boraks fiziksel ve kimyasal özellikleri (Bıyıkoğlu ve Yeksan 2008)

İçerik	Değer
Formülü	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
Moleküler Ağırlığı	201.27 g/mol
B_2O_3 % min.	68.00 min.
Na_2O % min.	30.27 min.
Suda çözünürlüğü, g/100 g, 25 ⁰ C	2,55 g
Erime Noktası	741- 760 ⁰ C
Kaynama Noktası	1571 ⁰ C
Renk	Beyaz

Rafine bor ürünlerinden olan susuz boraks uzay teknolojisi, metalurji, emaye ve sır kaplama sanayi; gübre, cam, cam elyafı, sabun ve deterjan, yangın geciktirici, antiseptik ve kozmetik ürünlerinin üretimi alanlarında kullanılmaktadır (Stefanov 2000).

Atık sularda biriken kurşun, civa ve kadmiyum gibi toksik maddelerin ortadan kaldırılmasında, sanayi atıklarından ağır metallerin ayrılması işleminde, temiz ve tükenmeyen enerji kaynağı olan hidrojenin depolanmasında kullanılan sodyum borohidrit (NaBH_4), susuz borakstan sentezlenmektedir (Alibeyli ve ark. 2011; Kayacan ve ark. 2011).

1.1.4.2. Sodyum perborat (NaBO_3)

Rafine bor ürünü sodyum perborat, yaklaşık % 90'ı Kırka (Eskişehir) ilçesinde işlenmektedir (Barth 1998). Sodyum perborat; beyaz, kokusuz, suda çözülebilen, toksik kimyasal bileşendir. Monohidrat ($\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), trihidrat ($\text{NaBO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), tetrahidrat ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) halleri kristalizedir. Monohidrat ve tetrahidrat formları ticari olarak büyük öneme sahiptir (İpekoğlu ve Polat 1987).

Sodyum perborat; immunoserolojik (serumda antikor aranması) yöntemlerde, bazı antikor çalışmalarında ve ELİSA testi için geliştirilen fosfat sitrat tampon bileşiminde kullanılmaktadır (Shen ve ark. 2003; Boundet ve ark. 2001; Cooke ve ark. 2003).

Sodyum perborat, ayrıca; tarımda böcek öldürücü ilaç olarak kullanılan organofosfat bileşiğinin topraktan ve atık sulardan temizlenmesi için kullanılmaktadır (David ve Seiber 1999). Sodyum perboratın içeriğindeki hidrojen peroksit ağartıcı etkisine sahiptir ve bundan dolayı sodyum perborat, diş beyazlatma solüsyonlarına, diş macunlarına (Joiner 2006; Joiner 2007), deterjan ve tekstil ürünlerine (Fung ve ark. 2007) ilave edilmektedir. Ayrıca; deodorant, saç yapımı maddeleri, bidon boyaaları, dezenfentan ve leke çıkarıcı maddelere ilave edilmektedir (Simon ve Smith 2000; Sümer 2004; Şahin ve Ağırtaş 2008).

1.1.4.3. Potasyum perborat ($K_2B_2O_6.H_2O$)

Potasyum hidroksit, hidrojen peroksit ve dipotasyum tetraborat pentahidratın birbirleriyle etkileşimi sonucu üretilmektedir (Kalın 2005). Güçlü oksitleyici ajan olan potasyum perborat bu özelliği ile saç boyalarında kullanılmaktadır (Takeshi Oishi ve ark. 1998).

Potasyum perborat, insanlarda görülen enfeksiyon hastalığı amebiyazisin tedavisinde kullanılan antiseptik çözelti kimyasallarından biridir ve bu kimyasallar arasında sodyum perborat da yer almaktadır (Laso 1981).

Chupla ve çalışma arkadaşları sodyum ve potasyum perborat ile iğne yapraklı ağaçlardan elde edilen kağıt hamurlarının ağartılması üzerine yapılan çalışmalarda, hidrojen peroksitin parlatma, direnç gösterme özellikleri üzerinde potasyum perboratın daha etkili olduğu belirlemiştir (Kalın 2005).

1.1.5. Bor ve Kanser

Bor minerali, hayatımızın her noktasında karşımıza çıkmaktadır. Yiyeceklerde, kullandığımız temizlik ve kozmetik ürünlerinde, emaye kaplı tava ve tencerelerde, bilgisayar teknolojisinde ve daha birçok sektörde kullanılmaktadır.

Bor; tıp, biyoloji, fizik, kimya alanlarında başarılı bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Kuşkusuz, insan sağlığı için borun kullanım alanları daha fazla dikkat çekmektedir. Özellikle son yıllarda, kanser tedavilerinde bor içeren bileşikler yeni bir umut ışığıdır. Borun kanserle olan mücadelesi nöron yakalama tedavisiyle (BNCT) başlamıştır. 1968'de Japonlar tarafından kullanılan yöntem, şu an günümüzde en riskli beyin tümörleri tedavisinde uygulanmaktadır (Nakagawa ve Hatanaka 1997). Bu yöntemin temeli; nötron bombardımanı sonrasında kanserli dokuya ulaşan ve parçalanan bor'un kanserli hücreleri yok etmesi prensibine dayanır. Termal nötron (düşük enerjili nötron) ve çekirdekdeki kararlı bor izotopu (^{10}B) arasında meydana gelen reaksiyon sonucu, yoğun iyonize ve yüksek biyolojik etkinliğe sahip Helyum (He) ve Lityum (Li) çekirdekleri meydana gelmektedir (Sauerweina ve Zurlab 2002; Nakagawa ve ark. 2009). Tümör hücrelerini hedef alan yüksek enerjili çekirdekler, hücre DNA'sına zarar

vererek bölünmesini engellemektedir (Azab ve ark. 2006; Yamamoto ve ark. 2009). BNCT, beyin tümörlerinin yanı sıra; meme, troid, kolon kanserlerinde de kullanılan bir yöntemdir (Dagrosa ve ark. 2007; Dagrosa ve ark. 2011; Yanagie ve ark. 2009).

Scorei ve arkadaşları; MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerinde, kalsiyum fruktoborat ve borik asitin apoptotik yolağın aktivasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak; her iki bor bileşiğinin hücre proliferasyonunu engellediği rapor edilmiştir. Kalsiyum fruktoborat uygulamasında p53 ve bcl-2 proteinlerinin miktarında azalma, prokaspaz-3 proteinin uyarılması, kaspaz 3 aktivitesinde artış, sitozolde ki sitokrom-c miktarındaki artış gibi bulgular apoptotik yolağın tetiklendiğini gösterdiğinden, yalnızca kalsiyum fruktoboratın apoptoza neden olduğu borik asitin apoptotik etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır (Scorei ve ark. 2008). Bir diğer çalışmada, borik asitin prostat kanser hücre hattı DU-145'in proliferasyonunu baskıladığı ve bunun yanında mitokondriyel fonksiyonu olumsuz etkilediği ve hücre döngüsünü bozarak hücreyi ölüme sürüklediği rapor edilmiştir (Barranco ve ark. 2006).

Yapılan tüm bu araştırmaların sonuçları kanser tedavisi için heyecan uyandırmaktadır. Bundan dolayı farklı bor bileşiklerinin çeşitli kanser doku ve hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Borun endüstri alanındaki kullanımının yanında sağlık ve tıp sektöründe de yeni umutlar getirmesi, bor bileşiğinin önemini büyük ölçüde artırmıştır.

1.2. KANSER

Kanser tarih boyunca insanoğlunu etkisi altına almıştır. Eski Mısır'daki insan mumyaları, fosilleşmiş kemik tümörleri ve eski el yazmaları kanserin o zamanlarda da var olduğuna dair birkaç kanıttır. Yaklaşık 160 yıl önce Alman mikroskop uzmanı Johannes Mueller kanserin hücrelerden oluştuğunu göstermiştir ve normal hücre ile kanserli hücre arasındaki özgün farkı ortaya koyacak hüresel değişiklikleri aramaya başlamıştır (Haggard ve Smith 1938(a); Haggard 1938(b)).

Kanser vakalarının sayısal verilerine bakacak olursak, dünya çapında ölümlerin % 10'una kanser sebep olmaktadır. 2000'li yıllarda, dünya çapında yaklaşık 11 milyon insanda kanser görülmüştür ve bunları yaklaşık 7 milyonu hayatını kaybetmiştir (Parkin ve ark. 2005). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) en son yaptığı istatistiklere göre her yıl dünyada 7,6 milyon insan kanserden ölmektedir. Düşük ve orta gelirli ülkelerde kanser görülme oranı gelişmiş ülkelere göre % 72 daha fazladır. 2030 yılına kadar dünya çapında kansere yakalanmış kişi sayısının tahminen 17 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) www.euro.who.int).

1.2.1. Kanser Gelişimi ve Fizyolojisi

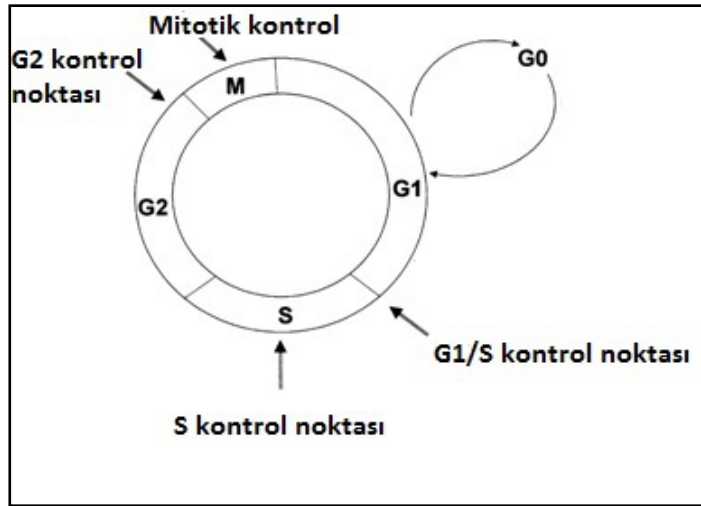
Kanser kelimesinin kökeni, tıbbın babası olarak bilinen, Yunan hekim Hipokrat'a (M.Ö. 460-377) kadar dayanır. Vücut yüzeyinde gelişen, kırmızı, ağrılı, sıcak ve yavaş büyüyen şişliklere "carcinomas" ve "carcinoma" terimleri ilk kez Hipokrat tarafından kullanılmıştır. Galen (M.S. 2.yüzyıl) ise hücreleri yengece benzeterek kanser adını vermiştir (Atıcı 2007).

Normal vücut hücreleri büyür, bölünür ve sonunda ölür. Yaşamın ilk yıllarında, hücre bölünmesi çok hızlı olmasına karşın yetişkinlikten sonra hücrelerin bölünme hızı giderek yavaşlamaktadır. Dokulardaki normal hücreler, yıpranmış veya yaşam faaliyetini yitirmiş hücrelerin yerini doldurmak için bölünür, gelişir ve böylece doku bütünlüğü korunur (Levin ve Boyle 2008). Kanserli hücrelerde böyle kontrollü bir bölünmeden ve doku bütünlüğünden bahsetmek mümkün değildir.

Kanser; çevresel ya da genetik faktörlerin etkisiyle, apoptoz ve hücre bölünmesinde görev alan genlerin mutasyona uğraması sonucu, hücrelerin kontrolsüz çoğalması şeklinde tanımlanmaktadır. Kontrolsüz bölünmeyle sürekli çoğalan hücreler, dokularda kümelenmiş tümörleri oluşturmaktadırlar. Oluşan tümörlerin yayılıp yayılmamasına göre kanser iki gruba ayrılmaktadır. Malignant tümörler; kanserli hücreler, kan ve lenf sistemiyle vücudun diğer bölgelerine taşınarak çoğalmasıyla (metastaz) oluşmaktadır. Bening tümörler ise yayılma özelliği göstermeden oluştuğu dokuda çoğalmaya devam etmektedir (Bertram 2001; Cooper ve Hausman 2004).

Kanser hücrelerinin en temel özelliği olan kontrolsüz çoğalmanın mekanizmasını açıklamak için kanserli/normal hücre döngüsünü incelemek gerekir. Hücre döngüsü ve fazları ilk kez 1951 yılında Howard ve Pele tarafından tanımlanmıştır (Golias ve ark. 2004). Normal hücre döngüsünde; G_0 , G_1 (interfaz), S (sentez fazı), G_2 ve M (Mitoz) fazı bulunmaktadır. G_0 fazı, dinlenme fazıdır ve hücre büyüme faktörü ile uyarılmadığı sürece farklılaşmış hücreler bu fazda beklemektedir. G_1 fazında RNA ve protein sentezi, S fazında DNA replikasyonu gerçekleşmekte ve DNA sayısı iki katına çıkmaktadır. S fazından mitozla geçen periyot G_2 fazı olarak adlandırılmaktadır. Hücre bölünmesinin son safhası olan mitozda hücre sayısı iki katına çıkmaktadır (Collins ve ark. 1997; Park ve Lee 2002; Lewin 2004). Sürekli bölünmek için uyarı alan hücrelerde mitozdan sonra döngü; G_1 , S, G_2 fazları şeklinde tekrarlanmaktadır (Vermeulen ve ark. 2003).

Hücre döngüsünün hasarsız ve düzgün işleyebilmesi için, kritik bölgelerde kontrol noktaları vardır. Bu kontrol noktaları; G_1 -S, S, G_2 -M gibi faz geçişlerinde ve metafaz-anafaz arasındadır. Herhangi bir sebeple; DNA'da hasar meydana gelmişse, hücre döngüsü durdurulmakta ve DNA tamir edildikten sonra, döngü normal işlevine devam etmektedir (Lukas ve ark. 2004; Cabadak 2008).



Şekil 1.1. Hücre döngüsü ve kontrol noktaları (Garrett 2001)

Hücre döngüsünün önemli elemanlarından olan siklin, siklin bağımlı kinazlar (Cdk; cyclin dependent kinase), siklin bağımlı kinaz baskılayıcısı (CKI; cyclin dependent kinase inhibitor) döngünün kontrol noktalarında görev

almaktadır. Siklin (Siklin A ve B) ve Cdk (Cdk 2,4 ve 6) kompleksinin (Güneş 2006) rolü, hücre döngüsü aşamalarında görev alan proteinlerin fosforilasyonunu sağlayarak döngünün ilerlemesini kontrol etmektir (Garrett 2001). CKI ise siklin ve Cdk'nın etkileşimini baskılayarak hücre döngüsünü G1 ve S evresinde durdurmaktadır (Sielecki ve ark. 2000).

Hücre döngüsüne, tümör baskılayıcı (p53 ve Rb) genler ve Her 2, lneu, ras, raf, myb, c myc gibi çeşitleri olan proto-onkogenler olmak üzere 2 gen ailesinin etkisi bulunmaktadır. Proto-Onkogenler hücre dış yüzeyinde büyüme faktörü ve ligandlar olarak; hücre iç zarında, reseptör olarak; sitoplazmada, çekirdek ile zar arasında iletişimi sağlayan yapı olarak; çekirdekte, gen ifadesine katılan transkripsiyon faktör olarak etkinlik göstermektedirler. Tümör baskılayıcı genler ise kanser oluşumunu engelleyen transkripsiyon faktörleri ifade etmektedir. Bu genlerde meydana gelecek mutasyon veya gen ifadesindeki bozulmalar doğrudan ya da dolaylı olarak hücre döngüsünü etkileyerek kanser oluşumunu tetiklemektedirler (Lehman ve ark. 1991; Diamandis 1997).

Proto-onkogenlerde meydana gelecek mutasyonlar bu genlerin onkogen olarak isimlendirilmesine neden olmaktadır. Onkogenler arasında en önemlisi ras onkogenidir. *Ras* genindeki mutasyonlar insanda oluşan kanserlerinin yaklaşık % 20'sinde görülmektedir (Downword 2002). Ras proteini hücre zarının iç yüzeyinde yerleşmiş ve GDP (Guanin difosfat)'ye bağlı bir şekilde inaktif formda bulunmaktadır. Hücre yüzeyinden gelen uyarıyla GDP'yi GTP (Guanin trifosfat)'ye dönüştürerek aktif halde gelmektedir. Aktif Ras, sinyal iletimi için birkaç yolak kullanmaktadır. Bu yolakların sonunda ras proteini, hücrede hayatta kalma işlevi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre döngüsünün devamı, apoptoz, translasyon gibi hücre için önemli mekanizmaları düzenlemektedir. *Ras* geninde meydana gelen mutasyonlar Ras proteininin sürekli GTP'ye bağlı halde ve aktif formda kalmasını sağlayarak, sürekli bir mitojenik uyarı iletmektedirler (Malumbres ve Barbacid 2002).

Tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53, hücre döngüsünde ve apoptozda etkin olan bir proteindir. İnsanda oluşan kanserlerinin % 50 den fazlasını *p53* geni mutasyonu oluşturmaktadır (Vermeulen ve ark. 2005). DNA hasarlarında p53 protein hücre döngüsünü G₁ fazında inhibe eder ve hasarın düzeltilmesi için hücreye zaman kazandırır. Eğer hasar onarılamayacak kadar çoksa, p53 hücreyi

apoptoza sürüklemektedir (Sadiquov 2001). *p53* geninde meydana gelecek olan mutasyon veya *p53* proteinini inhibe edecek başka faktörler, hücre döngüsünün kontrol mekanizmasının bu basamağını etkisiz bırakmakta ve DNA hasarı onarılmadan hücre döngüsüne devam etmektedir (Vermeulen ve ark. 2003).

Retinoblastoma tümör baskılayıcı gen (*Rb*) hücre döngüsünün en çok G₁ fazında etkinliğini göstermektedir. *Rb* proteini transkripsiyon faktörü olan E2F'nin aktivasyonunu düzenlemektedir. S fazında kullanılacak proteinler E2F transkripsiyon faktörü sayesinde sentezlenmektedir. *Rb* genindeki bir mutasyon sonucu hatalı olarak sentezlenen bir protein *Rb* proteini E2F'yi inaktif edememekte ve sürekli S fazı için protein sentezlenerek ve hücrenin düzensiz bölünmesine neden olmaktadır. *Rb* geninde meydana gelen bu mutasyon, insanlarda glioblastoma ve retinoblastoma kanserlerine neden olmaktadır (Weinberg 1995; Güneş 2006).

1.2.2. Beyin Kanseri

Beyin kanseri özellikle çocuklarda kanserden kaynaklanan ölümlerin başında gelen nedenlerden biridir. Kanser tedavilerindeki gelişmelere rağmen beyin kanserinin tedavisi oldukça zordur ve halen etkili bir ilacı olmayan tümörler grubuna girmektedir. Beyin kanseri primer (kök hücre) beyin hücrelerinin anormal gelişim göstermesiyle oluşabileceği gibi metastaz yeteneğine sahip kanserli hücrelerin diğer organlardan kan dolaşımıyla beyine göç etmesi sonucunda da oluşabilir (Singh ve ark. 2003; Vescovi ve ark. 2006).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının (International Agency for Research on Cancer) 2008 kanser raporunda; yaklaşık 13 milyon insanda kanser görülmüş ve yaklaşık 8 milyon insanın hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Araştırmada beyin kanseri vakaları her 100.000 kişinin 238'inde görüldüğü ve sadece 64'ünün hayatta kalabildiği rapor edilmiştir. Beyin kanseri diğer kanser çeşitlerine göre görülme sıklığı en az fakat ölüm oranı yüksek kanser çeşitidir (Ferlay ve ark. 2010).

Beyin kanseri tümörleri birkaç çeşit olmakla birlikte Dünya Sağlık Örgütü glioblastoma ve nöroblastoma kanserli hücreleri sırasıyla astrosit ve embriyonel beyin tümörü sınıfı içerisine dahil etmektedir (Vescovi ve ark. 2006).

1.2.2.1. Rat glioma kanser hücresi (C6)

Gliyal tümörler santral sinir sisteminin tümörlerinin en büyük grubudur. Gliyal tümörler en sık beynin ön lobunda sonra ve temporal bölgede görülmektedir. Bu kanser, türünde glioblastoma multiforme (GBM) tümör hücrelerinin merkezi sinir sistemine sızmasıyla nörolojik fonksiyon kaybına ve sonunda da ölüme yol açmaktadır. Beyin tümörlerinin yaklaşık % 60 kadarını glioma kanserleri oluşturmaktadır (Gazi ve Tapul 2006). Glioma kanser araştırmalarında; çekirdek çeşitliliği (nuclear pleomorphism), yüksek mitotik aktivite, nekrotik ve kanama bölgelerin varlığı gibi insan glioma kanserlerine benzerlik gösterdiği için C6 rat glioma hücresi kullanılmaktadır (San-Galli ve ark. 1989; Gazi ve Tapul 2006). Ayrıca C6 rat glioma tümör insan glioblastomasının tipik histolojik özelliklerini sergilemektedir (Kemerli ve ark. 2003).

C6 rat glioma hücresi, nitrözoure (alkilleştirici, antmeoplastik bir ilaç grubu) maruz kalan Wistar-Furth cinsi ratlardan elde edilmiştir (Teicher 2006). C6 hücreleri yeni doğan sıçanların beyinlerin içine enjekte edildiğinde, glioblastoma multiform (GBM) hücrelerine morfolojik olarak çok benzemektedir (Ozog ve ark. 2002; Lin ve ark. 2008).

C6 glioma hücresinin beyin içinde yıldız şeklinde gliyal destek dokusu olan astrosit'ten köken aldığına inanılmakta ve astrositoma olarak sınıflandırılmaktadır. Astrositler kan-beyin bariyerinde çok önemli rolü vardır ve tıpkı bir filtre gibi beyni korumaktadır. Astrositlerde meydana gelen gen kayıpları, amplifikasyon ve nokta mutasyonları hücrenin tümör hücresine dönüşmesine neden olmaktadır. Bu tümör hücrelerinden olan C6, kan damarlarını çevreleyen endotel zar yüzeyinde gelişmektedir (Grobber ve ark. 2002).

Beyin tümörlerinde cerrahi ve ışın tedavisi uygulamalarının bu tümörlerin tedavisinde etkili olmadığına tespitinden sonra bu tümörler üzerinde yaklaşık 20 yıldır potansiyel kemoterapötik, genetik, immünolojik tedavi metotları denenmeye başlanmıştır (Sibenaller ve ark. 2005; Kemerli ve ark. 2005). Fan ve arkadaşları; akrep zehiri olan BmKCT (Buthus martensii Karsch Chlorotoxin-like Toxin)'nin C6 hücre büyümesini baskıladığı ve metastazını önlediğini rapor etmiştir (Fan ve ark. 2010). C6 hücresinin bitkisel ilaç zerdeçalın aktif bileşeni olan kurkumin

(*Curcuma longa*) ile muamelesi sonucu, hücrede apoptozu tetiklediği ve bunun sonucu olarak hücre popülasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Fong ve ark. 2010).

1.2.2.2. Fare nöroblastoma kanser hücresi (NS20Y)

Nöroblastoma çocuklarda en sık görülen solid tümör olmakla birlikte çocukluk çağı kanserlerinin yaklaşık % 9'unu oluşturmaktadır (Seeger ve ark. 1977; Thiele 1998). Sempatik sinir sisteminin sinir ucu hücrelerinde görülen tümörler (Pahlman ve ark. 2004) olan nöroblastoma tümörleri, *N-myc* gen amplifikasyonu ve kromozom 1'in kısa kolundaki genlerin yeniden düzenlenmesi ya da kaybı gibi en karakteristik sitogenetik değişimlere sahiptir (Thiele 1998).

NS20Y hücresi, C1300 nöroblastoma hücresi ile A/J fare suşuyla türetilmiştir (Fishman ve ark. 1997). Bu tümörler, beyin korteks kısmında yer almakta (Tang ve ark. 2009) ve koloni şeklinde görülmektedir (Merad-Boudia ve ark. 1998).

Kanser tedavisinde asıl amaç; kanserli hücrelerin hepsini ve tümör gelişimine maruz kalmış dokuları ortadan kaldırmaktır. Çoğu zaman bu mümkün değildir. Çünkü tümörler hayati organlara bulaşabilir, hatta bütün vücuda dağılabilir. Teorik olarak yetersiz gibi görünse de, hastalığın çok erken safhasında tümörlü bölgenin lokal cerrahi müdahalelerle alınması etkili bir tedavi yöntemidir. Işın tedavisi, tümör hücrelerini yok etmek için başka bir yöntemdir. Fakat bu yöntemde, tümörlü hücrelerin etrafındaki sağlam hücrelere zarar vermeden, yüksek doz uygulamasında problemler çıkmaktadır. Bütün bu sebeplerden dolayı kemoterapi kanser tedavisinde dayanak noktası olmaya devam etmektedir (Knowles ve Selby 2005).

1.3. APOPTOZ (Programlı Hücre Ölümü)

Apoptoz ilk kez, 1842 yılında amfibiaların başkalaşımı sırasında oluşan hücre ölümleri morfolojisini gözlemleyen Carl Vogt tarafından tanımlanmıştır (Peter ve ark. 1997; Eerola 1999). 1950'lerde "hücre intiharı", 1958'de "kazara hücre ölümü", 1964 yılında ise, Lockshin ve Williams tarafından "programlı hücre ölümü" tanımları yapılmıştır (Otsuki ve Shibata 2003). "Apoptoz" terimini 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından kullanılmıştır. Apoptoz kelimesi apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin bir araya gelerek "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelen bir kelimedenden köken almaktadır (Datta ve Greenberg 1998).

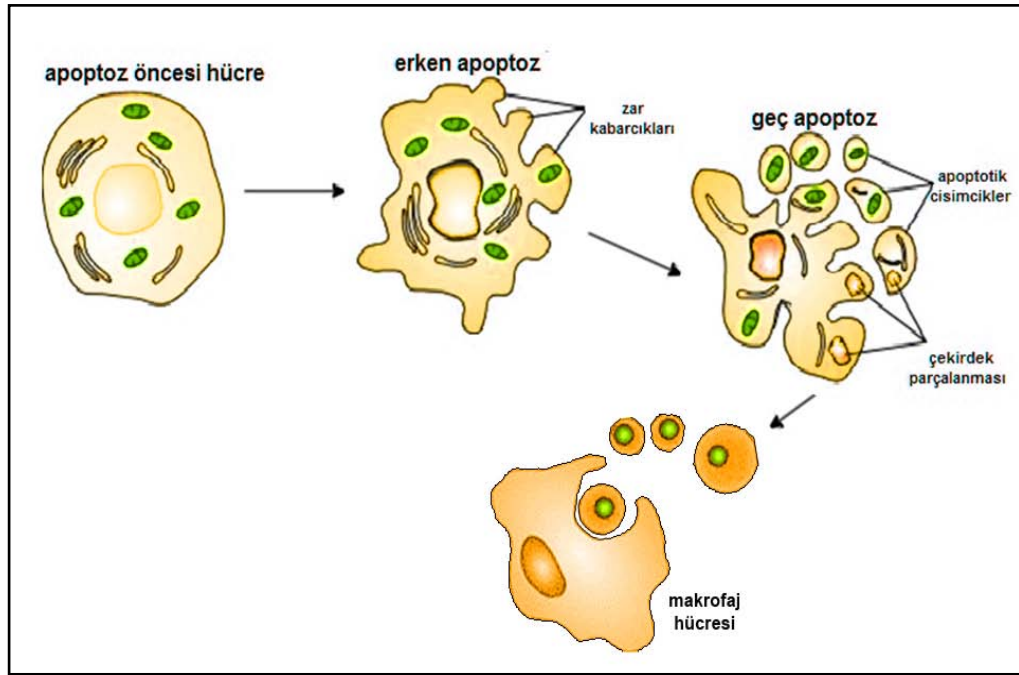
Bütün canlılar doğar, büyür, çoğalır, yaşlanır ve ölürlür. Bu yaşam döngüsünün sağlıklı bir şekilde yürüyebilmesi hücrenin çoğalma / ölüm (proliferasyon/apoptoz) oranının sabit olmasına bağlıdır (Altunkaynak ve Özbek 2008). Apoptoz, tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur (Lumachi ve Basso 2002; Ameisen 2002). Çok hücreli organizmalarda ise gelişim sırasında vücudun şekillenmesinde ve istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırarak doku dengesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Degretev ve Yuan 2008). Özellikle omurgalı canlılarda; embriyonik dönemde sayıları fazla olan nöron (sinir hücresi) ve oligodentrositler (sinir sistemi destek dokusu) apoptoz mekanizmasıyla gerekli sayıya indirgenmektedir (Shield ve Mirkes 1998). Ancak bu şekilde normal hücre homeostazisi sağlanmış olur.

Apoptoz; genlerle düzenlenir ve hücrenin ölümüne yol açan bir seri hücresel olayın aktivasyonunu kapsayan, programlı bir intihar sürecidir. Bu süreç işlerken RNA ve protein sentezine, enerjiye ihtiyaç duymaktadır (El-Mahdy ve ark. 2005).

1.3.1. Apoptozun Morfolojisi

Apoptoza giden hücreler komşu hücrelere zarar vermeden ve herhangi bir iltihabi reaksiyona sebep olmadan ölürlür. Apoptozda görülen morfolojik değişimler; çekirdek, sitoplazma ve hücre membranında gözlemlenir. Çekirdekte, kromatin ve diğer proteinlerin parçalanması sonucu yoğunlaşma başlar ve çoğu zaman kromatinin çekirdek zarının iç yüzeyine yerleşmesi nedeniyle, at nalı

şeklinde görülür (Algeciras-Schimmich ve ark. 2002). Apoptozun ilerleyen evrelerinde çekirdek büzüşmeye başlar ve membranla sarılı bir şekilde, birkaç parçaya ayrılabilir. Stoplazma, laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesiyle, çekilmeye ve küçülmeye başlar (Şekil 3.8 ve 3.9). Parçalanmış hücre organelleri ve çekirdek bulunan küçük kesecik benzeri apoptotik cisimler (tomurcuklar) meydana gelmektedir. Hücre zarında görülen en önemli değişim stoplazma zarının iç kısmında yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin zarın dış yüzeyine çıkmasıdır. Ayrıca N-asetil glikozamin ve N,N diasetilşitaroz molekülleride apoptozda hücre zarından dışarı çıkmaktadır. Bunlar, apoptozu uğrayan hücrelerin makrofajlar tarafından tanınmasında önemli parametrelerdir (Guerrero ve Arias 2001; Güleş ve Eren 2008). Apoptozu uğramış hücreler yoğunlaşmış ve komşu hücrelerden ayrılmış şekilde bulunmaktadır (Kerr ve ark. 1972).



Şekil 1.2. Apoptotik hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler (Gottlieb ve ark. 1997)

Hücre ölümünün diğer bir mekanizması olan nekrotik ölümden apoptozdan farklı olarak sitoplazmanın hızlı bir şekilde şişmesi, organellerin bozulması ve plazma zarının yırtılması gibi değişimler görülmektedir. Nekroza; sıcaklık, osmotik şok, mekanik stres, donma-erime, yüksek konsantrasyonda hidrojen

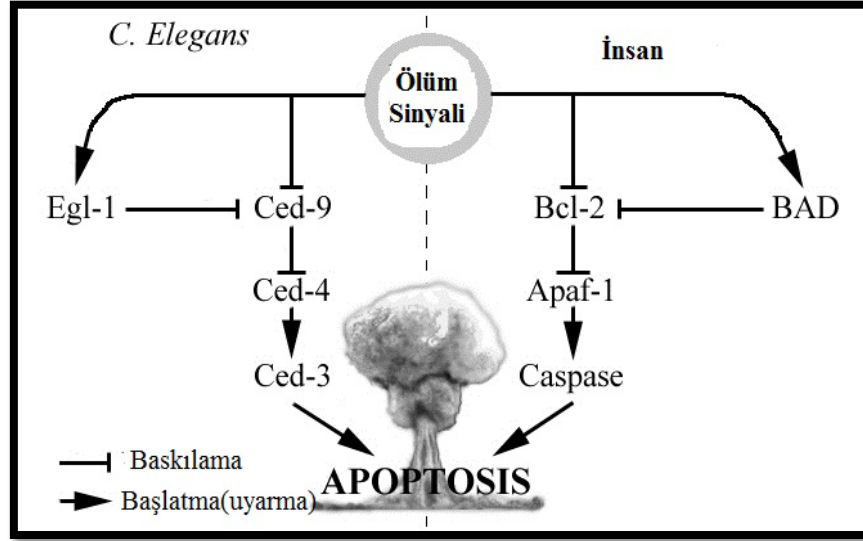
peroksit gibi fizikokimyasal stresler neden olmakla beraber TNF reseptörleri, dsRNA, IFN- γ , ATP'nin azalması, iskemi gibi hücrel uyarı çeşitleride neden olmaktadır (Krysko ve ark. 2008).

1.3.2. Apoptozun Mekanizması

Besin maddeleri, büyüme faktörleri ve hücre dışından gelerek reseptör aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyalleri hücrenin hayatını nasıl sürdüreceğine karar veren etmenlerdir. Bütün bu faktörler hücrenin bölünmeye, farklılaşmaya ve hatta ölmeye karar vermesini etkilemektedir (Shield ve Mirkes 1998; Solakoğlu 2009).

Hücrelerde apoptoz süreci, hücre içi (birincil) sinyal yollarının aktivasyonu ile başlatılabileceği gibi, bir uyarı sonucu (ikincil) da gelişebilmektedir (Öktem ve ark. 2001). Hücre içinde kendiliğinden apoptozun meydana gelmesi bir grup genin etkinliğiyle sağlanmaktadır. Apoptozun iç sinyal yollarıyla düzenlenmesi ve moleküler mekanizmaları konusundaki bilgilerin çoğu, *Caenorhabditis elegans* üzerinde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir (Messina ve Jaworowski 1996; Ameisen 2002). *C. Elegans*'da organ gelişimi ve programlı hücre ölümünü düzenleyen anahtar genlerden olan ced-3 ve ced-4 apoptozun pozitif kontrolünü sağlarken; ced-9 bu genlerin aksine, hücre ölümünü engellemektedir (Soini ve ark. 1998). Şekil 1.3 de görüldüğü üzere insan gibi yüksek organizmalarda da bu genlere benzerlik gösteren başka genlerin bulunmuş olması apoptozda görev alan genlerin evrim boyunca çok iyi bir şekilde korunduğuna kanıt oluşturmaktadır (Lui ve Hergartener 1999).

Şekil 1.3. *C.Elegans* ile insan apoptotik modülatörlerin karşılaştırılması (Vaskivuo 2002)



Apoptoz'u 4 evrede gruplarsak;

- 1- *Başlangıç evresi*: Hücreler çeşitli uyarıcı sinyaller alınır ve bu sinyaller hücre çoğalmasını ya da ölümünü tetikler.
- 2- *Karar evresi*: Hücre gelen sinyalleri yorumlar ve apoptoza gidip gitmeyeceğine karar verir (Shield ve Mirkes 1998).
- 3- *Parçalanma evresi*: Hücre apoptoza karar vermiştir ve artık dönüşü olmayan bir noktadadır. Sonrasında hücre parçalanır. (Soini ve ark. 1998).
- 4- *Yutulma evresi*: Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Narula ve ark. 1997).

Apoptozun hücre içi uyanları; büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir. Hücre dışı uyanları ise; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktör (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (İGF), oksidatif stres, glukokortikoidler, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar, genotoksik ajanlar ve çeşitli antijenler olarak sıralanabilir (Shield ve Mirkes 1998).

Bir dizi hücrel stres sonucu apoptoz mekanizması işlemeye başlamaktadır. Genel hatlarıyla apoptoz mekanizmasına göz atacak olursak; apoptozun erken evresinde, hücreler birleşme bölgelerinden ayrılmakta ve hücrenin sitoplazması

yoğunlaşmaya başlamaktadır. Mitokondri membran bütünlüğünü kaybetmekte ve sitokrom-C'nin stoplazmaya salınımı gerçekleşmektedir. Sitokrom-C, sitoplazmaya geçerek kaskaz şelalesini oluşturmak için kaspaz-9'u aktif hale getirmektedir. Kaspaz şelalesinin sonunda kaspaz 3, endonukleazları aktif hale getirerek kromozomal DNA'nın 3' ucundan kesilip 180-200 baz çifti büyüklüğünde parçalara ayrılmasını sağlamaktadır (Collins ve ark. 1997; Meyer ve Cance 2001; Bredesen ve ark. 2008).

Hücre zarında da gözlemlenen birtakım değişiklikler vardır. Apotozun erken evresinde, iç zarda yerleşik halde olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzim yardımıyla zar dışına çıkmaktadır. Hücre hacminin 1/3'ünü kaybederek büzüşmekte, yüzeyinde kabarcıklar (blebbing) oluşmaktadır. *In vivo* ortamda, apoptotik hücreler fagositik hücreler tarafından tanınıp yutulmaktadır. *In vitro* ortamda ise, apoptotik cisimler (blebbing) şişip patlamaktadır (Messina ve Jaworowski 1996; O'Driscoll ve ark. 2006; Gültekin ve ark. 2008).

1.3.3. Apoptozun Moleküler Düzenlenmesi

Apoptoz; hücre içinden ve dışından gelen sinyallerle sitoplazma ve hücre zarında başlamakta, organellerde (mitokondri, endoplazmik retikulum) devam etmektedir (Dartsch 1999). Apoptozun sürecinde yer alan birtakım moleküler düzenleyiciler mevcuttur (Çizelge 1.5). Bu düzenleyici moleküller apoptoz yolaklarında işe karışan genlerin ürünü olan proteinlerdir.

Çizelge 1.5. Apoptozun düzenlenmesinde görev alan genler (Yıldırım ve ark. 2007)

Apoptoz düzenlenmesinde görev alan genler	
<ul style="list-style-type: none">• Fas, Trail, TNF (almaç ve ligandlar)• Bcl-2 Ailesi Proteinler bcl-2, bcl-xL, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, and A1,bax, bak, bcl-xS, bad, bid, bik, and Hrk• Kinazlar RIP3, CAP, AKT, PKA, MapK• Mitokondri Proteinleri VDAC, ANT, Sitokrom C, AIF, SMAC	<ul style="list-style-type: none">• Kaspazlar Kaspaz 2, 8, 10 –başlatıcı Kaspaz 3, 6, 7 – efektör• Transkripsiyon faktörleri Myc, P53, Nur77• Kaspaz Düzenleyici IAP/Survivin (5 adet), apaf-1• FADD, TRADD, DAD1

1.3.3.1. Kaspazlar

Kaspazlar apoptozun düzenlenmesinde ve hücre siklusunda görev alan sistein proteaz ailesidir (Algeciras-Schimmich ve ark. 2002). Kaspazlar, *C. elegans*' da hücre ölüm geni olan Ced-3'ün homologudur (Fan ve ark. 2005) ve evrimsel olarak çok iyi korunmuştur. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinlerin aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır (C-Asp- ase , C:sistein amino asidi, Asp:aspartik asit, -ase:kesici enzim) (Yıldırım ve ark. 2007).

Memelilerde kaspaz ailesi 12 üyeden oluşmaktadır (çizelge 1.6). Kaspaz -13, sığırdaki kaspaz 4'ün, kaspaz 11 ise farede bulunan kaspaz 4 ve 5'in homologu olduğu bulunmuştur (Launay ve ark. 2005). Apoptoz sinyali ile uyarıldıktan sonra ilk aktivasyona uğrayan kaspazlara başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9,) başlatıcı kaspazların doğrudan ya da dolaylı etkileşimi ile aktif hale gelen ve apoptozda devamlılığı sağlayan kaspazlara efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) denilmektedir (Boatright ve Salvesen 2003).

Çizelge 1.6. Kaspazlar ve rolleri (Fan ve ark. 2005)

Kaspazlar	Rolleri
Kaspaz 2, 8, 9 ve 10	Apoptoz aktivatörü
Kaspaz 3, 6 ve 7	Apoptoz efektörü
Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14	İnflamatuar mediator

İnaktif kaspazlar, amino uçlarında (N-terminal) bulunan bölgenin (prodomain) uzunluğuna göre sınıflandırılmaktadır (Launay ve ark. 2005). Prokaspaz 8 ve 10'nun uzun olan prodomain kısmında ölüm efektör alanı (Death Effector Domain; DED) bulunurken, prokaspaz 2 ve 9'un prodomain kısmında ise kaspaz güçlendirme ve toplama alanı (Caspase Activation and Recruitment Domain; CARD) bulunmaktadır (Oliver ve Vallette 2005). DED ve CARD, prokaspazların aktivasyonunda ve protein-protein etkileşimiyle oluşan kaspaz-şelalesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Fan ve ark. 2005).

Kaspazlar, inaktif proenzim (prokaspaz) olarak stoplazmada bulunmakta ve ölüm sinyali geldiğinde inaktif olan başlatıcı kaspazlar aspartik asit birimlerinin kesilmesiyle aktivite kazanmaktadırlar. Aktif olan başlatıcı kaspazlar kendilerinden sonraki inaktif kaspazları aynı yolla aktif hale getirerek bir kaspaz aktivasyon şelalesi oluşturmaktadır. İki büyük başlatıcı kaspaz olan kaspaz 8 ve 9 farklı apoptotik yollarda kaspaz şelalesinin ilk adımı oluşturmaktadır ve apoptotik süreci devam ettirmektedir (Boatright ve Salvesen 2003). Başlatıcı kaspazların aktivasyonu apoptotik yolağın doğru mekanizmada işlemesi için oldukça önemlidir. Lenfosit, monosit, kalp ve endotel hücrelerinin gelişiminde kaspaz 8'in rolü vurgulanmıştır (J. van Raam ve Salvesen 2011). Kaspaz 8 geninin ifade edilmemesi sonucu çocuklarda nöroektodermal beyin tümörü (medulloblastoma)'nın oluştuğu rapor edilmiştir (Zuzak ve ark. 2002). Kaspaz 9'un eksikliğinde, stoplazmada sitokrom-C miktarı yüksek olsa dahi apoptoz mekanizmasının başlayamadığı bildirilmiştir (Kuida ve ark. 1998). Başka bir çalışmada, kaspaz 9 geninde mutasyona sahip farelerin beyin dokusunda gelişimsel bozukluklar saptanmıştır. Aynı zamanda, kaspaz 9'dan yoksun, gama ışınlarına, kemoterapötik ilaçlara maruz kalan dokularda apoptoza dirençlilik ve tümör gelişimi gözlenmiştir (Hakem ve ark. 1998).

Kaspaz 8'in aktivasyonu hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleriyle gerçekleşmektedir. En iyi bilinen reseptörler; TNF-a, TNFR, Fas-FasL, TRAIL, TRAMP (Thorburn 2004; Fulda 2008) olarak sınıflandırılabilir. Bu reseptörlere bağlanan ligandlar ölüm bölgesi oluşturmakta ve kaspaz 8'in aktivasyonuna neden olmaktadır (Kantari ve Walczak 2011). Kaspaz 9'un aktivasyonu, mitokondri zar geçirgenliğinin bozulmasıyla sitoplazmaya salınan sitokrom-C Apaf-1 adı verilen molekül ile birleşerek "apoptozom" yapısını oluşturmaktadır (Li ve ark. 1997; Pop ve ark. 2006). Aktif olan kaspaz 8, prokaspaz 3'ü kaspaz 9 ise, prokaspaz 3, 6 ve 7'yi aktifleştirerek apoptotik yolağın sürdürülmesini sağlamaktadır (Boatright ve Salvesen 2003).

Geç apoptoz evresinde meydana gelen ve hücre için artık apoptozdan geri dönüşün olamayacağını gösteren DNA parçalanması, kaspazlar sayesinde olmaktadır. Kaspaz 3 tarafından aktive olan endonukleaz enzimlerinden olan CAD (Caspase activated DNase) DNA'yı nükleozom bağlantı noktalarından parçalamaktadır. Kaspaz 3'ün aktive olması kaspaz 8 ya da kaspaz 9'dan birinin aktivasyonu ile mümkündür. Ayrıca, kaspaz 8, 9 ve 3'den birinin inaktif olduğu durumlarda da DNA parçalanması gözlenmemektedir (Pan ve ark. 2001).

Kaspazların hücre ölümünün değişik formlarında aktif görevleri olduğu bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan deneylerle, kaspazların apoptozis ve inflamantasyonda rolünün olduğu gösterilmiştir. Kaspaz 3, 8 veya 9 eksikliği olan hayvanların embriyonel gelişim sürecinde apoptoz mekanizmasında görülen bozulmadan dolayı perinatal dönemde (gebeliğin yirminci haftasından doğuma kadar geçen süre) öldükleri tespit edilmiştir. Benzer şekilde; *Drosophilada* kaspaz 1 geninde görülen delesyon sonucunda larva ölümlerinin gerçekleştiği bildirilmiştir (Wolf ve Green 1999).

1.3.3.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesinin önemli bir üyesi olan Bcl-2 protoonkogeni, insan B hücre lenfomasında (**B** cell lenfoma) taşınan t (14;18) kromozomun kırılma noktasında keşfedilmiştir. Ayrıca Bcl-2 ailesinin en önemli üyesi olan Bcl-2'nin daha öncede bahsedildiği gibi *C.elegans*'da bulunan ced-9 geninin homoloğu olduğu bilinmektedir (Gottlieb ve Babior 1997).

Bcl-2 ailesi üyeleri hücrenin hayatta kalmasına ya da ölmesine karar verecek olan sinyallerin geçmek zorunda olduğu kontrol noktaları gibi işlev görmektedir (Borner 2003). Bu üyelerden Bax gibi birkaçı pro-apoptotik olup apoptozu hızlandırırken Bcl-2 gibi bazıları ise anti-apoptotik olarak isimlendirilmekte (Çizelge 1.7) ve apoptozun baskılanmasında görev almaktadır (Donovan ve Cotter 2004; Dejean ve ark. 2006). Ayrıca bu üyelerden, Bcl-2 (anti-apoptotik) ve Bax (pro-apoptotik)'ın birbirine oranı, hücrenin apoptoza maruz kalıp kalmadığının tespitinde önemli rol oynamaktadır (Xu ve ark. 2006).

Bcl-2 üyeleri yapısal ve fonksiyonel önemi olan, Bcl-2 homoloji (BH) bölgelerine (BH 1-4) sahiptir (Harris ve Thompson 2000). Anti apoptotik olanlar homoloji bölgelerin hepsine sahipken apoptotik öncülü olanlar da sadece ilk üçü mevcuttur (Ouyang ve Giffard 2004).

Çizelge 1.7. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması (Korsmeyer 1999)

Anti-apoptotik üyeler	Bcl-2, Bcl-x _L , Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13
Pro-apoptotik üyeler	Bax, Bak, Bok, Boo
Sadece BH3 bölgesi olan üyeler	Bcl-x _S , Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, PUMA, Bclg, HR

Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri genellikle mitokondri dış zarında nadiren de endoplazmik retikulum ve çekirdek zarlarında bulunmaktadır (Papadopoulos ve ark. 1998; Chipuk ve ark. 2010). Pro-apoptotik üyeleri olan Bax ve Bid ise çoğunlukla sitoplazmada bulunmakta, az da olsa mitokondri dış zarında da rastlanmaktadır. Bak ise yalnızca mitokondri dış zarında yer almaktadır (Chipuk ve ark. 2010).

Bcl-2 ailesini anti apoptotik üyeleri mitokondri dış zarın seçici geçirgenliğini güçlendirerek sitokrom-C'nin stoplazmaya çıkmasını engellemekte ve hücreyi sitotoksit saldırılardan (UV ve gama ışınları, kemoterapotik ilaçlar, vs) korumaktadır (Pagliari ve ark. 2009). Pro apoptotik üyeler ise mitokondri zar bütünlüğünü bozarak sitokrom-C'nin mitokondriden salınmasına yol açmakta ve hücreyi apoptoza sürüklemektedir (Cory ve ark. 2003).

Bcl-2 ailesi apoptozun her iki yolağında da aktiftir. Pro-apoptotik üye Bid apoptozun dış yolağında etkin görevi olan kaspaz 8 tarafından aktive edilerek mitokondri zarına yerleşmektedir. Mitokondri zarında yer alan Bak ile etkileşime giren aktif Bid, Bak'ın şeklini değiştirmektedir (Donovan ve Cotter 2004; Roucou ve ark. 2002; Ouyang ve Giffard 2004). Ayrıca aktif Bid, Bax ile etkileşime girerek proteinin biçimsel değişikliğine yardımcı olmaktadır (Lucken ve Martinou 2005).

1.3.3.3. P53 geni

Tümör baskılayıcı gen olan p53 geni insanda 17. kromozomun kısa kolunda bulunmakta ve 53 kDa'luk protein (p53: Tümör baskılayıcı protein) kodlamaktadır (Shu ve ark. 2007). T antijenlerinde SV40 (Simian virus 40) virüsünün keşfedildiği çalışmalar sırasında onkogen olduğu düşünülmüştür (Chen 1997). Yapılan sonraki çalışmalarla, çok sayıda genin transkripsiyonunu değiştirerek, hücre metabolizma, genom bütünlüğünün korunması, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptoz gibi birçok fonksiyonda rol aldığı anlaşılmıştır (Almog ve Rotter 1997; Yu ve Zhang 2005; Yu ve Zhang 2007).

Tümör baskılayıcı p53 geninin en önemli fonksiyonu; DNA hasarlarının kalıtılmasına karşı genom kararlılığının sağlanmasıdır. Şöyle ki; p53, DNA hasarına karşı cevap oluşturan bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir. Bu süreçte DNA'nın tamir edilebilmesi için gereken zamanın kazanılması amacıyla hücre döngüsünü G₁ fazında durdurmaktadır (Ekert ve Vaux 1997; Lee ve ark. 2003). DNA hasar tamir edilmeyecek kadar büyükse ya da DNA tamir mekanizmasında aksaklık varsa hücre döngüden tamamen çıkmakta ve apoptoz süreci başlamaktadır (Shu ve ark. 2007). Apoptoz sürecine giren hücrede p53 proteinin ekspresyon seviyesi artmaktadır, eksprese olan p53 proteini çekirdeğe göç ederek burada ölüm reseptörleri olan Fas (CD95) geninin ve pro-apoptotik Bcl-2 üyelerini (Bad, Bid, Noxa, PUMA) kodlayan genlerin düzenlenmesinde transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır (Wu ve ark. 2008). Ayrıca, sitoplazmada bulunan Bcl-2 gen ailesinin ürünleri olan proteinleri aktive edilerek, mitokondri zar bütünlüğünün bozulmasında doğrudan rol almaktadır (Shabnam ve ark. 2004).

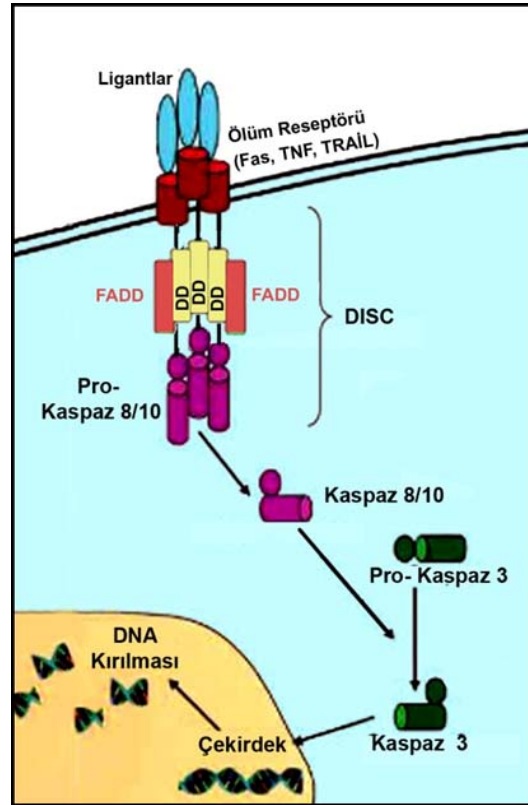
1.3.4. Apoptoz Yolakları

Memeli hücrelerinde apoptoz başlıca iki ana yolakta düzenlenir. Bunlardan birincisi, dışarıdan gelen ölüm sinyalleriyle aktive olan ölüm reseptörlerinin aktive olmasıyla başlayan ölüm reseptör yolağı (dış yolak), diğeri ise çeşitli faktörlerle DNA'da oluşan hasar sonrasında aktive olan mitokondriyel yolaktır (iç yolak) (Steinbach ve Weller 2006). Her iki yolağın ortak özelliğı apoptozun moleküler düzenleyicileri olan enzimatik kaspaz şalesinin aktif edilmesidir (Ashkenazi 2008).

1.3.4.1. Ölüm reseptörü yolağı (Dış yolak)

Apoptozun dış yolağı, hücre yüzeyinde bulunan spesifik ölüm reseptörlerinin özgün ligandlarına bağlanmasıyla hücre dışında başlamaktadır (Thorburn 2004). Dış yolakta görev alan, ölüm reseptörlerinden en önemlileri TNF reseptör ailesidir ve bu aile üyeleri bağışıklık sisteminin gelişiminde ve fonksiyonunda görev almaktadır. TNF reseptörlerinin en bilinen türleri; TNF-R1, Fas (CD95), TRAMP (DR3), TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5) and DR6 olarak sınıflandırılabilir (Schneider ve Tschopp 2000). Hücre yüzeyinde yer alan bu reseptörler uyarıldıklarında ligandlarına bağlanırlar. Reseptör-ligand eşleşmeleri TNF- TNF1, Fas- FasL, TRAIL (R1,R2)- DR4/DR5 şeklinde olmaktadır (Steinbach ve Weller 2006).

Reseptörler dış kaynaklı bir uyarı aldığı zaman ligandlara bağlanmakta ve reseptörlerin stoplazmik kısmında yer alan ölüm bölgesi (DD; Death Domain) aktif olmaktadır. Aktif DD bölgesine adaptör proteinler olan FADD ya da TRADD'ın bağlanması sonucu "ölüm uyarıcı sinyal kompleksi" (DISC; Death Induce Signaling Complex) adı verilen yapı oluşmaktadır (Ashkenazi ve Divit 1998; Wang ve ark. 2006; J. van Raam ve Salvesen 2011). DISC oluşumu prokaspaz 8 veya 10'u katalizleyerek aktif hale getirmektedir. Aktif kaspaz 8 veya 10 ise kaspaz şelalesini başlatmak için efektör kaspazları (kaspaz 3, 6, 7) aktifleştirmektedir (Sartorius ve ark. 2001; Ghavami ve ark. 2009).



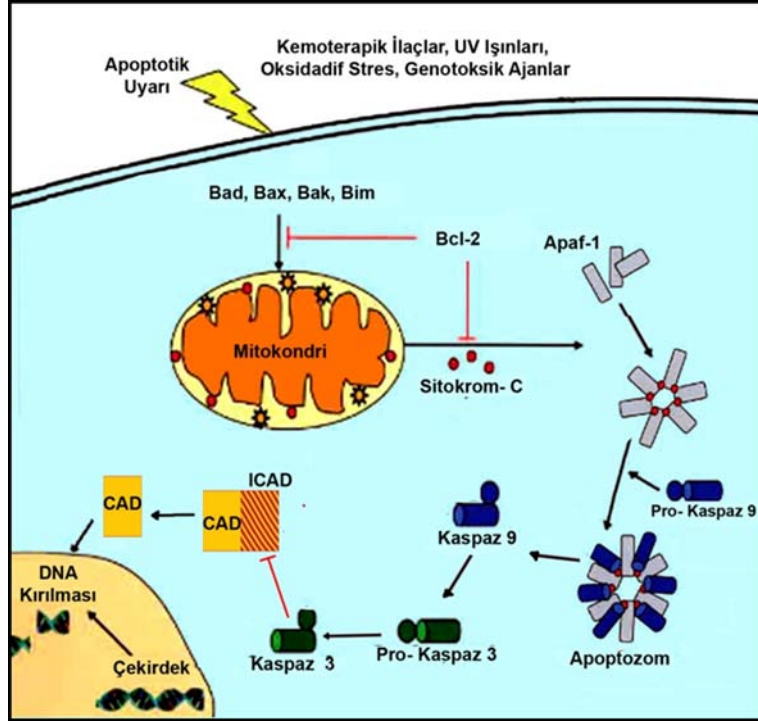
Şekil 1.4. Apoptozun dış yolak mekanizması (Rismanchi ve Blackstone 2007)

1.3.4.2. Mitokondriyel yolak (İç yolak)

Sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, oksidatif stres, aşırı açlık, büyüme faktörleri azlığı gibi dış kaynaklı uyarılara hem de endojen DNA hasarlarına karşı başlayan mitokondriye dayalı olarak başlayan apoptoz mekanizmasına iç yolak adı verilmektedir (Steinbach ve Weller 2006). İç yolağın merkezinde yer alan mitokondri organeli apoptotik sinyallerin çekirdeğe iletilmesinde anahtar rol üstlenmektedir. Mitokondri bu görevini dış zarına yerleşmiş Bcl-2 ailesi üyeleriyle gerçekleştirmektedir. Bcl-2 ailesi mitokondri zarında ve sitoplazmada bulunan ve aldıkları sinyallerle hücreyi apoptoza sürükleyen bir proteaz ailesidir (Gross ve ark. 1999; Desagher ve Martinou 2000).

Sitoplazmada bulunan ve Bcl-2 ailesinin önemli üyesi olan Bax, sinyallerle aktifleştiginde mitokondri zarında bulunan anti-apoptotik Bcl-2 ile birleşerek Bcl-2 işlevini baskılamaktadır. Diğer yandan Bax, mitokondri zarında bulunan pro-apoptotik Bak'ın aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktive olan Bak, "mitokondriyel apoptozu" başlatan kanal olan MAC (Mitokondriyal apoptosis-induced channel)'in bütünlüğünü bozarak sitokrom-C'nin ve diğer membran proteinlerinin (AIF, apoptozu uyaran faktör; SMAC/DIABLO) salınmasına yol açmaktadır (Peixoto ve ark. 2009; Ghavami ve ark. 2009).

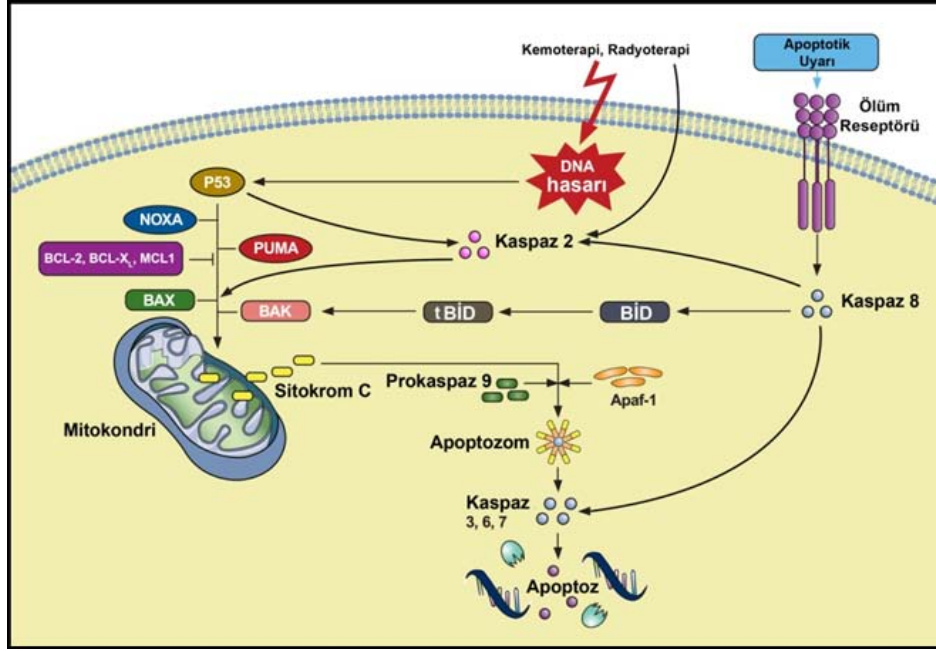
Sitokrom-C'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla oluşan apoptozom, pro-kaspaz 9'un aktivasyonuna neden olmaktadır (Li ve ark. 1997; Cain ve ark. 2002). Kaspaz 9 tarafından aktif edilen pro-kaspaz 3 sitoplazmadaki ICAD (inhibitor of caspase activated DNase) ve PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] moleküllerini inaktif hale dönüştürmektedir (Wolf ve ark. 1999). ICAD'ın inaktivasyonu sonucu serbest kalan CAD, çekirdeğe geçerek DNA'nın 180-200 baz çifti ve katlarında parçalanmasına yol açmaktadır (Otsu ve ark. 2005; Eckhart ve ark. 2007).



Şekil 1.5. Apoptotun iç yolak mekanizması (Rismanchi ve Blackstone 2007)

Hücrelerin işlevlerine bağlı olarak ölüm reseptörü yolları ile mitokondri aracılı yolak zaman zaman apoptosis yolağı ile kesişebilir. Örneğin; düşük konsantrasyonlarda ki prokaspaz 8, iç yolakta görev alan Bid (proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini) ile etkileşime girerek Bid'i aktive etmektedir. Aktif Bid mitokondri zarında bulunan pro-apoptotik Bcl-2 üyesi olan Bak ile etkileşime girip mitokondri zar bütünlüğünün bozulmasını tetiklemektedir (Ashkenazi 2008; Fulda 2008; Kantari ve Walczak 2011).

Ayrıca genotoksik stres, DNA hasarı sonucu uyarılan tümör baskılayıcı gen ürünü olan p53 proteini (Shabnam ve ark. 2004; Ashkenazi 2008) apoptoz iç yolakta pro-apoptotik üye olan Bax'ın aktivasyonunu sağlayarak mitokondri dış zara yerleşmesine neden olmaktadır. Mitokondri zar yüzeyinde oluşan Bax kanalı zar bütünlüğünü bozarak sitokrom-C'nin sitoplazmaya salınmasına neden olmaktadır (Heiden ve Thompson 1999; Sprick 2004; Donovan ve Cotter 2004).



Şekil 1.6. Apoptozun iç ve dış yolak mekanizmasının kesiştiği noktalardaki moleküler düzenleyiciler (Ashkenazi 2002; Baptiste-Okoh ve ark. 2008).

Ölüm almaç yolağında kaspaz 8 tarafından ya da doğrudan uyarın ile aktif olan kaspaz 2 (Mohan ve ark. 2006) iç yolak mekanizmasında da aktif hale gelerek apoptoza yardımcı olmaktadır. İç yolakta aktif hale gelen p53 proteini sayesinde aktif hale gelen kaspaz 2, mitokondriden sitokrom-C'nin salınımını için Bid'i aktive etmektedir (Tyagi ve ark. 2006). Bax ve Bid proteinlerinin ortak özelliği mitokondri membran bütünlüğünü bozarak sitokrom-C' nin salınmasına neden olmalarıdır (Harris ve Thompson 2000).

1.3.5. Apoptozu belirlemede kullanılan yöntemler

Apoptoz hücrede biyokimyasal ve morfolojik bir takım değişikliklere neden olmaktadır. Biyokimyasal değişimler, mitokondri zar bütünlüğünde değişme, mitokondriyel proteinlerin salınması, kaspaz aktivasyonları ve kaspaz aktivasyonuna bağlı DNA'nın 180-200 bp ve katlarına parçalanması ve fosfatidilserinin plazma zarı dışına yerleşmesi şeklinde açıklanmaktadır. Morfolojik değişimler ise hücre iskeletinde meydana gelen bozulmayla birlikte hücrenin büzülmesi, çekirdek zarı kenarına kromatinin yoğunlaşması, çekirdek

parçalanması, plazma zarında kabarcıkların oluşumu ve apoptotik keseciklerin (body) oluşumu şeklinde sıralanabilir (Krysko ve ark. 2008).

Apoptoz belirlemede, kültür hücrelerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmalar ile denek hayvanlarının kullanıldığı *in vivo* çalışmalarda uygulanan çalışmalarda teknikler farklılık göstermektedir. *In vivo* çalışmalarda apoptozun doku örneklerinde belirlenebilmesi *in vitro* çalışmalara göre çok daha karmaşık yöntemler gerektirmektedir. Bu yöntemler arasında manyetik rezonans görüntüleme, manyetik rezonans spektroskopi, bilgisayarlı tomografi sayılabilir (Brauer 2003; Kettunen ve Brindle 2005).

Apoptoz teriminin ilk kullanıldığı yıllarda sadece morfolojik görüntüleme yöntemlerinden faydalanılmıştır (Eerola 1999). Günümüzde ise, apoptotik hücreleri moleküler düzeyde özgül olarak belirlemeye yarayan yöntemler uygulanmıştır (Sgonc ve Gruber 1998; Jakob ve ark. 2008). 80'li yılların sonuna doğru, DNA kırıklarının oluştuğu ortaya çıkınca, bunun saptanabilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Yamaguchi ve Sakurai 1991; Fesus ve ark. 1989). Daha sonra, kaspazların apoptozda etkin görev aldıkları bulunmuş ve enzim-substrat ilişkisinden yola çıkarak apoptoz belirlemede kaspaz aktivasyonlarının ölçüldüğü yeni yöntemler uygulanmaya başlanmıştır (Akşit ve Bildik 2008).

Apoptoz mekanizması karışık ve doğurduğu sonuçlar da çeşitli olunca belirleme yöntemleri çeşitlilik göstermektedir. Apoptoz sırasında meydana gelen olayların daha kapsamlı açıklanabilmesi için birden fazla teknik kullanılarak sonuçların doğrulanması gerekmektedir (O'Driscoll ve ark. 2006).

1.3.5.1. Sitotoksikite testleri

Çeşitli bileşiklerin hücre çoğalması ve canlılığı üzerindeki olumsuz etkilerine sitotoksik etki adı verilmektedir. Bu etkiyi belirlemek için yapılan testlere de sitotoksikite testleri denilmektedir ve hücre canlılığını (MTT) ya da hücre ölümünü (NR) tespit etmek amacıyla uygulanmaktadır (Ekwall ve ark. 1990).

MTT testi çeşitli kimyasal ajanların sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla canlı hücre sayılarının nicel olarak ölçüldüğü bir test yöntemidir. İlk kez 1983 yılında Mossman tarafından geliştirilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondriyel

enzim aktivitesiyle sarı renkli tetrazolium tuzlarının [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] mor renkli formazan kristallerine dönüşüp, bu yoğunluğun kolorimetrik yöntemle ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Verma ve ark. 2010).

Suda çözünebilir tetrazolium tuzu, mitokondride bulunan dehidrogenaz süksinat enzimi tarafından tetrazolium halkalarına ayrılarak formazan kristallerine dönüşmektedir. Formazan kristalleri hücre zarından geçemediği için sadece canlı hücrelerde birikmektedir. Bu kristaller DMSO ya da izopropanol gibi organik çözücülerde çözünmekte ve spektrofotometrede uygun dalga boylarında (540-570 nm) ışığı absorbe etmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006; Fent 2001).

Hücre canlılığının ölçüldüğü bir başka test ise Borenfreund ve Puerner (1984) tarafından geliştirilmiş olan nötral kırmızısı (3-amino-*m*-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) alımı testidir. Bu testin prensibi nötral kırmızısı boyasının (NR; Neutral Red) canlı hücrelerin lizozom matriksine yayılması ve bağlanması esasına dayanmaktadır (Fotakis ve Timbrell 2006; Repetto ve ark. 2008). Hücre yüzeyinde veya lizozom zarındaki hasar, nötral kırmızısının alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı hücrelerle ölü hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır. Canlı hücrelerin lizozomlarında biriken nötral kırmızısı boyasının oluşturduğu renk şiddetinin nicel ölçümü spektrofotometre ile uygun dalga boyunda (540-570 nm) yapılmaktadır.

Hücre proliferasyonunun tespit edildiği bir başka yöntemde BrdU yöntemidir. BrdU (bromo deoxyuridine triphosphate) boyasının S fazına giren hücrelerde [3H] timidin ile birleşmesi ve mitotik hücrelerin tanınmasına dayalı bir yöntemdir (Kee ve ark. 2002).

1.3.5.2. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

Apoptoz sırasında hücrede meydana gelen sitoplazmanın azalması, çekirdeğin küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek zarı etrafında toplanması, mitokondri zar bütünlüğünün bozulması gibi değişiklikler çeşitli mikroskoplarla morfolojik olarak görüntülenmektedir. Geliştirilen özel boyama teknikleriyle boyanan hücreler ışık mikroskobu, floresan mikroskobu, elektron mikroskobu ve faz kontrast mikroskopları kullanılarak incelenmektedir

(Haunstetter ve Izumo 2001; O'Driscoll ve ark. 2006). Hemotoksilen, eozin, aluminyum potasyum sülfat, sitrik asit gibi kimyasallarla boyanan hücreler ışık mikroskopunda görüntülenirken, Annexin V, propidium iyodür, akridin turuncusu, etidyum bromid, DAPI, Hoechs gibi boyalarla boyanan hücreler ise floresan mikroskopta incelenmektedir (Stadelmann 2000).

Apoptotik uyarıdan sonra hücrede meydana gelen en erken olay mitokondriyal zar bütünlüğünün bozulmasıdır ve bu mitokondriyel değişim floresan boyalarla boyanıp morfolojik olarak incelenmektedir. Bu yöntem için JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazol-karbosiyanin (TTBC)-iyodür), Rhodamine 123 gibi özel floresan boyalar ve ticari olarak sunulan kitler (MitoCapture®) kullanılarak apoptoza uğrayan hücreler kolaylıkla tespit edilmektedir (Galluzzi ve ark. 2007).

Mitokondriyal apoptoz belirleme kitinde kullanılan bir katyonik boya olan MitoCapture® (Biovision), sağlıklı ve apoptotik hücrelerde farklı ışımaya yapmaktadır. Apoptotik hücrelerde MitoCapture® boyası mitokondri içinde birikmediğinden sitoplazmada monomer halinde kalmakta ve floresan mikroskopta FITC filtresi altında yeşil renkli görülmektedir. Mitokondri zar geçirgenliği bozulmamış olan sağlıklı hücrelerde ise MitoCapture® boyası mitokondri içine geçerek hücrenin kırmızı renkli görünmesine neden olmaktadır.

1.3.5.3. Biyokimyasal yöntemler

Apoptoz mekanizmasının biyokimyasal özellikleri arasında kaspazlar, sitokrom-C, fosfatidilserin gibi enzimlerin aktivasyonlarındaki değişim ve DNA'nın mono/oligonükleozomlarına ayrılması sayılabilir. Bu değişimleri saptamak için çeşitli biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir (Allen ve ark. 1997; Ulukaya 2003).

Apoptoz mekanizmasında en önemli proteaz ailesi kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonunun belirlendiği iki yöntem vardır. Bunlar; spektrofotometrik yöntemler (kolorimetrik, florometrik) ve akış hücremetrisi (Flowsitometri) yöntemleridir (Otsuki ve Shibata 2003). Kolorimetrik yöntemde kullanılan substratlar; kaspaz 3 için DEVD-pNA, kaspaz 8 için ise IETD-pNA'dır. Bu substratların yapısında

bulunan ve pNA adı verilen kromofor (renk maddesi) uzantısının aktif kaspaz enzimi ile koparılmasının ardından serbest kalan pNA'nın yaydığı ışığın şiddeti spektrofometrede 400-405 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Florometrik yöntemde ise substratlardaki AFC (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) maddesinin oluşturduğu floresan ışımının florometre cihazında uygun dalga boyunda ölçülmesiyle kaspaz aktivasyonu belirlenmektedir (Köhler ve ark. 2002).

Annexin V yöntemi, apoptozun erken evresinde, plazma zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine hareket eden fosfatidilserin moleküllerinin tespit edilmesi prensibine dayanır. Apoptozu uyaran etmen ne olursa olsun fosfatidilserinin zarın dış yüzeyine çıkması çekirdek değişikliklerinden daha önce gerçekleşmektedir (Shounan ve ark. 1998). Bu yöntemde, floresan bir boya ile işaretlenmiş Annexin V molekülü hücre zarının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserin moleküllerine bağlanmakta ve floresan mikroskopta FITC filtre altında (Shield ve Mirkes 1998; Gidon ve ark. 1999) ya da akış hücremetrisi (Anzar ve ark. 2002) yardımıyla apoptotik hücreler spesifik olarak belirlenmektedir.

Akış hücremetrisi yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak, apoptozda ifade olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteini saptanabilmekte ve böylece apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve nicel sonuç vermesi açısından, apoptoz tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Darzynkiewicz ve ark. 1992; Zamai 1993).

Ayrıca, apoptozla özgü DNA kırıklarının tespit edilmesi amacıyla TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling) yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, apoptotik hücrelerin parçalanmış DNA'sında yer alan 3'OH (hidroksil) grubunun, ortama eklenen biotin dUTP (deoxyuridine triphosphate) ile işaretlenmesi esasına dayanmaktadır (Otsuki ve Shibata 2003; Rode ve ark. 2004). Daha sonra akış hücremetrisi veya floresan mikroskopla incelenmektedir. Agaroz jel elektroforezi de yine apoptotik hücrelere özgü DNA kırıklarının gösterilebildiği biyokimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem elektriksel bir alanda biyolojik moleküllerinin büyüklüklerine, yüklerine göre ayrışması prensibine dayanmaktadır. Memeli hücrelerde apoptozun belirlenmesinde DNA önemli bir bileşendir ve apoptotik hücrelerin DNA'sı farklı

sayıda nükleozomlarına ayrıldığı için agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağı şeklinde görülmektedir (Rios ve Recio 2006; Pagliari ve ark. 2009).

Ayrıca, apoptotik hücreler moleküler yöntemler kullanılarak da belirlenir. Apoptoz yolaklarında rolü olduğu bilinen bcl-2 ailesine ait olan bazı proteinlerin hücre içindeki ifadeleri, başlatıcı ya da efektör kaspazların ifadeleri, p53 gibi transkripsiyon faktörleri ile bazı onkogen ürünlerinin ifadesi western blot yöntemiyle tespit edilmektedir. Sitokrom C'nin mitokondriden dışarı çıkıp çıkmadığı da yine bu metotla belirlenmektedir. Sitokrom C tespitinde, önce alt-fraksiyonlama yapılarak, hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılmaktadır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom C'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılmaktadır (Ulukaya 2003).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Alet, cihaz ve sarf maddeler

Otoklav, CO₂ inkübatörü (Heraus, Heracell), steril kabin (Heraus, klas II), sıvı azot (AÜBİBAM sıvı azot üretim tesisi), sıvı azot tankı, Eliza cihazı (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (X71 Olympus), florasan filitreler (FITC, WB), Nanodrop (Eppendorf), derin dondurucu (-20) (Philips),(-86°C) (Thermo), soğutmalı ve santrifüj (Heraus), su banyosu (Clifton), vorteks (Velp), hassas terazi (Ohaus), 25 ve 75 cm²'lik kültür flaskları, 96 kuyulu plakalar (BD), agaroz jel elektroforezi (Thermo), kar-buz makinesi (Scotsman), kuru hava sterilizatörü (FN400), pH metre (Inoloab WTW).

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat (Etibor) sulu çözeltileri, nötral red (NR) (Fluka), MTT boya (Applichem), dimetilsülfoksit (DMSO), fetal sığır serum (FBS) (Sigma), Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM) (Biochrom AG), PBS-EDTA (Merck), KCl (Merck), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), NR desorb, sodyum bikarbonat (Sigma), penisilin/ streptomisin (Sigma), hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), Tripsin EDTA (Sigma), Formaldehit (Merck), Triton- x100 (Sigma).

2.1.3. Çalışmada kullanılan hücreler

NS20Y hücreleri, 1972 yılında Amano ve arkadaşları tarafından C1300 fare nöroblastoma hücresi ile A/J fare suşundan elde edilmiştir (Saito ve ark. 1996). Deneyde kullanılan NS20Y neuroblastoma hücreleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Figen ÇALIŞKAN tarafından; DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)' den satın alınmış ve çalışmamız için hediye edilmiştir.

C6 rat glioma hücresi, Benda ve arkadaşları tarafından 1968 yılında, yüksek derecede kanserojen madde olan N-nitrosomethylurea ile muamele edilen rat glioma suşundan türetilmiştir (Volpe ve ark. 1975; Barth Rolf 1998). Deneyde kullanılan C6 hücresi, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmokoloji Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Miriş DİKMEN tarafından hediye edilmiştir.

2.1.4. Deneyde kullanılan solüsyonların hazırlanmaları

% 10 FBS-DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium)(1 L)

% 10 besiyeri, NS20Y ve C6 hücrelerinin kültüre edilmesinde kullanılmıştır.

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
Fetal Bovine Serum (FBS)	100 ml
DMEM	10,15 gr
Penisilin/streptomisin	10 ml
Sodyum Bikarbonat (% 9,2'lik)	40 ml

DMEM ultra saf su içinde çözülmüş, sodyum bikarbonat ilave edilerek 0.22 µm filtreden geçirilmiştir. Diğer solüsyonlarla birlikte toplam hacim 1 L'ye tamamlanmış ve steril ortamda hazırlanan medyum'un pH'sı, HCl ile 7,4'e ayarlanarak +4 °C'de saklanmıştır.

1x PBS (Phosphate Buffered Saline) (1L)

Deney hücrelerini yıkamak için kullanılmıştır

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
KCL	0.2 gr
NaCL	8 gr
KH ₂ PH ₄	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.14 gr

De iyonize su içinde çözülmüş, toplam hacim 1L'ye tamamlanmış ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1x PBS – EDTA (1 L)

Deney hücrelerini yıkamak için kullanılmıştır.

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
KCL	0.2 gr
NaCL	8 gr
KH ₂ PH ₄	0.2 gr
Na ₂ HPO ₄	1.14 gr
EDTA	0.372 gr

De iyonize su içinde çözülmüş, toplam hacim 1L'ye tamamlanmış ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Tripsin-EDTA (100 ml)

Deney hücrelerini flask yüzeyinden kaldırmak için kullanılmıştır.

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
Tripsin-EDTA (10x)	50 ml
PBS-EDTA	50 ml

Solüsyon steril olarak satın alınmıştır.

Nötral red solüsyonu

10x stok solüsyonu (100 ml)

Nötral red	0,33 g
Distile su	100 ml

Stok solüsyonu yukarıda verilen miktarlarda, vortekste karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta, 2 ay saklanmıştır.

1x çalışma solüsyonu (10 ml)

10x stok	1 ml
Medyum	9 ml

Deney öncesinde taze hazırlanan çalışma solüsyonu 0,22 µm filtreye steril edilip 37 °C'lik su banyosunda yarım saat ısıtılmıştır.

Nötral red ayrıştırıcısı (NR- desorb) (100 ml)

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
Glasial asetik asit	1ml
Etanol	50 ml

Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

MTT solüsyonu (1 ml)

<u>Bileşikler</u>	<u>Miktar</u>
MTT	5 mg
Distile su	1 ml

MTT boyasının çözülmesi için 30 dk manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. 0,22 µm filtreye steril edilip küçük hacimlerde, ışık görmeyecek şekilde -20 °C'de saklanmıştır.

5X TBE solüsyonu (100 ml)

<u>Bileşik</u>	<u>Miktar</u>
Tris Base	5,4 gr
Borik asit	2,75 gr
0,5 M EDTA (pH:8)	2 ml

Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Çalışma solüsyonu 1x'dir. Stok solüsyonu 1: 5 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

2.1.5. Bor bileşenleri ve hazırlanması

BOREN (Türkiye Bor Araştırma Enstitüsü)'in desteklediği “2009-Ç-0214” numaralı ve “Bazı Bor Minerallerinin Antimikrobiyal, Antikanserojenik ve Bakteri Yaşamına Etkilerinin Araştırılması” başlıklı projesinde kullanılan bor bileşenleri Etibor'dan temin edilmiştir.

Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenleri distile suda çözülerek 250 mM'lık ana stok solüsyonu hazırlanmıştır. Final konsantrasyonu 1 mM- 25 mM arasında olan seri dilüsyonlar hazırlanmıştır ve deneylerde kullanılmak üzere uygun konsantrasyonlar seçilmiştir. NS20Y hücrelerinde kullanılmak üzere, susuz boraks'ın 5, 7,5, 10, 15 ve 20 mM, sodyum perborat'ın 0,03125, 0,0625, 0,125, 0,25 ve 0,5 mM ve potasyum perborat'ın 0,5, 1, 1,5, 2 ve 2,5 mM konsantrasyonları seçilmiştir. C6 hücreleri için, susuz boraks'ın 0,125, 0,25, 0,5, 1 ve 2,5 mM, sodyum perborat'ın 2,5, 5, 10 ve 15 mM, potasyum perborat'ın 1, 5, 7,5, 10 ve 25 mM konsantrasyonları seçilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücre kültürü

Çalışmada kullanılan NS20Y ve C6 hücreleri, % 10'luk Fetal Bovine Serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicilin-streptomycin ve % 9,2'lik sodyum bikarbonat (NaHCO₃) içeren besiyerinde 25 cm²'lik kültür

flaskları içinde, % 5 CO₂ ve % 95 hava ortamında, 37 °C'deki nemli inkübatörde kültüre edilmişlerdir.

NS20Y ve C6 hücreleri stoktan canlandırıldıktan birkaç pasaj sonra deneylerde kullanılmıştır. Hücreler 1x PBS ile yıkanmış ve 2x Tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılarak santrifüj tüpünde toplanmıştır. Thoma lamı ile sayılan hücreler kuyucuk başına; NS20Y için 3,5x10³, C6 için 3x10³ hücre olacak şekilde % 10'luk FBS DMEM içerisinde süspansiyon hale getirilmiş ve 96 kuyulu kültür plakalarına aktarılmışlardır. Hücreler plaka yüzeyine yapışıp ortama adapte olmaları için 24 saat, 37 °C'de, % 5 CO₂ ve % 95 hava ortamında inkübe edilmişlerdir. 24 saatin sonunda, hücrelerin besi yerleri uzaklaştırılmış ve hücrelere test bileşenlerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren besiyeri verilmiştir. Kontrol grubu hücrelerine test bileşeni uygulanmamış, sadece taze besi yeri ilave edilmiştir. Hazırlanan plakalar 24, 48 ve 72 saat sürelerde 37 °C de % 5 CO₂ içeren inkübatörde büyütülmüşlerdir. Bütün deneyler en az ikişer kere tekrar edilmiş ve sonuçların ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.

2.2.2. Sitotoksik testler

2.2.2.1. MTT testi

MTT testi, Chiba'nın yöntemi geliştirilerek uygulanmıştır (Chiba, 1998). Bu yöntemde MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) boyası kullanılmıştır. Bor bileşenleriyle muamele edilen hücrelerin 24, 48 ve 72 saat inkübasyonundan sonra besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Final konsantrasyonu her kuyucuğa 0,5 mg/ml olacak şekilde verilir, 3 saat süreyle 37 °C'de % 5 CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. 3 saat sonunda, MTT solüsyonu uzaklaştırılıp oluşan formazan tuzları 0,1 ml DMSO ile çözülmüştür. Plaka, 250 devirde 10 dk hafifçe çalkalanmış ve formazan tuzlarının etkin bir şekilde çözünmesi sağlanmıştır. Ardından, formazan kristallerinin çözünmesiyle oluşan renk şiddetinin optik dansitesi (OD) plaka okuyucu cihazında (Bio-Tek, EL x808- IU) 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Kontrol grubu ile kıyaslanarak bor bileşenlerinin IC₅₀ dozu belirlenmiştir. Çalışmalar 4 paralel olarak 2'şer kez tekrar edilmiş ve her bir

deneyin ortalamaları alınarak, SPSS (17.0)/ One Way Anova/ Post Hock testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

2.2.2.2. Nötral kırmızısı alımı testi

Ulusal toksikoloji kurumsal merkez programının (The National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods; NICEATM) (2003) yöntemi geliştirilerek uygulanmıştır.

NS20Y ve C6 hücreleri, bor bileşenleriyle 24, 48 ve 72 saat muamele edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Hücreler 200 µl 1x' lik NR çalışma solüsyonundan 3 saat inkübe edildikten sonra, NR solüsyonu uzaklaştırılıp dikkatli bir şekilde 100 µl PBS-A ile yıkanmıştır. Nötral red boyasının hücre içinde çözünmesi için kuyucuklara 100 µl NR –desorb ilave edilmiş ve 20 dk çalkalanmıştır. Oluşan rengin OD' si plaka okuyucuda (Bio-Tek, ELx808-IU) 570 nm' de ölçülmüştür.

Yapılan MTT ve NR sitotoksosite test sonuçlarının değerlendirilmesinin ardından, hücreler için toksit olmayan en uygun doz ve süreler tespit edilmiştir. Apoptoz belirleme testleri bu doz ve sürelerde uygulanmıştır.

2.2.3. Apoptoz belirleme testleri

2.2.3.1. Mitokondri zar geçirgenliği testi

MitoCaptureTM (Biovision, K250) apoptoz tanımlama kit'inin önerdiği protokole uygun olarak çalışılmıştır. Bu yöntemde, sağlıklı ve apoptotik hücreler mitokondriyal zar geçirgenliklerindeki farka dayalı olarak tespit edilmiştir.

Mitokondriyal zar geçirgenliği çalışmasında, NS20Y ve C6 hücreleri flask başına sırayla $2,3 \times 10^5$ ve 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. Bor bileşenlerinin IC₅₀ dozlarının bir alt konsantrasyonları olan, NS20Y hücrelerinde susuz boraks için 7,5 mM, sodyum perborat için 0,25 mM, potasyum perborat için 2 mM test maddesi hücrelerin besi yerine ilave edilmiştir. C6 hücrelerinde susuz boraks için 0,5 mM, sodyum perborat için 10 mM, potasyum perborat için 0,1 mM olarak hücrelerin besiyerine ilave edilmiştir. Deneyin negatif kontrol için

hücrelere sadece besiyeri; pozitif kontrolü için ise Cis-platin 7,5 µM içeren besiyeri ilave edilmiştir. Her bir test maddesi ile hücreler 48 saat inkübe edildikten sonra 1×10^6 hücre 500 xg de 5 dk santrifüj edilerek toplanmıştır. Oda sıcaklığında hazırlanan mito-capture solüsyonunda tekrar süspansiyon edilen hücreler 37 °C, % 5 CO₂ inkübatörde 20 dk bekletilmiştir. Süre sonunda hücreler 500 xg' de 5 dk santrifüj edilerek boya solüsyonu uzaklaştırılmış ve pellet hücreler tekrar inkübasyon solüsyonu ile seyreltilmiştir. Bu solüsyondan 20 µl lama damlatılarak hazırlanan preparatlar karanlık ortamda florasan mikroskopunda (Olympus Ix70), WB filtre ile incelenmiştir. Sağlıklı (kırmızı), apoptotik (yeşil) hücreler sayılarak ortalamaları alınmış, çizelge (3.1- 3.2)ve grafik (3.9- 3.10) halinde sunulmuştur.

2.2.3.2. Kaspaz 3/ 8 aktivasyonu

Apoptoz belirleme yöntemlerinden olan kaspaz aktivitesi ölçümü, Kaspaz-3/ CPP32 ve Kaspaz-8/FLICE (Bivision) kolorimetrik deney kiti'nin önerdiği yöntemle göre uygulanmıştır.

Kaspaz 3/8 aktivasyonu için NS20Y ve C6 hücreleri flask başına sırayla $2,3 \times 10^5$ ve 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmişlerdir. Bor bileşenlerinin IC₅₀ dozlarının bir alt konsantrasyonları olan, NS20Y hücrelerinde susuz boraks için 7,5 mM, sodyum perborat için 0,25 mM, potasyum perborat için 2 mM test maddesi hücrelere uygulanmıştır. C6 hücrelerinde susuz boraks için 0,5 mM, sodyum perborat için 10 mM, potasyum perborat için 0,1 mM olarak hücrelerin besiyerine ilave edilmiştir. 48 saat inkübe edildikten sonra, 2×10^6 hücre santrifüj edilerek toplanmıştır. Pellet halindeki hücrelere, 50 µl hücre liziz tamponu konulup 10 dk buz içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre ekstratını ayırmak için sürenin sonunda 10.000 xg'de 1 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant kısmı temiz ependorf tüpe aktarılmıştır. Elde edilen protein miktarları Nanodrop spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. 100 µg protein 96'lık plakaların kuyucuklarına aktarılmış ve üzerine kaspaz özgül substratlar ilavesi edilerek plaka 2 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda, reaksiyonlar plaka 400 nm dalga boyunda, plaka okuyucuda (Bio-Tek, ELx808-IU) okutulmuştur.

2.2.3.3. DNA fragmentasyonunun agaroz jel elektroforezi ile analizi

DNA fragmentasyonu yöntemi, Quick Apoptotic DNA Ladder kiti'nin önerdiği şekilde uygulanmıştır.

NS20Y ve C6 hücreleri, sırayla 7×10^5 ve 6×10^5 sayıda 75 cm^2 'lik flasklara ekilmişlerdir. Hücreler, bor bileşenlerinin IC_{50} dozunun bir alt konsantrasyonu ile 48 saat inkübe edilmiştir. 7,5 mM susuz boraks, 0,25 mM sodyum perborat, 2 mM potasyum perborat NS20Y hücrelerine uygulanmıştır. 0,5 mM susuz boraks, 10 mM sodyum perborat, 0,1 mM potasyum perborat C6 hücrelerinin besiyerine ilave edilmiştir. İnkübasyon sonunda, 3×10^6 hücre santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. 200 μl PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine 105 μl liziz tamponu ilave edilip nazikçe pipetleyerek karıştırılmış ve ardından 45 μl enzim A solüsyonu ilave edilerek, 37°C 'de 10 dakika, 15 μl Enzim B ilavesi yapılarak 50°C 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda, her bir örneğe sırasıyla 15 μl amonyum asetat ve 150 μl izopropanol eklenip iyice karıştırılmıştır. -20°C 'de 10 dakika inkübasyonun ardından DNA'nın çökmesi için 13000 rpm'de ($+4^\circ\text{C}$) 10 dk santrifüj edilmiştir. Dipte toplanan DNA, 1,5 ml % 70'lik etanol ile nazikçe yıkanmış ve tekrar 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. DNA'dan etanolün tamamen uzaklaşmasını sağlamak için, tüpler ağzı açık şekilde oda sıcaklığında 2-3 saat bekletilmiş, 30 μl DNA süspansiyon tamponu ile DNA pelleti dağıtılarak agaroz jel için hazır hale getirilmiştir. İzole edilen DNA'nın görüntülenmesi amacıyla, % 1,2'lik Agaroz jel hazırlanmış ve içerisine 0,5 $\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür solüsyonundan 5 μl eklenerek elektroforez tankına dökülmüştür. Jel donduktan sonra, yükleme boyasıyla karıştırılan 30 μl DNA her bir kuyuya yüklenmiş ve marker olarak Sigma 123 bp DNA ladder kullanılmıştır. 5 V/cm elektrik akımı altında 1-2 saat boyunca DNA'nın yürümesi sağlanmıştır. Jel UVP jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

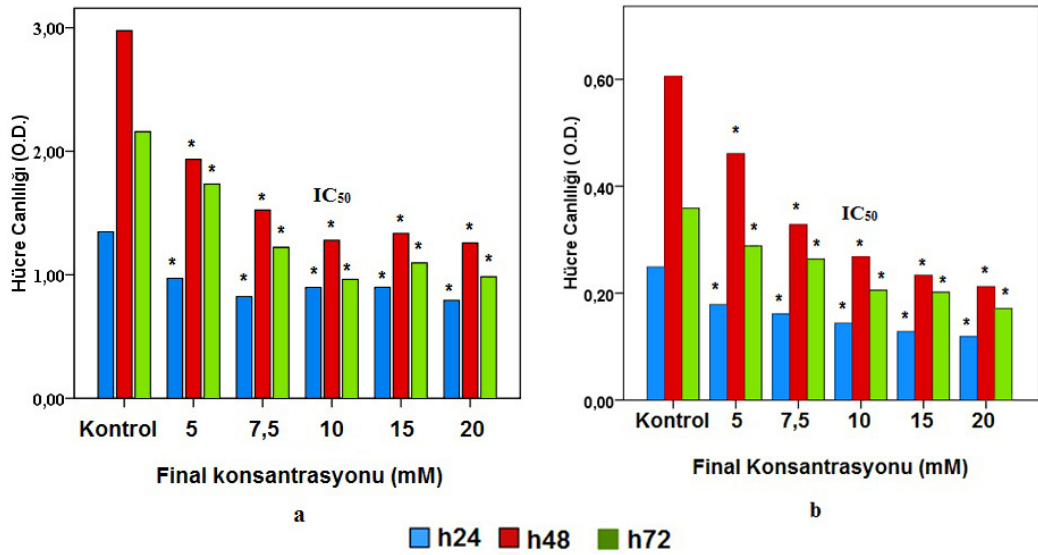
3. BULGULAR

3.1. Sitotoksik Etkiler

Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenleri materyal yöntemde açıklanan konsantrasyonlarda NS20Y ve C6 hücrelerine uygulanmış, MTT ve NR yöntemlerinin sonucuna göre her bir bor bileşiğinin her bir hücre için IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. IC₅₀'nin bir düşük konsantrasyonu apoptoz belirleme yöntemlerinde kullanılmıştır.

3.1.1. Susuz boraks

NS20Y hücrelerinde uygulanan 2,5 ve 1 mM konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu görülmüş, 25 mM dozunun hücreler için sitotoksik olduğu belirlendiğinden değerlendirmeye alınmamıştır. Yeni doz aralıkları 20, 15, 10, 7,5 ve 5 mM olarak belirlenmiştir.



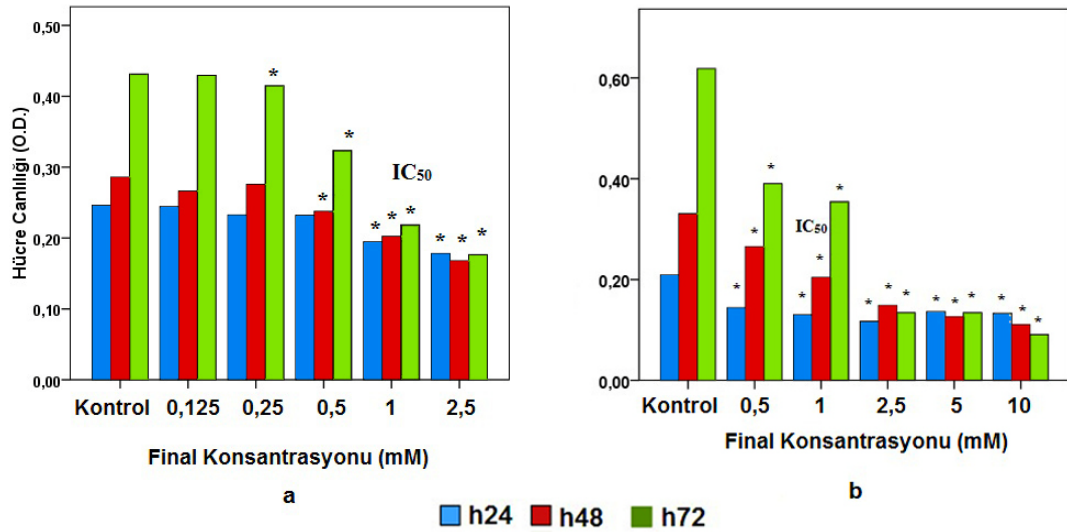
Şekil 3.1. Susuz boraksın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alım (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

Şekil 3.1(a)'da; Susuz boraks uygulamasının ardından 24 saat sonra hücrelerdeki sitotoksik etkisi bütün konsantrasyonlarda birbirine yakın değerlerde

çıkmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında hücre canlılığında azalma olmasına karşın, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark görülmemiştir. 48 saat sonunda ise hücre canlılığında doza bağlı belirgin bir azalma gözlenmiştir.

MTT ile belirlenen uygun konsantrasyonlar NR testinde de uygulanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Şekil 3.1 (b)'de; 24 saat inkübasyon sonunda, susuz boraksın, NS20Y hücre üzerinde lizozomal aktiviteye dayalı sitotoksik etkisinde anlamlı farklılık görülmemiştir. 48 saat sonunda, 10 mM susuz boraks'ın hücre sayısını yarıya azalttığı gözlenmiş ve susuz boraksın IC₅₀ dozunun 10 mM olduğu belirlenmiştir. Apoptoz belirleme testlerinde IC₅₀'nin bir düşük konsantrasyonu (7,5 mM) kullanılmıştır.

C6 hücrelerinde, belirlenen yeni dozların 24 ve 48 saatlik etkisinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir (Şekil 3.2.a). 72 saat sonunda 1mM'lık konsantrasyonunun hücre sayısını kontrole göre yarı yarıya azalttığı görülmüştür.



Şekil 3.2. Susuz boraksın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alımı (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

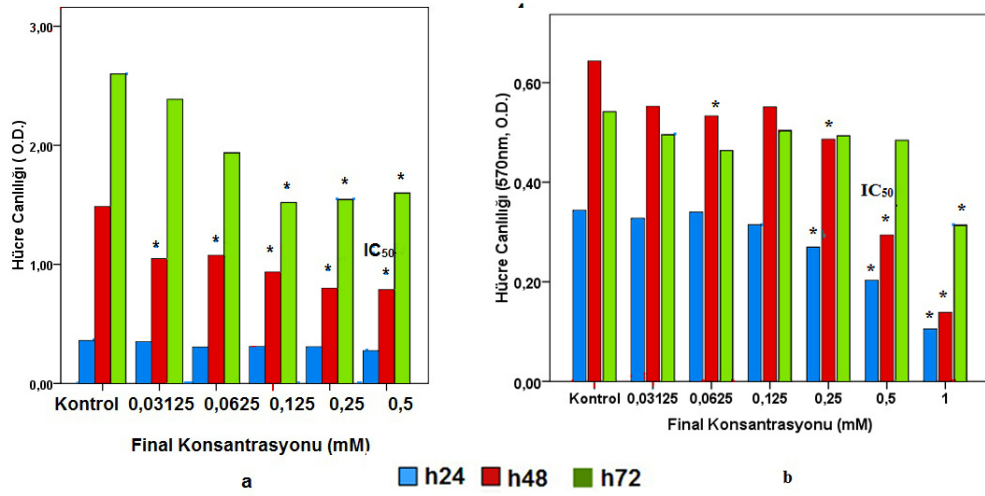
0,125 ve 0,25 mM susuz boraks konsantrasyonlarının C6 hücrelerinde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı MTT testiyle belirlendikten sonra, NR testinde bu iki konsantrasyonlar uygulanmamış ve çalışmalara 0,5, 1, 2,5, 5 ve 10 mM konsantrasyonları ile devam edilmiştir. Şekil 3.2 (b) incelendiğinde, 24 saat

sonunda bütün konsantrasyonların hücredeki sitotoksik etkisinin birbirine yakın olduğu ve kontrole kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. 48. saatte hücre sayısında doza bağlı bir azalma gözlenirken 72 saat sonunda 1 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda ani bir düşüş gözlenmiştir. Susuz boraksın, C6 hücresinde susuz boraksın IC₅₀ değerinin 48 saatte 1 mM olduğuna karar verilmiştir. Apoptoz belirleme yöntemlerinde IC₅₀ değerinin bir düşük konsantrasyonu olan 0,5 mM'ın kullanılması uygun görülmüştür.

3.1.2. Sodyum perborat

MTT testinin sonuçlarına göre, 24 saatlik inkübasyon sonunda NS20Y hücrelerinde sodyum perboratın hiçbir konsantrasyonunun sitotoksik etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Ancak, 48 ve 72. saatlerde hücre sayısında doza bağlı azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5 (a)).

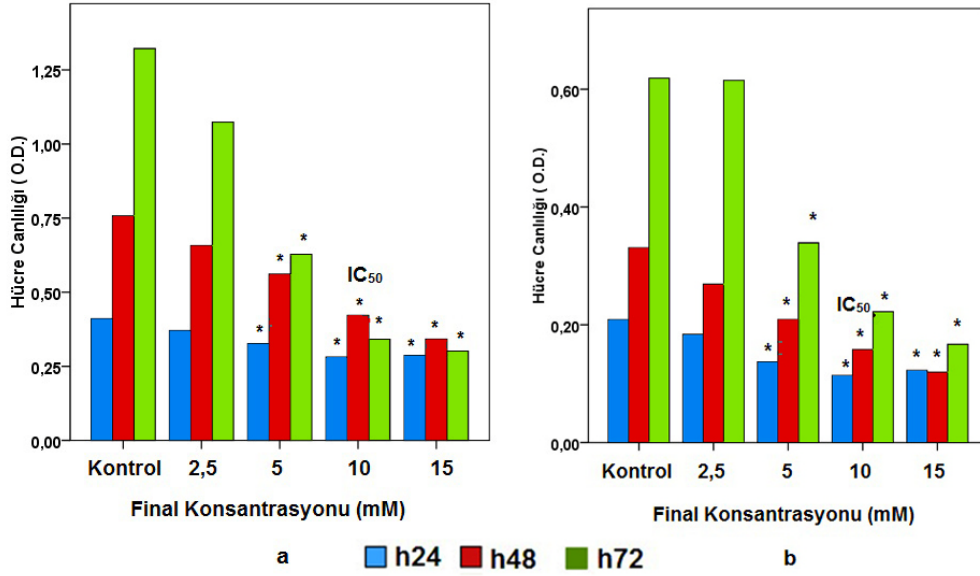
NR testinde, MTT yönteminde çalışılan konsantrasyonlar aynen uygulanmıştır. NS20Y hücresinde sodyum perboratın 0,5 ile 0,25 mM konsantrasyonlarının hem 24 hem de 48. saatlerde sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. 72. saatin sonunda hücre sayısındaki doza bağlı azalmanın diğer inkübasyon sürelerine göre daha az oranda gerçekleştiği görülmüştür. Bu değerlendirmeler sonucunda kontrole oranla en uygun IC₅₀ değerinin 48 saatte 0,5 mM olduğu belirlenmiş (Şekil 3.5 (b)) ve apoptoz belirleme yöntemlerinde IC₅₀ değerinin bir düşük konsantrasyonu olan 0,25 mM'ın kullanılması uygun görülmüştür



Şekil 3.3. Sodyum perboratın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alımı (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

C6 hücrelerinde sodyum perborat etkisiyle (Şekil 3.6 (a)) 24. saatte hücre sayısında anlamlı bir azalma görülmemiştir. 48. ve 72. saatte hücre sayısında doza bağlı etki gözlenmiştir.

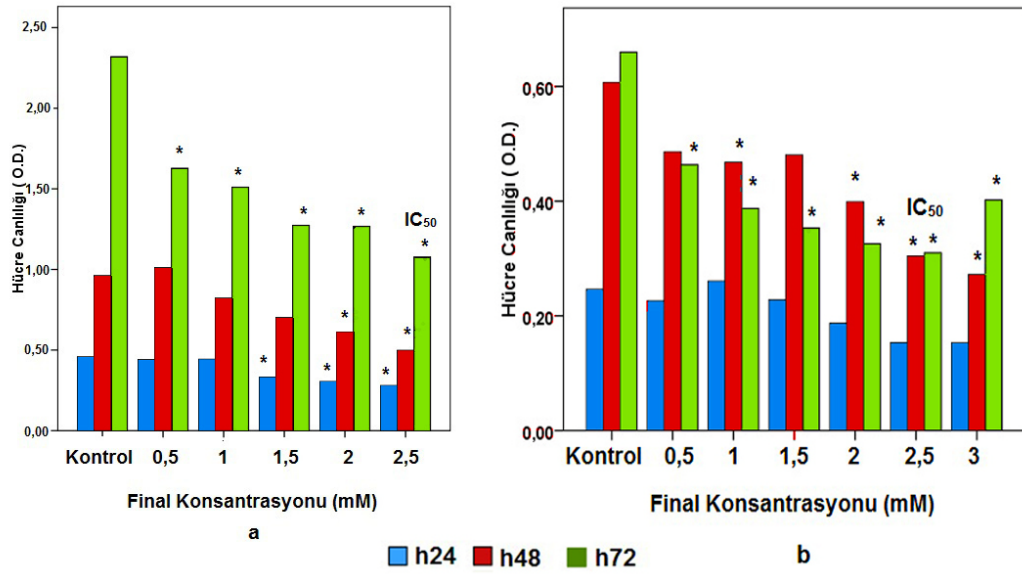
Sodyum perboratın C6 hücresinde MTT ile belirlenen sitotoksik etkisi NR testi ile de doğrulanmıştır. Şekil 3.6 (b) incelendiğinde; 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda hücre sayısında doza bağlı zayıf bir azalma meydana gelmiştir. 72. saatte 2,5 mM'dan daha yüksek konsantrasyonlarda hücre sayısının belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Her iki yöntemin sonucuna göre sodyum perboratın C6 hücrelerindeki IC_{50} değerinin 48. saatte 10 mM olduğu belirlenmiş ve apoptoz belirleme yöntemlerinde IC_{50} değerinin bir düşük konsantrasyonu olan 5 mM'ın kullanılması uygun görülmüştür.



Şekil 3.4. Sodyum perboratın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alımı (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

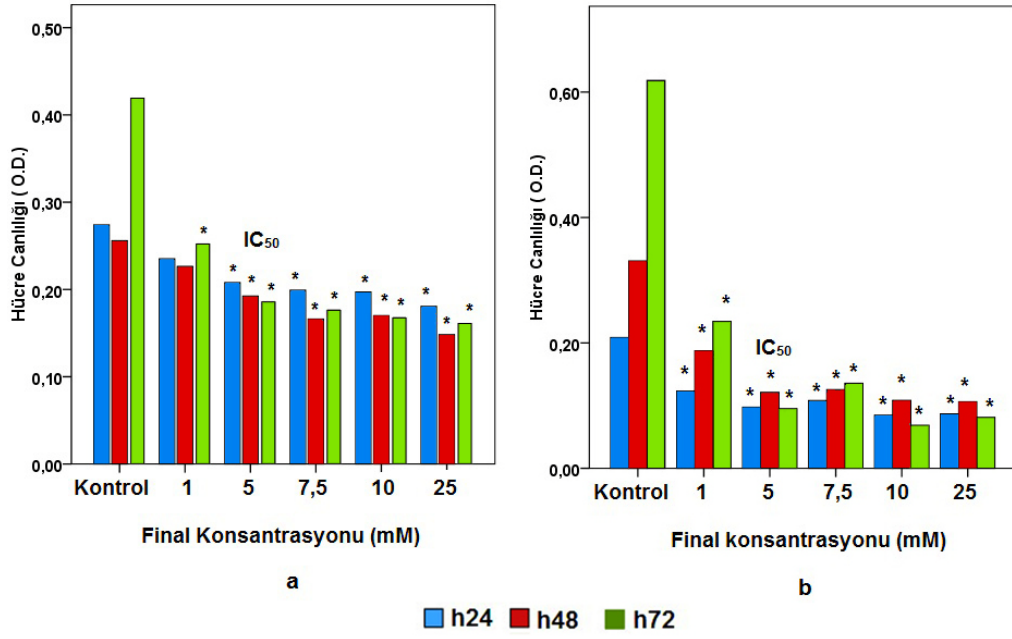
3.1.3. Potasyum perborat

Potasyum perborat'ın NS20Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde 24. saatte hücre sayısında doza bağlı anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. 48 saatlik sitotoksik etkide doza bağlı zayıf bir artış gözlenmiş, 72. saatte ise doza bağlı anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7 (a)). NR testi ile belirlenen sitotoksik etki de MTT sonuçlarına benzerlik göstermektedir (Şekil 3.7 (b)). Her iki testin sonuçları incelendiğinde potasyum perboratın NS20Y hücrelerindeki IC₅₀ değerinin 2,5 mM olduğuna belirlenmiş ve apoptoz belirleme yöntemlerinde IC₅₀'nin bir düşük konsantrasyonu olan 2 mM kullanılmıştır.



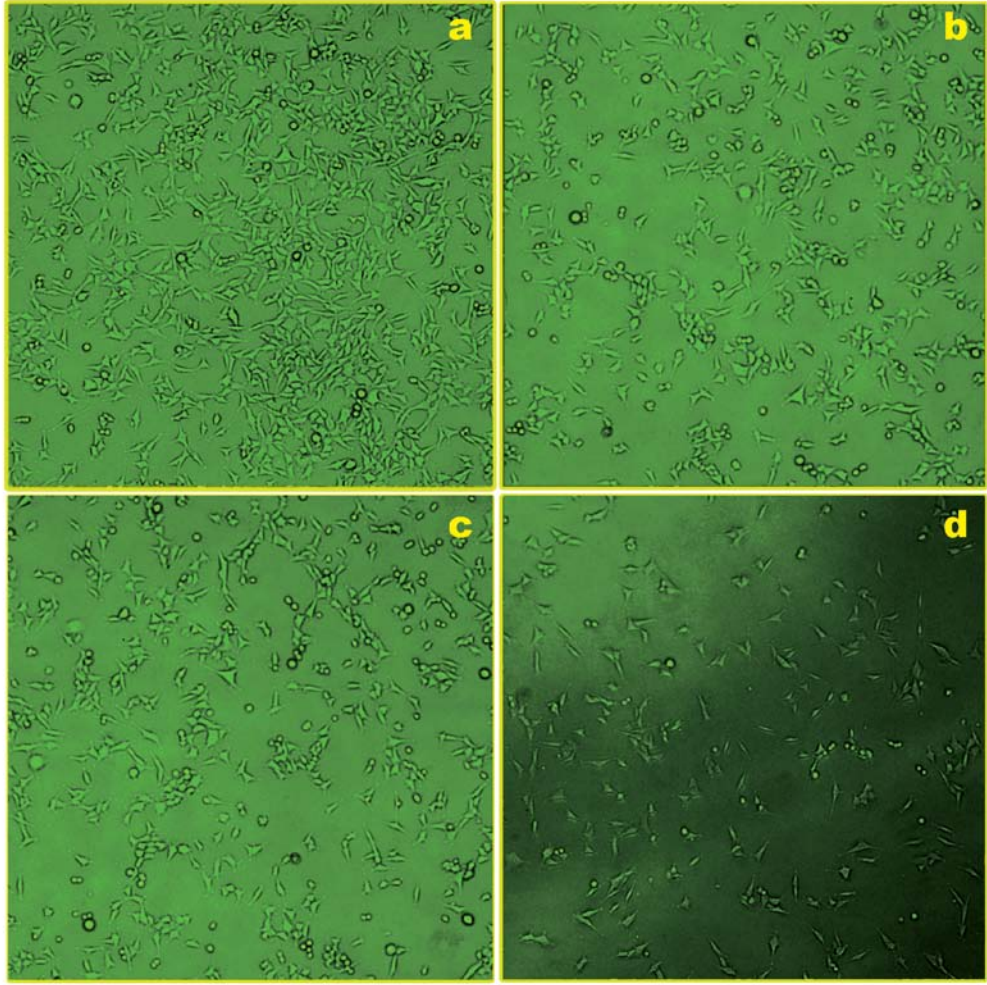
Şekil 3.5. Potasyum perboratın, NS20Y hücresi üzerindeki sitotoksik etkinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alımı (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

Şekil 3.8 (a) incelendiğinde, potasyum perborat'ın C6 hücreleri üzerinde 24 ve 48. saatlerde doza bağlı zayıf bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülürken 72. saatte sitotoksik etkide doza bağlı anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. NR sonuçlarına bakıldığında (Şekil 3.12) 24. saatte doza bağlı zayıf bir sitotoksik etki görülürken, 48 ve 72. saatlerde bu etkide doza bağlı daha anlamlı bir artış gözlenmiştir. Her iki çalışmanın sonucu değerlendirildiğinde, potasyum perborat-ın C6 hücresinde IC_{50} değerinin 48. saatte 5 mM olduğu belirlenmiş ve apoptoz belirleme yöntemlerinde IC_{50} 'nin bir düşük konsantrasyonu olan 1 mM kullanılmıştır.

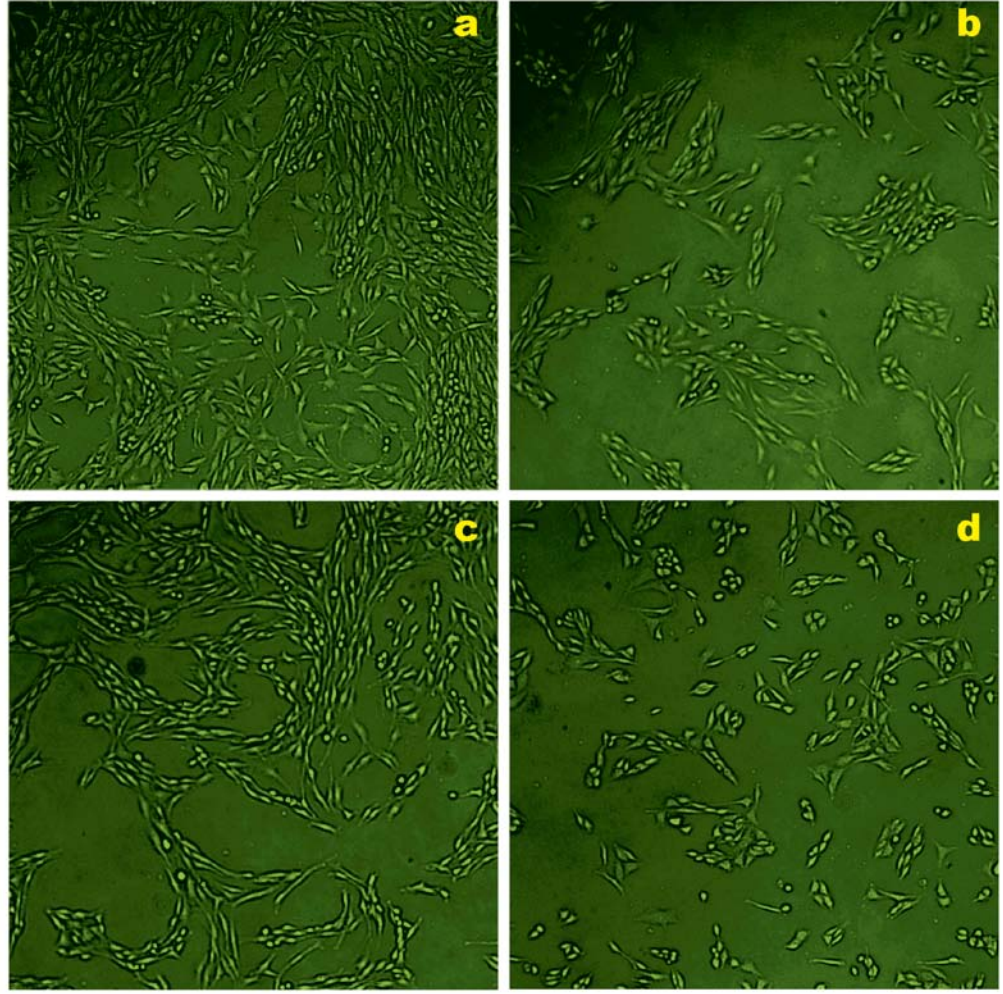


Şekil 3.6. Potasyum perboratın, C6 hücresi üzerindeki sitotoksik etkisinin MTT (a) ve Nötral kırmızısı alımı (b) testi ile değerlendirilmesi. (*) işareti kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,001$)

NS20Y hücrelerinin bor bileşenleriyle 48 saat inkübasyonu sonunda morfolojik görüntüleri (şekil 3.7) inverted mikroskopta (X71 Olympus) incelendiğinde; susuz boraksın (7,5 mM), sodyum perboratın (0,25 mM) ve potasyum perboratın (2 mM) etkisiyle hücre proliferasyonunda kontrole göre yaklaşık % 50 azalma gözlenmiştir. NS20Y hücrelerinin kontrol grubunda, hücreler birbirine yapışık küçük kümeler halinde görülürken, susuz boraks ve sodyum perborat bileşenlerinin etkisinde hücrelerin birbiriyle etkileşiminin zayıf, kümeleşmenin oldukça az ve hücre morfolojisinin daha yuvarlak olduğu görülmüştür. Potasyum perboratın etkisiyle hücre etkileşimlerinin oldukça zayıf olduğu ve kümeleşmenin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.7. NS20Y hücrelerinde kontrol (a), susuz boraks (b), sodyum perborat (c) ve potasyum perboratın (d) 48. saat inkübasyon sonrasındaki IC₅₀ doz etkisinin inverted mikroskop görüntüleri (X200). Hücre proliferasyonunda doz artışına paralel olarak bir azalma ve hücre morfolojisinde yuvarlaklaşma, büzülme, gibi değişimler gözlenmektedir.



Şekil 3.8. C6 hücrelerinde kontrol (a), susuz boraks (b), sodyum perborat (c) ve potasyum perboratın (d) 48. saat inkübasyon sonrasındaki IC₅₀ doz etkisinin inverted mikroskopta ki görüntüleri (X200). Hücre proliferasyonunda doz artışına paralel olarak bir azalma ve hücre morfolojisinde yuvarlaklaşma, büzülme gibi değişimler gözlenmektedir.

C6 hücrelerinin bor bileşenleriyle 48 saat inkübasyonu sonunda morfolojik görüntüleri (şekil 3.8) inverted mikroskopta (X71 Olympus) incelendiğinde; susuz boraksın, sodyum perboratın ve potasyum perboratın etkisiyle hücre proliferasyonunda kontrole göre yaklaşık % 50 azalma gözlenmiştir. C6 hücrelerinin kontrol grubunda, iğ şeklinde olan hücrelerin birbirleriyle etkileşiminin fazla olduğu görülürken, susuz boraks (0,5 mM) etkisinde hücrelerin birbiriyle etkileşiminin zayıf olduğu, oval şeklini alan hücrelerin küçük kümeler

oluşturdukları, sodyum perboratın (5 mM) etkisinde hücre etkileşimlerinin daha fazla, hücre morfolojisinin kontrol grubuyla hemen hemen aynı görünümde olduğu gözlenmiştir. Potasyum perboratın (1 mM) etkisiyle ise hücrelerin birbirleriyle etkileşiminin oldukça zayıf olduğu, hücrelerin daha yuvarlak ve kümeleşmenin oldukça az olduğu görülmüştür.

3.2. Mitokondriyel Zar Bütünlüğü Testi

Mitokondri zar bütünlüğü belirleme yöntemi daha öncede açıklandığı üzere, sağlıklı ve apoptotik hücrelerin mitokondri zarlarında ve sitoplazmalarında biriken özel bir florasan boyanın yaydığı ışımının florasan mikroskopuyla görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Florasan boyanın sağlıklı hücrelerde mitokondri matriksinde birikmesiyle hücrenin parlak kırmızı renkte görünmesine sebep olmaktadır. Apoptoza uğramış hücrelerde ise mitokondri zar bütünlüğü bozulduğu için boya mitokondride birikmediği için sitoplazmada monomerik yapıda kalmaktadır ve böylece apoptotik hücreler parlak yeşil renkte görülmektedir. Florasan boyanın yaydığı sinyaller florasan mikroskopunda (Olympus IX70) FITC veya Rhodamine filtreleriyle incelenmektedir (Heiden ve ark. 1997). Bu çalışmada susuz boraks, soydum perborat, potasyum perborat bileşenlerinin sitotoksosite çalışmalarıyla belirlenen konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak da hücreleri apoptoza sürüklediği bilinen ve kanser tedavisinde kullanılan Cis-platin (7,5 mM) uygulanmıştır. İncelenen preparatlardan her bir örnek için normal ve apoptoza uğrayan toplam 5000 hücre sayılmış ve yüzde ifadelerine dönüştürülmüştür.

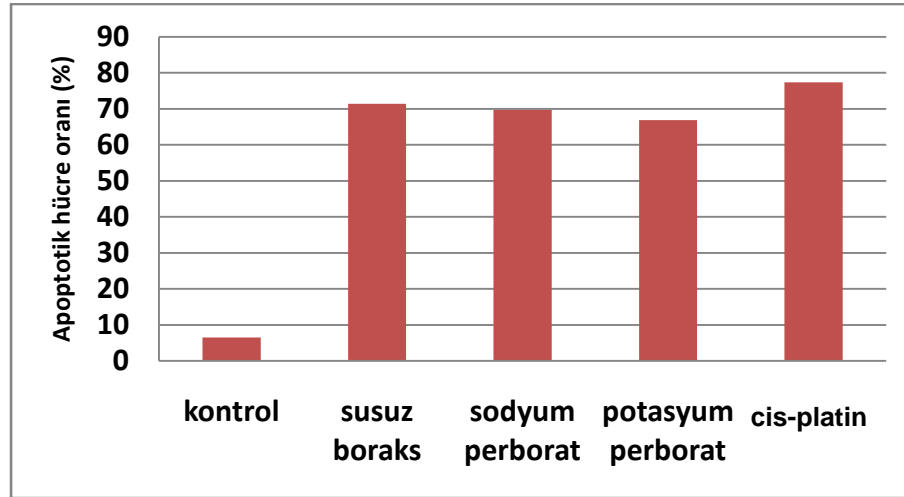
3.2.1. Bor bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde mitokondriyel zar bütünlüğü üzerine etkileri

Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat'ın NS20Y hücrelerinde apoptotik etkileri morfolojik olarak gözlemlenmiştir. Toplam 5000 hücre içerisinde normal ve apoptotik hücreler sayılmış, % apoptoz oranları belirlenmiş ve grafikler çizilmiştir. (Şekil 3.9) Hücreler floresan mikroskopta fotoğraflanmış ve Şekil 3.10'da sunulmuştur. Kontrol hücreleriyle kıyaslan-

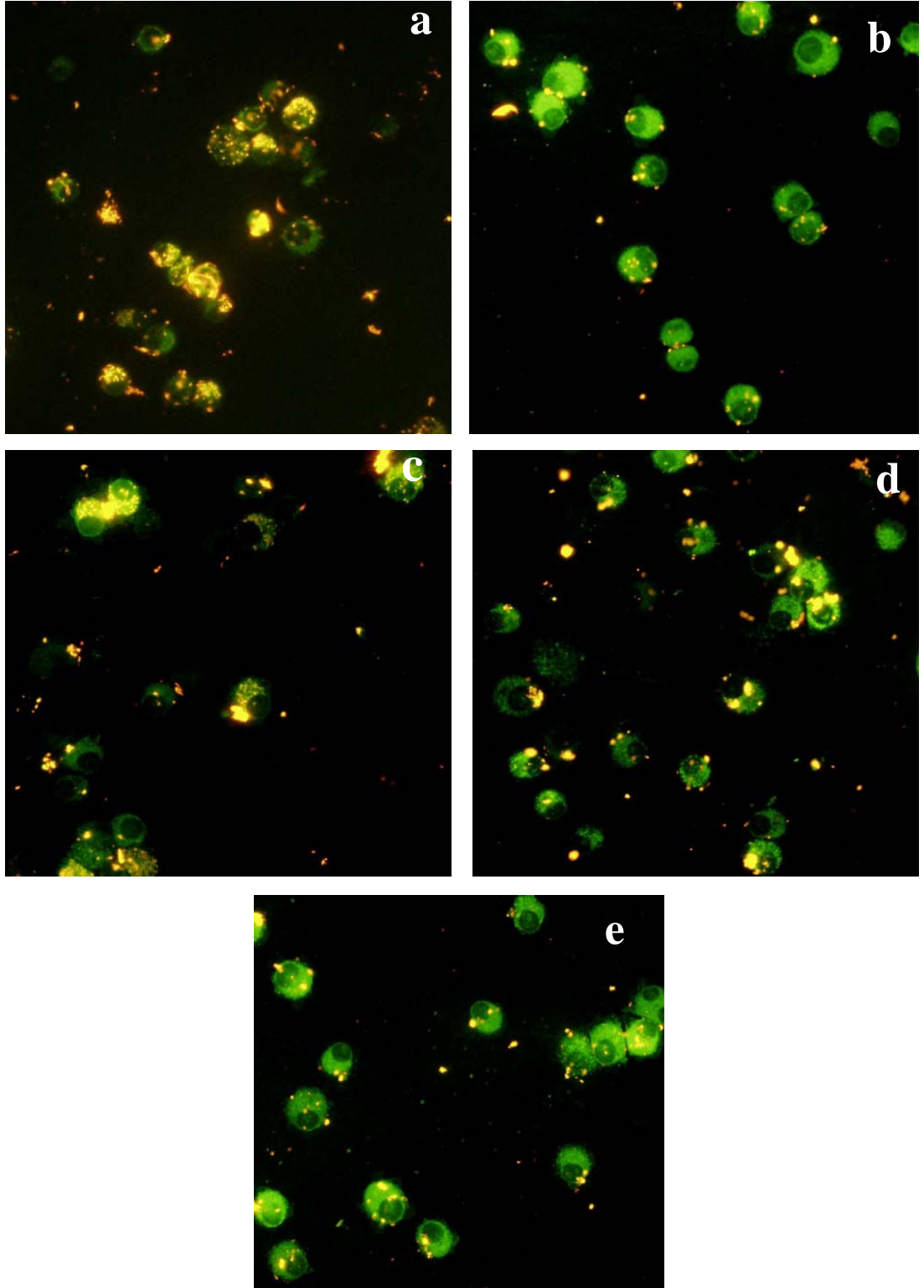
dığında susuz boraks'ın % 71,38, sodyum perborat'ın % 69,68 ve potasyum perborat'ın % 66,88 oranında apoptotik etkiye sahip olduğu görülmüştür. NS20Y hücreleri normal morfolojilerinden farklı olarak yuvarlak ve büzüşmüş şekilde gözlenmiştir.

Çizelge 3.1. Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde 48 saat inkubasyon sonrası apoptoz üzerine etkilerinin sayım ve % oranları

NS20Y	Mitokondriyal Zar Bütünlüğü Testi		
	Toplam Hücre Sayısı	Apoptotik Hücre	
		Sayısı	Oranı %
Kontrol	5000	324,5	6,49
SusuzBoraks (7,5 mM)	5000	3569	71,38
Sodyum Perborat (2 mM)	5000	3484	69,68
Potasyum Perborat (2 mM)	5000	3344	66,88
Cis Platin (7,5 mM)	5000	3868,5	77,37



Şekil 3.9. Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde 48 saat inkubasyon sonrası apoptoz üzerine etkileri.



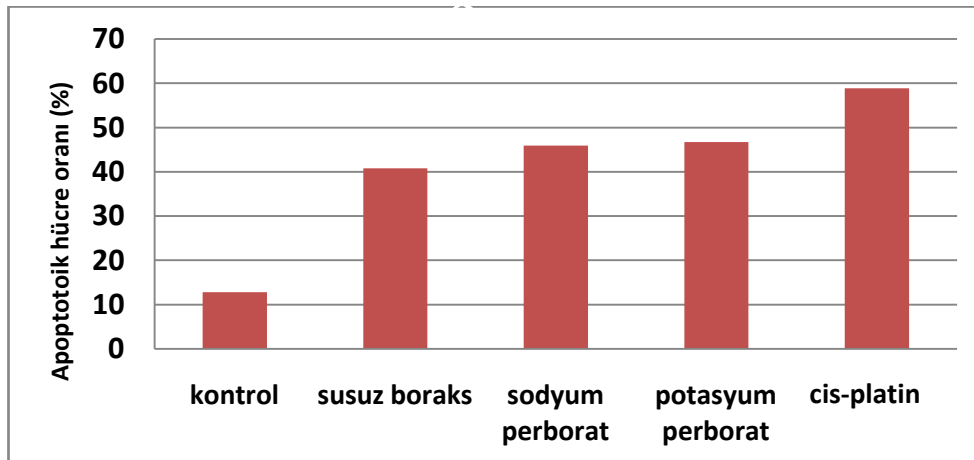
Şekil 3.10. NS20Y hücrelerinde 48 saat sonra susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin apoptotik etkilerinin mito-capture boyama ile değerlendirilmesi. Sarı-kırmızı sağlıklı hücreleri, yeşil apoptotik hücreleri göstermektedir. Kontrol, b. Cis-platin (7,5 mM), c. Susuz boraks (7,5 mM), d. Sodyum perborat (0,25 mM), e. Potasyum perborat (2 mM) (x400)

3.2.2. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde mitokondriyel zar bütünlüğü üzerine etkileri

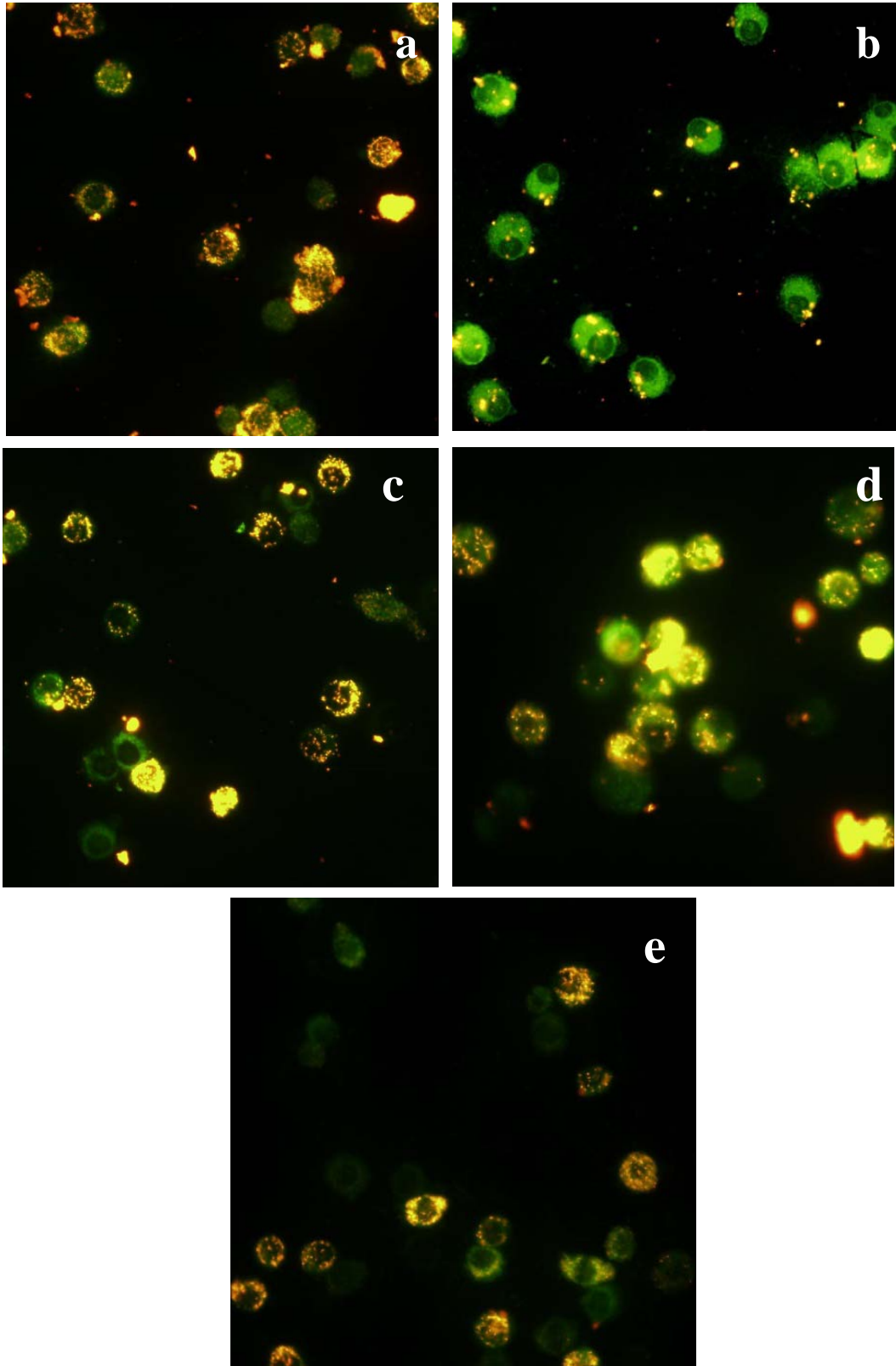
Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat uygulanan C6 hücrelerinde apoptotik etkiler morfolojik olarak gözlemlenmiştir. Toplam 5000 hücre içerisinde normal ve apoptotik hücreler sayılmış, % apoptoz oranları belirlenmiş ve grafikler çizilmiştir (Çizelge 3.2). Hücreler floresan mikroskopta fotoğraflanmış ve Şekil 3.11’de sunulmuştur. Kontrol hücreleriyle kıyaslandığında potasyum perborat’ın % 46,73, sodyum perborat’ın % 45,89 ve susuz boraks’ın % 40,75 oranında apoptotik etkiye sahip olduğu görülmüştür. C6 hücreleri iğ şeklindeki morfolojisinden farklı olarak yuvarlak ve büzüşmüş şekilde gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.2. C6 hücrelerinde 48 saat inkubasyon sonrası susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin apoptoz üzerine etkilerinin sayım ve % oranları

C6	Mitokondriyel Zar Bütünlüğü Testi		
	Toplam hücre sayısı	Apoptotik hücre	
		Sayısı	Oran (%)
Kontrol	5000	741	12,82
Susuz boraks (0,5 mM)	5000	2037,5	40,75
Sodyum perborat (5 mM)	5000	2294,5	45,89
Potasyum perborat(1 mM)	5000	2336,5	46,73
Cis-platin (7,5 mM)	5000	2944	58,88



Şekil 3.11. Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin C6 hücrelerinde 48 saat inkubasyon sonrası apoptoz üzerine etkileri.



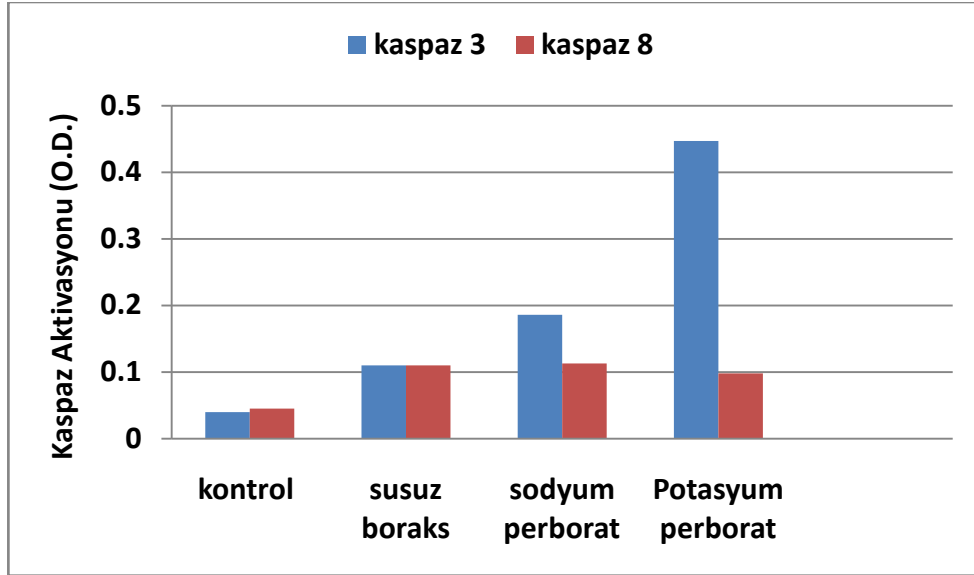
Şekil 3.12. C6 hücrelerinde 48 saat sonra susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin apoptotik etkilerinin mito-capture boyama ile değerlendirilmesi. Sarı-kırmızı sağlıklı hücreleri, yeşil apoptotik hücreleri göstermektedir a. kontrol, b. Cisplatin (7,5 mM), c. susuz boraksın (0,5 mM), d. sodyum perborat (5 mM), e. potasyum perborat (1 mM) (x400)

3.3. Kaspaz 3 / 8 Aktivasyon Belirleme Testleri

Bor bileşenlerinin, kaspaz 3 / 8 aktivasyonları üzerine etkisi NS20Y ve C6 hücrelerinde gözlemlenmiştir. Susuz boraks NS20Y hücrelerinin kaspaz 3 aktivasyonunda yaklaşık 3 katı artışa neden olurken sodyum perborat yaklaşık 4,5 kat, potasyum perborat ise yaklaşık 11 kat artışa sebep olmuştur. Diğer yandan her üç bor bileşiği kaspaz 8 aktivasyonunda yaklaşık 2,5 kat artışa neden olmuştur (Çizelge 3.3 ve Şekil 3.13).

Çizelge 3.3. Bor bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi

NS20Y	Kontrol	Susuz boraks	Sodyum perborat	Potasyum perborat
Caspase 3	0,04	0,11	0,186	0,447
Caspase 8	0,045	0,11	0,113	0,098

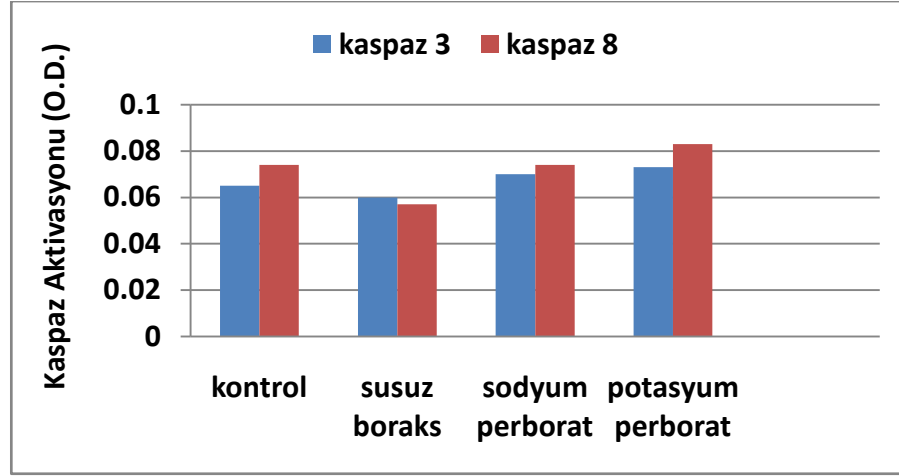


Şekil 3.13. Susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerinin NS20Y hücrelerinde kaspaz 3 ve 8 enzim aktivasyonları üzerine etkisi

C6 hücresinde test edilen bor bileşenlerinin kaspaz 3 ve 8 aktivasyonları üzerine etkilerinin birbiriyle benzer ve oldukça zayıf oranda olduğu gözlenmiştir. Susuz boraks ve sodyum perborat C6 hücresinin kaspaz 3 aktivasyonunda yaklaşık 1 kat artışa neden olurken potasyum perborat yaklaşık 1,5 kat artışa sebep olmuştur. Diğer yandan her üç bor bileşiğinin kaspaz 8 aktivasyonu üzerine etkisi kaspaz 3 ile aynı oranda gerçekleşmiştir (Çizelge 3.4 ve Şekil 3.14).

Çizelge 3.4. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi

C6	Kontrol	Susuz boraks	Sodyum perborat	Potasyum perborat
Caspase 3	0,060	0,062	0,068	0,089
Caspase 8	0,066	0,050	0,070	0.103

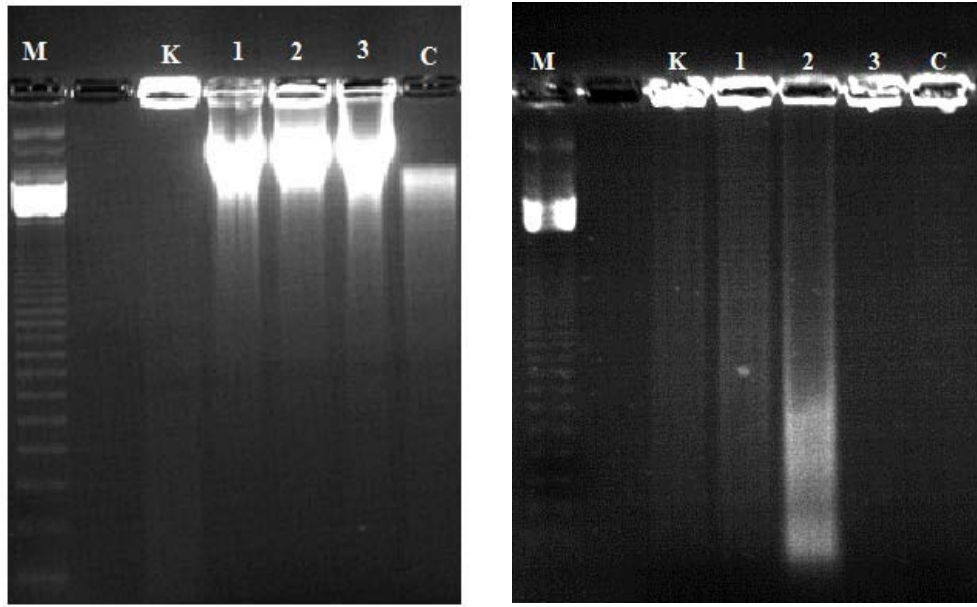


Şekil 3.14. Bor bileşenlerinin C6 hücrelerinde kaspaz 3/ 8 aktivasyonları üzerine etkisi

3.4. DNA Fragmentasyon Analizi

Test bileşenlerinin apoptotik etkilerinin belirlenmesi amacıyla olası DNA kırıklarının görüntülenmesi için Agaroz jel elektroforezi yöntemi Quick Apoptotic DNA ladder kiti (Biovision, K120) protokolüne göre uygulanmıştır. Apoptozun son evresinde DNA nükleozomlar arasından kırılarak agaroz jelde merdiven gö-

rüntüsü oluşturur. Çalışmada bor bileşenlerinin önceden belirlenen konsantrasyonlarıyla C6 hücreleri muamele edilmiştir. Kontrol hücrelerinin DNA'ları kırılmadan tek bir bant halinde gözlenirken (K sütunu), susuz boraksın C6 hücrelerinin DNA'larında düşük oranda kırılmaya yol açtığı ve sodyum perborat ile potasyum perboratın uygulandığı hücrelerin DNA'larında herhangi bir kırılmanın olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.15.b). Çalışmada kullanılan bor bileşiklerinin NS20Y hücre DNA'larında kırılmaya neden olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.15.a)



-a-

-b-

Şekil 3.15. NS20Y hücrelerine (a), C6 hücrelerine (b) bor bileşenlerinin DNA fragmentasyonuna etkisi. Molekül ağırlık markeri, K. Kontrol, 1. Sodyum perborat, 2. Susuz boraks, 3. Potasyum perborat, C. Cis-platin

Çizelge 3.5. Bor bileşenlerinin NS20Y ve C6 kanserli hücre hattında sitotoksik ve apoptotik etkilerinin gösterildiği genel sonuç tablosu.

		NS20Y Hücreleri	C6 Hücreleri
Susuz boraks	IC₅₀	48. saatte 7,5 mM	48. saatte 0,5 mM
	Mitokondri zar bütünlüğü (% apoptoz)	% 71	% 41
	Kaspaz aktivasyonu	Kaspaz 3; 3 kat artış Kaspaz 8; 2,5 kat artış	Kaspaz 3 ve 8; 1 kat artış
	DNA fragmentasyonu	Kırılma yok	Zayıf Kırılma etkisi
Sodyum perborat	IC₅₀	48. saatte 0,25 mM	48. saatte 5 mM
	Mitokondri zar bütünlüğü (% apoptoz)	% 70	% 46
	Kaspaz aktivasyonu	Kaspaz 3; 4,5 kat artış Kaspaz 8; 2,5 kat artış	Kaspaz 3 ve 8; 1 kat artış
	DNA fragmentasyonu	Kırılma yok	Kırılma yok
Potasyum perborat	IC₅₀	48. saatte 2 mM	48. saatte 1 mM
	Mitokondri zar bütünlüğü (% apoptoz)	% 67	% 47
	Kaspaz aktivasyonu	Kaspaz 3; 11 kat artış Kaspaz 8; 2,5 kat artış	Kaspaz 3 ve 8; 1,5 kat artış
	DNA fragmentasyonu	Kırılma yok	Kırılma yok

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya bor rezervlerinin %72'sinin bulunduğu ülkemizde bor; sanayi, teknoloji, sağlık alanlarında kullanılan değerli bir madendir. Borun, kemik gelişimi üzerindeki olumlu etkisinden (Bronner 2008) antibakteriyel ve antifungal aktivitelerine (Bursalı ve ark. 2011) kadar birçok özelliğinden sağlık alanında faydalanılmaktadır. Bunlara ek olarak, anti-kanser alanındaki çalışmalar da her geçen gün artmaktadır. Bu kadar geniş kullanım alanına sahip olan bor'un kanserli hücre hatları üzerindeki bilinen etkileri göz önüne alınarak çalışmamızda çeşitli bor bileşiklerinin iki farklı beyin tümörü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşenlerin normal ya da kanserli hücre hatlarında ki etkilerini gösteren bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamız nöroblastoma ve glioma kanser hücreleri üzerinde bor bileşenlerinin apoptotik etkisini araştırmak adına ilk ön çalışma niteliğindedir.

Su, toprak gibi canlıların yaşadığı her yerde bor bulunmakta ve canlılar için önemli mikrobelerini oluşturmaktadır. Bakterilerden memelilere kadar hemen hemen bütün canlılarda temel bir iz elementtir. Birçok çalışma göstermiştir ki; bor elementi bağışıklık fonksiyonlarıyla ilgili biyomoleküllerin yapısında bulunmakta, çeşitli biyokimyasal yollarda önemli ve özgün roller üstlenmektedir (Hunt 2003). Aynı zamanda bor embriyogenezdeki hücre farklılaşmasında, yara iyileşmesinde, kalsiyum ve kemik metabolizmasında, çok sayıda proteinin transkripsiyonunda ve translasyonunda önemli görevler üstlenmektedir. Ancak bor içeren ligandlar için özgül bir reseptör henüz karakterize edilmemiştir ve bu reseptörlerin fonksiyon mekanizması da bilinmemektedir (Dzondo-Gadet ve ark. 2002). Son yıllarda bazı bor içerikli biyomoleküllerin içerdikleri bor sayesinde ligandlarla dört tane koordine kovalent bağ oluşturabildikleri keşfedilmiştir. Diğer yandan, bor elementinin içinde bulunduğu kompleksi termodinamik olarak kararlı hale getirdiği de bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Hunt 2003).

Bitkilerde karbonhidrat metabolizmasında, hormon aktivasyonunda, tohum çimlenmesinde, damar sistemi elemanları olan ksilem ve floemin farklılaşmasında, hücre zarı yapısında ve fonksiyonunda borun önemli rol

oynadığı belirtilmiştir. Örneğin topraktaki bor eksikliği kök meristem hücrelerinin bölünmesini ve büyümesini engelleyerek bitki kökünün uzamasını durdurmaktadır (Dell ve Huang 1997). Tarım uygulamalarında bor konsantrasyonu arttıkça bitki büyümesinin baskılandığı sonucuna varılmıştır. Pamuk bitkisi üzerinde yapılan bir çalışmada, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 ppm bor içeren suyla sulanan bitkide dozun artışına bağlı olarak pamuk veriminde düşüş gözlemiştir. Düşük dozlarda bor uygulamasının pamuk verimini arttırmasına karşın doz artışı ile birlikte verim azalması borun bitkiler içinde bir iz element olduğunu göstermektedir (Uygan ve Çetin 2009).

Bor insanlar için de besinlerle günlük olarak alınması gereken iz elementler arasındadır. Diyetle alınan günlük bor miktarı arttırılan ve kısıtlanan iki deney gurubunda beyin fonksiyonlarındaki ve günlük aktivitelerdeki değişim incelenmiştir. Sağlıklı yaşlı kadın ve erkeklerden oluşan deney gruplarından birisi 3.25 mg/gün bor içeren diyetle beslendiğinde beyin fonksiyonlarında ve bilişsel performansında artış gözlenirken, 0,25 mg/gün bor içeren diyetle beslenen grupta ise yavaş aktivitelere eğilimin arttığı hızlı aktivitelere eğilimin ise azaldığı rapor edilmiştir (Penland 1994). Nielsen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, günlük bor alımında 0,25 mg'dan 3,25 mg'a kadar olan artışın menopoz sonrası kadınlarda plazma estradiol ve testosteron konsantrasyonunda artışa neden olduğu, idrarla kalsiyum atılımının azaldığı rapor edilmiştir (Nielsen ve ark. 1987). Diğer yandan Sheng ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada 5 hafta boyunca günlük diyetin 5 ppm bor ile desteklenen ovaryumları alınmış ratlar aynı zamanda östrojen ile muamele edilmişler. Sonuç olarak tek başına alındığında borun kemik parametreleri üzerinde etkili olmadığı fakat ovaryumları alınmış ratlara östrojen ile birlikte bor verildiğinde kemik kalitesi üzerine östrojenin faydalı etkilerini arttırdığı gösterilmiştir (Bronner 2008).

Bor'un erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada bor madeninde çalışan erkek işçiler ile bor'a maruz kalmayan erkeklerde kan, idrar ve semen parametrelerine bakılmıştır. Sonuç olarak iki grubun parametre değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Robbins ve ark. 2010).

Kutlu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada bor'un mutajenik aktivitesi araştırılmıştır. Kırka ilçesindeki Seydisuyu nehrinden alınan 4 su örneğinin içerdiği bor miktarları (3.755, 1.674, 1.568, 0.694 g/L) hesaplanmış ve

Salmonella typhimurium'un TA 98 ve TA 100 suşları üzerinde mutajenik etkisine bakılmıştır. Borun en yüksek konsantrasyonunda dahi mutajenik etkinin görülmediği rapor edilmiştir (Kutlu ve ark. 2007).

Bor bileşenlerinin genetik toksikoloji çalışmaları çeşitli prokaryot ve ökaryot canlılarda test edilmiştir. Bu çalışmalar sonunda borun canlılar üzerinde genotoksik ve mutajenik etkinliğine neredeyse hiç rastlanmamıştır (Türkez ve ark 2009). (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1. Prokaryot ve ökaryot canlılarda çeşitli bor bileşenlerinin genotoksik ve mutajenik etkinleri (Türkez ve ark 2009).

Hücre çeşitleri (Yöntem)	Bor bileşenleri	Sonuçlar
<i>E. coli</i> (Poli-A yöntemi)	Sodyum perborat	Pozitif
<i>S. typhimurium</i> (AMES yöntemi)	Borik asit	Negatif
<i>S. typhimurium</i> (AMES yöntemi)	Boraks	Negatif
Çin hamster hücreler Fare embriyo fibroblastları İnsan foreskin fibroblastları (Hücre kültürü yöntemi)	Rafine ve ham boraks kernit	Negatif
Çin hamster ovaryum hücreleri (CA ve SCE yöntemleri)	Borik asit	Negatif
Fare lenfoması (gen mutasyonu yöntemi)	Borik asit	Negatif
İnsan lenfoması (SCE yöntemi)	Borik asit	Negatif
İnsan lenfoması (SCE ve MN yöntemleri)	Kernit	Negatif

Alüminyumun toksik etkisi üzerinde borik asitin engelleyici rol üstlendiği *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Fare karaciğer hücreleri 5 mg/kg alüminyum klorid (AlCl₃) ile uyarılmış ve 4 gün sonra farelere 3,25, 13, 36, 58,5 mg/kg doz aralıklarında borik asit verilmiştir. Alüminyum bu hücrelerde alkalın fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), laktat dehidrojenaz (LDH) enzim seviyelerinin artışına sebep olmuştur. Düşük konsantrasyondaki borik asitin ALP (3,25 ve 13 mg/kg) ve LDH (3,25 mg/kg) enzim

aktivitelerini normal seviyeye getirdiği ve böylece alüminyumun karaciğer hücresi üzerinde toksik etkisini düşürüldüğü rapor edilmiştir (Türkez ve ark. 2011).

Bor bileşenlerinin kanserli hücre büyümesini baskılayan ya da tamamen yok eden mekanizmasının yanında sağlıklı hücreler üzerindeki etkisi de araştırılmaktadır. Fibroblast hücrelerinde yapılan çalışmada, borik asitin doğrudan proteaz aktivasyonunu sağlayarak ekstrasellüler matriksde depolanan sitokinlerin (TNF- α) salınımını gerçekleştirdiği, ayrıca NF κ B gibi transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna yol açarak dolaylı yoldan yara iyileştirme mekanizmasında görev aldığı rapor edilmiştir (Nzietchueng ve ark. 2002).

1960'lı yılların sonlarında geliştirilmiş ve beyin, melanoma gibi kanserlerin tedavisinde uygulanmaya başlanmış BCNT (Boron nötron yakalama tedavisi) yönteminin tıp alanındaki kullanımı her geçen gün artmaktadır (Yamamoto ve ark. 2008). Nötron bombardımanı sonrasında kanserli dokuya ulaşan ve parçalanan bor'un kanserli hücreleri yok etmesi prensibine dayanan bu yöntemde termal nötron (düşük enerjili nötron) ve çekirdekdeki kararlı bor izotopu (^{10}B) arasında meydana gelen reaksiyon sonucu, yüksek biyolojik etkinliğe sahip yoğun iyonize Helyum (He) ve Lityum (Li) çekirdeklerinin oluştuğu bildirilmiştir (Sauerweina ve Zurlob 2002). Yüksek enerjili bu çekirdekler tümör hücrelerini hedef alarak hücre DNA'sına zarar vermekte ve hücre bölünmesini engellemektedir (Azab 2006; Yamamoto ve ark. 2009). BNCT yönteminin beyin tümörlerinin yanı sıra; meme, troid, kolon kanserlerinde de kullanıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Dagrosa 2007; Dagrosa 2011; Yanagie ve ark. 2009). BCNT yönteminde kullanılan boronfenilalanin bileşiğinin C6 hücre döngüsünü baskıladığı bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Yoshida 2002).

Bor bileşenleri olan fenilboronik asit ve borik asitin kanser hücrelerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada prostat ve meme kanseri hücreleri üzerinde yapılmıştır. 1 μM fenilboronik asit prostat ve meme kanseri hücrelerinin göç etmesini anlamlı bir şekilde durdurmuş ancak kanserli olmayan prostat ve meme hücrelerinin göçü üzerine hiçbir etki göstermemiştir. Kanser hücrelerinin göçünü engelleyen bu bileşiğin hücrenin metastaz yeteneğinin kısıtladığı da yine aynı çalışmada belirtilmiştir (Bradke ve ark. 2008).

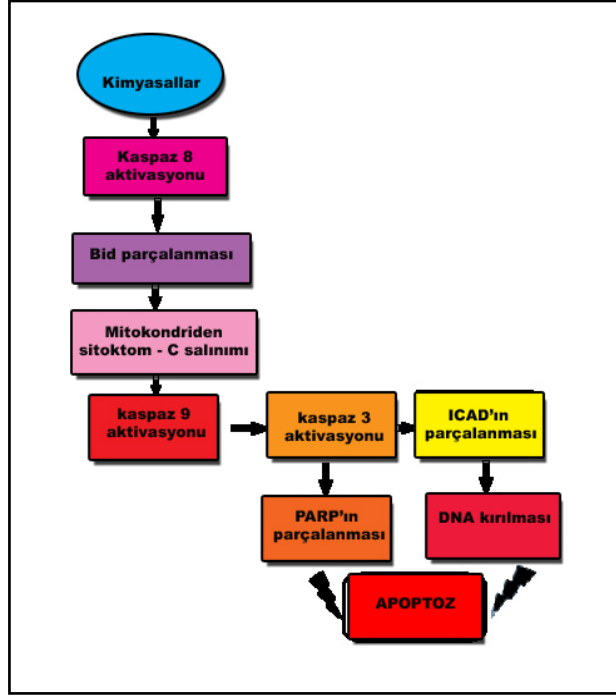
Toksisite testleriyle canlılık, hücre çoğalması ve ölümü gibi fizyolojik süreçler tespit edilmektedir (Longo-Sorbello 2006). Bor ve türevlerinin hücre

canlılığı üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda; borik asit uygulaması sonucu DU-145 ve LNCaP prostat kanseri hücre hatlarının çoğalmasında doza bağlı azalma gözlenmiştir. DU-145 hücrelerinin borik asite karşı daha hassas olduğu bildirilmiş, 500 ve 1000 μM borik asit konsantrasyonları DU-145 hücre hatlarında hücre çoğalmasını % 87 ve % 98 oranında durdurduğu görülmüştür. Ayrıca tümör olmayan prostat hücre hatları PWR-1E ve RWPE-1' in gelişimini de baskıladığı rapor edilmiştir (Barranco ve Eckhert 2004). Kübik boron nitrit bileşiğinin insan nöroblastoma (NB-1) ve eklem kondrositleri (nHAC-kn) üzerindeki sitotoksikite çalışmasında ise 40 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozun hücre çoğalmasını baskıladığı gözlenmiştir (Koga 2006). Yapılan *in vivo* çalışmalarda; lipozomlara bor izotopu B^{10} 'un 782,77 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ 'lik miktarı gamma ışını aktivasyonu ile aktarılarak borlu immunolipozomlar elde edilmiştir. Fare pankreas tümör hücrelerine, borlu immunolipozomlar doğrudan enjekte edildiğinde tümör büyümesini baskıladığı ve tekrardan gelişim göstermediği rapor edilmiştir (Yanagie ve ark. 1997; Yang 2011).

Bizim çalışmamızda, NS20Y hücrelerinde susuz boraksın 10 mM'ın üzerindeki 48. saatte sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür. Apoptoz belirleme çalışmalarında kullanılan 7,5 mM susuz boraksın % 71 oranında mitokondri aracılığıyla apoptoza yol açtığı görülmüştür (Çizelge 3.5). Susuz boraksın gerek beyin tümörü hücrelerinde gerekse farklı kanser türlerinde etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmadığından dolayı bulgularımızın kıyaslanabileceği bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Alanında ilk ön araştırma olan bu tez çalışmasında, gözlenen apoptotik etkinin hem iç hem dış yolak aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Çünkü hem kaspaz 3 hem de kaspaz 8 aktivasyonunda yaklaşık 3 kat artış olduğu bulunmuştur. Anto (2002) ve Ashkenazi (2008) adlı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda çeşitli kimyasallar aracılığıyla iki farklı apoptoz mekanizmasının aktif olabileceği gösterilmiştir. Bunlardan biri, pro-apoptotik protein olan Bax'ın anti-apoptotik Bcl-2'yi bloke etmesiyle mitokondri zar bütünlüğünün bozulması ve sitokrom-C'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle başlayan mekanizmadır (iç yolak). Bu mekanizma aynı zamanda, hücrenin maruz kaldığı çeşitli kimyasallara yanıt olarak kaspaz 8 aktivasyonundaki artışla da başlayabilir. Kaspaz 8 aktivasyonundaki artış sitoplazmik Bid proteinin aktivasyonu aracılığıyla pro-

apoptotik Bak ve Bax proteinlerinin mitokondri zar bütünlüğünü bozmasına yol açmaktadır (Tang ve ark. 1999). Diğer bir apoptoz mekanizmasında ise kaspaz 8 aktivasyonu aynı zamanda efektör kaspazlardan kaspaz 3'ün aktivasyonu aracılığıyla apoptozu doğrudan uyarabilmektedir (dış yolak). İç yolakta sitokrom-C'nin salınmasıyla birlikte kaspaz 3 aktivasyonunda artış görülmektedir. Yaptığımız çalışmanın bulgularında NS20Y hücrelerinde susuz boraks etkisiyle kaspaz 3 aktivasyonunda 3 kat artış görülmüştür. Aynı zamanda MitoCapture® bulguları da mitokondri zar bütünlüğünün bozulduğunu kanıtlamaktadır. Diğer yandan, kaspaz 8 aktivasyonunda da yaklaşık 3 katlık artışın görünmesi apoptoz mekanizmasının sadece iç yolaktan gerçekleşmediğini aynı zamanda kaspaz 8 aracılığıyla da apoptozun uyarıldığını düşündürmüştür.

Doğrudan kimyasalların etkisiyle ya da ölüm reseptörleri aracılığıyla uyarılan kaspaz 8 farklı yollarla da olsa kaspaz 3 aktivasyonunda artışa neden olmaktadır. Aktive olan kaspaz 3 molekülünün ICAD (inhibitor of caspase-3 activated DNase) aracılığıyla DNA kırılmasına yol açarak apoptozu gerçekleştirdiği Anto ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Anto ve ark. 2002). Ancak kaspaz 3 aktivasyonu diğer yandan, PARP aktivasyonu aracılığıyla da apoptozu yol açmaktadır (Şekil 4.1) ve bu yolak DNA kırılmasıyla sonuçlanmamaktadır (Boulares ve ark. 1999; Mc Gee ve ark. 2002). Bizim bulgularımızda iki kanserli hücre hattında da her üç bor bileşiğinin etkisiyle DNA kırılması tespit edilmemiştir. Uyguladığımız üç bor bileşiğinin de beyin tümörü hücrelerinde apoptozu PARP aktivasyonu aracılığıyla neden olduğu düşünülmüştür.



Şekil 4.1. Apoptotik iç yolakta PARP'ın aktivasyonu ile DNA kırılması olmaksızın gerçekleşen apoptoz mekanizması (Anto 2002).

Sodyum perborat yine nöroblastoma hücreleri üzerinde 0,5 mM'ın üzerindeki konsantrasyonlarda 48 saat sonunda sitotoksik etki göstermiştir. 0,25 mM sodyum perboratın bu hücrelerde mitokondri zar bütünlüğünü % 70 oranında bozduğu da belirlenmiştir. Kaspaz aktivasyonlarında ise susuz borakstakine benzer bir artış gözlenmiştir. Ancak sodyum perboratın apoptotik etki gösteren konsantrasyonu (0,25 mM) susuz boraksa (7,5 mM) göre oldukça düşüktür. Bu nedenle sodyum perboratın nöroblastoma hücrelerindeki apoptotik etkisinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Apoptoz mekanizmasının her iki bor bileşeninde benzer olduğu düşünülmektedir. Watanabe ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; sodyum perborat tetrahidratın, 4 bakteri suşunda (*Salmonella typhimurium*, TA102 ve TA2638; *Escherichia coli*, WP2/ pKM101 ve WP2 *uvrA*/ pKM101) mutajenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Watanabe ve ark. 1998). Bizim çalışmamızda 0,5 mM gibi düşük bir konsantrasyonda sitotoksik etkinin başladığı düşünülürse, gözlenen bu etkinin hücrede meydana gelen ölümcül mutasyonlar sonucu olabileceği tahmin edilmektedir.

Potasyum perborat bileşiğinin 2,5 mM ve üzerindeki dozlarının NS20Y hücrelerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Mitokondri zar bütünlüğünün bozulması üzerine diğer bor bileşenleriyle benzer etkiye (% 67) sahip olduğu da gözlenmiştir. Ancak bu bor bileşiğinin kaspaz aktivasyonlarına olan etkisi diğer bileşiklere göre farklılık gözlenmiştir. Kaspaz 3 aktivasyonu 11 kat artış gösterirken kaspaz 8 aktivasyonunda zayıf bir artış olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç gözlenen apoptoz mekanizmasının mitokondri ve apoptozom aracılı yolak ile gerçekleştiğini düşündürmüştür (Wu ve ark. 2011).

İleriki çalışmalarda apoptoz yollarında görev alan Bcl-2, Bid, ölüm reseptörleri, ICAD ve PARP gibi proteinlerin ekspresyon seviyelerinin ve aktivasyonlarının ölçülmesi ile nöroblastoma kanseri hücrelerinde susuz boraksın apoptotik etki mekanizması kesin olarak aydınlatılacaktır.

Glioma kanser hücrelerinde (C6) susuz boraks, sodyum perborat ve potasyum perborat bileşiklerinin sırasıyla 1, 10 ve 5 mM'ın üzerindeki konsantrasyonları sitotoksik aktivite göstermiştir. Her üç bileşen de bu hücrelerde zayıf apoptotik etki sergilemiştir. Mitokondri zar bütünlüğüne olan etkileri ortalama % 45 oranında gözlenmiştir. Kaspaz aktivasyonlarındaki değişime bakıldığında hem kaspaz 3 hem de kaspaz 8'in aktivasyonları oldukça zayıf (yaklaşık 1 kat) artış göstermiştir. Daha öncede belirtildiği gibi, test edilen üç bileşiğin her iki hücre hattında DNA kırılmasına etki etmediği gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak test edilen bor bileşenlerinin glioma hücreleri üzerinde anlamlı bir apoptotik etki sergilemedikleri sadece zayıf oranda sitotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Glioma kanseri hastalarında yaygın bir şekilde kullanılan BNCT yönteminde bor kaynağı olarak boraks, *p*-karboksi-fenilboronik asit, boronfenilalanin, sodyum borokaptat ve sodyum fenildodekaborat gibi bileşenler kullanılmıştır (Yoshida ve ark. 2002; Yamamoto ve ark. 2008; Yamamoto ve ark. 2009). Hücrenin boronfenilalanin bileşiğinden bor almasıyla gerçekleşen reaksiyonun sodyum borokaptat bileşiğinden alınan bor ile oluşan reaksiyondan 4 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yine bu çalışmada, borun tümör hücreleri tarafından alınması hücre döngüsünün farklı fazlarında değişiklik göstermiştir. Her bir bor bileşiğinin hücrelere verilmesinden 24 saat sonra hücre içindeki bor miktarları ölçüldüğünde, hücrelerin G₂/M fazlarında G₀/G₁ fazına göre daha fazla

bor içerdikleri belirlenmiştir. Boronfenilalanin uygulanan grupta C6 hücrelerinin içinde biriktirdiği bor miktarı hücre döngüsü fazlarına göre ölçüldüğünde, G2/M : G0/G1 oranının sodyum borokaptat'a göre yaklaşık 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu bulgular göstermiştir ki, bor bileşiklerinin hücre içine giriş mekanizmaları farklı olmakla birlikte metabolik aktivasyonları yüksek olan tümör hücrelerinin G2/M evrelerinde daha fazla bor alınımının gözlenmesi bor içeren bileşiklerin aktif taşıma gibi difüzyondan farklı mekanizmalarla hücreye alındığını göstermektedir. Çalışmamızda test edilen bor bileşenlerinin C6 hücreler üzerinde oldukça zayıf bir apoptotik etki sergilediği görülmüştür. Ancak glioma kanseri tedavisinde bor içeren bileşenlerin BNCT yönteminde kullanıldığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Yamamoto ve ark. 2009). Bu yöntemde borun hücreyi öldürdüğü mekanizmanın apoptozdan farklı olduğu bilinmektedir. Bizim bulgularımız da bu bilgiyi doğrulamaktadır. Glioma kanseri hücrelerinde borun hangi mekanizma ile etkili olduğunun kesin biçimde anlaşılabilmesi için farklı yöntemlerle test edilmesi, hücre ölüm yollarında rol alan proteinlerin ekspresyon ve aktivasyonlarının ortaya konması önemlidir.

Sonuç olarak, elde edilen bütün bulgular değerlendirildiğinde, nöroblastoma kanseri hücrelerinin test edilmiş olan bor türevlerine karşı glioma kanserinden daha fazla duyarlı olduğu gözlenmiştir. Bu farkın, bor bileşenlerinin hücrelerde başlattıkları apoptoz süreçlerinin mekanizmalarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kullanılan bor bileşenlerinin her iki kanser türünde de etkilerinin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması için ileri seviyede araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan bor içerikli bileşenlerin daha önce hiçbir kanser hücre hattında çalışılmadığı daha önceki bölümlerde bildirilmiştir. Bu nedenle ön çalışma niteliğindeki bulgularımızın farklı sitotoksik ve apoptotik etki belirleme yöntemleriyle de test edilmesi gerekmektedir. Ancak bu şekilde bu bileşenlerin sitotoksik ve apoptotik etkileri hakkında kesin sonuçlar ileri sürülebilir.

Çalışmamızın bundan sonraki aşamasında, tespit edilen sitotoksik ve apoptotik etkilerin mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için söz konusu yollarda işe karışan çok sayıda gen gruplarının ekspresyon seviyeleri ve süreleri, gen ürünlerinin birbirleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi

planlanmaktadır. Ayrıca, bu mekanizmaların farklı mekanizmalarla olan olası etkileşimlerinin de incelenmesi gerekmektedir. Test bileşenlerinin farklı kanser türleri üzerinde apoptotik etkilerin araştırıldığı çalışmalar laboratuvarımızda halen devam etmektedir.

Bor üzerine yapılan çalışmaların ilerlemesi ve bor bileşenlerinin ilaç ham maddesi olarak kullanılabilmesi yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına yol açacaktır. Bizim çalışmamız ilaç geliştirme aşamalarında faz I olarak isimlendirilmektedir. Faz I çalışmalarının çeşitlendirilmesinden sonra test bileşenlerinin deney hayvanları üzerindeki etkilerinin de inceleneceği faz II çalışmalarının yapılması bor bileşenlerinin potansiyel ilaç yapımında kullanılabilmesi için oldukça önemlidir.

Dünyanın en zengin bor madenlerine sahip olan ülkemizin öz kaynaklarıyla geliştirilecek olan bir kemoterapi ilacı daha ucuz maliyetle üretileceğinden, hem kanser hastalarının hem de ülkemizin ekonomisine ciddi katkıda bulunacaktır. Sitotoksik etkileri düşük apoptotik etkileri yüksek olan ve birçok farklı kanser türünde etkin olabilen bileşenlerden geliştirilebilecek kemoterapötik ilaçların kanser tedavisinde kullanılması kansere çare bulunması bakımından önemli yer tutmaktadır. Bu çalışmanın bor bileşenlerinin farklı kanser türleri üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi adına gelecek çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Abd-El-Aziz, A.S., Carraher, C.E. (2007), "Macromolecules Containing Metal and Metal- Like Elements," (Ed: Abd-El-Aziz A.S., Carraher C.E., Pitmann C.U., Zeldin M.), *John Wiley- Sons Publishers*, Canada, 2-3.
- Acarkan, N. (2002), "Bor Ürün Çeşitleri ve Kullanım Alanları," İTÜ. Maden Fakültesi, Cevher ve Kömür Hazırlama Anabilim Dalı, 80626 Maslak-İstanbul.
- Adair, R. (2007), "Boron, Understanding the Elements of the Periodic Table," *Rosen Central Publishers*, USA, 7-11.
- Akşit, H., Bildik, A. (2008), "Apoptozis," Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, **19:1**, 55-63.
- Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Peter M.E. (2002), "Apoptosis-independent functions of killer caspases," *Current Opinion in Cell Biology*, **14**, 721-726.
- Alibeyli, R., Arslan, S., Özdemir, E. (2011), "Single stage production and hydrolysis of sodium borohydride," *International Journal of Hydrogen Energy*, 1-6.
- Allen, R.T., Hunter, W.J., Agrawal, D.K. (1997), "Morphological and Biochemical Characterization and Analysis of Apoptosis," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **37**, 215-228.
- Almog, N., Rotter, V. (1997), "Involvement of p53 in cell differentiation and development," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1333**, 1-27.
- Altunkaynak, B.Z., Özbek, E. (2008), "Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz Nedir?," *Tip araştırmaları dergisi*, **6:2**, 93-104.
- Ameisen, J.C. (2002), "On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years," *Cell Death and Differentiation*, **9**, 367-393.
- Anto, R.J., Mukhopadhyay, A., Denning, K., Aggarwal, B.B. (2002), "Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl," *Life Sciences and Medicine, Carcinogenesis*, **23**, 143-150.

- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G., Pauls, K.P. (2002), "Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility," *Biology of Reproduction*, **66**, 354-360.
- Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998), "Death Receptors: Signaling and Modulation," *Science, Apoptosis*, **281**, 1305-1308.
- Ashkenazi, A. (2002), "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily," *Nature Reviews Cancer*, **2**, 420-430.
- Ashkenazi, A. (2008), "Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **19**, 325-331.
- Atıcı, E. (2007), "Cancer and leukemia in the history of medicine," *Türk Onkoloji Dergisi*, **22:4**, 197-204.
- Ayrılmış, N. (2007), "Effect of fire retardants on internal bond strength and bond durability of structural fiberboard," *Building and Environment*, **42**, 1200-1206.
- Azab, A. K., Abu Ali, H., Srebnik, M. (2006), "Boron neutron capture therapy," *Studies in Inorganic Chemistry (Chapter 5)*, **22**, 337-366.
- Baptiste-Okoh, N., Barsotti, A.M., Prives, C. (2008), "A role for caspase 2 and PIDD in the process of p53-mediated apoptosis," *Proceedings of The National Academy of Sciences*, **105:6**, 1937-1942.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D. (2004), "Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation," *Cancer Letters*, **216**, 21-29.
- Barranco, W.T., Hudak, P.F., Eckhert, C.D. (2006), "Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk," *Cancer Causes Control*, **18**, 71-77.
- Barth, S. (1998), "Application Of Boron Isotopes For Tracing Sources Of Anthropogenic Contamination In Groundwater," *Water Research*, **32:3**, 685-690.
- Barth Rolf, F. (1998), "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas," *Journal of Neuro-Oncology Kluwer Academic Publishers*, **36**, 91-102.

- 3339Batar, T., Kahramana, B., Cirit, E., Celik, M.S. (1998), "Dry processing of borax by calcination as an alternative to wet methods," *International of the Journal Mineral Process*, **54**, 99-110.
- Bello, I., Chong, Y.M., Leung, K.M., Chan, C.Y., Ma, K.L., Zhang, W.J., Lee, S.T., Layyous, A. (2005), "Cubic boron nitride films for industrial applications," *Diamond and Related Materials*, **14**, 1784-1790.
- Bertram, J.S. (2001), "The molecular biology of cancer," *Molecular Aspects of Medicine*, **21**, 167-223.
- Bıykoğlu, A., Yeksan, E. (2008), "Production of anhydrous borax from borax pentahydrate," *International journal of hydrogen energy*, **33**, 7103-7109.
- Boatright, K.M., Salvesen, G.S. (2003), "Mechanisms of caspase activation," *Current Opinion in Cell Biology*, **15**, 725-731.
- Borner, C. (2003), "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions," *Molecular Immunology*, **39**, 615-647.
- Boulares, H.A., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. (1999), "Mark Role Of Poly(Adp-Ribose) Polymerase (Parp) Cleavage in Apoptosis," *The Journal Of Biological Chemistry*, **274:33**, 22932-22940.
- Bourbigot, S., Duquesne, S. (2007), "Fire retardant polymers: recent developments and opportunities," *Journal of Materials Chemistry*, **17**, 2283-2300.
- Bradke, T.M., Hall, C., Carper, S.W., Plopper, G.E. (2008), "Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability," *Cell Adhesion and Migration*, **2:3**, 153-160.
- Brauer, M. (2003), "In vivo monitoring of apoptosis," *Progress in Neuro-Psycho-pharmacology and Biological Psychiatry*, **27**, 323-331.
- Bredesen, D.E., Rao, R.V., Mehlen, P. (2008), "Programmed Cell Death and Its Role in Neurological Disease," *Molecular Neurology (Chapter 8)*, Bentham Science Publishers, 125-143.
- Bronner, F. (2008), "Metals in Bone: Aluminum, Boron, Cadmium, Chromium, Lanthanum, Lead, Silicon, and Strontium," *Principles of Bone Biology, Chapter 25*, **3**, 515-531.

- Bursalı, E.A., Coşkun, S., Kızıl, M., Yurdakoç, M. (2011), "Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activities of boron/starch/polyvinyl alcohol hydrogels," *Carbohydrate Polymers*, **83**, 1377-1383.
- Cabadak, H. (2008), "Hücre Siklusu ve Kanser," Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, **9:3**, 51-61.
- Cain, K., Bratton, S.B., Cohen, G.M. (2002), "The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex," *Biochimie*, **84**, 203-214.
- Chapin, R.E., Ku, W.W., Kenney, M.A., McCoy, H., Gladen, B., Wine, R.N., Wilson, R., Elwell, M.R. (1997), "The Effects of Dietary Boron on Bone Strength in Rats," *Fundamental and Applied Toxicology*, **35**, 205-215.
- Chen, H.L., Carbone, D.P. (1997), "P53 as a target for anti-cancer immunotherapy," *Molecular Medicine Today*, **3:4**, 160-167.
- Chen, M.W., McCauley, J.W., LaSalvia, J.C. (2005), "Microstructural Characterization of Commercial Hot-Pressed Boron Carbide Ceramics," *Journal of the American Ceramic Society*, **88:7**, 1935-1942.
- Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998), "Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells," *Toxicology in Vitro*, **12**, 251-258.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., Green, R.D. (2010), "The BCL-2 Family Reunion," *Molecular Cell*, **37**, 299-310.
- Christogerou, A., Kavas, T., Pontikes, Y., Koyas, S., Tabak, Y., Angelopoulos, G.N. (2009), "Use of boron wastes in the production of heavy clay ceramics," *Ceramics International*, **35**, 447-452.
- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N.P. (1997), "The cell cycle and cancer," *The National Academy of Sciences*, **94**, 2776-2778.
- Collins, J.A., Schandl, C.A., Young, K.K., Vesely, J., Willingham, M.C. (1997), "Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis," *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **45:7**, 923-934.
- Cory, S., Huang, D.C.S., Adams, J.M. (2003), "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis," *Oncogene*, **22**, 8590-8607.

- Cooke, M.S., Podmore, I.D., Mistry, N., Evans, M.D., Herbert, K.E., Griffiths, H.R., Lunec, J. (2003), "Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair," *Journal of Immunological Methods*, **280**, 125-133.
- Cooper, G.M., Hausman, R.E. (2004), "The Cell, A Molecular Approach," Third Edition, ASM Press, Washington, USA, 631-632.
- Çelik, C., Boyacı San, F.G., Saraç, H.I. (2008), "Effects of operation conditions on direct borohydride fuel cell performance," *Journal of Power Sources*, **185**, 197-201.
- Dagrosa, M.A., Thomasz, L., Longhino, J., Perona, M., Calzetta, O. (2007), "Optimization of Boron Neutron Capture Therapy for the Treatment of Undifferentiated Thyroid Cancer," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **69**, 1059-1066.
- Dagrosa, M.A., Crivello, M., Perona, M., Thorp, S., Cruz, G.A.S., Pozzi, E. (2011), "First Evaluation of the Biologic Effectiveness Factors of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) in a Human Colon Carcinoma Cell Line," *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **79**, 262-268.
- Dartsch, D. C. (1999), "Mechanisms of Toxicity Programmed Cell Death (Apoptosis)," *Toxicology (Chapter 11)*, Academic Press, 245-255.
- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M.A., Lassota, P., Traganos, F. (1992), "Features of Apoptotic Cells Measured by Flow Cytometry," *Cytometry*, **13**, 795-808.
- Datta, S.R., Greenberg, M.E. (1998), "Molecular Mechanisms of Neuronal Survival and Apoptosis," *Hormones and Signaling*, **1**, 257-306.
- David, M.D., Seiber, J.N. (1999), "Accelerated hydrolysis of industrial organophosphates in water and soil using sodium perborate," *Environmental Pollution*, **105**, 121-128.
- Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., Kinnally, K.W. (2006), "Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1762**, 191-201.
- Dell, B., Huang, L. (1997), "Physiological response of plants to low boron," *Plant and Soil (Chapter 8)*, Kluwer Academic Publishers, **193**, 103-120.

- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I., Srebnik, M. (2002), "Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms," *Plant Science*, **163**, 931-942.
- Demirtaş, A. (2006), "Bor Bileşikleri ve Tarımda Kullanımı," Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, **37:1**, 111-115.
- Desagher, S., Martinou, J.C. (2000), "Mitochondria as the central control point of apoptosis," *Trends in Cell Biology*, **10:9**, 369-377.
- Diamandis, E.P. (1997), "Clinical applications of tumor suppressor genes and oncogenes in cancer," *Clinica Chimica Acta*, **257**, 157-180.
- Doğan, M., Bayramlı, E. (2010), "Effect of Boron-Containing Materials on the Flammability and Thermal Degradation of Polyamide 6 Composites Containing Melamine," *Journal of Applied Polymer Science*, **118**, 2722-2727.
- Donovan, M., Cotter, T.G. (2004), "Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1644**, 133-147.
- Downward, J. (2002), "Targeting Ras Signalling Pathways In Cancer Therapy," *Nature Reviews*, **3**, 11-22.
- Dzondo-Gadet, M., Mayap-Nzietchueng, R., Hess, K., Nabet, P., Belleville, F., Doussent, B. (2002), "Action of Boron at The Molecular Level: Effects on Transcription and Translation in a Acellular System," *Biological Trace Element Research*, **85**, 23-33.
- Eckhart, L., Fischer, H., Tschachler, E. (2007), "Phylogenomics of caspase-activated DNA fragmentation factor," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **356**, 293-299.
- Eerola, A.K. (1999), "Apoptosis and Apoptosis Regulating Proteins and Factors in Small and Large Cell Lung Carcinoma," Oulu University Library, Department of Pathology University of Oulu, FIN-90401, Oulu, Finland, 21-22.
- Eichler, J., Lesniak, C. (2008), "Boron nitride (BN) and BN composites for high-temperature applications," *Journal of the European Ceramic Society*, **28**, 1105-1109.

- Ekert, P.G., Vaux, D.L. (1997), "Apoptosis, haemopoiesis and leukaemogenesis," *Baillieres Clinical Haematology*, **10**, 561- 576.
- Ekwall, B., Silano, V., Paganuzzi-Stammati, A., Zucco, F. (1990), "Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures," Short-term Toxicity Tests for Non-genotoxic Effects (Chapter 7), (Ed: Bourdeau P.), Published by John Wiley & Sons Ltd., 75-99.
- El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q., Wani, G., Wani, A.A. (2005), "Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase 8 and mitochondrial events in p53- null myeloblastic leukemia HC-60 cells," *Department of Radiology ,Ohio State University, Columbus, OH 43210, USA*, **117:3**, 409-417.
- Fakıoğlu, E., Yürüm, Y., Veziroğlu, T.N. (2004), "A review of hydrogen storage systems based on boron and its compounds," *International Journal of Hydrogen Energy*, **29**, 1371-1376.
- Fan, T.J., Han, L.H., Cong, R.S., Liang, J. (2005), "Caspase Family Proteases and Apoptosis," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **37:11**, 719-727.
- Fan, S., Sun, Z., Jiang, D., Dai, C., Ma, Y., Zhao, Z., Liu, H., Wu, Y., Cao, Z., Li, W. (2010), "BmKCT toxin inhibits glioma proliferation and tumor metastasis," *Cancer Letters*, **291**, 158-166.
- Fent, K. (2001), "Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples," *Toxicology In Vitro*, **15: 4-5**, 477-488.
- Ferlay, J., Shin, H., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D.M. (2010), "Estimates of Worldwide Burden Of Cancer In 2008: Globocan 2008," *International Journal of Cancer*, **127**, 2893-2917.
- Fesus, L., Thomazy, V., Autuori, F., Ceru, M.P., Tarcsa, E., Piacentini, M. (1989), "Apoptotic hepatocytes become insoluble in detergents and chaotropic agents as a result of transglutaminase action," *FEBS*, **245**, 150-154.
- Fishman, D., Wolfson, M., Bazarski, E., Segal, S., Rager-Zisman, B. (1997), "The effects of measles virus persistent infection on AP-1 transcription factor binding in neuroblastoma cells," *FEBS Letters*, **410**, 191-194.

- Fong, D., Yeh, A., Naftalovich, R., Choi, T.H., Chan, M.M. (2010), "Curcumin inhibits the side population (SP) phenotype of the rat C6 glioma cell line: Towards targeting of cancer stem cells with phytochemicals," *Cancer Letters*, **293**, 65-72.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006), "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicology Letters*, **160**, 171-177.
- Fulda, S. (2008), "Caspase-8 in cancer biology and therapy," *Mini-review Cancer Letters*, **281**, 128-133.
- Fung, H., Wibowo, C., Ng, K.M. (2007), "Product-centered Process Synthesis and Development: Detergents," *Chemical Product Design: Toward a Perspective through Case Studies (Chapter 8)*, *Computer Aided Chemical Engineering*, **23**, 239-274.
- Galluzzi, L., Zamzami, N., La Motte Rouge, T., Lemaire, C., Brenner, C., Kroemer, G. (2007), "Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis," *Apoptosis*, **12**, 803-813.
- Garrett, M.D. (2001), "Cell cycle control and cancer," *Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research*, Haddow Laboratories, Sutton, Surrey, **81:5**, 515-522.
- Gazi, C., Tapul, L. (2006), "C6 Sıçan Glioma Hücreleri Üzerine Aloe Emodin ve Cisplatinin Etkilerinin İki ve Üç Boyutlu Hücre Kültür Modellerinde İncelenmesi," *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **69**, 110-116.
- Gentz, M.C., Grace, J.K. (2006), "A Review of Boron Toxicity in Insects With an Emphasis on Termites," *Journal of Agriculture and Urban Entomology*, **23:4**, 201-207.
- Geyikoğlu, F., Türkez, H., (2008), "Boron compounds reduce vanadium tetraoxide genotoxicity in human lymphocytes," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**, 342-347.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M. (2009), "Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes," *Journal of Medical Genetics*, **46**, 497-510.

- Gidon-Jeangirard, C., Hugel, B., Holl, V., Toti, F., Laplanche, J.L., Meyer, D., Freyssinet, J.M. (1999), "Annexin V Delays Apoptosis While Exerting an External Constraint Preventing the Release of CD4⁺ and PrP^{c+} Membrane Particles in a Human T Lymphocyte Model," *The Journal of Immunology*, **162**, 5712-5718.
- Gmeling, K., Németh, K., Martin, U., Eby, N., Varga, Z. (2007), "Boron concentrations of volcanic fields in different geotectonic settings," *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, **159**, 70-84.
- Golias, C.H., Charalabopoulos, A., Charalabopoulos, K. (2004), "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review," *Blackwell Publishing Limited International Journal of Clinical Practice*, **58**, 1134-1141.
- Goodlett, C.R., ve Horn, K.H. (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health* 25(3):175–184,
- Gottlieb, A.R., Babior, M.B. (1997), "Regulation of Fas-Mediated Apoptosis," *Current Topics In Cellular Regulation*, Academic Press, **1**, 69-105.
- Grobben, B., De Deyn, P.P., Slegers, H. (2002), "Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion," *Cell and Tissue Research*, **310**, 257-270.
- Gross, A., McDonnell, M.J., Korsmeyer, S.J. (1999), "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis," *Genes and Development*, **13**, 1899-1911.
- Guerrero, A., Arias, J.M. (2001), "Cell Division and Programmed Cell Death," *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach (Third Edition)*, Section IX, Academic Press, 1171-1184.
- Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008), "Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler," *Yeni Yüzyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2**, 73-78.
- Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E. (2008), "New discoveries in the mechanisms of apoptosis and cell survival and novel potential therapeutic strategies," *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi*, **36**, 120-130.
- Güneş, H.V. (2006), "Moleküler Hücre Biyolojisi," 2. Baskı, Kaan Kitabevi, Eskişehir, 356-357.
- Güyağüler, T. (2001), "Türkiye Bor Potansiyeli," *Maden Mühendisleri Odası, 4.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, İzmir.

- Habashi, F. (2009), "Boron: Its History and Its Position in the Periodic Table," *IV International Boron Symposium, 15-17 / October, Eskişehir-TURKEY*.
- Haggard, H.W., Smith, G.M. (1938a), "Johannes Müller and the Modern Conception of Cancer," *Yale of Journal Biology Medicine*, **10:5**, 419-436.
- Haggard, H.W. (1938b), "The conception of Cancer Before and After Johannes Miller," *Bulletin of the New York Academy Medicine*, **14:4**, 183-197.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, S.M., Elia, A., Luis de la Pompa, J. (1998), "Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo," *Cell*, **94**, 339-352.
- Hakkı, S.S., Bozkurt, B.S., Hakkı, E.E. (2010), "Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1)," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24**, 243-250.
- Harris, M.H., Thompson, C.B. (2000), "The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability," *Cell Death and Differentiation*, **7**, 1182-1191.
- Haunstetter, A., Izumo, S. (2001), "Apoptosis," *Heart Physiology and Pathophysiology (Fourth Edition)*, Chapter 52, 927-947.
- Heiden, M.G.V., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., Thompson, C.B. (1997), "Bcl-xL Regulates the Membrane Potential and Volume Homeostasis of Mitochondria," *Cell*, **91**, 627-637.
- Heiden, M.G.V., Thompson, C.B. (1999), "Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?," *Nature Cell Biology*, **1**, 209-216.
- Helvacı, C. (2004), "*Türkiye Borat Yatakları: Jeolojik Konumu, Ekonomik Önemi ve Bor Politikası*," Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Jeoloji Mühendisliği Bölümü, 5. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir.
- Hunt, D.C. (2003), "Dietary Boron: An Overview of The Evidence for Its Role in Immune Fuction," *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **16**, 291-30.
- Irmak, P. (2006), "*Türkiye' de bor madeni ve ekonomik incelemesi: Eskişehir-Kırka işletmesi örneği*," Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İktisat Anabilim Dalı, Eskişehir.
- İpekoğlu, Ü., Polat, M. (1987), "Bor Endüstrisine Genel Bakış, A General View to Boron Industry," *Madencilik Dergisi (Mart sayısı)*, 26, Sayı 1, 5-16.

- Jain, A., Anthonysamy, S., Ananthasivan, K., Ranganathan, R., Mittal, V., Narasimhan, S.V., Rao, P.R. (2008), "Characterization of electrodeposited elemental boron," *Materials Characterization*, **59**, 890-900.
- Jakob, S., Corazza, N., Diamantis, E., Kappeler, A., Brunner, T. (2008), "Detection of apoptosis in vivo using antibodies against caspase-induced neo-epitopes," *Methods*, **44**, 255-261.
- Joiner, A. (2006), "The bleaching of teeth: A review of the literature," *Journal of dentistry*, **34**, 412-419.
- Joiner, A. (2007), "Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties," *Journal of Dentistry*, **35**, 889-896.
- Josten, P., Kutschera, U. (1999), "The Micronutrient Boron Causes the Development of Adventitious Roots in Sunflower Cuttings," *Annals of Botan*, **84**, 337-342.
- J. van Raam, B., Salvesen, G.S. (2011), "Proliferative versus apoptotic functions of caspase-8 hetero or homo: The caspase-8 dimer controls cell fate," *Biochimica et Biophysica Acta*, BBAPAP-38663, 10.
- Kahyaoğlu, M., Darcan, C., Ergene, E. (2009), "Bor Bileşiklerinin Mikrobiyal Etkileri ve Kullanım Alanları," *IV. Uluslararası Bor Sempozyumu, 15-17 / Ekim*, Eskişehir.
- Kalın, V. (2005), "Tekstil atıkları ve pamuk linterinden, kağıt hamuru ve kağıt üretim koşullarının belirlenmesi," Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Kahramanmaraş.
- Kantari, C., Walczak, H. (2011), "Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta*, **1813**, 558-563.
- Kaup, Y., Schmid, M., Middleton, A., Weser, U. (2003), "Borate in mummification salts and bones from Pharaonic Egypt," *Journal of Inorganic Biochemistry*, **94**, 214-220.
- Kayacan, I., Doğan, Ö.M., Uysal, B.Z. (2011), "Effect of magnesium on sodium borohydride synthesis from anhydrous borax," *International Journal of Hydrogen Energy*, Hydrogen Energy Publications, **36**, 7410-7415.

- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J.M. (2002), "The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis" *Journal of Neuroscience Methods*, **115**, 97-105.
- Kemerli, Ç., Taşkın, M.M., Güzelhan, Y., Kaplan, N. (2003), "Deneysel C6 Glioma Modelinde Teknik ve Migrasyon Yönünden Bir İnceleme", *Düşünen Adam Dergisi*, **16:1**, 57-64.
- Kemerli, C., Taşkın, M.M., Sütpideler, N., Kaplan, N., Ethemoglu, B. (2005), "C6 Rat Glioma Modelinde Histopatoloji, İnvazyon, Migrasyon ve Tumor Gelişimi," *Turkish Neurosurgery*, **15:3**, 109-115.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, R. (1972), "Apoptosis: A basic biological phenomenon with winderanging implication in tissue kinetics," *British Journal of Cancer*, **26**, 239-257.
- Kettunen, M.I., Brindle, K.M. (2005), "Apoptosis detection using magnetic resonance imaging and spectroscopy," *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **47**, 175-185.
- Knowles, M.A., Selby, P.J. (2005), "Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer," *Oxford Bioscience*, Oxford University Press (4. Edition), UK, 22-23.
- Koga, K., Kaji, A., Hirosaki, K., Hata, Y., Ogura, T., Fujishita, O., Shintani, K. (2006), "Cytotoxic evaluation of cubic boron nitride in human origin cultured cells," *Toxicology in Vitro*, **20**, 1370-1377.
- Korsmeyer, S.J. (1999), "BCL-2 Gene Family and the Regulation of Programmed Cell Death," *Cancer Research*, **59**, 1693-1700.
- Köhler, C., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2002), "Evaluation of caspase activity in apoptotic cells," *Journal of Immunological Methods*, **265**, 97-110.
- Krysko, D.V., Berghe, T.V., D'Herde, K., Vandenabeele, P. (2008), "Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis," *Methods*, **44**, 205-221.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P., Flavell, R.A. (1998), "Reduced Apoptosis and Cytochrome-C Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9," *Cell*, **94**, 325-337.

- Kurama, S., Kara, A., Kurama, H. (2007), "Investigation of borax waste behaviour in tile production," *Journal of the European Ceramic Society*, **27**, Issues 2-3, 1715-1720.
- Kutlu, M., Aydoğan, Gözde., Mumcu, Emel. (2007), "Mutagenicity analysis of water samples from Seydisuyu (Kırka, Turkey) stream under the influence of boron production complex," *Food and Chemical Toxicology*, **45:10**, 2064-2068.
- Lamprecht, S.A., Lipkin, M. (2001), "Cellular Mechanisms of Calcium and Vitamin D in the Inhibition of Colorectal Carcinogenesis," *Annals of the New York Academy of Sciences*, 73-87.
- Laso, F. (1981), "Methods of Combating Amebiasis in Humans," United States Patent, Patent No: 4296102, Patent Date: Oct. 20, 1981.
- Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2005), "Vital functions for lethal caspases," *Oncogene*, **24**, 5137-5148.
- Lee, Y-J., Kuo, H-C., Chuc, C-Y., Wang, C-J., Lin W-C., Tseng T-H. (2003), "Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells," *Biochemical Pharmacology*, **66**, 2281-2289.
- Lehman, T.A., Reddel, R., Pfeifer, A.M.A., Spillare, E., Kaighn, M.E., Weston, A., Gerwin, B., Harris, C.C. (1991), "Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes," *Environmental Health Perspectives*, **93**, 133-144.
- Lewin, B. (2004), "Genes VIII," (Ed: Challice, J., Carlson, G., Zeigler, S., Dudonis, C.), *Pearson Prentice Hall*, USA, Chapter 29, 843-882.
- Levin, B., Boyle, P. (2008), "Dünya Kanseri Raporu 2008," Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanseri Araştırmaları Kurumu (IARC), 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, Fransa.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang X. (1997), "Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade," *Cell*, **91**, 479-489.

- Lucken, A.S., Martinou, J.C. (2005), "Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane," *Comptes Rendus Biologies*, **328**, 616-631.
- Lukas, J., Lukas, C., Bartek, J. (2004), "Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time," *DNA Repair*, **3**, 997-1007.
- Lumachi, F., Basso, S. (2002), "Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases," *Thyroid*, **12:1**, 27-34.
- Longo-Sorbello, G.S.A., Saydam, G., Banerjee, D., Bertino, J.R. (2006), "Cytotoxicity and Cell Growth Assays," *Cell Biology (Third Edition)*, 315-324.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2002), "Ras Oncogenes: The First 30 Years," *Nature Reviews*, **3**, 7-13.
- Marney, D.C.O., Russell, L.J. (2008), "Combined Fire Retardant and Wood Preservative Treatments for Outdoor Wood Applications," *A Review of the Literature*, *Fire Technology*, **44**, 1-14.
- Mc Gee, M.M., Hyland, E., Campiani, G., Ramunno, A., Nacci, V., Zisterer, D.M. (2002), "Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6," *FEBS Letters*, **515**, 66-70.
- Meacham, S.L., Elwell, K.E., Ziegler, S., Carper, S.W. (2007), "Boric Acid Inhibits Cell Growth in Breast and Prostate Cancer Cell Lines," *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, 299-306.
- Merad-Boudia, M., Nicole, A., Santiard-Baron, D., Saille, C., Ceballos-Picot, I. (1998), "Mitochondrial Impairment as an Early Event in the Process of Apoptosis Induced by Glutathione Depletion in Neuronal Cells: Relevance to Parkinson's Disease," *Biochemical Pharmacology*, Elsevier Science, **56**, 645-655.
- Mergen A., Demirhan M.H. (2009), 'Dissolution kinetics of probertite in boric acid solution', *International Journal of Mineral Process*, **90**, 16-20.

- Messina, A., Jaworowski, A. (1996), "Mechanisms of developmental cell death," *Chemical Factors in Neural Growth, Degeneration and Repair (Chapter 4)*, Elsevier, New York, 89-122.
- Meyer, T.K., Cance, W.G. (2001), "Signal Transduction and Apoptosis," *Surgical Research (Chapter 22)*, Academic Press, 253-270.
- Mohan, J., Gandhi, A.A., Bhavya, B.C., Rashmi, R., Karunagaran, D., Indu, R., Santhoshkumar, T.R. (2006), "Caspase-2 Triggers Bax-Bak-dependent and -independent Cell Death in Colon Cancer Cells Treated with Resveratrol," *The Journal Of Biological Chemistry*, **281:26**, 17599-17611.
- Nakagawa, Y., Hatanaka, H. (1997), "Boron neutron capture therapy, Clinical brain tumor studies," *Journal of Neuro-Oncology*, **33**, 105-115.
- Nakagawa, Y., Kageji, T., Mizobuchi, Y., Kumada, H., Nakagawa, Y. (2009), "Clinical results of BNCT for malignant brain tumors in children applied radiation and Isotopes," *Applied Radiation and Isotopes*, **67**, 27-30.
- Narula, J., Kharbanda, S., Khaw B. (1997), "Apoptosis and the Heart," *CHEST*, **112**, 1358-62.
- NICEATM (The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods), (2003), "Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay," Phase III Validation Study, 1-20.
- Nielsen, F. H., Hunt, C.D., Mullen, L.M., Hunt, J.R. (1987), "Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women," *FASEB*, **1**, 394-397.
- Nzietchueng, R.M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet P., Hess, K. (2002), "Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing," *Journal of Trace Elements in Medicine Biology*, **16**, 239-244.
- O'Driscoll, L., O'Connor, R., Clynes M. (2006), "Cell And Tissue Culture: Assorted Techniques; Methods in Apoptosis," *Cell Biology (Chapter 40)*, 335-342.
- Oganov, A.R., Solozhenko, V.L. (2009), "Boron: a Hunt for Superhard Polymorphs," *Journal of Superhard Materials*, Allerton Press, Russia, **31:5**, 285-291.

- Oliver, L., Vallette, F.M. (2005), "The role of caspases in cell death and differentiation," *Drug Resistance Updates*, **8**, 163-170.
- Otsu, K., Sato, K., Ikeda, Y., Imai, H., Nakagawa, Y., Ohba, Y., Fujii, J. (2005), "An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation," *Biochemistry Journal (Printed in Great Britain)*, **389**, 197-206.
- Otsuki, Y., Li, Z., Shibata, M.A. (2003), "Apoptotic Detection Methods from Morphology to Gene," *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, **38:3**, 275-340.
- Ouyang, Y., Giffard, R.G. (2004), "Changes in astrocyte mitochondrial function with stress: effects of Bcl-2 family proteins," *Neurochemistry International*, **45**, 371-379.
- Ozansoy M., Başak A.N. (2006), ' Parkinson hastalığında programlanmış hücre ölümü', *Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.*, **9(1)**: 54-61
- Ozog, M.A., Bechberger, J.F., Naus, C.C.G. (2002), "Increases Connexin43 Expression and Suppresses Growth of C6 Glioma Cells," *Cancer Research*, **62**, 3544-3548.
- Öktem, S., Özhan, M.H., Özol, D. (2001), "Apoptozisin Önemi," *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, Toraks Dergisi*, **2:1**, 91-95.
- Öner, B.U. (2007), "*Türkiye'nin Alternatif Enerji Kaynakları ve Bor Madeninin Endüstride Kullanım Alanlarının Araştırılması*," Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Ticaret Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı.
- Özkan, Ş.G., Çebi, H., Delice, S., Doğan, M. (1997), "Bor Minerallerinin Özellikleri ve Madenciliği," *Etibank Bor Araştırma Merkezi, 2. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, 16-17 Ekim, İzmir.
- Pagliari, L.J., Pinkoski, M.J., Green, D.R. (2009), "Apoptosis Signaling: A Means to an End," *Handbook of Cell Signaling (Chapter 301)*, Three-Volume Set 2 ed., 2535-2543.
- Pahlman, S., Stockhausen, M.T., Fredlund, E., Axelson, H. (2004), "Notch signaling in neuroblastoma," *Seminars in Cancer Biology*, **14**, 365-373.
- Pan, J., Xu, G., Yeung, S.J. (2001), "Cytochrome *c* Release Is Upstream to Activation of Caspase-9, Caspase-8, and Caspase-3 in the Enhanced

- Apoptosis of Anaplastic Thyroid Cancer Cells Induced by Manumycin and Paclitaxel,” *The Journal of Clinical Endocrinology And Metabolism*, **86:10**, 4731-4740.
- Papadopoulos, M.C., Koumenis, I.L., Xu, L., Giffard, R.G. (1998), “Potentiation of murine astrocyte antioxidant defence by bcl-2: protection in part reflects elevated glutathione levels,” *European Journal of Neuroscience*, **10**, 1252-1260.
- Park, M.T., Lee, S.J. (2002), “Cell Cycle and Cancer,” *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **36:1**, 60-65.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005), “Global Cancer Statistics, 2002,” *CA: a cancer journal for clinicians*, **55**, 74-108.
- Peixoto, P.M., Ryu S.Y., Pruzansky, D.P., Kuriakose, M., Gilmore, A., Kinnally, K.W. (2009), “Mitochondrial apoptosis is amplified through gap junctions,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **390**, 38-43.
- Penland, J.G. (1994), “Dietary Boron, Brain Function, and Cognitive Performance,” *Environ Health Perspect*, **102**, 65-72.
- Peter, M.E., Heufelder, A.E., Hengartner, M.O. (1997), “Advances in apoptosis research,” *Proceeding of the National Academy Sciences of the USA*, **94**, 12736-12737.
- Pop, C., Timmer, J., Sperandio, S., Salvesen, G.S. (2006), “The Apoptosome Activates Caspase-9 by Dimerization,” *Molecular Cell*, **22**, 269-275.
- Porter, I.A., Path, M.C., Brodie, J., Path, F.C. (1969), “Boric Acid Preservation of Urine Samples,” *British Medical Journal*, **2**, 353-355.
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L. (2008), “Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity,” *Nature Protocols*, **3**, 1125-1131.
- Rios, J.L., Recio, M.C. (2006), “Natural Products As Modulators Of Apoptosis and Their Role in Inflammation,” *Studies in Natural Products Chemistry*, **33**, 141-192.
- Rismanchi, N., Blackstone, C. (2007), “Mitochondrial functions and Dysfunction in the nervous system,” *Molecular Neurology* (Ed: Waxman, S.), Chapter 3, Elsevier Academic Press, 29-39.

- Robbins, W.A., Xun, L., Jia, J., Kennedy, N., Elashoff, D.A., Ping, L. (2010), "Chronic boron exposure and human semen parameters," *Reproductive Toxicology*, **29**, 184-190.
- Rode, H.J., Eisel, D., Frost, I. (2004), "Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation," *Roche Applied Science (3rd edition)*, Mannheim, Germany, 1-75.
- Ronning, C., Feldermann, H., Hofsass, H. (2000), "Growth, doping and applications of cubic boron nitride thin films," *Diamond and Related Materials*, **9**, 1767-1773.
- Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B., Martinou, J.C. (2002), "Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein," *Biochemical Society*, **368**, 915-921.
- Sadiquov, S. (2001), "Canlılarda Moleküler Düzenleme Mekanizmaları," *Moleküler Biyolojide Özel Konular*, Erciyes Üniversitesi Yayınları, No:127, Kayseri.
- Saito, Y., Maruyama, K., Kawanoi, H., Hagino-Yamagishi, K., Kawamura, K., Saido, T.C., Kawashima, S. (1996), "Molecular Cloning and Characterization of a Novel Form of Neuropeptide Gene as a Developmentally Regulated Molecule," *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **271:26**, 15615-15622.
- San-Galli, F., Vrignaud, P., Robert, J.M., Coindre, J.M., Cohadon, F. (1989), "Assessment of the experimental model of transplanted C6 glioblastoma," *Journal of Neuro-Oncology*, **7**, 299-304.
- Sartorius, U., Schmitz, I., Krammer, P.H. (2001), "Molecular Mechanisms of Death-Receptor-Mediated Apoptosis," *ChemBiochem*, **2**, 20-29.
- Sauerweina, W., Zurlob, A. (2002), "The EORTC Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Group: achievements and future projects," *European Journal of Cancer*, **38**, 31-34.
- Schneider, P., Tschopp, J. (2000), "Apoptosis induced by death receptors," *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **74**, 281-286.

- Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C.M., Mitran, V., Cimpean, A., Iordachescu, D. (2008), "Comparative Effects of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells," *Biological Trace Element Research*, **122**, 197-205.
- Seeger, R.C., Rayner, S.A., Banerjee, A., Chung, H., Laug, W.E., Neustein, H.B., Benedict, W.F. (1977), "Morphology, Growth, Chromosomal Pattern, And Fibrinolytic Activity Of Two New Human Neuroblastoma Cell Lines," *Cancer Research*, **37**, 1364-1371.
- Sgonc, R., Gruber, J. (1998), "Apoptosis Detection: An Over View," *Experimental Gerontology*, **33:6**, 525-533.
- Shabnam, M.S., Srinivasan, R., Wali, A., Majumdar, S., Joshi, K., Behera, D. (2004), "Expression of p53 protein and the apoptotic regulatory molecules Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in locally advanced squamous cell carcinoma of the lung," *Lung Cancer*, **45**, 181-188.
- Shen, J.C., Lao, Y., Kamath-Loeb, A., Wold, M.S., Loeb, L.A. (2003), "The N-terminal domain of the large subunit of human replication protein A binds to Werner syndrome protein and stimulates helicase activity," *Mechanisms of Ageing and Development*, **124**, 921- 930.
- Sheng, M.H., Taper, L.J., Veit, H., Qian, H., Ritchey, S.J., Lau, K.H. (2001), "Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats," *Biological Trace Element Research*, **82**, 109-123.
- Shibli, A., Srebnik, M. (2006), "Environmental aspects of boron," *Studies in Inorganic Chemistry (Chapter 9)*, **22**, 551-598.
- Shield, M.A., Mirkes, P.E. (1998), "Apoptosis," *Handbook of Developmental Neurotoxicology (Chapter 8)*, Academic Press, 159-188.
- Shounan, Y., Feng, X., O'Connell, P.J. (1998), "Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity," *Journal of Immunological Methods*, **217**, 61-70.
- Shu, K.X., Li, B., Wu, L.X. (2007), "The p53 network: p53 and its downstream genes," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **55**, 10-18.
- Sibenaller, Z.A., Etame, A.B., Mushtaq, M.A., Barua, M., Ryken, T.C. (2005), "Genetic Characterization of Commonly Used Glioma Cell Lines: Results

- Neurosurg Focus,” *American Association of Neurological Surgeons*, **19(4)**, 1-5.
- Sielecki, T.M., Boylan, J.F., Benfield, P.A., Trainor, G.L. (2000), “Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors: Useful Targets in Cell Cycle Regulation,” *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society, **43:1**, 1-18.
- Simon, J.M., Smith, R.A. (2000), “Borate raw materials,” *Society Glass Technology*, **41:6**, 169-173.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B. (2003), “Identification Of A Cancer Stem Cell İn Human Brain Tumors,” *Cancer Research*, **63**, 5821-5828.
- Sivrikaya, H., Saraçbaşı, A. (2004), “Bor Madeninin Ahşap Koruma Endüstrisinde Değerlendirilmesi, Evaluation Boron Mine in Wood Protection Industry,” 2. Uluslararası Bor Sempozyumu, 23-25 Eylül 2004, Eskişehir.
- Soini, Y., Pääkkö, P., Lehto, V-P. (1998), “Histopathological Evaluation of Apoptosis in Cancer,” *American Journal of Pathology*, **153:4**, 1041-1053.
- Solakoğlu, Z. (2009), “Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni,” *Klinik Gelişim*, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 20-25.
- Sprick, M.R., Walczak, H. (2004), “The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis,” *Biochimica et Biophysica Acta*, **1644**, 125-132.
- Stadelmann, C., Lassmann, H. (2000), “Detection of apoptosis in tissue sections,” *Cell and Tissue Research*, **301**, 19-31.
- Stefanov, S. (2000), “Applications of borate compounds for the preparation of ceramic glazes,” *Society Glass Technology*, **41:6**, 193-196.
- Steinbach, J.P., Weller, M. (2006), “Apoptosis Pathways and Chemotherapy,” *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy (First Edition)*, 141-154.
- Sümer, G. (2004), “Bor Bileşikleri,” Uluslararası Bor Sempozyumu, Anadolu Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Seramik Bölümü, 23-25 Eylül 2004, Eskişehir.
- Şahin, Ö., Genli, N., Özdemir, M. (2005), “A new method for producing anhydrous puffed borax,” *Chemical Engineering and Processing*, **44**, 1-6.

- Şahin, Ö., Ağırtaş, S. (2008), “Yeni Bir Yöntem Kullanarak Yüksek Döküm Yoğunluklu Bor Oksit Üretimi,” Proje No: 107M191, Şanlıurfa.
- Takeshi Oishi, S., Nakanishi, T.F., Yamamoto, T.T. (1998), “Powdered Hair Dye Containing Cyclodextrin Inclusion Complex,” United States Patent, Patent No: 4808189, Patent Date: Feb. 28, 1989.
- Tang, D., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (1999), “Caspase-8 Activation and Bid Cleavage Contribute to MCF7 Cellular Execution in a Caspase-3-dependent Manner during Staurosporine mediated Apoptosis,” *The Journal of Biological Chemistry*, **275:13**, 9303-9307.
- Tang, S-S., Zhang, J-H., Liu, H-X., Li, H-Z. (2009), “PC2/CPE-mediated pro-protein processing in tumor cells and its differentiated cells or tissues,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, **303**, 43-49.
- Teicher, B.A. (2006), “Brain Tumor Models for Cancer Therapy,” *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy*, 58-73.
- Thiele, C.J. (1998), “Neuroblastoma Cell Line,” (Ed: Masters, J.) *Human Cell Culture*, Kluwer Academic Publishers, Lancaster, UK, **1**, 21-53.
- Thorburn, A. (2004), “Death receptor induced cell killing,” *Cellular Signalling*, **16**, 139-144.
- TMMOB, (2003), “Bor Raporu,” Metalurji mühendisler Odası, 1-50.
- Türkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Çolak, S. (2009), “*The evaluation of genotoxic effects of boron compound*”, IV. Uluslararası Bor Sempozyumu, 15/17 Ekim, Eskişehir.
- Türkez, H., Geyikoglu, F., Tatar, A., Keleş, M.S., Kaplan, İ. (2010), “The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood,” *Experimental and Toxicologic, Pathology*, **ETP-50510**, 1-9.
- Türkez, H., Geyikoğlu, F., Çolak, S. (2011), “The protective effect of boric acid on aluminum-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats,” *Turk Journal Biology*, TÜBİTAK, **35**, 293-301.
- Tyagi, A., Rana Singh, P., Agarwal, C., Agarwal, R. (2006), “Silibinin activates p53-caspase 2 pathway and causes caspase-mediated cleavage of Cip1/p21 in apoptosis induction in bladder transitional-cell papilloma RT4 cells: evidence for a regulatory loop between p53 and caspase 2,” *Carcinogenesis*, **27:11**, 69-80.

- Ulukaya, E. (2003), "Apoptozis ders notları," Uludağ Üniversitesi, Bursa, biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf.
- Uslu, T. (2007), "Küresel Enerji Politikaları ve Türkiye Gerçeği, Bor Madeninin Enerji Kaynağı Olarak Kullanılması," *TMMOB Türkiye VI. Enerji Sempozyumu*, 414-431.
- Uygan, D., Çetin, Ö. (2009), "Determination of Boron Levels Some Selected Agricultural Fields on Soil and Irrigation Water in Irrigation Scheme Eskişehir- Seyitgazi," *IV. Uluslararası Bor Sempozyumu*, 665-672.
- Van Slyke, K.K., Michel, V.P., Rein, M.F. (1981), "Treatment of vulvovaginal candidiasis with boric acid powder," *Am J Obstet Gynecol*, **141:2**,145-148.
- Wang, P., Song, J.H., Song, D.K., Zhang, J., Hao, C. (2006), "Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis," *Cellular Signalling*, **18**, 1528-1535.
- Watanabe, K., Sakamoto, K., Sasaki, T. (1998), "Comparisons on chemically-induced mutation among four bacterial strains, Salmonella typhimurium TA102 and TA2638, and Escherichia coli WP2/ pKM101 and WP2 uvrA/ pKM101: collaborative study II," *Mutation Research*, **412**, 17-31.
- Weinberg, R.A. (1995), "The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control," *Cell*, **81**, 323-330.
- Wolf, B.B., Green, D.R. (1999), "Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases," *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 20049-20052.
- Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F., Greeni, D.R. (1999), "Caspase-3 Is the Primary Activator of Apoptotic DNA Fragmentation via DNA Fragmentation Factor-45/Inhibitor of Caspase-activated DNase Inactivation," *The Journal of Biological Chemistry, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **274:43**, 30651-30656.
- Woods, W.G. (1994), "An Introduction to Boron: History, Sources, Uses, and Chemistry," *Environ Health Perspect*, **102**, 5-11.
- Wu, Y., Xing, D., Liu, L., Gao, B. (2008), "Regulation of Bax activation and apoptotic response to UV irradiation by p53 transcription-dependent and -independent pathways," *Cancer Letters*, **271**, 231-239.

- Wu, Y., Wang, D., Wang, X., Wang, Y., Ren, F., Chang, D., Chang, Z., Jia, B. (2011), "Caspase 3 is Activated through Caspase 8 instead of Caspase 9 during H₂O₂-induced Apoptosis in HeLa Cells," *Cell Physiol Biochem*, **27**, 539-546.
- Xu, J., Ji, L.D., Xu, L.H. (2006), "Lead-induced apoptosis in PC 12 cells: Involvement of p53, Bcl-2 family and caspase-3," *Toxicology Letters*, Elsevier Ireland Ltd., **166**, 160-167.
- Vaskivuo, T. (2002), "Regulation of apoptosis in the female reproductive system," Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oulu.
- Verma, A., Prasad, K.N., Singh, A.K., Nyati, K.K., Gupta, K.R., Paliwal, V.K. (2010), "Evaluation of the MTT lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of neurocysticercosis," *Journal of Microbiological Methods*, **81**, 175-178.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2005), "Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer," *Ann Hematol*, **84**, 627-639.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2003), "Cell cycle and apoptosis," *Cell Proliferation*, **36**, 165-175.
- Vescovi, A.L., Galli, R., Reynolds, B.A. (2006), "Brain Tumour Stem Cells," *Nature Reviews*, **6**, 425-436.
- Volpe, J.J., Fujimoto, K., Marasa, J.C., Agrawal, H.C. (1975), "Relation of C-6 Glial Cells in Culture to Myelin," *Biochem. J.*, Printed in Great Britain, **152**, 701-703.
- Yalınkılıç, M.K., Su, W.Y., Imamura, Y., Takahashi, M., Demirci, Z., Yalınkılıç, A.C. (1998), "Boron effect on decay resistance of some fire-retardant coatings applied on plywood surface," *Holz Als Roh-Und Werkstoff*, **56**, 347-353.
- Yamaguchi, M., Sakurai, T. (1991), "Inhibitory effect of calcium-binding protein regucalcin on Ca²⁺-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei," *Federation of European Biochemical Societies*, **279**, 281-284.
- Yamamoto, T., Nakai, K., Matsumura, A. (2008), "Boron neutron capture therapy for glioblastoma," *Cancer Letters*, **262**, 143-152.

- Yamamoto, T., Nakai, K., Kageji, T., Kumada, H., Endo, K., Matsuda, M., Shibata, Y., Matsumura, A. (2009), "Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma," *Radiotherapy and Oncology*, **91**, 80-84.
- Yanagie, H., Tomita, T., Kobayashi, H., Fujii, Y., Nonaka, Y., Saegusa, Y., Hasumi, K., Eriguchil, M., Kobayashi, T., Ono, K. (1997), "Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy," *British Journal of Cancer*, **75:5**, 660-665.
- Yanagie, H., Kumada, H., Sakurai, Y., Nakamura, T., Furuya, Y. (2009), "Dosimetric evaluation of neutron capture therapy for local advanced breast cancer," *Applied Radiation and Isotopes*, **67**, 63-66.
- Yang, F., Jin, C., Jiang, Y., Li, J., Di, Y., Ni, Q., Fu, D. (2011), "Liposome based delivery systems in pancreatic cancer treatment: From bench to bedside," *Cancer Treatment Reviews*, 1-10.
- Yasui, L., Kroc, T., Gladden, S., Andorf, C., Bux, S., Hosmane, N. (2010), "Boron neutron capture in prostate cancer cells," *Applied Radiation and Isotopes*, ARI 5470, doi:10.1016/j.apradiso.2011.07.001.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. (2007), "Moleküler Biyoloji, Protein sentezi ve yıkımı," Nobel yayınevi, Ankara.
- Yoshida, F., Matsumura, A., Shibata, Y., Yamamoto, T., Nakauchi, H., Okumura, M., Nose, T. (2002), "Cell cycle dependence of boron uptake from two boron compounds used for clinical neutron capture therapy," *Cancer Letters*, **187**, 135-141.
- Yu, J., Zhang, L. (2005), "The transcriptional targets of p53 in apoptosis control," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier Inc., **331**, 851-858.
- Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., Cataldi, A., Vitale, M. (1993), "Optimal Detection of Apoptosis by Flow Cytometry Depends on Cell Morphology," *Cytometry*, **14**, 891-897.
- Zuzak, T.J., Steinhoff, D.F., Sutton, L.N., Phillips, P.C., Eggert, A., Grotzer, M.A. (2002), "Loss of caspase-8 mRNA expression is common in childhood primitive neuroectodermal brain tumour/medulloblastoma," *European Journal of Cancer*, **38**, 83-91

BOREN (2011), “Bor Elementi Hakkında Genel Bilgiler,”

<http://www.boren.gov.tr/icerik.php?id=24>. Erişim tarihi 04.2011

Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü (2011), “Türkiye’de Bor Üretiminin

Tarihçesi,” http://www.etimaden.gov.tr/tr/0_sayfa_ortakSayfa.asp?

http://www.etimaden.gov.tr/tr/0_sayfa_ortakSayfa.asp?
http://www.etimaden.gov.tr/tr/0_sayfa_ortakSayfa.asp?
hangisayfa=4_sayfa_a_3. Erişim tarihi 05.2011

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) (2010), “Up to 40% of cancer cases could be prevented,” Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.

[http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-](http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2010/02/up-to-40-of-cancer-cases-could-be-prevented)

[http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-](http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2010/02/up-to-40-of-cancer-cases-could-be-prevented)
[http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-](http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2010/02/up-to-40-of-cancer-cases-could-be-prevented)

[http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-](http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2010/02/up-to-40-of-cancer-cases-could-be-prevented)
[http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-](http://www.euro.who.int/en/what-we-publish/information-for-the-media/sections/press-releases/2010/02/up-to-40-of-cancer-cases-could-be-prevented)
prevented. Erişim tarihi 06.2011