



**BOR TÜREVLERİNİN SERVİKS KANSERİ HÜCRELERİNİN BÜYÜMESİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE KOÇAK

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.**

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Doç. Dr. Mehmet KORKMAZ

**MANİSA
2011**

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm Yüksek Lisans eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılarından, gösterdikleri sevgi ve anlayışlarından dolayı başta sevgili hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet KORKMAZ'a, sonsuz desteğini, bilgi ve birikimini büyük bir sabırla paylaşan ve yol gösterici hocam Prof. Dr. İsmet Deliloğlu GÜRHAN'a, sevgili hocalarım Yrd. Doc. Dr. Nuray ALTINTAŞ ve Doc. Dr. F.Sırrı Çam'a, lisansüstü çalışma arkadaşım, 3 yıl boyunca çalışmalarımızı uyumlu bir şekilde yürüttüğümüz, iyi ve kötü zamanlarda birbirimize destek olduğumuz arkadaşım Erkan KAHRAMAN'a, lisansüstü eğitimim boyunca desteğini ve yardımını esirgemeyen Dr. Seda ÖRENAY BOYACIOĞLUN'a, Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde ki hayvan hücre kültürü ve doku mühendisliği laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşime en içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	II
ÖZET.....	VI
İNGİLİZCE ÖZET	VI I
ŞEKİL DİZİNİ	VIII
TABLO DİZİNİ	XI
SİMGE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.GENEL BİLGİLER	3
1.1. BOR.....	3
1.1.1. BOR MADENİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	3
1.1.2. BORUN CANLILARA ETKİSİ	7
1.1.3. BOR, İNSAN SAĞLIĞI VE KANSER	8
1.2 SERVİKS KANSERİ	11
1.2.1 KANSER	11
1.2.2 SERVİKS VE ANATOMİK YERLEŞİMİ.....	15

1.2.3 SERVİKS KANSERİ MEKANİZMASI	16
1.3 APOPİTOZ	20
1.3.1 APOPİTOZ ÖZELLİKLERİ	20
1.3.2 APOPİTOZ MEKANİZMASI & ANNEKSİN & KASPAZLAR.....	22
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
2.1 GEREÇ	35
2.1.1 HÜCRE DİZİLERİ	35
2.1.2 KİMYASAL MADDELER	35
2.1.3 MALZEMELER	36
2.1.4 AYGITLAR	37
2.2 YÖNTEM	39
2.2.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ İÇİN STERİLİZASYON	39
2.2.2 HÜCRE DİZİLERİ VE KÜLTÜR AŞAMASI	39
2.2.3 HÜCRELERİN VE BOR SOLUSYONLARININ DENEY İÇİN HAZIRLANMASI	43
2.2.4 YAPILAN ANALİZLER	48

2.2.4.1 KOLORİMETRİK ANALİZLER.....	46
A. MTT ANALİZİ.....	46
B. CASPASE GLO 3/7 KİTİ İÇERİĞİ, UYGULANMASI VE ANALİZİ.....	48
C. CASPASE GLO 8 KİTİ İÇERİĞİ, UYGULANMASI VE ANALİZİ	48
D. CASPASE GLO 9 KİTİ İÇERİĞİ, UYGULANMASI VE ANALİZİ	50
2.2.4.2 MİKROSKOBİK ANALİZLER.....	51
A. ANNEKSİN V FITC KİT İÇERİĞİ, UYGULANMASI VE ANALİZİ.....	51
B. CASPASE FITC FAD FMK KİT İÇERİĞİ, UYGULANMASI VE ANALİZİ.....	52
2.2.4.3 İSTATİSTİK ANALİZ	52
3.BULGULAR	53
3.1 HÜCRE KİNETİĞİ.....	53
3.2 KOLORİMETRİK TESTLER.....	61
3.3 MİKROSKOBİK ANALİZLER	71
4.TARTIŞMA	82
5.KAYNAKLAR	86

ÖZET

Bio. Ayşe Koçak

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD. Manisa

TÜRKİYE

Amaç ve kapsam: Farklı Bor türevlerinin serviks kanseri hücre hattında büyümesinin gözlenmesi ve apoptozis yollarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal-metod: American tissue cell culture'dan ticari olarak alınan HTB-32 serviks karsinoma ve CCL-62 He-La kontaminantı, ölümsüz serviks hücre hatları uygun koşullarda optimize edilmiş ve Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü, hayvan hücre kültürü laboratuvarında tüm hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Gerekli üreme koşulları ayarlanan bu hücre hatlarının MTT ve hücre kinetiği ölçümleri yapılmıştır.

Borik asit (H_3BO_3), boraks pentahidrat ($Na_2B_4O_7 \cdot 5H_2O$) ve disodyum pentaborat dekahidratın ($Na_2O \cdot 5B_2O_3 \cdot 10H_2O$) farklı konsantrasyonları uygulanmıştır.

Caspase-Glo 3/7 Assay, Caspase-Glo 8 Assay, Caspase-Glo 9 Assay, Annexin V FITC ve Caspase VAD FMK kitleri ile apoptoz analizi yapılmıştır.

Veriler, annexin V ve caspase Vad FMK testleri için Ki kare testi, Caspase 3/7, caspase 8, Caspase 9 testleri için ise Student T ve ANOVA testleri kullanılmıştır. Odd Ratio oranları %95 güven aralığı içerisinde SPSS 16.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Tartışma-Sonuç: HTB-32 hücre hattına madde uygulamasını takiben, kontrole göre, % canlılık oranını baskılamada DPD'nin, tüm dozları etkili olmaktadır. Ayrıca, DPD'nin güne bağlı artan her dozunda, apoptozisin iç yolak ve dış yollarını kapsayan kaspaz 3/7, anneksin 5, fas ligand, kaspaz 8, kaspaz 9 ölçümlerinde, borik asit ve pentaborat dekahidrata göre daha anlamlı sonuçlar alınmıştır, bu sebeple daha iyi bir apoptotik ajan olduğu öngörülmektedir.

ABSTRACT

Bio. Ayse Kocak

Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology and Genetics.

Manisa

TURKEY

Aim: Different Boron derivatives observation of cervical cancer cell line growth and apoptosis pathways were investigated.

Materials and Methods: American tissue cell carcinoma of the cervix culture commercially from the HTB-32 and CCL-62 cervical cell lines and suitable conditions have been optimized and animal cell culture laboratory of the Department of Bioengineering, Ege University Faculty of Engineering, all cell culture studies were conducted. Set the required growth conditions and cell kinetics of these cell lines were measured by MTT.

Boric acid (H_3BO_3), borax pentahydrate ($Na_2B_4O_7 \cdot 5H_2O$) and disodium pentaborate decahydrate ($Na_2O \cdot 5B_2O_3 \cdot 10H_2O$) was applied in different concentrations.

Caspase-Glo 3 / 7 Assay, caspase-Glo 8 Assay, caspase-Glo 9 Assay, and Annexin V-FITC apoptosis analysis was performed with the kits.

Data, Annexin V and caspase chi-square test for testing Vad FMK, caspase 3 / 7, caspase 8, caspase 9 in the Student's t and ANOVA tests were used for testing. Odd Ratio of rates within 95% confidence interval were evaluated statistically using SPSS 10.0.

Conclusion and discussion; HTB-32 cell line, the rate of vitality in suppressing DPD, the effective dose olmaktadır. En all the doses effective $1000\mu M$ was 5. day. In addition, increasing the dose of DPD on the day, covering the caspase pathway of apoptosis in the inner and outer pathway 3 / 7, Anneke 5, moroccan ligand, caspase 8, caspase-9 measurements, boric acid, and a more significant results have been dekahidrata pentaborate, therefore, more a well-apoptotic agent that can be envisaged.

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Bor elementi.....	5
Şekil 2. a-Normal hücre bölünmesi, b-Kanserli hücre bölünmesi.....	12
Şekil 3. Kanser aşamaları	14
Şekil 4. Kanser başlangıcı.....	14
Şekil 5. Kanser yayılımı	15
Şekil 6. Serviksin anatomisi.....	18
Şekil 7. HPV 16'nın genomik haritası	21
Şekil 8. Embriyonik gelişimde apoptoz	25
Şekil 9. Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz	27
Şekil 10. TNF α sinyal yoluyla apoptoz	27
Şekil 11. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması	29
Şekil 12. Aktifleşen Bid ile Bak aktivasyonu	31
Şekil 13. Aktifleşen Bid ile Bak ve Bax aktivasyonu	32
Şekil 14. Mitokondrial yolda Bad proteini ile apoptoz	34
Şekil 15. Çalışma düzeni	40
Şekil 16. Steril kabin içerisinde flaskların hazırlanması.....	41

Şekil 17. Çalışma düzeni ve besiyerleri.....	42
Şekil 18. Bor türevlerinin hazırlanması	45
Şekil 19. HTB-32 üreme kinetiği	56
Şekil 20. CCL-62 üreme kinetiği	57
Şekil 21. CCL-62 (P/12) Mikroskopi Görüntüleri (10X objektifle büyütme)	58
Şekil 22. HTB-32 (P/13) Mikroskopi Görüntüleri (10X objektifle büyütme)	59
Şekil 23 a. , Şekil 23 b. , Şekil 23 c. (HTB-32) , Şekil 23 d. , Şekil 23 e ve Şekil 23 f Tripan blue yöntemiyle canlılık ölçümleri.....	60
Şekil 24. MTT kalibrasyon eğrisi	63
Şekil 25. Bor Bileşiklerinin MTT Testi Sonucu HTB-32 Hücre hattının proliferasyonu üzerine olan etkileri (% olarak baskılama oranları)	64
Şekil 26. Bor Bileşiklerinin MTT Testi Sonucu CCL-62 Hücre hattının proliferasyonu üzerine olan etkileri (% olarak baskılama oranları)	65
Şekil 27. HTB-32 Serviks karsinoma hücre dizisi Kaspaz ölçümleri	68
Şekil 28. CCL-62 hücre dizisi Kaspaz ölçümleri	71
Şekil 29. Borik asit ile Annexin FITC ölçümleri	73
Şekil 30. BP ile Annexin V FITC ölçümleri.....	74
Şekil 31. DPD ile anneksin V FITC ölçümleri.....	75
Şekil 32. Annexin V FITC ile apoptotik hücreler (CCL-62,P/14,3.Gün,1000µM DPD ile) (10X objektif ile)	76
Şekil 33 a-b. Annexin V FITC ile apoptotik hücreler (HTB-32,P/16,5.Gün,1000µM DPD ile) (10X objektif ile)	77
Şekil 34. Annexin V FITC ile canlı hücreler CCL-62 (P/14,3.Gün,500µM BA ile muamele) (10X objektif ile)	77

Şekil 35. Annexin V FITC ile canlı hücreler HTB-32 (P/16,3.gün,500µM BA ile muamele (10X objektif ile)	78
Şekil 36. HTB-32 P/14 1000µM DPD 5.gün ölçümü	79
Şekil 37. BP ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü.....	80
Şekil 38. BA ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü	81
Şekil 39. DPD ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü	82



TABLO DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo.1. Bor Elementinin Özellikleri3

Tablo 2. HTB-32 kaspaz analizleri67

Tablo 3. CCL-62 kaspaz analizleri69



SİMGE KISALTMALAR DİZİNİ

ATCC: American Tissue and Cultures

HTB-32: Serviks karsinoma hücresi

CCL-62: Serviks Epitelyal hücresi

B: Bor

BA: Borik Asit

BP: Boraks Pentahidrat

DPD: Disoydum Pentaborat Dekahidrat

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

HPV: Human Papilloma Virus

Ppm: Perts per million

Mg: Miligram

Kg: Kilogram

NAD: Nikotinamid adenin di nükleotit

NADP: Nikotinamid adenin di nükleotit fosfat

FAD: Flavin

NK: Natural öldürücü

ŞEKİL VE KISALTMALAR DİZİNİ DEVAM

Ca: Kalsiyum

Mg: Magnezyum

TNF: Tümör nekroz faktör

DU-145: Prostat Kanser Hücre hattı

MDA-MD-231: İnsan Meme Hücre hattı

TSE: Türkiye Standartları Enstitüsü

GSH: Glutasyon

EEG: Elektroensefalogram

URR: Uzun kontrol bölgesi

ORF: Açık okuma bölgesi

EM: elektron mikroskop

DED: Ölümü oluşturan bölge

DISC: Ölümü başlatan sinyallerine yapısı

FADD: Fas Adaptör Ölüm Bölgesi

CARD: Kaspazı aktive eden bölge

DMSO: Dimetilsülfoksit

DMEM: D-Minimum Esansiyel Medyum

EMEM: Eagle Minimum Esansiyel Medyum

PBS: Fosfatlanmış tuz tamponu

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

HBSS: Hank's Balanced Salt



GİRİŞ VE AMAÇ

Bor, kimyasal sembolü (B) olup, periyodik cetvelin 5. elementi ve III A grubunun metal olmayan tek elementidir (1). 1980 yılından beri iz element olarak tanımlanan bor, 1996 yılında epidemiyolojik verilerin eksikliği de dikkate alınarak Dünya Sağlık Örgütünce (DSÖ) “insan sağlığı için olası temel elementler” sınıfına alınmıştır (2). Eğer bora maruz kalınırsa, çoğunluğu solunum gastrointestinal sistem tarafından emilir. Çoğunlukla vücut doku ve sıvılarıyla emilmektedir, borik asit, $B(OH)_3$ ve az miktarda B (OH) formundadır (3).

Deney hayvanlarında ve kısıtlı epidemiyolojik çalışmalarda doğal ve sentetik bor bileşiklerinin birçok yararlı etkileri gösterilmiştir. Kemik metabolizması açısından önemli olan vitamin D, kalsiyum ve magnezyum ile ilişkisinin yanında steroid hormon mekanizmasını etkilediği ve menapoz sonrası kadınlarda antioksidan etkileri saptanabilmiş birkaç örnektir (4). Son yıllarda özellikle bazı kanser türleri üzerinde koruyucu ve tedavi edici etkileri üzerinde gerek epidemiyolojik gerekse hayvan ve laboratuvar çalışmalarından ümit verici sonuçlar ortaya çıkmaktadır (5, 6, 7).

Mortalite sıralamasında ikinci sıraya yükselen kanser; hücre çoğalması, apoptozis (programlı hücre ölümü), farklılaşma, yaşlılık ve bunların kendi iç dengelerindeki kontrol yollarının bozulmasıyla, genetik ve epigenetik değişikliklerle uyarılan çok aşamalı moleküler bir süreçtir. Karsenogenezis de önemli iki ana faktör vardır, bunların ilki artan hücre proliferasyonu diğeri ise azalan apoptozistir (8). Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (9).

Serviks kanseri kadın kanserleri içerisinde meme kanserinden sonra dünyada en sık görülen ikinci kanser türüdür. Dünya sağlık örgütünün verilerine göre dünyada her yıl yaklaşık olarak 500 000 kadın serviks kanseri teşhisi almaktadır ve bu kişilerin her yıl yaklaşık 270 000’i hayatını bu hastalık sebebiyle yitirmektedir (10) . Ortalama görülme yaşı 52 olup 35-39 ve 60-64 yaşları arasında iki ayrı dönem içerisinde pik yapmaktadır (11).

Bugüne kadar az sayıda yapılan epidemiyolojik ve in vitro çalışmalarda doğadaki serbest bor ve bazı yüksek bor içerikli sentetik bileşiklerin serviks kanseri ile prostat, meme, akciğer gibi değişik kanserleri önleyebileceği yönünde çalışmalara rastlanmaktadır (12).

Korkmaz (2007) ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bor yönünden zengin bölgede yaşayan 472 ve bor yönünden fakir bölgede yaşayan 587, toplam 1059 sosyoekonomik düzeyi düşük kadından servikal smear alınmıştır ve bor yönünden zengin bölgede yaşayan kadınlarda servikal kanser için herhangi bir sitopatolojik bulguya rastlanamamışken bor yönünden fakir bölgede yaşayan 15 kadında sitopatolojik bulgulara rastlanmıştır (13). Bu bağlamda bor ve türevlerinin HPV'nin inhibisyonu ya da hücre proliferasyonunun üzerine mi etkisinin olduğu net değildir. Bu noktada bizim çalışmamız, serviks kanseri hücre hattında, hücre proliferasyonu açısından ele alınacağı için deney sonuçlarımızın da net olmayan bilgilere ışık tutacağını düşünmekteyiz. Bu amaçla farklı 3 bor türevinin (Borik asit, boraks pentahidrat ve disodyum pentaborat dekahidrat) değişik konsantrasyonlarını kullanarak, serviks kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunun ortaya çıkarılması planlanmıştır.

Bu çalışmada; antikanserojen özelliğinin olduğu öngörülen farklı bor bileşiklerinin serviks karsinoma (HTB-32) ve serviks HeLa kontaminatı epitelyal hücre dizilerine (CCL-62) uygulanmasıyla, farklı büyüme profillerinin gözlemlenmesi, ayrıca kanserleşme sürecindeki önemli mekanizmalar olan apoptotik yolların incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1.Bor

1.1.1 Bor elementinin genel özellikleri

Bor, periyodik tabloda B simgesi ile gösterilen, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Bor, tabiatta hiçbir zaman serbest halde bulunmaz. Doğada yaklaşık 230 çeşit bor türü olduğu bilinmektedir (14).

Tablo 1. Bor Elementinin Özellikleri

Atomik yapısı	
Atomik hacmi	4,6 cm ³ /mol
Elektron konfigürasyonu	1s ² 2s ² 2p ¹
Elektron sayısı	(yüksüz) 5
Proton sayısı	5
Atomik hacmi	4,6 cm ³ /mol
Atomik çapı	1,17 Å
Kristal yapısı	Rhombohedral
İyonik çapı	0,23 Å
Nötron sayısı	6
Valans elektronları	2s ² 2p ¹
Kimyasal özellikler	
Elektrokimyasal eşdeğer	0,1344 g/amp-hr
Elektronegativite(pauling)	2,04
Füzyon ısısı	50,2 kJ/mol
İyonizasyon potansiyeli:	
Birinci:	8,298
İkinci:	25,154
Üçüncü:	37,93

Valans elektron potansiyeli(- eV)	190
Fiziksel özellikler	
Atomik kütlesi	10,811
Kaynama noktası	4275°K 4002°C 7236°F
Termal genişleme katsayısı	0,0000083 cm/cm/°C(0°C)
Kondüktivite: Elektriksel: Termal:	1,0E-12 106/cm 0,274W/cmK
Yoğunluk	2,34 g/cc@300K
Görünüş	Sarı-kahverengi ametal kristal
Elastik modülü Bulk:	320/GPa
Atomizasyon entalpisi	573,2 kJ/mole@ 25 °C
Füzyon entalpisi	22,18 kJ/mole
Spesifik ısı	1,02 J/gK
Molar hacmi	4,68 cm ³ /mole
Fiziksel durumu	20 °C & 1 atm) katı
Buharlaştırma ısısı	0,348 Pa@2300 °C



Şekil 1. Bor elementi

Bor okyanuslarda, kayalarda, madenlerde ve bazı topraklarda borat formunda olan ve düşük konsantrasyonlarda tabiatta doğal olarak bulunan bir elementtir. Yer kabuğunda yaklaşık 10 mg/kg ve okyanuslarda 4.5 mg/L konsantrasyonlarındadır. Bor çevreye ana olarak kayalardan aşınma, deniz sularından ve volkanik aktivite yolu ile borik asidin buharlaşması yoluyla yayılır (15).

Bor mineralleri ve bileşikleri çeşitle endüstri dallarında çok farklı malzeme ve ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır. Bor ve ürünlerinin kullanım alanlarını aşağıdaki gruplarda toplamak mümkündür;

Cam Sanayi: Borosilikat camları. İzolasyon cam elyafı, tekstil cam elyafı, optik lifler, cam seramikleri, şişe ve diğer düz camlarda.

Seramik Sanayi: Emaye, sır, sırça, porselenlerde.

Nükleer Sanayi: Nükleer kazalarda güvenlik amaçlı ve nükleer atık depolayıcı olarak, (Reaktör kontrol çubukları) , uzay ve havacılık sanayinde (sürtünme – aşınmaya dayanıklı malzemeler, roket katkı malzemeleri).

Askeri & Zırhlı Araçlar: Zırh plakalar, kompozit malzemelerde.

Elektronik – Elektrik ve Bilgisayar Sanayinde: Bilgisayarların mikro çiplerinde, CD- sürücülerinde bilgisayar ağlarında; Isıya – aşınmaya dayanıklı fiber optik kablolar, yarı iletkenler, vakum tüpler, elektrik kondansatörleri, gecikmeli sigortalarda.

İletişim Araçlarında: Cep telefonları, modemler, televizyonlarda.

İnşaat – Çimento Sektöründe: Mukavemet ve izolasyon artırıcılarda.

Metalurji: Paslanmaz ve alaşımlı çelik, sürtünmeye ve aşınmaya dayanıklı malzemeler, briket malzemeleri, lehimleme, döküm malzemelerinde katkı maddesi olarak.

Enerji sektöründe: Hidrojen taşıyıcı, güneş enerjisinin depolanması güneş pillerinde koruyucu olarak.

Otomobil sanayinde: Hava yastıklarında, hidroliklerde, ısı ve ses yalıtımı sağlamak amacıyla, antifriz karışımına katkı maddesi olarak.

Tekstil Sektöründe: Isınmaya dayanıklı kumaşlar, yanmayı geciktirici ve önleyici selülozik malzemeler, izolasyon malzemeleri, tekstil boya ları, deri renklendiricileri, suni ipek parlatma malzemelerinde.

Kimya sanayinde: Bazı kimyasalların indirgenmesinde, elektrolitik işlemlerde, banyo çözeltilerinde, petrol boya larında, yanmayan erimeyen boya larında, tekstil boya larında.

Tıp alanında: Osteoporoz tedavilerinde, alerjik hastalıklarda, psikiyatride, kemik gelişiminde ve artiritte, menopoz tedavisinde, beyin kanserlerinin tedavisinde (BNCT), dezenfekte edicilerde, antiseptiklerde.

Tarım sektöründe: Suni gübrede (bitkilerin gelişiminde) ve böcek öldürücü olarak (insektisit).

Koruyucu olarak: Ahşap malzemelerde ve ağaçlarda koruyucu olarak, boya ve vernik kurutucularında.

Kağıt Sanayi: Beyazlatıcı olarak.

Temizleme ve beyazlatma Sanayinde: Toz deterjanlar, toz beyazlatıcılar, parlaticılarda, bu alanlara ek olarak; Mumyalamada, manyetik cihazlarda, korozyonu önlemede, fotoğraf kimyasallarında, mıknatıslarda kullanılmaktadır (16).

1.1.2 Borun canlılara etkisi

Yerkabuğu denizler yeraltı-yerüstü suları bor içermektedir. Bor yatakları çevresinde içme ve kullanma suları bor yoğunlukları yüksek yerde yaşamını sürdürenler bor ve bileşiklerine çevre yoluyla ve temelde yiyecek ve içeceklerle maruz kalmaktadır (12).

Pek çok araştırma borun bitki yaşamında temel element toprakta hatta insan yaşamında belli sınırlarda olmak kaydıyla önemli olduğunu göstermektedir. Bor endüstri atık sonucu limit değerleri aştığında suda yaşayan canlılara veya tarımsal sulamada kullanılması halinde bitkilere zarar verebilmektedir. Endüstride, tarımsal alanlarda ve içmesularındaki bor konsantrasyonu çevresel açıdan oldukça önemlidir (17).

İnsanlarda ve hayvanlarda alınan borun fazlası vücuttan atıldığı için borik asit ancak yüksek dozlarda alındığı zaman toksik etki gösterebilir (18). 18 ile 20 g arasında bir yetişkin dozunun ölümcül olduğu gösterilmesine rağmen, bor sebebiyle ölüm nadir görülmektedir ve hatta bazı yetişkinler 80- 297 g boru tolere edebilmektedir (18, 19). Borik asitin potansiyel lethal dozunun genellikle yeni doğanlar için 3 ila 6 g, yetişkinler için 15 ila 20 g olduğu belirtilmektedir (20).

Hayvanlarda ve insanlarda absorbe edilen borik asit metabolize edilmeden hızlı bir şekilde pasif difüzyon yolu ile vücut sıvılarına yayılmaktadır (21, 22). Vücut sıvılarında ve dokularda en fazla borik asit $B(OH)_3$ olarak daha az miktarda da $B(OH)_4^-$ anyonu olarak bulunur. İnsan kanında % 98.4 oranında borik asit ve % 1.6 oranında da borat anyonu şeklindedir. Bor kemik dokuda birikmektedir fakat yumuşak dokularda herhangi bir bor birikmesi olmamaktadır (23). 50 sağlıklı insanda yapılan çalışma tam kan, serum ve idrar bor konsantrasyonu ortalamasının sırasıyla 0.06, 0.02, 0.75 olduğunu göstermiştir (24).

1.1.3 Bor, insan sağlığı ve kanser

Epidemiyolojik verilerin eksikliğine rağmen WHO borun insan sağlığı için fizyolojik olarak yarar sağlayabileceğini rapor etmiştir. Deneysel insan çalışmaları borun yaşam içerisinde metabolizmaya yada yarar sağlayıcı kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glukoz, trigliserid, reaktif oksijen ve östrojen süreçleri gibi ciddi yaşamsal faliyetlere etki edebildiğini göstermiştir (25). Çeşitli metabolik aktivitelere etki ettiği bilinen bor 1980 yılında iz element olarak tanımlanmıştır (2).

İnsan vücudunda toplam bor konsantrasyonu 3 ile 20 mg arasında değişmektedir. Total olarak İnsan vücuduna bor 3 farklı yolla alınabilir;

- a) İçme suyu ile
- b) Yiyecekler ile
- c) Soluma (havadaki tozmadan) ve deri yoluyla (4).

Hunt borun hayvanlarda, bitkilerde, kültüre ortamlarda ve kimyasal reaksiyon sistemlerinde en az 26 enzimin aktivitesine etki ettiğinin bildirmiştir. Bor immun sistem, insulin salınımı, enerji substrat yolaklarını içeren enzimatik aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. NADPH seviyelerinin düzenlenmesinde etkin rolü vardır. NADPH molekülü, hücrelerde indirgenmiş glutatyon (GSH) miktarını artırarak oksidatif stresi buna bağlı olarak da oksidatif hasarları azaltabilmektedir. Buradan anlaşılacağı üzere borun, oksidatif stres ve oksidatif solunum üzerinde etkisi büyüktür (26).

Buna ek olarak; kalsiyum, fosfor, vitamin D, magnezyum, molibden, alüminyum gibi çeşitli mikronutrientlerin metabolizmasında düzenleyici bir rol oynamaktadır. Kemik metabolizması açısından önemli olan vitamin D, kalsiyum ve magnezyum ile ilişkisinin yanında steroid hormon mekanizmasını etkilediği ve menapoz sonrası kadınlarda antioksidan etkileri saptanabilmiş birkaç örnektir (27-30).

Menapoz sonrası osteoporoz görülen kadınlarnın serumlarındaki kalsitonin seviyeleri diğer insanlara göre daha yüksek seviyede bulunmaktadır klinikte bilinmektedir ki; serumda kalsitonin seviyelerinin yüksek olması kalsiyum atılımını artırmaktadır.

Bor günlük olarak yeterli miktarda alındığında serumdaki kalsitonin seviyesi düşmekte ve buna bağlı olarak da kalsiyum kaybı azalmaktadır (28, 29). Borun mikronütrient metabolizmasını olumlu yönde etkilemesi ve bunun yanında serumdaki kalsitonin seviyesini düşürmesi borun osteoporoz oluşumunun önlenmesinde çok önemli bir rol oynayabileceğinin işareti olmuştur (4, 28, 29). Bor beslenmesinin 8.gününde; Ca ve Mg'un boşaltımla atılımının % 40 ve %33 azaldığı görülmüştür (31). Steroid hormon metabolizması üzerinde yapılan birçok çalışmada göstermiştir ki; menopoz sonrası dönemde 7 hafta boyunca günde 3 mg bor kullanan kadınlarda 17-β estradiol hormonun önemli oranda arttığı gözlemlendi.

Steroid 15 hormon seviyelerin yükselmesi kalsiyum atılımını azaltmaktadır. Bundan dolayı borun günlük olarak yeterli miktarda alınması osteoporoz görülen bayanlar için büyük önem taşıdığı görüldü (4, 28-30).

İnsanlarda dört hafta boyunca süren bor uygulamasında plazma lipidlerinin konsantrasyonlarında, LDL ve HDL yapılarının dağılım miktarlarında herhangi bir değişiklik saptanamamıştır(32). Bor, T hücrelerinin aktivitesini azaltarak ve serumdaki antikor konsantrasyonlarını düzenleyerek artirit sonucu oluşacak olumsuz etkileri azaltmaktadır (4, 33). Romatoid artrit ile ilgili yapılan çalışmalarda içme suyunda, toprakta, meyve ve sebzelerde daha yüksek oranda bor içeren bölgelerde gözlenen artrit vakalarının bor konsantrasyonu daha düşük olan bölgelere göre daha az olduğu bildirilmiştir (4, 28, 33, 34).

Ayrıca yapılan bir başka çalışma Borun antioksidant özelliğini ortaya koymaktadır ve bu özelliği ile ateroskleroz hastalığının önlenmesinde etkin bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. (4).

Moleküler düzeyde DNA ve RNA üzerinde borik asitin belirli doz üzerinde özellikle pre-mRNA yapısında inhibe edici özelliklerin bulunması buna ek olarak bazı RNA'lar için katalitik etkisinin olduğu moleküler çalışmalar tarafından desteklenmiştir. (36, 37). Tümör nekrozu faktörü (TNF) (*tumor necrosis factor*), birçok hücre tipi tarafından salgılanan ve kanserli hücrelerin yıkımını sağlayan bir sitokindir. 185 amino asitlik bir glikoprotein hormonudur, ancak bazı hücreler daha uzun veya daha kısa izoformlarını salgılayabilir (9) :

İnsanlarda 7. kromozomda kodlanır. İki formu bulunmaktadır:

1. TNF alfa (TNF α , kaşektin/kaşeksin; *cachectin/cachexin*)

2. TNF beta (TNF β , lenfotoksin; *lymphotoxin*)

Metabolik işleyişte önemli bir görevi olan TNF- α 'nın bor alımıyla ilişkili olduğu araştırmalarla ortaya konmuş olup, lipopolisakkarit ile uyarılmış Borik asit formlarının TNF- α üzerinde bir inhibitör etkisinin olduğu ancak aynı etkiyi borik asitin göstermediği gösterilmiştir (38).

Yapılan hücresel, klinik, epidemiyolojik çalışmalar diyetle alınan borun prostat kanser riskini azaltabileceğini öne sürmektedir (39, 40). Henderson K ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada borik asitin ryonidin reseptör duyarlı depolardan doza bağımlı olarak Ca²⁺ nın salınımını azalttığı gösterilmiş ve daha yüksek düzeyde kan borik asit düzeylerinin intraselüler Ca²⁺ siyallerinin ve depolarının azaltılması sebebiyle daha düşük bir prostat kanseri riski oluşturduğu belirlendi (40). Yapılan bazı çalışmalarda borun anti kanserojen özelliğe sahip olabileceğini gösterdi (5, 6). Ancak borun bu özelliklerinin hücre biyolojisinde, hangi mekanizmayla antikanserojen ve antioksidant etkilerini gösterdiği konusunda bilgiler sınırlıdır. Mevcut çalışmaların birinde prostat kanserinde farklı bor konsantrasyonları ile muamele edilen kanser hücrelerinde büyümeyi engelleyici bazı özellikler gözlemlendi. Bu çalışmaların birinde borun besin olarak alımı ile prostat kanseri riskinin ters orantılı olarak geliştiği gösterildi (5, 6, 7). Bir çalışmada Borik asidin; DU-145 prostat kanser hücrelerinin yüksek granülleşmesine, düşük volumüne ve yassılaştırmış hücrelere dönüşmesine sebep olduğuna dair çalışmalar gösterilmiştir (7). Meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmalarda ise; MDA-MB-231 insan meme hücrelerinde çalışılmış. BA ve kalsiyum fruktoborat meme kanser hücrelerini önlemede etkilidir demek çalışmanın sonuçları arasındadır. Korkmaz' ve ark (2007) çalışma grubunu yaptığı bir çalışmada ise; borik asit türevlerinden disodyum pentaborat dekahidrat'ın meme kanser hücrelerinde hücre büyümesini engellediği görüldü. Ancak hücre büyümesindeki azalmanın gerçek sebebinin bulunması için bu konuda daha geniş kapsamlı bir çalışmanın yapılması gerektiği de ortaya konuldu (41-42). Kültürde BA LNCap ve androjen bağımsız prostat kanseri hücreleri DU-145 ve PC-3'ün doza bağımlı bir şekilde hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterildi (43).

Korkmaz (2007) ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, bor yönünden zengin bölgede yaşayan 472 ve bor yönünden fakir bölgede yaşayan 587, toplam 1059 sosyoekonomik düzeyi düşük kadından servikal smear alınmıştır ve bor yönünden zengin bölgede yaşayan kadınlarda servikal kanser için herhangi bir sitopatolojik bulguya rastlanamamışken bor yönünden fakir bölgede yaşayan 15 kadında sitopatolojik bulgulara bulundu (13).

Mahabir S. ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada ise; kadınlarda bor alımı ve akciğer kanseri arasında ters bir ilişki olduğu bildirilmiş düşük düzeyde bor alan kadınlar ve HRT (hormon replasman tedavisini) kullanmayan kişilerdeki akciğer kanseri oranların önemli artış gösterdiği saptandı (44).

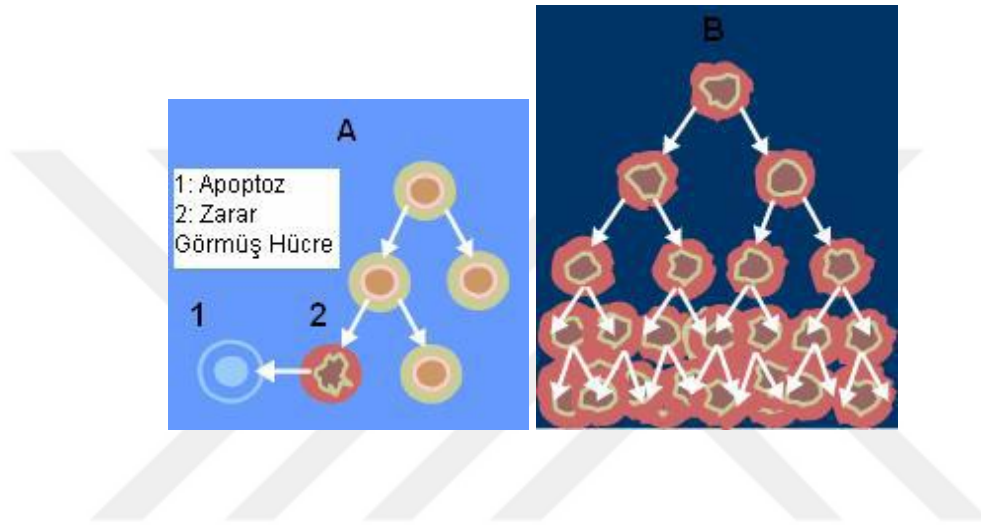
Yapılan çalışmalarla borun insan beyin fonksiyonları ve bilişsel performans üzerine etki ettiği gösterilmiştir. İnsanlarda beyin ve fizyolojik fonksiyonun ölçülmesi çalışmalarında diyetle yetersiz miktarda bor alımının hem elektroensefalogramda (EEG) daha düşük frekans aktivitesine yol açtığı hem de bilişsel ve motor testlerde daha az bir performans gösterildiği ortaya konuldu (35). Bor madeninde çalışan işçiler üzerinde yapılan bir çalışmada işçilerin depresyon düzeyleri araştırılmış ve işçilerin aldıkları depresyon puanlarına göre depresyonda olmadıkları belirlenmiştir (45).

1.2. SERVİKS KANSERİ

1.2.1. Kanser

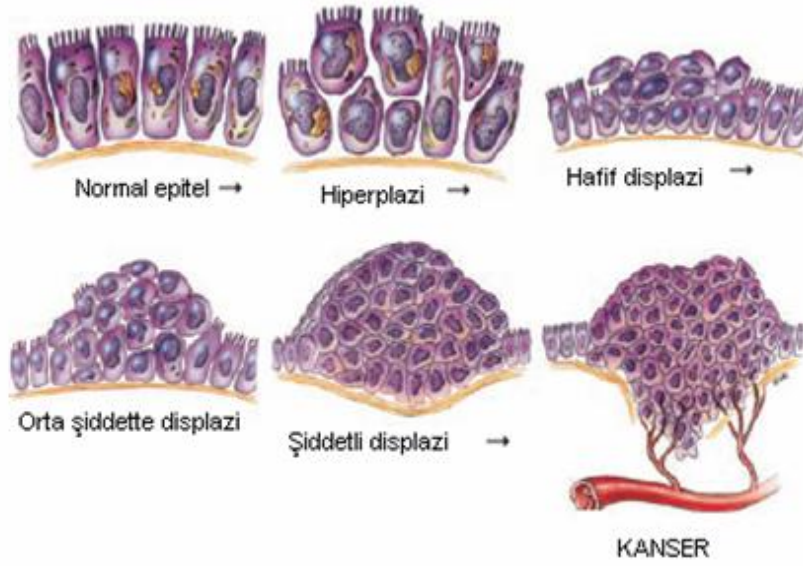
Hücre, tüm yaşayan organizmalar için yapısal, işlevsel bir birimdir ve yaşamın temel yapıtaşı olarak düşünülebilir. Hücreler normalde belli bir kontrol altında, ihtiyaca göre bölünerek çoğalırlar. Hücreler bir taraftan programlı ölüm (apoptoz) denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin (onkojen) etkisiyle oluşan proteinlerdir. Şekil 1.2.1'de görüldüğü gibi bu genler değişime uğradığında hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmalarına sebep olurlar (46-47).

Çoğalıp büyüyen bu hücrelerin oluşturduğu yapıları tümör denir. Tümörler, iyi huylu (benign-selim) ve kötü huylu (malign-habis) tümörler olarak iki gruba ayrılır . Kanser, bazı etkilerle değişime uğramış hücrelerin, gerek yerel ve gerek uzak noktalarda kontrolsüz olarak çoğalıp büyümelerinin sonucu oluşan habis hastalıklar grubudur . Başka bir deyişle, vücutta meydana gelen kötü huylu tümörlere kanser denir (47,48).



Şekil 2. a-Normal hücre bölünmesi, b-Kanserli hücre bölünmesi

Şekil 2. 'de görüldüğü gibi kanserli dokulara bakıldığında normal dokulardan farklı özelliklere sahip olduğu görülür. Kanserli dokulardaki bu farklılıklar, hücrelerin sayıca normalden fazla olması, çekirdeğin şekli ve boyutunun farklılığı, hücre yapısının normal dağılım ve dizilimini kaybetmesi olarak sıralanabilir. İmmünohistokimya ve diğer moleküler yöntemler kullanılarak, tümör hücreleri belirteçler ile tanımlanır ve kanserli dokular normal dokulardan ayırt edilebilmektedir (48).

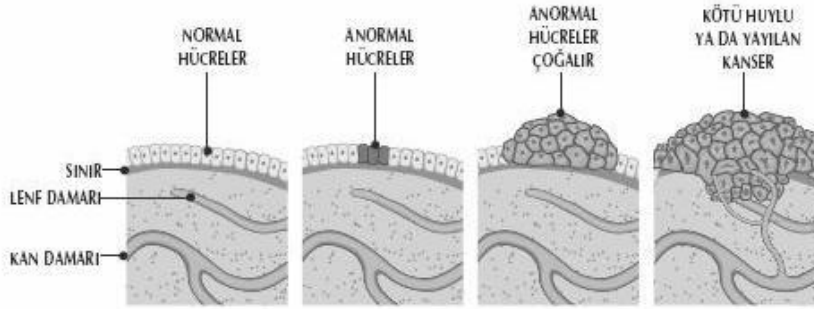


Şekil 3. Kanserin aşamaları

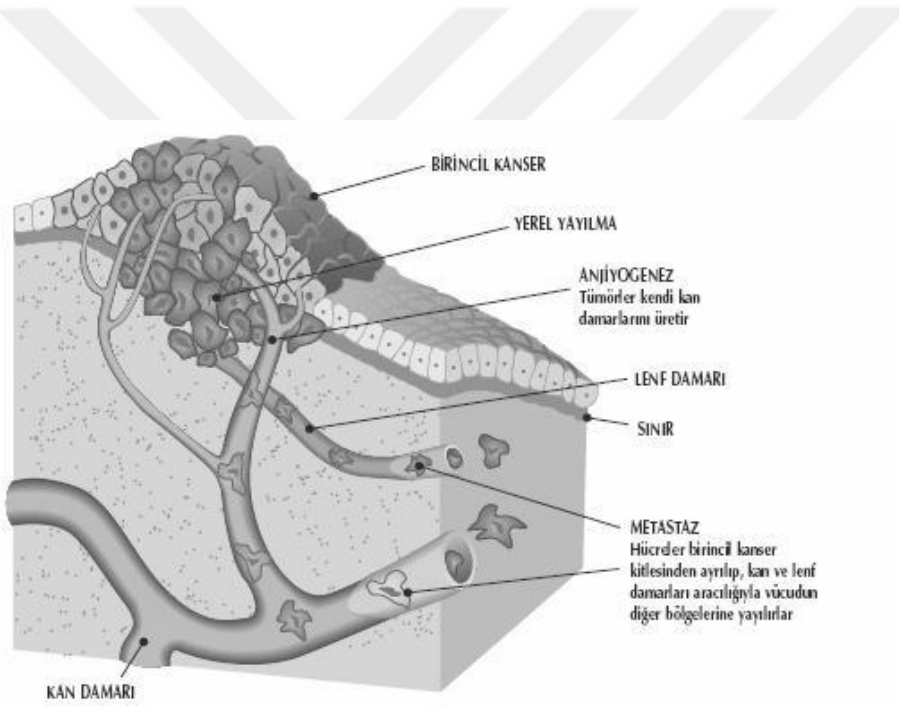
Biyopsi materyalinin mikroskopik incelemesinde, malignite ile hiperplazi birbirinden ayırt edilebilir. Hiperplazi, hücrenin gereğinden fazla sayıda bölünmesinden dolayı dokunun hücre sayısını artırarak büyümesidir. Bu aşamada, dokudaki hücre sayısı artar ancak hücrelerin dokudaki dizilimi normal dokudaki ile aynı kalır. Hiperplazi, geri dönüşümü olan bir aşamadır. Kanser hastalığına giden süreçlerden bir diğeri displazidir. Displazi, normal dokuların sahip olduğu hücre yapısı ve diziliminin kaybedildiği ve hücrelerin aşırı şekilde bölünerek çoğaldığı bir aşamadır (49).

Displastik değişiklikler gösteren serviks tedavi ile eski sağlıklı haline dönebilir ancak nadiren de olsa bu dönüşüm gerçekleşmez ve malign tümörler oluşur. Kanserde ise kontrolsüz şekilde bölünen hücreler büyüyüp çoğalırlar. Kanser hücreleri şekil 4’de görüldüğü gibi ya etraftaki dokuları istila ederek ya da lenf veya kan akışı ile vücudun diğer taraflarına yayılırlar (49).

Buna metastaz denir ve şekil 5’deki gibi yayılım göstermektedir (49).



Şekil 4. Kanserin Başlangıcı



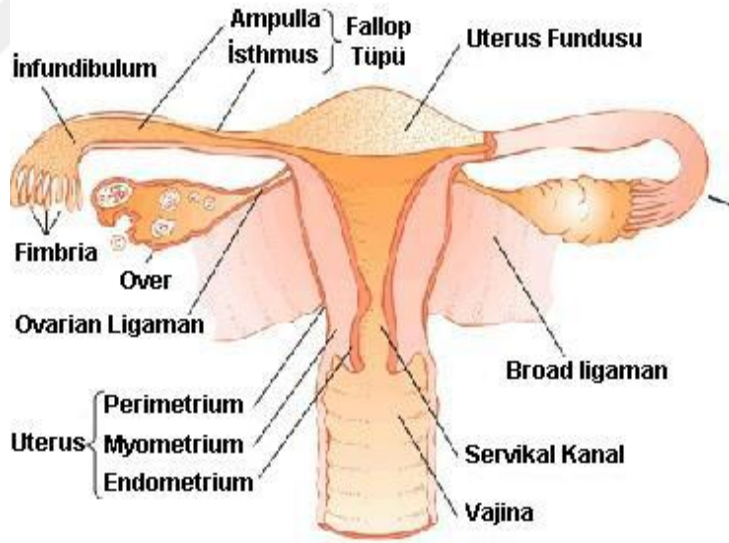
Şekil 5. Kanserin yayılımı

Kanserin sebepleri eksojen ve endojen olmak üzere ikiye ayrılabilir. Kimyasal maddeler, radyasyon, virüsler gibi eksojen nedenler ile hormonal, bağışıklık bozuklukları, kalıtsal mutasyonlar ve diğer genetik nedenler gibi endojen nedenler, birlikte veya ardışık olarak hücreleri etkileyerek uzun yıllar içinde kansere yol açabilirler (49).

1.2.2. Serviks ve anatomik yerleşimi

Uterus, mesane ve rektum arasında yer alan, döllenmiş yumurtanın doğuma kadar gelişimini sağlayan bir organdır. Uterus'un uzunluğu yaklaşık 7.5 cm genişliğinde 5 cm eninde olup kalınlığı 2.5 cm kadardır. Serviks önde mesaneden gözele yağlı bir dokuyla ayrılır, yanda ise serviksin damar ve lenfatiklerinin bulunduğu ligamentum kardinale ve parametriumlar bulunur. Saat 4 ve 8 hizasında, sakrouterin bağlar sakruma doğru uzanır. Endoserviks mukus salgılayan kriptomlardan zengin stroma üzerinde yer alan tek katlı silindirik epitelyum ile, ektoserviks ise yoğun fibröz stroma üzerinde yer alan çok katlı yassı epitelyum ile örtülüdür.

Orijinal yassı silindirik epitel sınırı ile metaplazisi tamamlandıktan sonra ortaya çıkan yeni yassı-silindirik epitel sınırı arasında kalan bölgede "transformasyon zonu" olarak adlandırılan bir geçiş bölgesi vardır ki bu bölge aktif metaplazi alanıdır ve genişliği yaklaşık 1-10 mm'dir (46).



Şekil 6. Serviksin anatomisi

1.2.3. Serviks kanseri mekanizması

Serviks kanseri tüm dünyadaki kadın kanserlerinin meme ve rektum kanserinden sonra 3. sıklıkta görülenidir. Gelişmekte olan ülkelerde 2. sıklıkta görülür iken, gelişmiş ülkelerde tarama programlarının başarılı uygulamaları nedeniyle 6. hatta bazı ülkelerde 10. sıraya inmiştir. Dünyada her yıl yaklaşık 400.000-500.000 yeni serviks kanseri saptanır iken, bunların 190.000 tanesi ölmekte, ölümlerin de %78'i gelişmekte olan ülkelerde görülmektedir. Bu sayılar serviks kanserinde tarama programlarının bu kanserin görülme sıklığını ve bu kanserden ölüm oranlarını azaltmakta ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (50,51). Serviks kanserinin sebebi serviksin devam eden çoğul hasar ve yaralanmaları ile ilişkili gibi gözükmektedir. Bu tip kanser, düşük sosyoekonomik gruptaki kadınlarda daha siktir ve ilk koitusun erken yaşta olması ve çoğul seksüel partnerle ilişkilidir.

Günümüzde servikal kanser etyolojisinde serviksin Human Papilloma Virus (HPV) enfeksiyonu büyük önem taşımaktadır. Skuamöz hücreli kanserlerin % 95'inde, adenokarsinomların da % 90'ında HPV DNA pozitif bulunmuştur (52).

Bütün papillomavirüsler küçük, çift iplikli ısıya dayanıklı DNA virüsleridir. HPV genomu 6800-8000 baz çiftinden oluşmuştur. Çift sarmallı çembersel DNA genomu 55 nm. çapında zarfsız, ikozahedral bir kapsidle çevrilidir. Organik solvanlara ve 560° C'lik sıcaklığa dayanıklıdırlar (53,54).

Viral partikül ağırlığının %80-90'ı kapsid proteinlerinden oluşur. Virion 72 kapsomerden (60 hegzamerik + 12 pentamerik) oluşan ikozahedral bir kapsid ile çevrilidir. Viral kapsid 2 proteinden oluşur. Bu proteinler; L1 geni tarafından kodlanan major protein ve L2 geni tarafından kodlanan minor proteindir. Yaklaşık 56.000 Dalton molekül ağırlığındaki L1 major kapsid proteini virion ağırlığının %80'ini oluşturur (54). Minör kapsid proteininin ağırlığı ise yaklaşık 76.000 Daltondur.

Viral DNA;

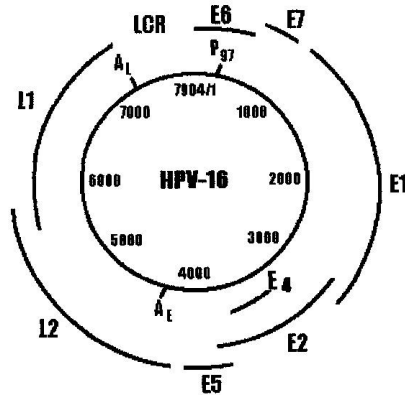
1. Kodlanmamış düzenleyici bölge (URR, LCR)
2. Açık okuma alanı (Open reading frame=ORF)

- a) erken gen bölgesi
- b) geç gen bölgesi'nden oluşur.

Viral DNA kodlanmamış düzenleyici bölge (URR veya LCR) ve açık okuma alanı (Open reading frame=ORF) olmak üzere iki bölüme ayrılır ve tamamı tek bir DNA sarmalı üzerinde kodlanır (53). Kodlanmamış bölge yaklaşık 400-1000 baz çiftinden oluşur ve uzun kontrol bölgesi (URR veya LCR) diye de adlandırılır. Bu bölge p57 promotör bölgesini de içine alır. Aktivatör ve baskılayıcılar sayesinde, ORF'lerin transkripsiyonu da kontrol altında tutularak, DNA replikasyonu düzenlenir. Dolayısıyla, URR viral proteinlerin regülasyonunda önemli rol sahiptir (55). Açık okuma alanı (ORF), erken ve geç gen bölgesi olmak üzere iki bölgeyi kodlar. Toplam 10 fonksiyonel bölge vardır. Bunlardan 8 tanesi erken, 2 tanesi geç bölge genidir.

Erken ORF'ler E1'den E8'e kadar numaralandırılmıştır ve viral replikasyon, enfeksiyon ve entegrasyonda major rol oynayan proteinleri kodlarlar. Erken ORF'ler E1, E2, E4, E5, E6, E7 olarak tanımlanır ve her birinin farklı bir fonksiyonu vardır. HPV'de E3 ve E8 ORF'nin bilinen bir fonksiyonu olmadığı için toplam erken ORF sayısı 6 olarak kabul edilmektedir. Geç ORF'ler ise L1 ve L2 olmak üzere iki tanedir (56,57).

Genomik haritası en ayrıntılı belirlenmiş HPV tipi HPV 16'dır. Şekil 7'de HPV 16'nın genomik haritasında görüldüğü üzere; çift sarmallı çembersel DNA molekülü 7904 baz çiftinden oluşmuştur. Transkripsiyon saat yönünde gerçekleşir. HPV 16 için haritalanmış olan tek transkripsiyonel promotör p97'dir. DNA sekansı sonucu ortaya çıkan ORF'ler E1-7, L1 ve L2 çembersel genomun dış tarafında gösterilmiştir. AE ve AL ile erken ve geç poliadenilasyon bölgelerinde gösterilmiştir. Viral uzun kontrol bölgesi (LCR) transkripsiyon ve replikasyon için düzenleyici elemanlar bulundurur (57,58).



Şekil 7. HPV 16'nın genomik haritası (61).

Herbir ORF; büyüklüğüne, çembersel genomdaki pozisyonuna ve erken/geç bölgede yer almasına göre kodlanır. Genomun erken bölgesi (E1-8) düzenleyici (regulatory) proteinleri kodlar. Bu proteinler, üretken olmayan enfekte hücrelerde ve transforme hücrelerde eksprese edilen transkripsiyon ve replikasyondan sorumlu proteinlerdir. Replikasyon sırasında önce erken bölge proteinleri, sonra geç bölge proteinleri sentez edilir (59).

Erken bölge ORF'leri:

E1 ve E2 genomik replikasyonda görevli kritik proteinleri kodlar. E4'ün fonksiyonu tam olarak anlaşılamayan sitoplazmik fosfoproteini kodladığı ve sitokeratin yapısını bozduğu bilinmektedir. E5, E6 ve E7 onkogenler olarak tanımlanır. E5 proteini büyüme reseptörlerini membrana bağlanarak aktive eder. Son yıllarda yapılan çalımsalar E5'in DNA hasarını takiben apoptozisi önlediğine dikkati çekmektedir (60). Viral entegrasyon sırasında E5'in de içinde bulunduğu genomun büyük bir parçası silinir. Bu nedenle E5'in, HPV ile ilişkili geç dönem karsinogeneziste önemli bir rolü olmadığı düşünülmektedir. E6 ve E7 hücre proliferasyonu ve transformasyonunu indükleyen proteinleri inaktive ederler (sırasıyla, p53 ve pRb). Her iki protein de tüm HPV ile ilişkili patolojilerde korunur ve eksprese edilirler. E6 ve E7 birbirinden bağımsız olarak çeşitli hücre tiplerini ölümsüzleştirme yeteneğine sahiptirler, ancak birarada eksprese edildiklerinde etkinlikleri daha yüksektir (60,61). E8'in de aynı E3 gibi fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak son yıllarda E8'in E2 ile birlikte çalışarak HPV DNA'sının replikasyonunu düzenlediği düşünülmektedir (60-62).

Geç bölge ORF'leri:

L1 ve L2 olarak tanımlanmış iki adet geç bölge geni viral replikasyonun geç döneminde sentezlenir. Minör ve major viral kapsid proteinlerinin kodlanmasından sorumludurlar ve böylece virüsün kapsid yapısının oluşmasını sağlarlar. L1, değişik tipler arasında yüksek düzeyde korunmuştur. Virusa antijenik özellik sağlayan major viral kapsid proteinlerini kodlar ve total proteinin yaklaşık %90'ını sentezler (63). L2 ise minor viral kapsid proteinlerini kodlar. Tipler arasında sekans değişimine uğramıştır ve tiplere özgü antikör hazırlanmasında antijen olarak kullanılır. Her iki geç bölge ORF'si (L1, L2) de prekanseröz ve malign hücrelerde eksprese edilmez (63). Ancak, geç bölge ORF'leri aşı geliştirilmesinde kullanımlarıyla son derece önemlidirler (62-63).

HPV ile indüklenen tümörlerin çoğunda E6 ve E7 viral proteinlerinin ekspresyonu dikkat çekmiştir. Bu durum E6 ve E7 viral proteinlerinin hücresel transformasyonla direkt ilişkili olduğunu göstermiştir (61). Yaklaşık 160 aminoasitten oluşan E6 ve 100 aminoasitten oluşan E7 onkoproteinlerinin düzensiz ekspresyonunun hücre transformasyonuna ve sonuçta kansere sebep olduğu düşünülmektedir (63). HPV ile ilişkili karsinogenezis daha çok E6, E7 proteini ve iki tümör baskılayıcı gen olan p53 ve pRB üzerinde yoğunlaşmıştır. HPV E6 proteinleri p53, E7 proteinleri ise Rb tümör baskılayıcı yolları hedefler. Birçok kanserde baskılanmış olan bu iki yola hücre döngüsü ve apoptozis ile ilişkilidir (64).

Bu süreçte; borun serviks kanserini önlemede önemli etkilerinin olduğunu öne süren çalışmalar yapılmıştır. Doğal bor rezervi olarak kabul edilen Türkiye bölgelerinde yapılan sitopatolojik ve mikronükleus taramalarında serviks kanseri oluşumuna rastlanmamış olup, borun serviks kanseri mekanizmasında inhibe ya da geriletici etkisinin olduğu düşünülmektedir (13).

Yapılan birkaç çalışmada ise; İmmunolojik olarak borun moleküler seviyesinde; hayvan varyasyonlarında, bitkilerde, hücre kültürlerinde ve artırılmış reaksiyon sistemlerinde asgari 26 enzimin aktivasyonunu etkilemesi gösterilmiştir. Bilinmeyen bir mekanizma ile klinikte izole edilen HIV-1 ırklarının salınımını bloke ettiği düşünülmektedir. İçeriğinde bor bulunan antibiyotiklerin gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı etkisi gösterilmiştir (26).

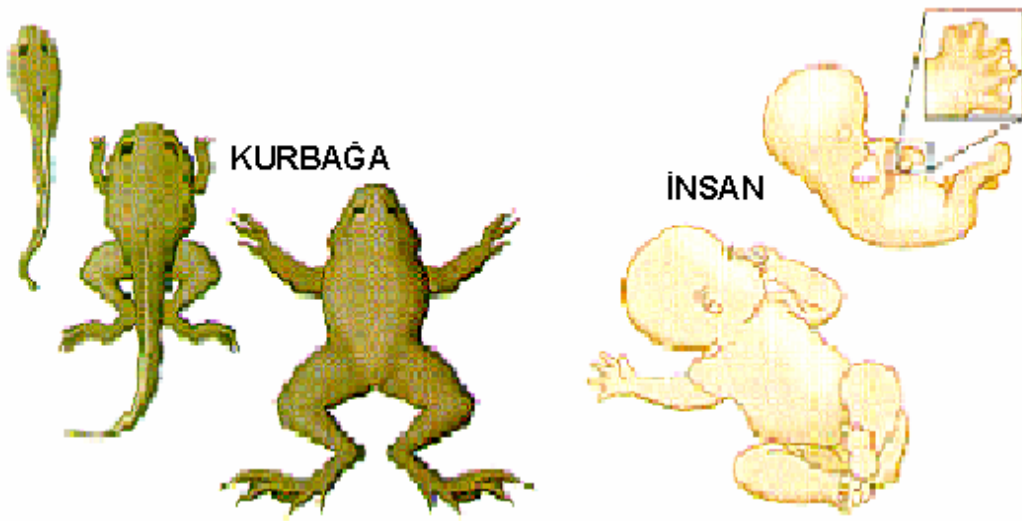
1.3 APOPTOZİS

1.3.1 Apoptoz özellikleri

Hücre ölümünün, farklı morfolojik özellikli iki tipi vardır; birincisi nekroz diğeri ise apoptozistir. Apoptozis, patolojik ya da çevreden gelen fizyolojik uyarılara karşı hücrel bir cevap olarak ortaya çıkar. Embriyonik gelişim sürecinde hücrelerin lokal olarak ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğu ve normal hücre döngüsünde fizyolojik bir olay olduğu bilinmektedir. Apoptozis dokuda tek tek hücrelerin azalmasıyla gözlenen bir hücre ölümüdür. Bu deyim Yunanca APO (ayrı) ve PZOTİS (düşmek) kelimelerinden oluşmuştur. ‘Sonbaharda ağaç yapraklarının tek tek düşmesi ve ağacı terk etmesi’ anlamındadır (65, 66). Apoptozis uzun yıllardan beri bilinmesine rağmen, nekrozdan farklı özgün ve önemli bir hücre ölüm şekli olarak değerlendirilmesi son yıllara dayanmaktadır. Özellikle 1990’dan sonra apoptozisi pozitif veya negatif yönde düzenleyen proteinlerin belirlenmesindeki hızlı gelişmeler apoptozisi moleküler biyolojinin popüler konularından biri haline getirmiştir (65).

Apoptozis vücutta aşağıdaki olaylarda görülür:

1. Embriyogenez ve metamorfoz (implantasyon ve organogenez). Örneğin; damağın birleşmesi, parmak arası perdesinin ortadan kalkması.



Şekil 8. Embriyonik gelişimde apoptozis (67)

2. Bağırsak kripta hücreleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücrelerin azaltılması
3. İmmün hücrelerin seçimi
4. Tümör hücrelerinin regresyon aşamasındaki ölümü
5. Hormon bağımlı dokularda hormonun kesilmesinden sonra oluşan atrofi
6. Viral hepatit gibi bazı viral hastalıklarda hücre hasarı oluşması
7. T hücresi ile oluşan sitotoksik hücre ölümü
8. Yaşlanma sırasında
9. Radyasyon ve antikanser ilaçların sitotoksik etkisinin gerçekleşmesi (67-69).

Ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozisin başlama süresi, hücre tiplerine göre değişiklik gösterir. Bununla birlikte bütün hücre tiplerinde, apoptozise ait morfolojik değişiklikler benzer olup oldukça hızlıdır (2-4 saat). Çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişiklikler birbiri ile uyumludur. Bu değişiklikler üç aşamada gerçekleşir; birinci aşamada, çekirdek ve hücre yoğunlaşması, ikinci aşamada, hücre tomurcuklanmasını takiben “apoptotik cisimciklerin” oluşumu ve son safha ise bu cisimciklerin fagositozudur (69).

Apoptotik hücrelerde meydana gelen karakteristik morfolojik değişiklikler en iyi elektron mikroskopunda (EM) belirlenir. Apoptoziste Elektron Mikroskopta incelemede yapısal değişiklikler iki evrede incelenmiştir. Apoptotik cisimlerin oluşması ve bunların makrofajlar ya da diğer komşu hücreler tarafından fagosite edilmesidir (69)

Başlangıçta apoptozise gidecek olan hücreler komşu hücrelerden ayrılır, yüzey organelleri kaybolur. DNA, endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla 180-200 baz çifti uzunluğunda, internükleozomal bağlantı noktalarından kırılmaya başlar. DNA'nın bu kırılması agar jel elektroforezinde tipik merdiven görünümü verir.

Parçalanmaya bağılı olarak çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde yerleşim gösterir. Çekirdek zarı parçalanır. Sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağılı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar. Hücre zarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşur. Buna karşılık mitokondrilerin yapısında önemli bir değışiklik görülmez. Endoplazmik Retikulum (ER) genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur. İkinci evrede hücre zarında büzüşmenin artması ve bunu takiben hücre parçalanması görülür. Parçalanmış, zarla çevrili yuvarlak konumdaki bu yapılara “apoptotik cisim” denir (69). Apoptotik cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları yer alır. Apoptotik cisimler genellikle hücreler arası alanlarda gözlenirler. Karaciğer ve böbrek üstü bezi korteksinde sinüzoidleri çevreleyen hücrelerde ve parankim hücreler arasında gözlenebilirler. Bazen kan damarlarına girebilirler. Apoptotik cisimler hızlıca makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Fagosite edilmeyen apoptotik cisimler daha sonra şişer ve dejenere olurlar. Bu olay nekroz ile aynıdır. “Sekonder nekroz olarak” olarak isimlendirilir. Apoptotik işlem oldukça hızlıdır, birkaç saat içinde tamamlanır. Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmaz (70). Apoptozis olan hücrelerde bir gen ya da genlerin aktivasyonu söz konusudur. Apoptotik olayları yöneten genlerdeki mutasyon bir takım hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (71, 72). Apoptozisin başlaması için çekirdek onkoproteinlerinin uyarılması gerekmektedir. Onkoproteinlerden c-fos ve c-jun ekspresyonuna bağılı olarak lenfoid hücrelerde apoptozis açığa çıkmaktadır. Normal hücre ölümünde görevyapan iki gen; Ced-3 (interleukin -1 β converting enzim) ve Ced-4’ün apoptoziste çok önemli işlevleri olduğu bilinmektedir. Apoptoziste bu genlerin birbirlerinden bağımsız hareket ettiği gözlenmiştir (71).

Tümör baskılayıcı bir diğerk gen 17. kromozomun kısa kolunda yer alan p53 genidir. Kanserli hastaların %80’inde mutasyona uğradığı bilinmektedir. Normal işlev gören p53 geni hücrede apoptozisin açığa çıkmasını kolaylaştırır. p53 protein düzeyinin artmasıyla apoptotik hücre ölümü arasında bir bağlantı vardır. p53, miyeloid lösemik hücrelerde, kolon kanser hücrelerinde apoptozisi uyarır (72,73).

1.3.2 Apoptoz mekanizması & annexin ve kaspazlar

Apoptozun Mekanizması

Apoptoz aslında tipik biyokimyasal reaksiyonlar serisidir. Kontrollü ve organize DNA ve protein sindirimi de dahil olmak üzere, sırasıyla belirli endonükleaz ve proteazlar tarafından işletilen bir programlı hücre ölümüdür. Programlı hücre ölümü olan apoptoz olayında, sinyal, reseptör ve apoptoz ilişkili çeşitli proteinler görev yapar (74).

Apoptoz katalitik reaksiyonlar serisidir ve tüm bu reaksiyonlarda kaspazlar denilen enzimler (sistein aspartat proteazlar) görev alır (75). Caspaselar proteolitik inaktif zymogenlerdir ve apoptotik uyarılara yanıt olarak aktif formlara dönüşürler (74, 75). Apoptotik "başlatıcı" caspaselar (kaspaz-2, -8, -9, -10) ve efektör kaspazlar olarak caspases (-3, -6, -7) iki ana gruba ayrılırlar (75).

Apoptoz iki yol ile aktiflenir. Bunlardan birisi iç yolak diğeri ise dış yolaktır. Dış yolak; dış membran reseptörleri ile etkileşim içinde çözünen moleküllerin aracılığı ile iç yolak ise mitokondri yakınsak uyarılarla tetiklenir. Bu yollar, tamamen farklıdır, efektör kaspazların kesişme yolakları mevcuttur (75,76).

Bu elemanların ışığı altında hücre iki yolla apoptoza girer (75-77):

- 1) Hücre dışı sinyaller aracılığı ile (sitoplazmik yol)
- 2) Hücre içi sinyaller aracılığı ile (mitokondriyal yol)

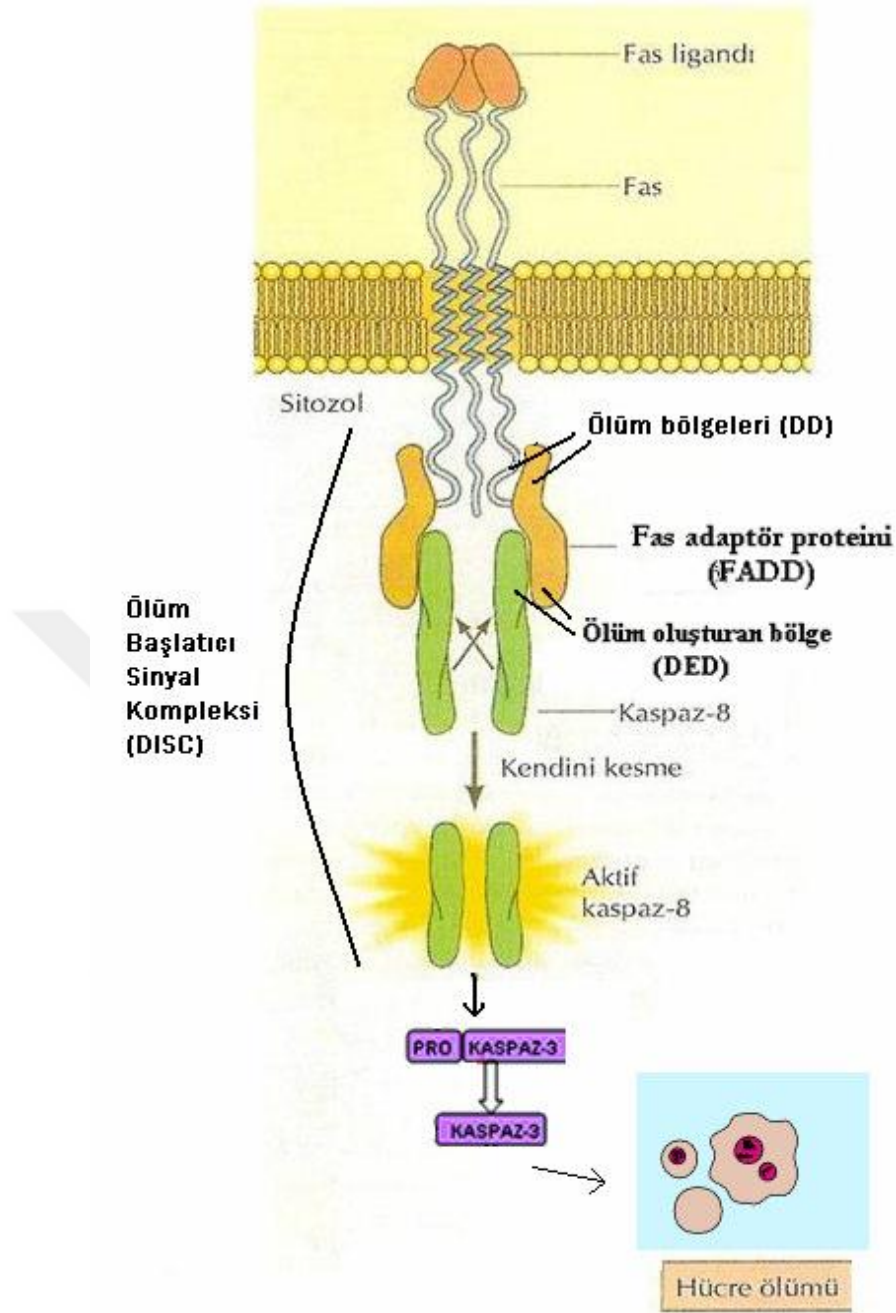
1) Hücre dışı sinyaller aracılığıyla, sitoplazmik yolda hücrenin apoptoza girmesi:

Memeli hücrelerinde Fas ve TNF gibi sinyal proteinleri hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanarak apoptoza giden yolu uyarırlar. Bunları kısaca açıklarsak (77);

a- Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

Mutasyonlu bir hücrenin ortadan kalkması gerektiğinde, öldürücü T lenfositleri zarında bulunan ve molekül ağırlığı 43 kD olan Fas sinyal proteini (Fas ligandı= CD95L), hedef hücrenin Fas reseptörüne bağlanarak olay başlar. Fas reseptörü, tümör nekroz faktör reseptör (TNF-R1) ile aynı gruptandır. Şekil 10' da görüldüğü gibi Fas reseptörü, hücre ölüm reseptörü olup, 3 aynı polipeptid zincir içerir. Fas sinyal proteini, reseptörün amino (NH₂) ucuna bağlandığında, bu 3 aynı polipeptid zincir Fas reseptörü trimer hale geçerek aktifleşir (75).

Fas reseptörü, lenfoid hücreler dahil, hemen hemen tüm hücrelerin zarında trans membran olarak uzanır. Fas aktivasyonu ile uyarılan apoptoz; bağışıklık yanıtının sonunda artı kalan lenfositlerin, kanser hücrelerinin veya virus ile enfekte hücrelerin ölümü ve ortadan kaldırılmasından sorumludur (78, 79).



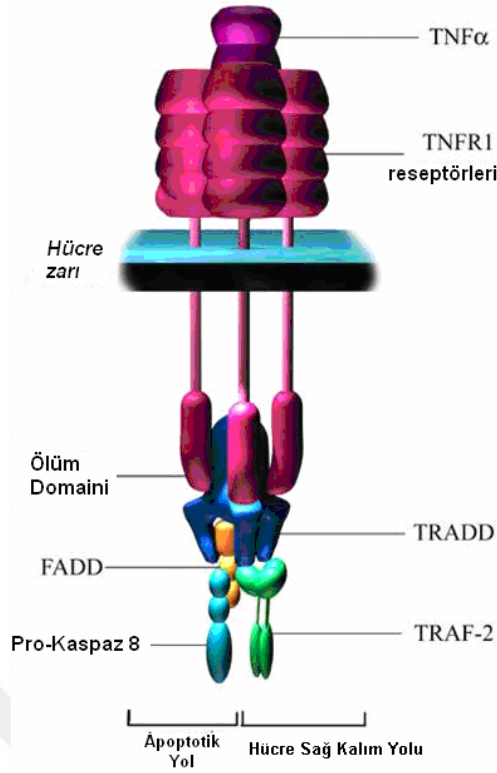
Şekil 9. Fas sinyal iletimi yoluyla apoptoz (80. literatürden uyarlanmıştır).

Fas yoluyla olan apoptoz belli bir sıra takip eder; Oluşan Fas sinyal/reseptör kompleksindeki reseptörün sitozolde uzanan COOH ucundaki 80 amino asitlik ölüm bölgesi (DD) otofosforile olur. Otofosforile olan Fas reseptörü DD bölgesinde Fas adaptör proteini (FADD) kendi ölüm bölgesi (DD) ile bağlanır. FADD bağlantısını takiben, başlatıcı kaspazlardan inaktif prokaspaz-8 DED (Ölüm oluşturan bölge=Death Effector Domain) bölgesi ile adaptör proteine bağlanır. Oluşan bu kompleks DISC (Ölümü Baslatan Sinyalleme Yapısı=Death Inducing Signalling Complex) adını alır.

Bu bağlantıların sonucunda prokaspaz-8 (FLICE), kendini keserek aktif kaspaz-8 haline geçer. Aktif kaspaz-8, kaspaz yolundaki sonlandırıcı (efektör) kaspazların aktivasyonunu başlatır. Son olarak sonlandırıcı kaspazlardan prokaspaz-3 kaspaz-3 olarak aktifleşir. Aktifleşen kaspaz-3, sitoplazmik inaktif ICAD/CAD (deoksiribonükleaz inhibitörünü/ kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) kompleksine bağlanır. Bu bağlantı sonucu aktifleşen CAD kompleksten ayrılır ve nükleus zarını geçerek nükleozomlar arasında uzanan linker DNA'ya bağlanıp o bölgeyi keser ve böylece DNA fragmentasyonunu gerçekleştirir. Bunu takiben CAD kesim noktasından ayrılır. DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, nükleer lamin A yıkılımla birlikte nükleer zarf da yıkılarak nükleus dağılır (81) .

b- Tümör nekroz faktör (TNF) sinyal iletimi yoluyla apoptoz:

Sinyal görevi yapan ve bir sitokin olan TNFalfa proteini, hücre zarında bulunan TNFR-1 (Tümör Nekroz Faktör Reseptörü) ile kompleks oluşturur. Şekil.1.3.3.da görüldüğü gibi, TNFR-1 reseptörünün sitozole uzanan kısmındaki DD bölgesine, TRADD (TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi) proteini bağlanır. TRADD diğer kısmıyla da FADD (Fas Adaptör Ölüm Bölgesi) adaptör proteinine bağlanır. Bu bağlantılar sonucunda, prokaspaz-8 aktifleşir. Aktif kaspaz-8 de sonlandırıcı kaspaz üyelerini ve sonunda aynı gruptan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, Fas sinyal iletim yoluyla apoptozda olduğu gibi, hücrede gerekli morfolojik değişiklikleri sağlayarak hücre apoptoz yoluyla ölür (76, 80).



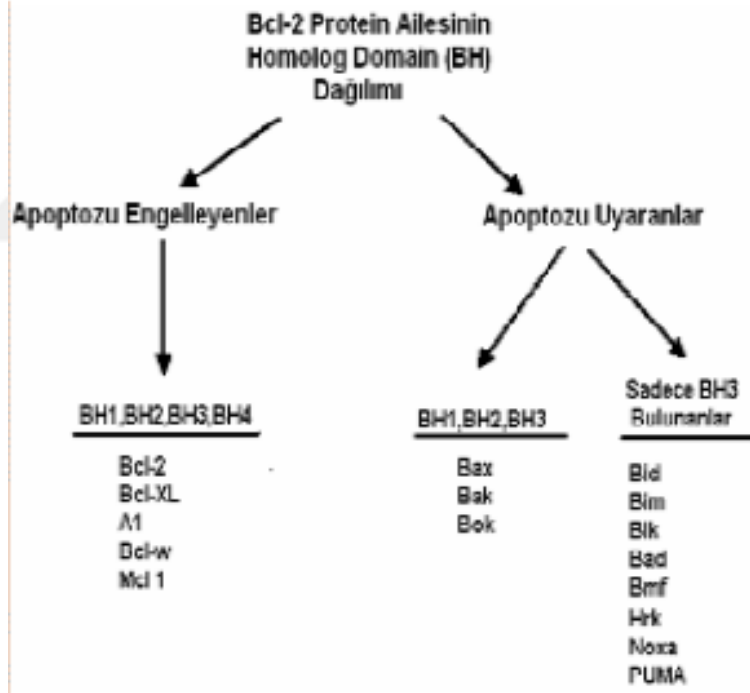
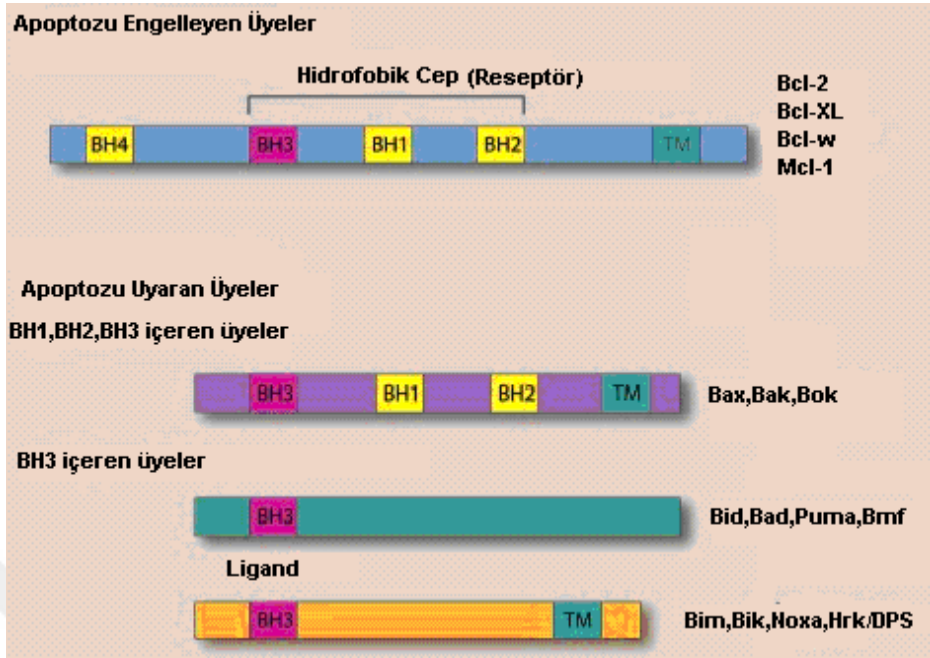
Şekil 10. TNF α sinyal yoluyla apoptoz (69)

2) Hücre içi sinyaller sonucu hücrenin apoptoza girmesi (Mitokondrial yol):

Mitokondri aracılığıyla hücrenin apoptoza girmesinde kaspazlar ve Bcl-2 proteinleri görev yapar. Kaspaz (*caspase: cysteine-aspartic-acid-proteases*) gen ailesi üyeleri hücreyi apoptoza götüren proteinleri kodlarlar. Kaspazlar, inaktif olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdendir (76).

Fare ve insanda kaspaz ailesinden 14 kaspaz proteini tanımlanmıştır. Kaspazlar, başlatıcı ve sonlandırıcı (efektör) kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılırlar ; **Başlatıcı kaspazlar** (kaspaz 2,8,9,10), apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini, aşağı kaspazlar olan sonlandırıcı kaspazlara nakledeleler. Bu kaspazların uzun bir bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain = Kaspazı Aktive Eden Bölge) ve DED (Death Effector Domain = Ölüm Oluşturan Bölge) olarak adlandırılırlar. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olurlar. **Sonlandırıcı (efektör) kaspazlar** (kaspaz 3,6,7) ise 100 kadar farklı hedef proteini keserek apoptozu sonlandırılırlar. Bu yüzden cellat kaspaz olarak da adlandırılırlar (76- 82).

Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine tersinir çalışarak apoptozu uyaran veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 apoptozu engellerken, Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-xs apoptozu uyarır. Bu apoptozu uyaran ve engelleyen proteinlerin işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye bağlıdır. Bu bölgeler bir reseptör gibi görev yapan hidrofobik cep ve bir ligand gibi görev yapan amfipatik α -heliks bölgeleridir. Bu proteinlerin her biri **Bcl-2 Homoloji bölgesi** (BH1, BH2, BH3, BH4) içerirler. Yapılarındaki BH1, BH2, BH3 bölgeleri hidrofobik cebi oluşturur. Amfipatik α -heliks BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğere proteinin BH3 bölgesine bağlanılırlar. Apoptozu uyaran üyeler yapılarında BH1, BH2, BH3 bölgelerini içeren ve sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden oluşur. Apoptozu engelleyen üyelerde ise bu bölgelerin 4'ü de bulunmaktadır. Bcl-2 üyeleri BH3 bölgelerinden bağlanarak dimerize olur, homodimer ve heterodimer yapılar oluştururlar (75-79) .

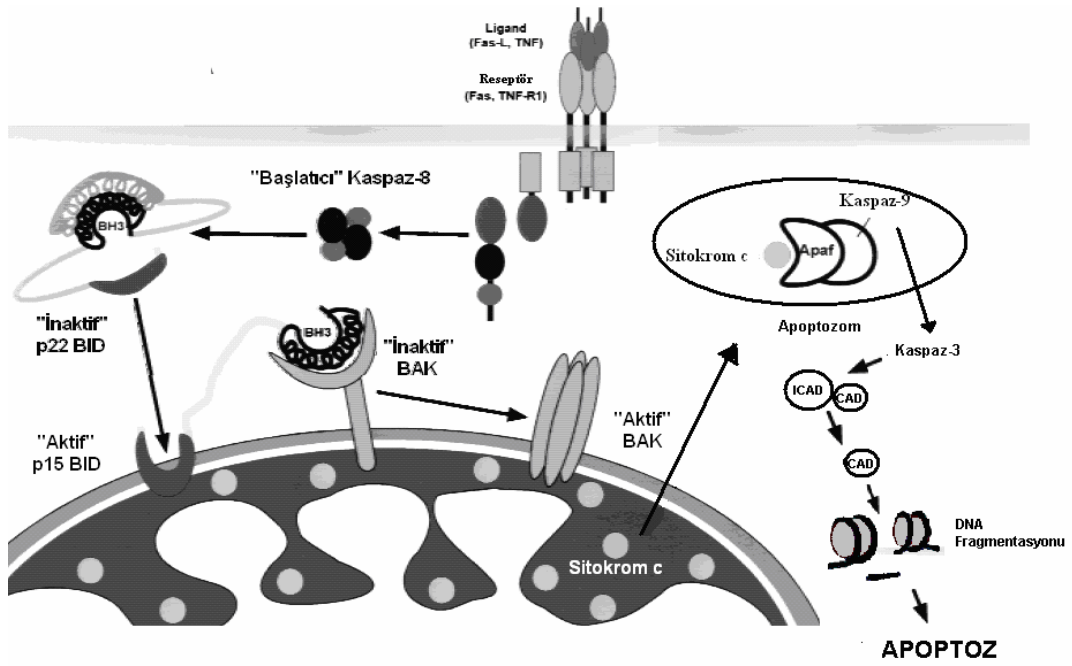


Şekil 11. Bcl-2 ailesi üyelerinin sınıflandırılması (69).

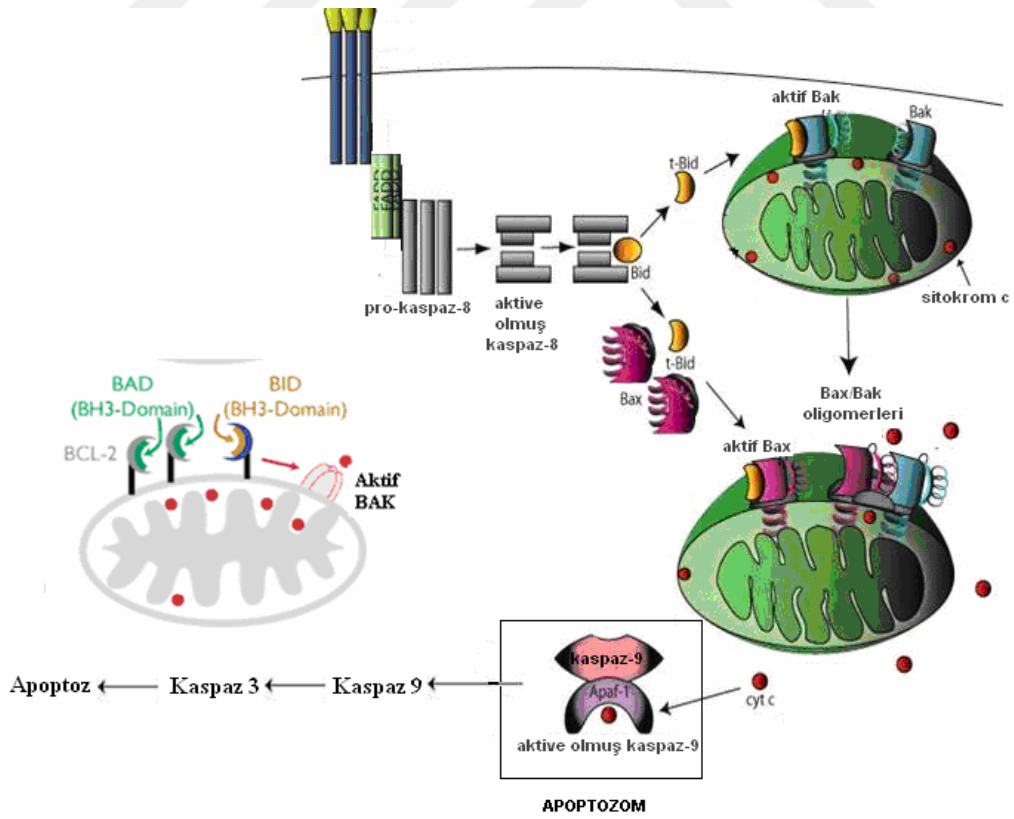
Bcl-2 ailesinden apoptozu uyaran proteinler, mitokondrial yolda mitokondri zarlarından sitokrom-c (sit-c) salınımını bunun devamında da kaspaz aktivasyonunu sağlayarak hücreyi apoptozu götürürler. DNA hasarı, büyüme faktörü (GF) eksikliği, ölüm reseptörlerinin uyarılması, radyasyon, kemoterapi vs. gibi apoptozu uyarıcı tüm ajanlar hücreyi mitokondriyal yolla apoptoza götürebilirler. Apoptozu uyaran bu ajanlar, sitozolde bulunan Bcl-2 ailesi üyelerinin görev yapmasını sağladıklarından mitokondrial yol, iç sinyal yoluyla apoptoz adını alır. Mitokondrial yolda olan apoptozu açıklamada örnek olarak; Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid ve Bad yoluyla aktifleşen Bak ve Bax proteinlerinin apoptoz etki mekanizması açıklanacaktır. Bu mekanizmalar arasındaki farklılık, sit-c salınımına kadar olan yolda görülür. Sit-c nin sitozole salınmasından sonraki adımlar birbirlerine benzer olarak devam ederek hücre apoptozla ölür (75).

i) Mitokondriyal yolda Bid proteini ile aktifleşen Bak ve Bax proteinlerinin apoptotik yolu

Fas sinyal-reseptör yolunda aktive olan kaspaz-8, sitozolde bulunan Bid (p22 Bid) proteinini keserek aktif tBid (p15 Bid) oluşturur. Aktif tBid, mitokondri dış zarına tutunur ve BH3 bölgesi ile mitokondri zarında bulunan Bak proteinine bağlanır. Bu bağlantı sonucu Bak proteini oligomerize olarak mitokondri zarında por oluşturur ve mitokondri iç ve dış zarları arasında yer alan sit-c nin sitozole salınmasına neden olur (75).



Şekil 12. Aktifleşen Bid ile Bak aktivasyonu (84.literatürden uyarlanmıştır)

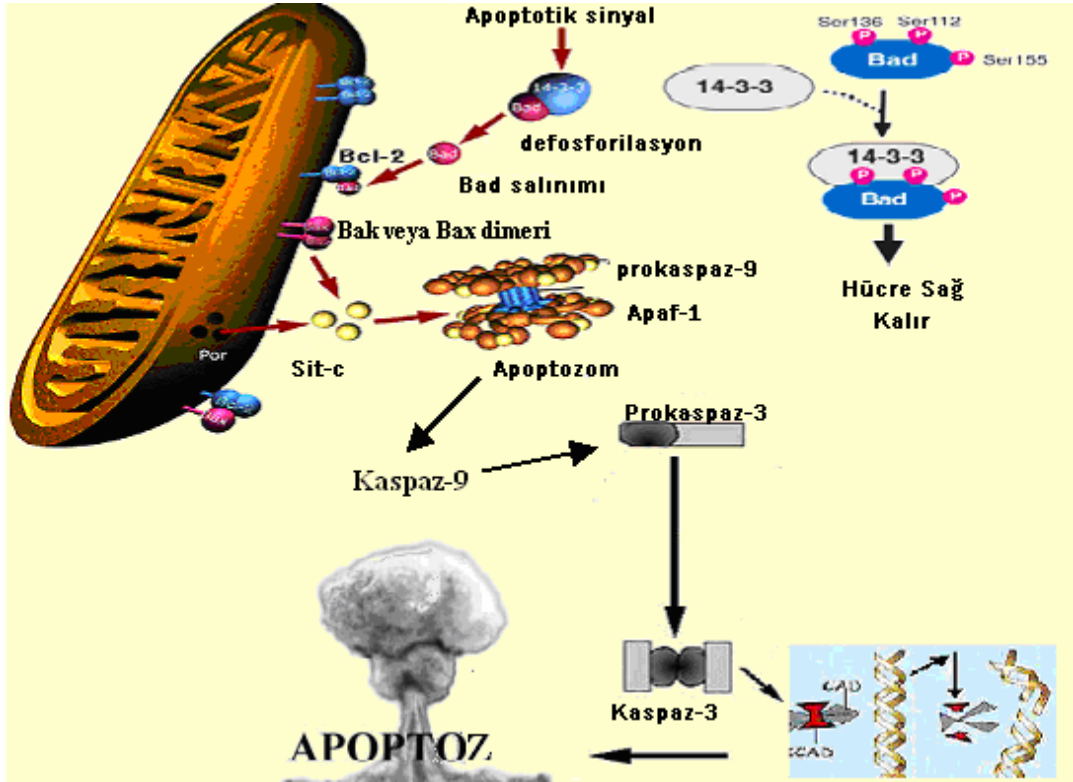


Şekil 13. Aktifleşen Bid ile Bak ve Bax aktivasyonu (84. literatürden uyarlanmıştır).

Aynı yolu takip eden tBID sitozolde bulunan Bax proteinine bağlanarak Bax'ın aktifleşip mitokondri dış zarına bağlanmasını ve zar yapısının bozulup mitokondriden sitozole sit-c salınımını sağlar. Bundan sonraki olaylar, her iki yolda da devam eder. Söyle ki; Sit-c, sitozolde Ced-4 a karşılık olan apaf-1 (Apoptotik Proteazı Etkinlestiren Faktör) ile kompleks (sit-c/apaf-1) oluşturur. Sit-c/apaf-1 kompleksi, prokaspaz-9'a bağlanarak apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozom kompleksindeki prokaspaz-9 kesilerek aktifleşir. Aktif kaspaz-9, proteolitik kesim ile sonlandırıcı prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktive kaspaz-3, Fas ve TNF yolunda olduğu gibi, apoptozla ilgili hücrel bozuklukları sağlayarak hücre apoptoza gider (80 ,81)

ii) Mitokondrial yolda Bad proteini ile aktiflesen Bak ve Bax proteinlerinin apoptotik yolu

Şekil.14'de görüldüğü gibi, fosforile Bad proteini, sitozolde 14-3-3 şaperon proteini ile kompleks oluşturarak inaktif halde bulunur. Antijenler, GF ve diğer yaşam faktörlerinin eksikliği nedeniyle Bad proteini defosforile olursa, kompleksten ayrılarak BH3 bölgesi ile, mitokondri dış zarında bulunan ve apoptozu engelleyen, Bcl-2 veya Bcl-2/Bcl-xl proteinlerine bağlanması ile kompleks oluşturur (70). Bu durumda Bcl-2 ve Bcl-xl apoptozu engelleme görevini yapamaz, dolayısıyla bu kompleksler Bak ve Bax proteinlerinin oligomerize olarak, mitokondri dış zarında por oluşturup yapının bozulmasını sağlarlar. Oluşan bu porlardan sit-c sitozole salınır. Bundan sonraki olaylar Bid yolunda olduğu gibi cereyan eder. Şöyle ki; sit-c/apaf-1 kompleksi oluşur. Buna prokaspaz-9 bağlanarak apoptozom kompleksi (sit-c/apaf-1/kaspaz-9) meydana gelir (70,74). Komplekste aktive olan kaspaz-9, prokaspaz-3'ü sonlandırıcı kaspaz-3 olarak aktive eder. Aktif kaspaz-3 nükelus ve sitoplazmada gerekli morfolojik değişikliklerin olmasını sağlayarak apoptozu sonlandırır (76).



Şekil 14. Mitokondrial yolda Bad proteini ile apoptoz (69).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Hücre dizileri:

- HTB-32, HT-3 Hücre Hattı
(Cervical Carcinoma Cell Line, ATCC'den temin edildi)
- CCL-62, FL Hücre Hattı (HeLa Contaminant FL Cell Line, ATCC'den temin edildi)

2.1.2. Kimyasal maddeler:

- Annexin V FITC Kit,100 Samples, Biovision, ABD,Kat. No: K101-25.
- Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega, ABD, Kat. No: G8090
- Caspase-Glo 8 Assay, Promega, ABD, Kat. No: G8200
- Caspase-Glo 9 Assay, Promega, ABD, Kat. No:G8210
- Caspase ACE FITC-VAD-FMK, Promega, ABD, Kat. No:G746A
- MEM Eagle with Earle's Salts, HyClone, Utah, ABD, SH30601.01
- DMEM High Glukoz 4.5 g/l Glucose, HyClone, Utah, ABD, SH300081.02
- Fetal Bovine Serum (FBS), HyClone, Utah, ABD, SV 30160.02
- L-Glutamine, HyClone, Utah, ABD, SH30034.01
- Borik Asit, BOREN,Ankara,Türkiye (Ulusal Bor Enstitüsü)
- Boraks Pentahidrat, BOREN, Ankara,Türkiye (Ulusal Bor Enstitüsü)
- Disodyum Pentaborat Dekahidrat, BOREN, Ankara,Türkiye(Ulusal Bor Enstitüsü)
- Sodyum klorür, Gerbu, Almanya
- Potasyum klorür, Sigma, Almanya
- Sodyum hidrojen fosfat, Fisher Chemical, ABD
- Potasyum hidrojen fosfat, Fisher Bioreagent, ABD
- Dimethyl Sulfoksit, Sigma, ABD, kat No: D8418
- HEPES buffer solüsyonu, HyClone, Utah, ABD, kat no: 30237.01

- Gentamycin 10 mg/ml, HyClone, Utah, ABD, kat no: SV30080.01
- Trypsin/EDTA solution (0.05%/0.02%), HyClone, Utah, ABD, kat no: SH30236.01
- Trypan blue 0,5%, HyClone, Utah, ABD, kat no: SV30084.01
- Formaldehyde - Solution 37 % , Merck, Almanya, kat no:100496
- Giemsa – Solution, Applichem, Almanya, kat no:A0885,0500

2.1.3.Malzemeler:

- Doku kültürü -Plate, 96 Well Steril, Sarstedt , Almanya
- Doku kültürü Flaskı, 25cm², Sarstedt , Almanya
- Doku kültürü Flaskı, 75cm², Sarstedt , Almanya
- Filtreli pipet ucu, steril (2ml), Ratiolab, Almanya kat no:3102011
- Filtreli pipet ucu, steril (5ml), Ratiolab, Almanya kat no:3105011
- Kryo tüp Steril, 1 ml, Clearline, Biosigma,İtalya, kat no: N40.3677
- Filtreli pipet ucu, steril, 10µL, Ratiolab, Almanya kat no:1760010
- Filtreli pipet ucu, steril, 200µL, Ratiolab, Almanya kat no:1760200
- Filtreli pipet ucu steril, 1000µL, Ratiolab, Almanya kat no:1761000
- Pasteur Pipeti, steril, tek tek steril, FL Medica ,İtalya
- Enjektör Filtre 0,22, Sarstedt, Almanya kat no:83.1826
- Santrifüj tüpü steril 15mL, Sarstedt, Almanya kat no:62.554.502
- Santrifüj tüpü steril 50mL, Sarstedt, Almanya kat no:62.547.254

2.1.4. Aygıtlar:

- Buzdolabı, +4, İndesit, İtalya
- Derin dondurucu, -20, İndesit, İtalya
- CO²'li etüv ,Heraeus cell, Almanya
- CO²'siz etüv , Heraeus B12, Almanya
- İverted mikroskop ,Olympus CK40 ve Olympus IX70, İngiltere
- Işık mikroskobu ,Olympus CX31, İngiltere
- Nitrojen tankı ve aktarma ünitesi ,Chart, MVE, Cleveland, ABD
- Laminar kabin ,Heraeus HS12 ve ESCO labculture plus class II, Almanya
- Manyetik karıştırıcı ,Nüve, Türkiye
- Mikroplate okuyucu ,Molecular Devices, Spectramax 190, ABD
- Su banyosu motor, Polyscience, ABD
- Vortex, Heidolph Reax Top, Almanya
- Hassas Terazı, Sartorius, Almanya
- Mikropipet Pipet seti (20-200-1000 µl'lik) ,Eppendorf, Almanya
- Nauber sayma lamı
- Otomatik pipetler, Eppendorf, Almanya
- Shaker ,Heidolph titramax 100, Almanya
- Soğutmalı santrifüj ,Eppendorf 5810R, Almanya
- Bio-luminesas ölçüm cihazı ,Varian Cary Eclipse, Santa Clara, ABD

2.2. YÖNTEM:

Tüm hücre kültürü çalışmaları, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği laboratuvarında çalışılmıştır.

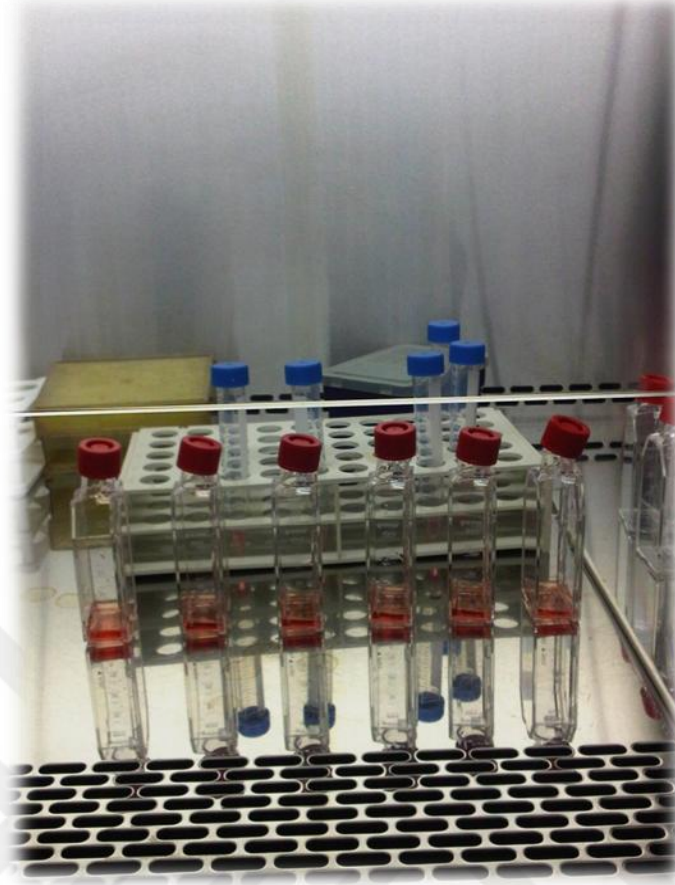
2.2.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır haldeki steril medyumlar ticari firmalardan sağlandı. Cam malzemeler 121°C'de 45 dakika otoklavlandı. Tüm sıvı maddeler 0.22 µm por çapındaki mikrobiyolojik filtrelerden süzülerek steril edildi. Steril kabin, 15 dakika ultraviyole ışık açılarak ve bunu takiben 15 dakika havalandırılarak steril edildi. Sterilize edilen kabine alınacak malzemeler ise %70 alkolle silinerek içeri alındı.

2.2.2. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması

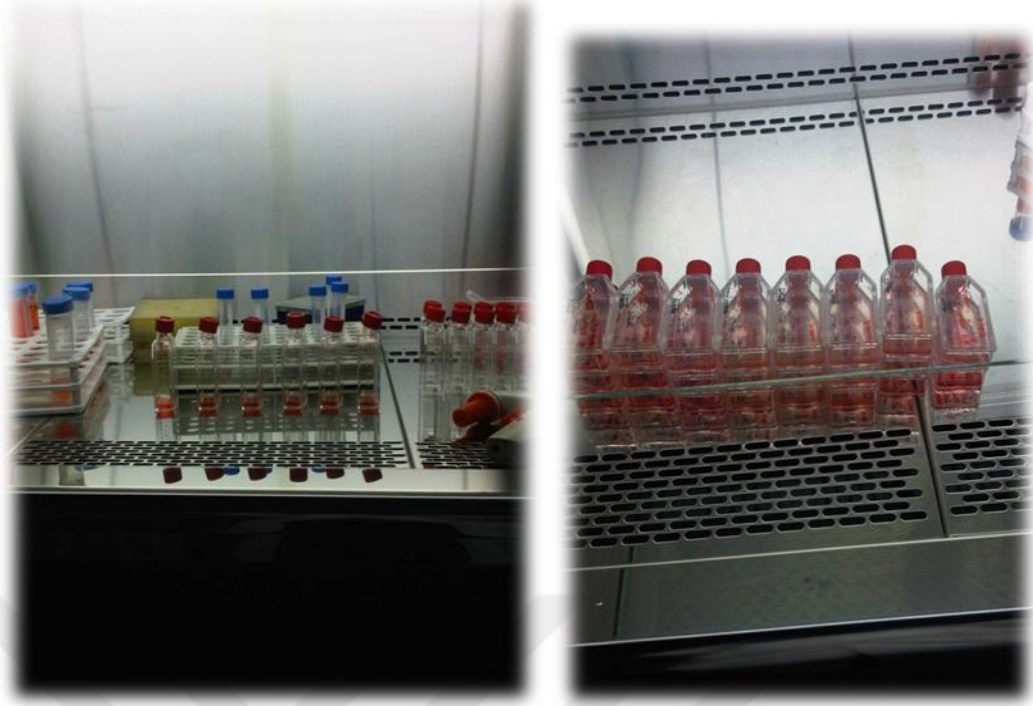
ATCC'DEN alınan CCL-62 He-La kontaminantı serviks karsinoma hücre dizisi rutin olarak, 1000 ml MEM besiyeri içinde, 100 ml Fetal sığır Serum, 1ml L-glutamin, 1ml Gentamisin solüsyonu destekli besiyerlerinde, 37 °C karbondioksitsiz ortamda yetiştirildi.

ATCC'DEN 1x 1 halinde alınan HTB-32 hücre dizileri rutin olarak, 1000 ml DMEM besiyeri içinde, 100 ml Fetal sığır serum, 1ml L-glutamin, 1ml Gentamisin solüsyonu destekli besiyerlerinde, 37 °C karbondioksitsiz ortamda yetiştirildi.



Şekil 15. Çalışma düzeni

Her iki hücre dizisi, 37°C sıcaklıktaki etüvde 24 saatliğine dinlendirmeye bırakıldı. Bir sonraki gün kontaminasyon olup olmadığı kontrol edildi. 48 saat sonra flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara 37 °C su banyosunda ısıtılan 1X'lik tripsin+EDTA'dan 1-2 ml eklendi. Flasklara eklenen tripsin+EDTA steril pipet yardımıyla çekildi. Tripsini çekilen flasklara yine aynı miktarda tripsin+EDTA eklendi. Flasklar 5-7 dakika 37°C CO2 etüvde bekletildi.



Şekil 16. Steril kabin içerisinde flaskların hazırlanması

Flask tabanına tutunmuş hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları inverted mikroskop ile kontrol edildi. Kalkan hücreler, önceden hazırlanmış içinde 3ml. besiyeri bulunan steril santrifüj tüplerine steril pipet yardımıyla aktarıldı. 800 rpm 'de 4 °C de, 5 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldı. Dipte kalan hücrelerle birlikte 0.5 ml. sıvı steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 ml. besiyeri konmuş flasklara (hücrenin yoğunluk durumuna göre 2-4 flask) dağıtıldı.



Şekil 17. Çalışma düzeni ve besiyerleri

2.2.3. Hücrelerin ve Bor Solusyonlarının Deney İçin Hazırlanması

Hücreler deney için flask içinde yeterli sayıya eriştiklerinde, tripsinlenerek toplandı. Tripkan blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayılarak, 200.000 hücre olacak şekilde hazırlandı. Hücreler santrifüj edildi. CCL-62 ve HTB-32 hücre dizileri hücre kinetiğinin çıkartılması için 30x9 cm² yüzeyli petrilere ekimi yapıldı. Her gün petrilere 3'er tanesi alınarak hücre kinetiği eğrisi çıkarıldı ve çalışma bu eğriye göre planlandı.

Bor türevlerinin hazırlanması:

Bor bileşikleri, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Organik Kimya Bölümünden temin edilmiştir ve herhangi bir yanlış hesaplama sebebinde olmamak adına tüm hesaplamalarda destek alınmıştır. Gerekli toz çözeltiler uygun homojen miktarlarda hazırlanıp çalışmanın sonuna doğru reaktivite kaybına sebep olmamak için stoklanmıştır. 250, 500 ve 1000µM lık stok çözeltiler hazırlanmıştır.

➤ **20mM Stok Borik Asit Çözeltisinin Hazırlanması.**

Borik Asitin Molekül Ağırlığı : 61.83 gr.

0.1236 gr borik asit tartılarak 100 ml besiyerinde çözündürülüp 20mM BA çözeltisi elde edildi.

➤ **20mM Stok Boraks Pentahidrat Çözeltisinin Hazırlanması**

Boraks Pentahidrat Molekül Ağırlığı : 291.30 gr.

0.5826 gr Boraks Pentahidrat tartılarak 100 ml besiyeri içerisinde çözündürülüp 20mM BP çözeltisi elde edildi.

➤ **20mM Disodyum Pentaborat Dekahidrat Çözeltisinin Hazırlanması**

Disodyum Pentaborat Dekahidrat Molekül Ağırlığı : 590.233 gr.

1.1804 Disodyum Pentaborat Dekahidrat 100 ml besiyeri içerisinde çözündürülüp 20mM DPD çözeltisi elde edildi.

2500 μ M, 5000 μ M ve 10000 μ M Ara Stokların Hazırlanması

Her bileşimin 20 mM'lık stoklarından:

➤ 2500 μ m Ara Stok İçin

Her bileşimin 20 mM'lık stoklarından 1.25 ml alınıp üzerine 8.75 ml besi yeri ilave edildi. Her bileşimin 2500 μ M ara stok dozu için aynı şekilde hesaplaması yapıldı.

➤ 5000 μ m Ara Stok İçin

Her bileşimin 20 mM'lık stoklarından 2.5 ml alınıp üzerine 7.5 ml besi yeri ilave edildi. Her bileşimin 5000 μ M ara stok dozu için aynı şekilde hesaplaması yapıldı.

➤ 1000 μ m Ara Stok İçin

Her bileşimin 20 mM'lık stoklarından 5 ml alınıp üzerine 5 ml besi yeri ilave edildi. Her bileşimin 1000 μ M ara stok dozu için aynı şekilde hesaplaması yapıldı.

Her bir 2500 μ M, 5000 μ M, 10000 μ M' lik çözeltilerden 1 birim alınır üzerine 9 birim hücre içeren taze besi yeri eklenirse besi yerindeki son konsantrasyonlar sırasıyla 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M bor olacaktır.

Tüm hazırlanan bor çözeltileri 0.22 μ m'lik enjektör filtrelerden geçirilerek sterilize edilmiştir.



Şekil 18. Bor türevlerinin hazırlanması

Hücrelerin Ölçümler için Hazırlanması

Hücreler ile ilk defa çalışma yapıldığı için kit çalışmasına geçilmeden önce hücre kinetiği eğrileri çıkartılmıştır.

Hücreler ölçümler için flask içinde yeterli sayıya ulaştıklarında tripsinlenerek toplandı. Tripin blue boyama yöntemi yardımıyla Neubauer lamında sayılarak, her bir analiz için gerekli sayıda hücre hazırlandı. Hücreler santrifüj edildi.

Tripin Blue Boyama Yöntemi ile canlı hücre sayımı

Tripin Blue boyama yöntemi, hücre sayımı için tavsiye edilen çeşitli yöntemlerden biridir. Bu metoda göre canlı hücreler boyanmaz, ölü hücreler boyanır.

Boyama işlemi aşağıda belirtilen sıra takip edilerek yapılır:

1. Bir tüpe 0.5 ml % 0.4 Tripin blue solüsyonu, üzerine 0.3 ml Hank's balanced salts (HBSS) (dilüsyon faktör= 5) ve son olarak da süpernatant eldesinin 5. basamağında tüpe alınan hücre süspansiyonundan 0.2 ml kondu.
2. Hazırlanan tüp 5-15 dakika oda ısısında beklemeye bırakıldı.
3. Süre sonunda tüp içeriği pipetlenerek karıştırıldı, homojenize edildi, bu süspansiyondan pipetle bir damla alınarak Neubauer lamı üzerine kondu.
4. Neubauer lamının ortasındaki 1 mm alandaki karelerde bulunan tüm hücreler sayıldı.
5. Mavi boyanan cansız hücreler ile boyanmayan canlı hücreler ayrı ayrı sayıldı.
6. Not: Her bir karenin çevresinin orta hattının sol ve en üst tarafına dokunan hücreler sayıldı. Sağ ve alt alanın çevresindeki hücreler sayılmadı.

7. Not: Eğer hücrelerin kümeler halinde görülmesi %10'dan fazla ise, hücrelerin yayıldığından emin oluncaya kadar tüm prosedür tekrarlandı.
8. Neubauer lamının her bir karesi 0.1mm³ ya da 10⁻⁴ cm³ toplam hacmi gösterir. 1cm³ ~1ml'ye eşit olduğu için, her ml'deki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı:

Her mL ' de bulunan toplam hücre sayısı:

Ortalama her karedeki sayım x dilüsyon faktör / sayılan kare X 10⁴

9. Hücre canlılığı (%) = Toplam canlı hücreler (boyanmamış) / toplam hücreler (boyanmış ve boyanmamış) x 100

Not: Eğer boyanmamış (canlı) hücrelerin her karedeki ortalama sayısı 37.5 ise, Toplam canlı hücre = [37.5X5X10⁴] canlı hücre / ml x 10 ml (orjinal volüm)=1.875x10⁷'dür.

Hücre canlılığı (%) = 1.875X10⁷ (canlı hücre) / 2.25X10⁷(toplam hücre) x 100= %83 oranında canlı hücre var demektir.

Buna göre canlı hücrelerin sayısı belirlenip hücre süspansiyonundan istenen miktar kadar alındı.

HTB-32 Hücre Hattının Üreme Kinetiği Eğrisinin Çıkartılması:

- Kültürde bulunan HTB-32 hücrelerinden iki tane 25 cm² lik flask tripsinize edilerek hücreler kaldırıldı.
- Hücreler Neubauer lamında sayıldı ve hücre vasatı içerisinde 4.5 x 10⁴ hücre olacak şekilde homojenize edildi.
- Yaklaşık 70 ml vasat + hücre süspansiyonu hazırlandı.
- Mililitresinde 4.5 x 10⁴ olan bu hücre süspansiyonundan 2 ml alınarak 9 cm²lik petrilere hücrelerin ekimi yapıldı.

- Toplamda 33 adet 9 cm² lik petri oluşturuldu.
- Bu petriler % 5 karbondioksitli etüvde inkübasyona alındı.
- Her gün bu petrilerden 3 tanesi alınıp ayrı ayrı tripsinize edilerek hücreler kaldırıldı.
- Hücreler besi yeriyle homojenize edilip Neubauer lamında sayıldı.
- Her bir petride bulunan hücre miktarı ayrı ayrı kayıt edilip bu üç petrinin ortalama değeri alındı ve ml deki hücre miktarı hesaplanıp kayıt edildi.
- Bu işlem aralıksız olarak 11 gün devam etti ve hücrelerin gün gün üreme miktarları hesaplandı

CCL-62 hücre hattının üreme kinetiği eğrisinin çıkartılması:

HTB-32'nin hücre kinetiği eğrisinin çıkartılmasında uygulanan bütün basamaklar aynı şekilde bu hücre hattına da uygulanıp bu hücre hattının da üreme kinetiği eğrisi çıkartıldı.

2.2.4. Yapılan Analizler

2.2.4.1. Kolorimetrik Analizler:

A. MTT Analizi

HTB - 32 Hücre Hattında MTT Analizi

Platelerin Hazırlanması Ve Bor İçerikli Besi Yerinin Eklenmesi

- Yapılan hücre pasajlama işlemlerinden sonra HTB-32 hücrelerinden 1 adet 25 cm²'lik hücre flaskı alınarak tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- Tripsinizasyon işleminden sonra elde edilen hücreler homojenize edilerek bürker lamında sayıldı. Sayılan hücreler 5x10⁴ hücre / ml olacak şekilde homojenize edildi.

- Homojenize edilen bu hücre süspansiyonundan 200 µl alınarak 96 kuyucuklu plate'lere ekimi yapıldı. Her bir kuyucuk için hücre son konsantrasyonu 10.000 olarak belirlendi.
- Çalışmamızda kullanacak olduğumuz bor dozları BA, BP ve DPD' nin her biri için 250µM, 500 µM, 1000 µM olarak belirlendi ve her bir doz için ayrı ayrı üç adet kuyucuğa hücre ekimi yapıldı.
- Bu üç kuyucuktan alınan toplam absorbans değerinin ortalaması alınarak her bir doz için kuyucuk başına düşen abzorbars değeri hesaplandı.
- Ayrıca kontrol grubu olarak belirlenen üç adet kuyucukta de herhangi bir bor uygulaması yapılmayıp sadece hücre ekim işlemleri gerçekleştirildi.
- Böylece her bir 96'lık plate üzerindeki 30 tane kuyucuğa (3 kuyucuk x 9 bor konsantrasyonu + 3 kontrol grubu olmak üzere) hücre ekimi yapıldı.
- 3. 5. ve 7. gün sitotoksisite (MTT) ölçümleri için ayrı ayrı 4 tane 96'lık plate hazırlanarak 37°C de karbondioksitli etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri değiştirilip her bir kuyucuğa 90 µl taze besi yeri + 10 µl bor içerikli besiyeri (BA, BP ve DPD' nin 2500 µM,5000 µM, 10000 µM'lık stok çözeltilerinin her bir dozajı için ayrı ayrı olarak üç farklı kuyucuğa) eklendi.

Böylece her bir bileşiğin kuyucuklardaki dozu, 250 µM, 500 µM, 1000 µM olarak elde edildi.

- Kontrol grubu olarak kullanılacak olan kuyucuklardaki hücrelere her hangi bir bor uygulaması yapılmayıp sadece besi yeri değiştirildi.
- Daha sonra plateler 37°C de karbondioksitli etüve alınarak inkübasyona devam edildi.

MTT Uygulaması

- Bor içerikli besi yeri eklendikten 24 saat sonra 96' lık platelerden bir tanesi alınarak her bir kuyucuk içerisine 15 µl Dye Solition eklendi.
- 4 saat 37°C de karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresi bittikten sonra her bir kuyucuğa 100 µl Stop Mix eklendi ve 1 saat daha 37°C de karbondioksitli etüvde inkübe edildi.
- Bu inkübasyon işleminden sonra plate, Mikroplate okuyucuda (Spectramax 190) 570 nm dalga boyunda okutuldu ve HTB-32 hücre hattının 1. gün MTT absorbands değerleri elde edildi.

HTB-32 hücre hattının 3. 5. 7. gün MTT analizleri ise geride kalan diğer üç adet 96' lık plate kullanılıp yukarıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi.

CCL - 62 hücre hattında MTT analizi

HTB-32 hücre hattında MTT analizi için uygulanan basamaklar bu hücre hattına da aynen uygulanmış ve BA, BP ve DPD' nin 250 µM, 500 µM, 1000 µM' lık konsantrasyonlarının CCL-62 hücre hattına uygulanmasından sonraki 1. 3. 5 ve 7. günlerde MTT analizi gerçekleştirilmiştir.

B. Caspase glo 3/7 kit içeriği, uygulanması ve analizi

CCL-62 He-La kontaminantı ve HTB-32 serviks karsinoma hücre dizilerinin üreme kinetiğine göre; pasajlanmaları yapıldı. 25lik flasklarda büyütülen hücreler, Tripan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayıldı ve yeterli olan flask içerikleri, 96lık well içeren platelere, well başına <2000 ml/hücre olacak şekilde paylaştırıldı.

Her iki hücre dizisi 24 saatlik, 37 °C olan %5'lik CO₂'li etüv inkübasyonuna bırakıldı. Ertesi gün, hücre dizilerine, 1. 3. ve 5. gün ölçümleri alınmak üzere Bor türevleri olan borik asit (H₃BO₃), boraks pentahidrat (Na₂B₄O₇.5H₂O) ve disodyum pentaborat dekahidratın (Na₂O.5B₂O₃.10H₂O) 250µM, 500 µM ve 1000µM'lik çözeltileri uygulandı. totalde her well'de 100µl süspansiyon ekimi yapıldı.

Ölçümleri yapmak üzere 1. 3. ve 5. günlerde alınan hücre dizilerinin kontaminasyon durumlarına bakıldı. Bu sırada **caspase glo 3/7 kit içeriği** olan 1 × 100ml Caspase-Glo® 3/7 Buffer ve liyofilize olan 1 Caspase-Glo® 3/7 Substrate homojen miktarda karıştırıldı. Çoklu otomatik pipet yardımıyla, içeriğinde hücre ve besiyeri totali 100µL olan süspansiyona 100µL kit içeriği uygulandı ve plateler 30 dakika ışıksız ortamda inkübasyona tabii tutuldu. Daha sonra uygun ortamda taşıma gerçekleştirilerek Varian Cary marka lüminometre ile ölçümler alındı.

Ayrıca sonuçların anlamlı olması adına platelere pozitif ve negatif kontrollerin ekimide yapıldı.

C. Caspase glo 8 kit içeriği, uygulanması ve analizi

CCL-62 HeLa kontaminantı ve HTB-32 insan serviks kanser hücre dizilerinin üreme kinetiğine göre; pasajlanmaları yapıldı. 25lik flasklarda büyütülen hücreler, Tripan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayıldı ve yeterli olan flask içerikleri, 96lık well içeren platelere, well başına <2000 ml/hücre olacak şekilde paylaştırıldı.

Her iki hücre dizisi 24 saatlik, 37 °C olan %5'lik CO₂'li etüv inkübasyonuna bırakıldı. Ertesi gün, hücre dizilerine, 1. 3. ve 5. gün ölçümleri alınmak üzere Bor türevleri olan borik asit (H₃BO₃), boraks pentahidrat (Na₂B₄O₇.5H₂O) ve disodyum pentaborat dekahidratın (Na₂O.5B₂O₃.10H₂O) 250µM, 500 µM ve 1000µM'lik çözeltileri uygulandı. totalde her well'de 100µl süspansiyon ekimi yapıldı.

Ölçümleri yapmak üzere 1. 3. ve 5. günlerde alınan hücre dizilerinin kontaminasyon durumlarına bakıldı. Bu sırada **caspase glo 8 kit içeriği** olan 1 × 100ml Caspase-Glo® 8 Buffer ve liyofilize olan 1 Caspase-Glo® 8 Substrate homojen miktarda karıştırıldı. Çoklu otomatik pipet yardımıyla, içeriğinde hücre ve besiyeri totali 100µL olan süspansiyona 100µL kit içeriği uygulandı ve plateler 30 dakika ışıksız ortamda inkübasyona tabii tutuldu. Daha sonra uygun ortamda taşıma gerçekleştirilerek Varian Cary marka lüminometre ile ölçümler alındı.

Ayrıca sonuçların anlamlı olması adına platelere pozitif ve negatif kontrollerin ekimide yapıldı.

D. Caspase glo 9 kit içeriği, uygulanması ve analizi

CCL-62 He-La kontaminantı epitelyal ve HTB-32 serviks kanser hücre dizilerinin üreme kinetiğine göre; pasajlanmaları yapıldı. 25lik flasklarda büyütölen hücreler, Tripkan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayıldı ve yeterli olan flask içerikleri, 96lık well içeren platelere, well başına <2000 ml/hücre olacak şekilde paylaştırdı.

Her iki hücre dizisi 24 saatlik, 37 °C olan %5'lik CO₂'li etöv inkübasyonuna bırakıldı. Ertesi gün, hücre dizilerine, 1. 3. ve 5. gün ölçümleri alınmak üzere Bor türevleri olan borik asit (H₃BO₃), boraks pentahidrat (Na₂B₄O₇.5H₂O) ve disodyum pentaborat dekahidratın (Na₂O.5B₂O₃.10H₂O) 250µM, 500 µM ve 1000µM'lik çözeltileri uygulandı. totalde her well'de 100µl süspansiyon ekimi yapıldı.

Ölçümleri yapmak üzere 1. 3. ve 5. günlerde alınan hücre dizilerinin kontaminasyon durumlarına bakıldı. Bu sırada **caspase glo 9 kit içeriği** olan 1 × 100ml Caspase-Glo® 9 Buffer ve liyofilize olan 1 Caspase-Glo® 9 Substrate homojen miktarda karıştırıldı. Çoklu otomatik pipet yardımıyla, içeriğinde hücre ve besiyeri totali 100µL olan süspansiyona 100µL kit içeriği uygulandı ve platerler 30 dakika ışksız ortamda inkübasyona tabii tutuldu. Daha sonra uygun ortamda taşıma gerçekleştirilerek Varian Cary marka lüminometre ile ölçümler alındı.

Ayrıca sonuçların anlamlı olması adına platelere pozitif ve negatif kontrollerin ekimide yapıldı.

2.2.4.2. Mikroskopik Analizler

A. Anneksin V FITC kit içeriği, uygulanması ve analizi

CCL-62 HeLa kontaminantı ve HTB-32 insan serviks karsinoma hücre dizilerinin üreme kinetiğine göre; pasajlanmaları yapıldı. 25lik flasklarda büyütölen hücreler, kit içeriğinde belirtilen $1-5 \times 10^5$ hücre totali için gerekli hesaplamaları yapılarak, Tripan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayıldı ve yeterli olan flask içeriklerine hücre süspansiyonları paylaştırdı.

Her iki hücre dizisi 24 saatlik, sıcaklığı 37 °C olan CO₂'siz etüv inkübasyonuna bırakıldı. Hücre yapışmasının sağlanmasıyla, ertesı gün, hücre dizilerine, 1. 3. ve 5. gün ölçümleri alınmak üzere Bor türevleri olan borik asit (H₃BO₃), boraks pentahidrat (Na₂B₄O₇.5H₂O) ve disodyum pentaborat dekahidratın (Na₂O.5B₂O₃.10H₂O) 250µM, 500 µM ve 1000µM'lik çözeltileri uygulandı.

Daha sonra tripsinizasyon uygulanarak hücreler kaldırıldı. Tüm içerik 15 cml'lik santrifüj tüpüne alındı. 4 °C de, 800 rpm'da 5 dakika santrifüjleme işleminden sonra süpernatant atıldı ve 1ml olan pellet homojenize edildi. Hücre pelletine **ANNEKSİN V FITC KİT İÇERİĞİ** olan 500 µl of 1X Binding Buffer uygulandı. Daha sonra flouresan ışımaya için gerekli olan kit içeriği 5 µl of Annexin V-FITC ve 5 µl of propidium iodide (PI 50µg/ml) uygulandı, örnekler 5 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.

Flouresan mikroskopi ile yapılacak incelemeler için lizinli lamlara kit ile muamele edilmiş hücre süspansiyonları convensiyonel olarak yayıldı. Hemen ardından flouresan ışımının kaybolmaması ve optimize apoptotik sonuçları almak üzere preparatlar kapatıldı, Histoloji Embriyoloji Ana Bilimdalında bulunan Olympus IX71 inverted flouresans mikroskop ile incelemeye alındı. Total her preparat için 20 hücre sayıldı, ölçümler bilgisayar ortamına aktarıldı.

B. Caspase FITC VAD FMK kit içeriği, uygulanması ve analizi

CCL-62 HeLa kontaminantı ve HTB-32 serviks karsinoma hücre dizilerinin üreme kinetiğine göre; pasajlamaları yapıldı. 25lik flasklarda büyütölen hücreler, kit içeriğinde belirtilen ml'de 5×10^5 hücre totali için gerekli hesaplamaları yapılarak, Tripan Blue boyama yöntemi yardımı ile Neubauer lamında sayıldı ve yeterli olan flask içeriklerine hücre süspansiyonları paylaştırdı.

Her iki hücre dizisi 24 saatlik, 37 °C olan CO²'siz etöv inkübasyonuna bırakıldı. Ertesi gün, 25 lik hücre flasklarında ki hücre dizilerine, 1. 3. ve 5. gün ölçümleri alınmak üzere Bor türevleri olan borik asit (H₃BO₃), boraks pentahidrat (Na₂B₄O₇.5H₂O) ve disodyum pentaborat dekahidratın (Na₂O.5B₂O₃.10H₂O) 250µM, 500 µM ve 1000µM'lik çözeltileri uygulandı.

Hücrelere ilgili günlerde anti-Fas monoklonal antikor (Clone CH-11, PanVera Kat. SY-100) 1/50 dilue oranında eklendi. Antijen-antikor ilişkisinin stabilitesi için 3-5 saat inkübasyona bırakıldı.

Daha sonra kit içeriğinde ki CaspACE™ FITC-VAD-FMK In Situ Marker her flaska son konsantrasyonu 10µM olacak şekilde eşit olarak paylaştırdı. İçeriğindeki flouresans reaksiyonun tam olabilmesi için ışıktan koruyarak 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücre içerikleri 300g'de 5 dakika santrifüjlenmek üzere tüplere alındı, süpernatant atıldı. Hücrelerin yıkanması için Fosfatlanmış tuz çözeltilisi ile (PBS) 300g'de 5 dakika daha santrifüjlendi. Daha sonra pellet 1 ml PBS kalacak şekilde homojenize edildi ve bu içeril poly lizinli lamlara dağıtıldı. %10 luk tamponlu formalin ile oda sıcaklığında 30 dakika fikse edilmesi sağlandı.

Su bazlı bir kapatıcı ile kapatılıp, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Ana Bilimdalında bulunan Olympus IX71 inverted flouresans mikroskop ile hücreler incelendi. Total her preparat için 20 hücre sayıldı, ölçümler bilgisayar ortamına aktarıldı.

2.2.4.3. İstatistik analiz

İstatistik çalışmalarında kalorimetrik yöntemler için Anova ve T testi, mikroskobik testler içinse Ki kare testi uygulandı.

3. BULGULAR

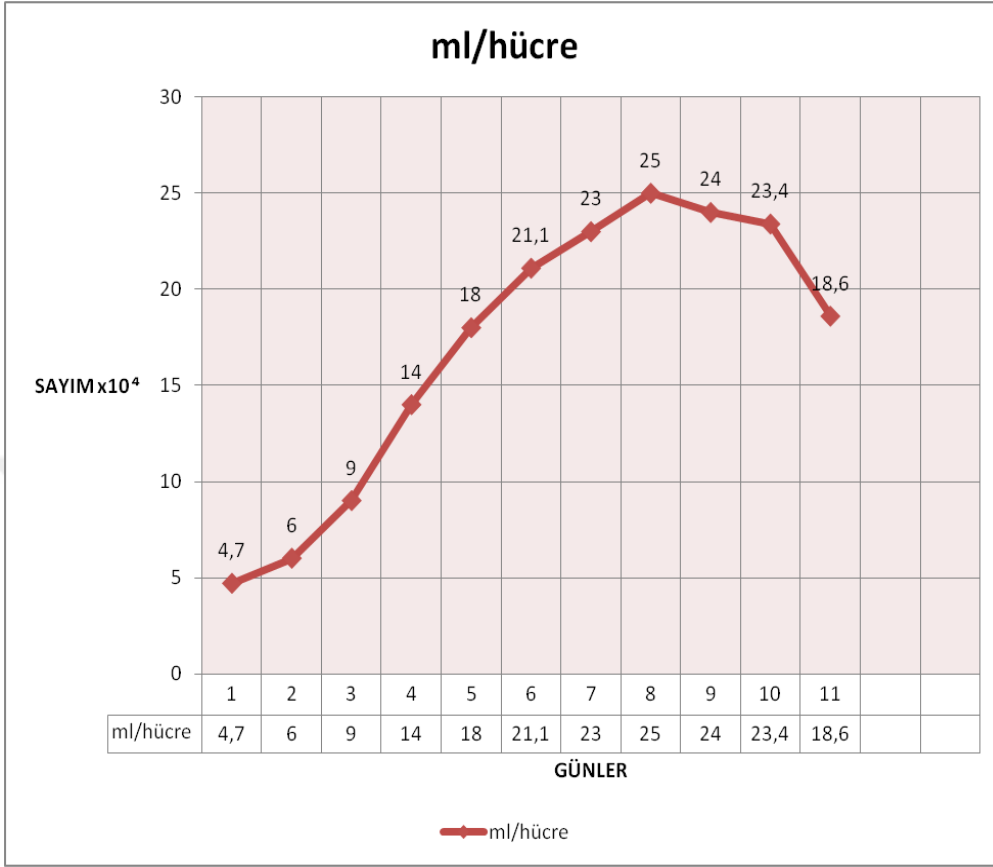
3.1. Hücre kinetiği

CCL-62 insan serviks HeLa kontaminantı ile HTB-32 serviks karsinoma hücre dizilerine ilişkin kinetik eğrileri Şekil 19 ve Şekil 20' de gösterilmiştir.

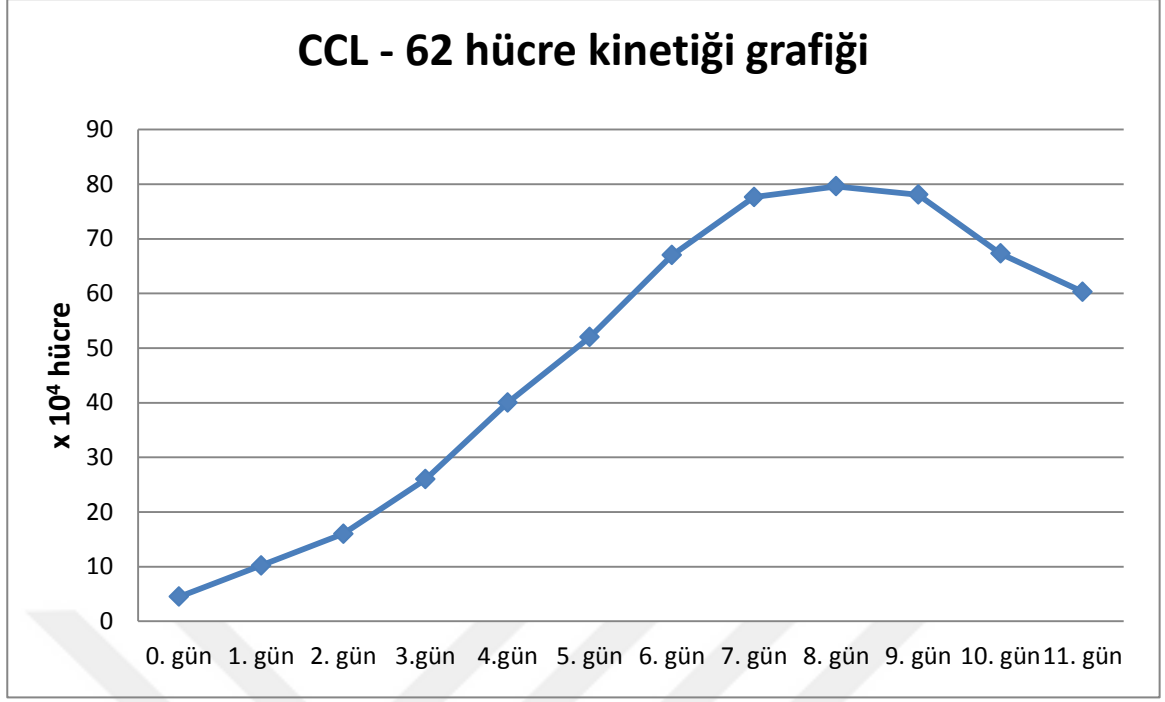
Hücre kinetiği eğrisine göre HTB-32'nin hücresel fazları :

- Adaptasyon fazı : 2-3. Gün
- Logaritmik faz : 3-5. gün arası
- Tepe fazı : 5-8. günler
- Ölüm fazı : 8. gün ve sonrası şeklinde belirlenmiştir.

Bu verilere göre bu hücre hattında apoptotik testleri yapmak için 1 ile 8 . günler arası en uygun zamanlar olarak belirlenmiştir. Bu hücre hattında gerçekleştirilen bütün uygulamalar bu günler içerisinde yapılmıştır.



Şekil 19. HTB-32 üreme kinetiği

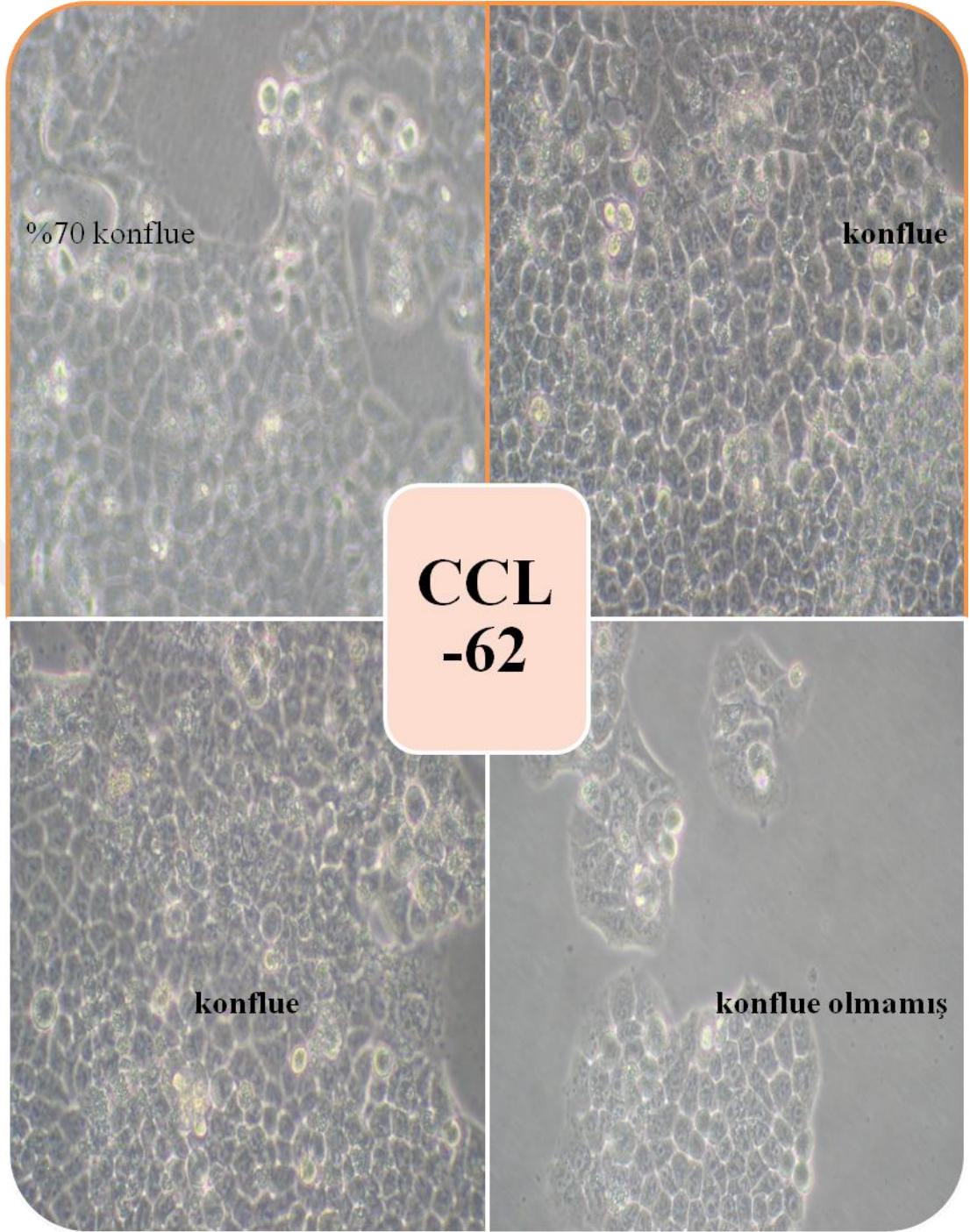


Şekil 20. CCL-62 üreme kinetiği

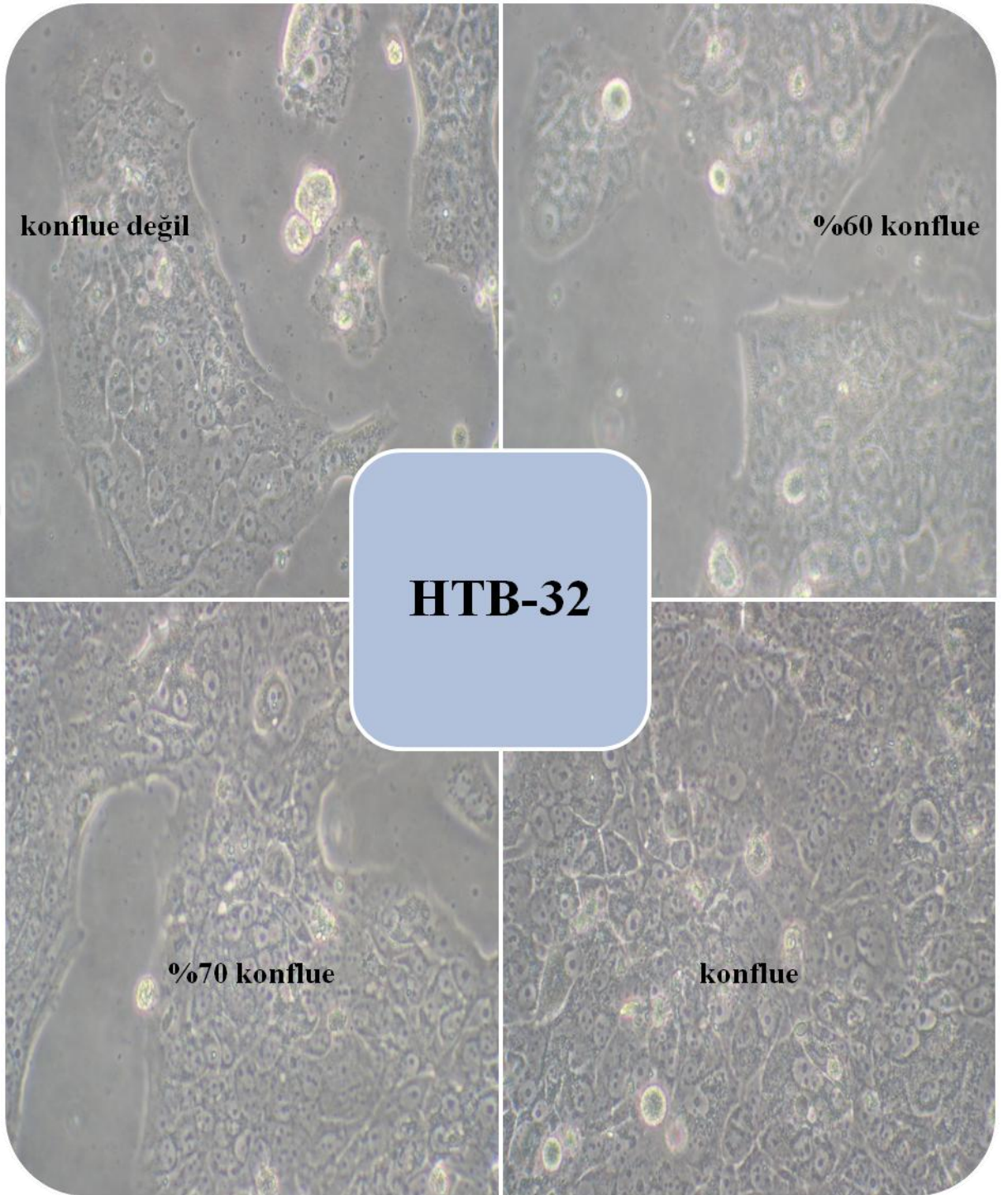
Hücre kinetiği eğrisine göre CCL - 62 nin hücresel fazları:

- Adaptasyon fazı : 0-1. Gün
- Logaritmik faz : 1- 8 gün arası
- Tepe fazı : 8-9 günler
- Ölüm fazı : 9. gün ve sonrası şeklinde belirlenmiştir.

Bu verilere göre CCL - 62 hücre hattında apoptotik testleri yapmak için 1 ile 8 . günler arası en uygun zamanlar olarak belirlenmiştir. Bu hücre hattında gerçekleştirilen bütün uygulamalar bu günler içerisinde yapılmıştır.



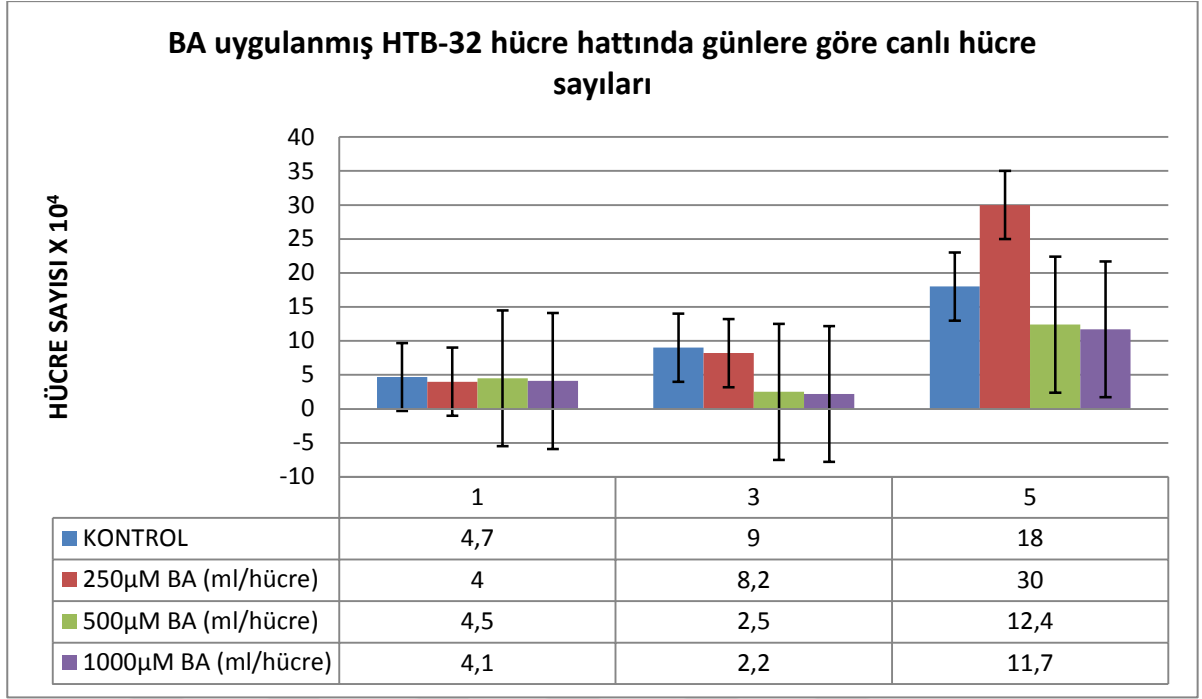
Şekil 21. CCL-62 (P/12) Mikroskopi Görüntüleri (10X objektifle büyütme)



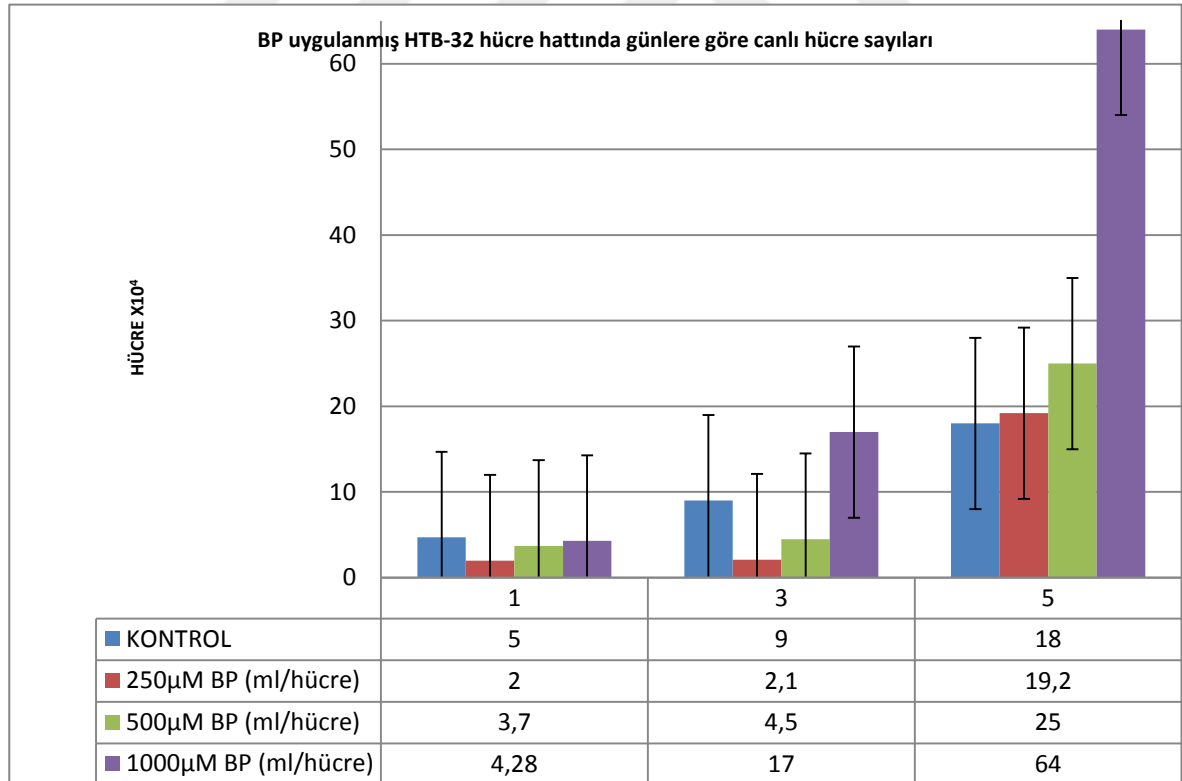
Şekil 22. HTB-32 (P/13) Mikroskopi Görüntüleri (10X objektifle büyütme)

Tripan Blue yöntemi ile canlılık ölçümleri:

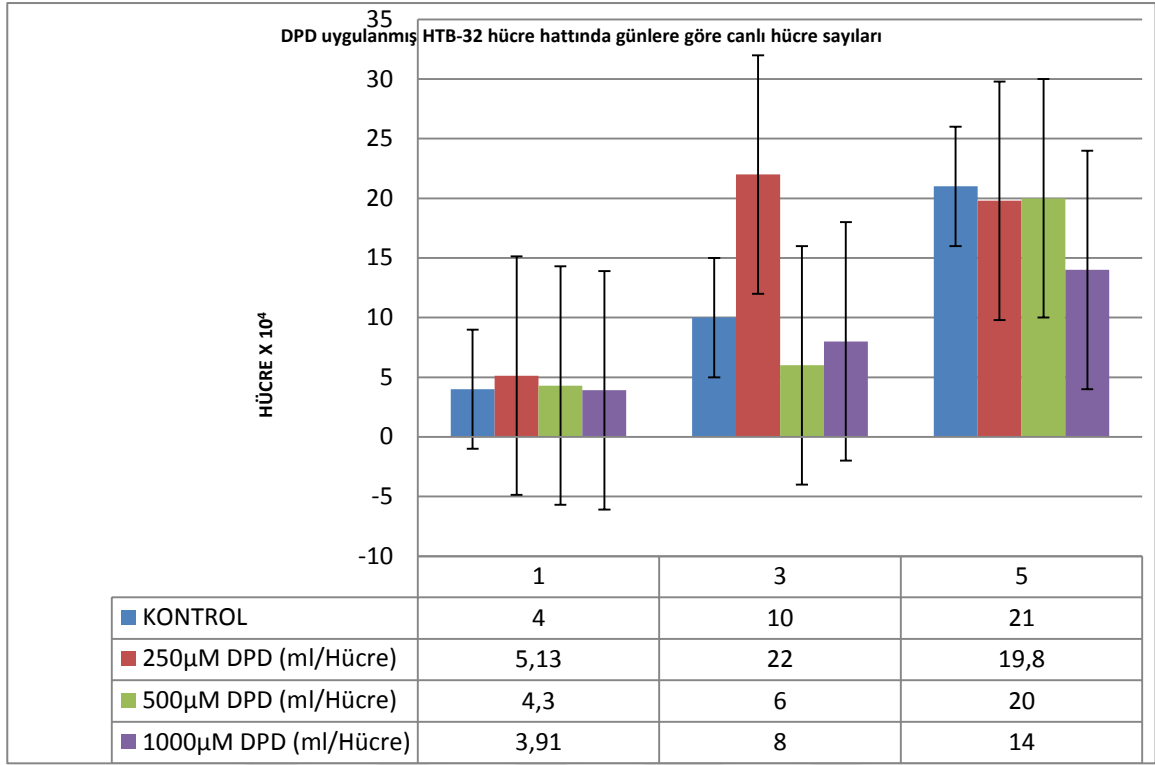
Şekil 23 a. , Şekil 23 b. , Şekil 23 c. (HTB-32) , Şekil 23 d. , Şekil 23 e ve Şekil 23 f. (CCL-62) tripan blue metodu ile ölçümleri göstermektedir.



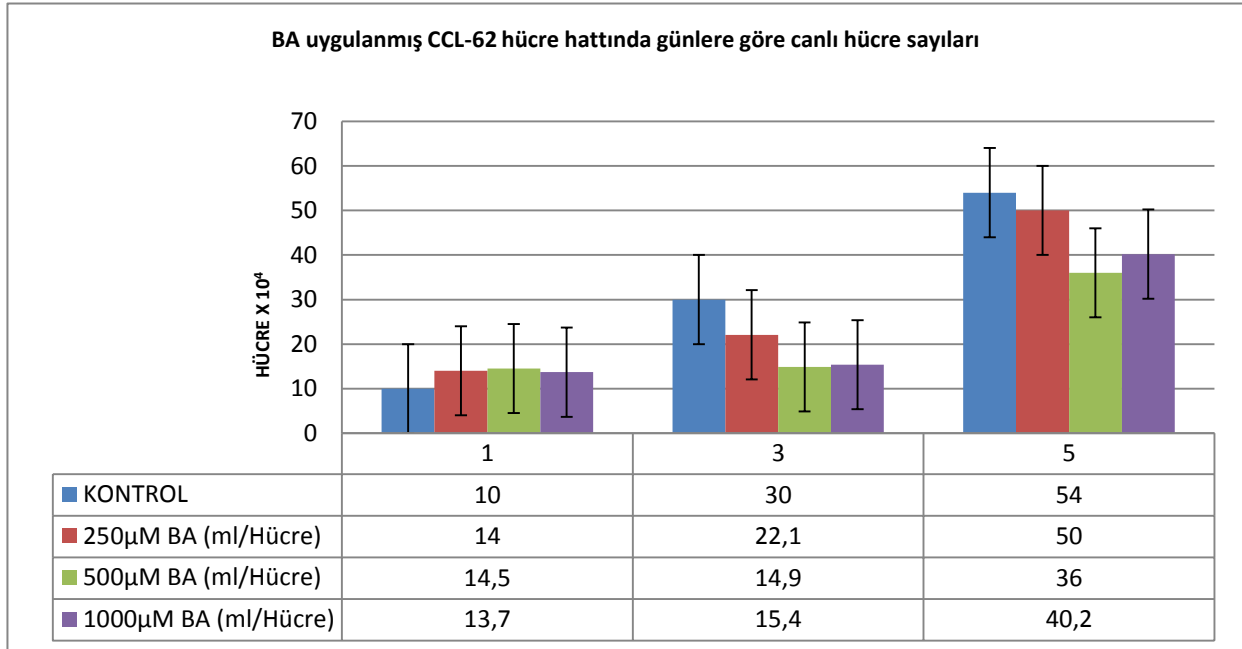
Şekil 23 a: Birinci günde canlı hücre sayısında kontrole göre bir farklılık gözlenmediği halde 3. ve 5. günde farklılık gözlenebilmektedir.



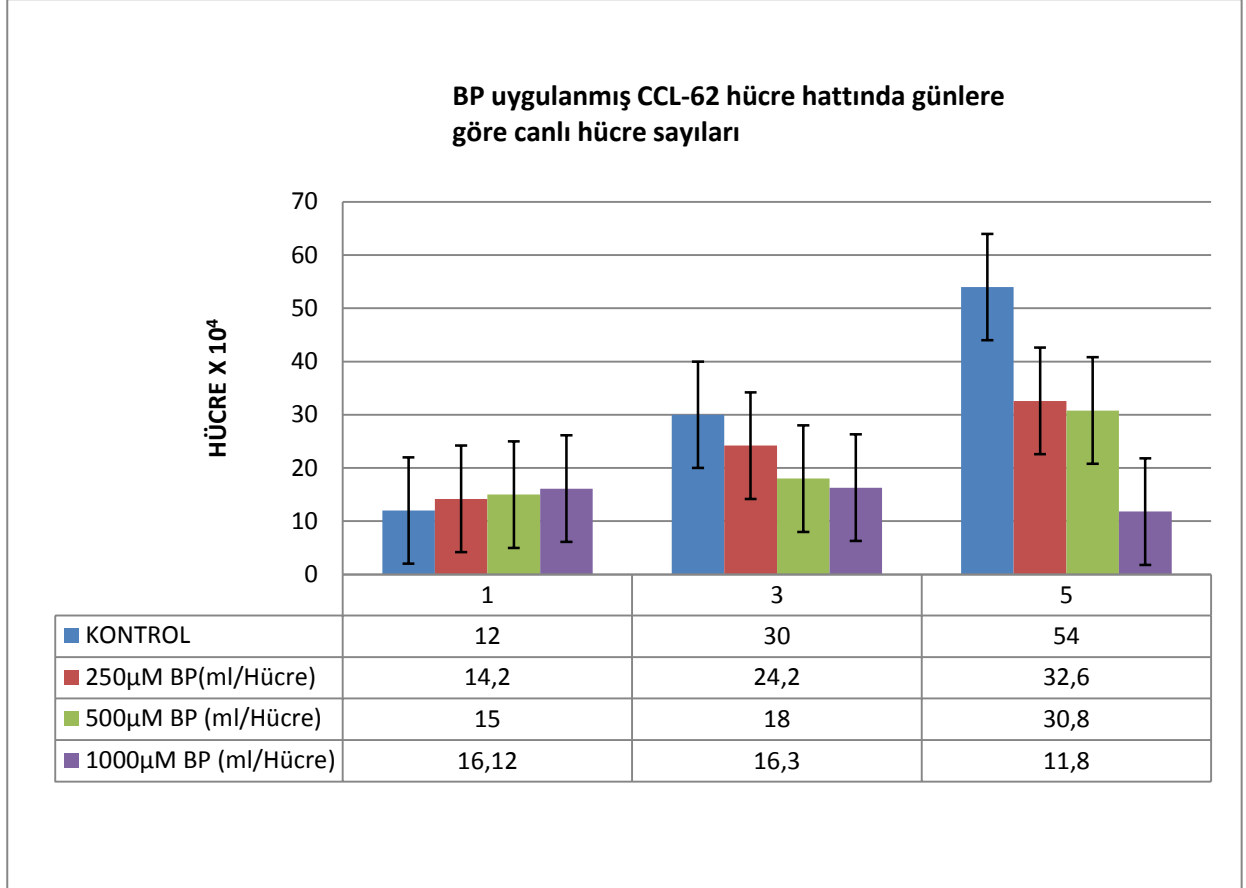
Şekil 23 b: Birinci günde canlı hücre sayısında kontrole göre bir farklılık gözlenmediği halde 3. ve 5. günde farklılık gözlenebilmektedir.



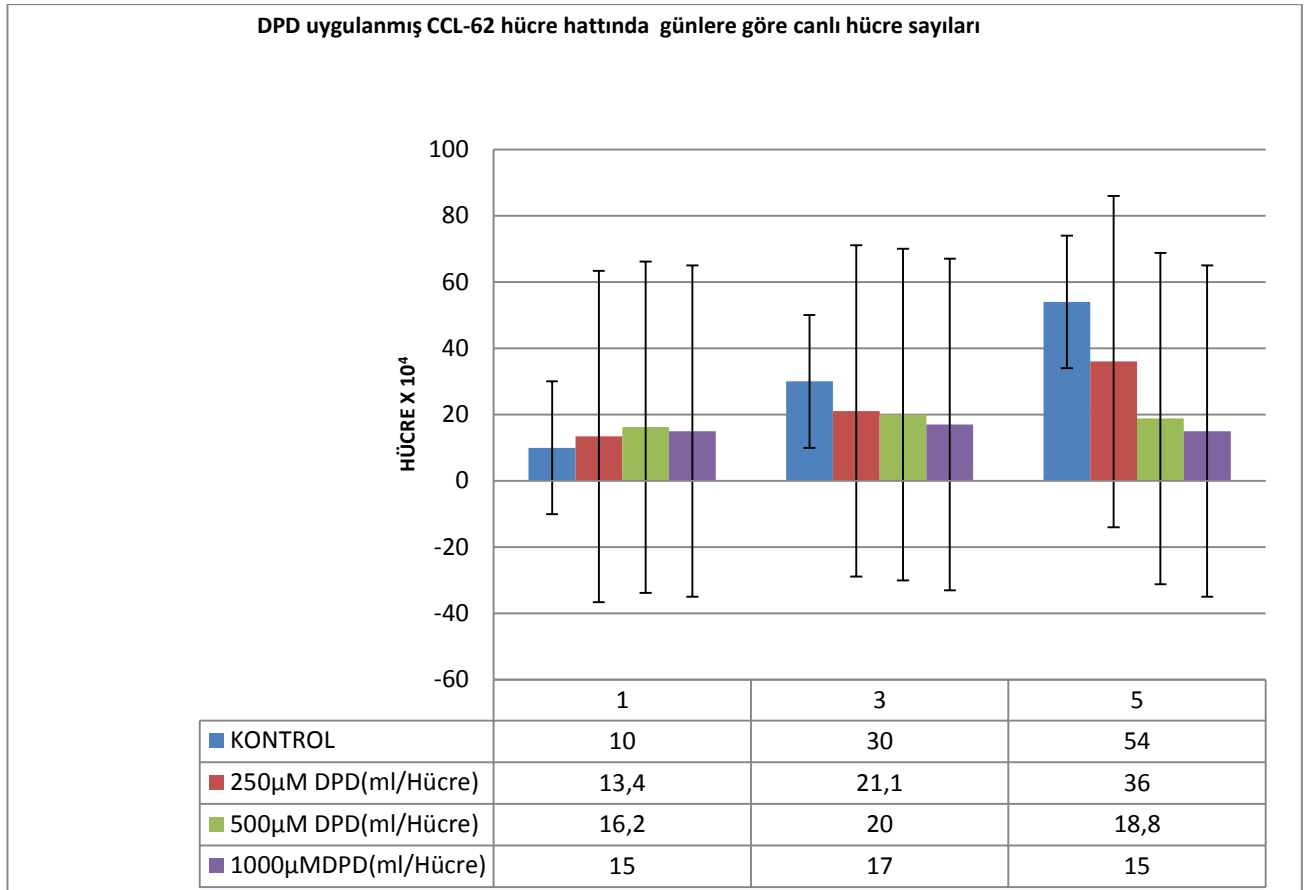
Şekil 23 c: Birinci günde canlı hücre sayısında kontrole göre bir farklılık gözlenmediği halde 3. ve 5. günde farklılık gözlenebilmektedir.



Şekil 23 d: Birinci günde canlı hücre sayısında kontrole göre bir farklılık gözlenmediği halde 3. ve 5. günde farklılık gözlenebilmektedir.



Şekil 23 e: Birinci günde canlı hücre sayısında kontrole göre yalnızca 1000 µM doza farklılık gözlenmediği halde 3. ve 5. günde tüm dozlarda farklılık gözlenebilmektedir



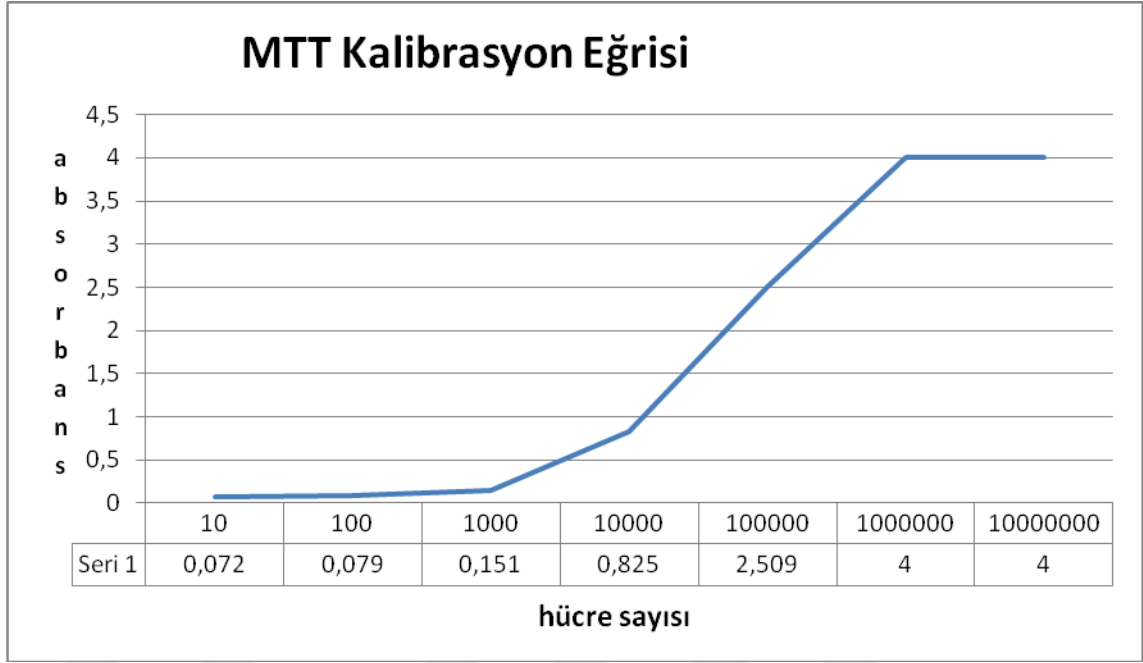
Şekil 23 f : Birinci uygulama gününde hafif bir artış görülmesine karşın diğer 3. ve 5. günlerin tüm dozlarında canlı hücre sayısı azalmıştır.

3.2 Kolorimetrik analizler

3.2 Kolorimetrik testler

3.2.1. MTT Kalibrasyon Testi

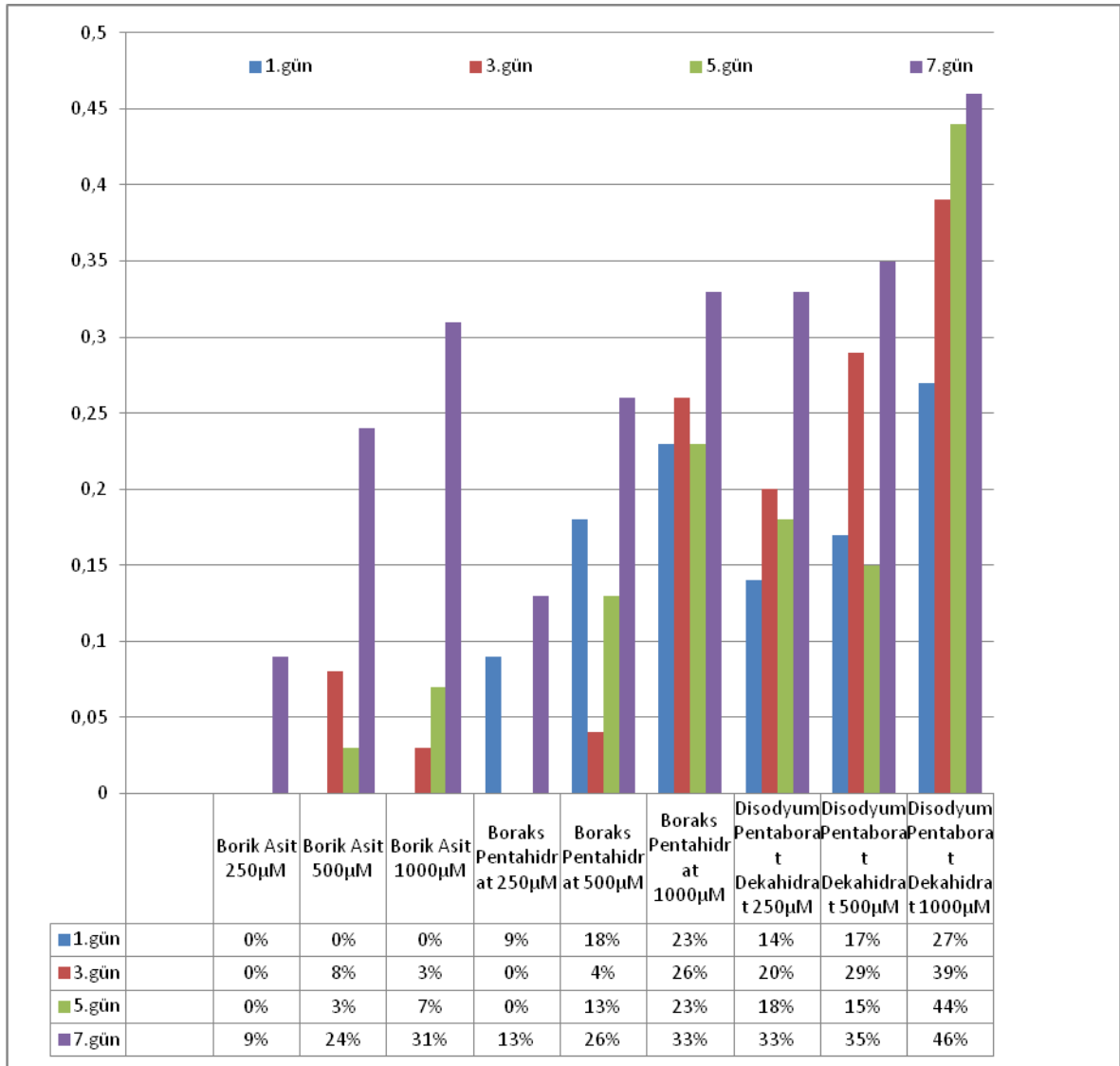
MTT kiti, 10^7 ila 10^8 arası hücre yoğunluğundaki ölçüm duyarlılık değerlerini vermiştir. Bu kalibrasyon eğrisi Şekil 24 de görülmektedir.



Şekil 24. MTT kalibrasyon eğrisi

MTT kalibrasyon testinden sonra kullanılan kitin duyarlılık düzeyinin 10^3 hücre ile 10^6 hücre arasında olduğunu belirlendi. Ayrıca 10^6 ve üzeri hücreyle 10^3 den az hücre miktarlarına karşı da duyarlı olmadığını görüldü.

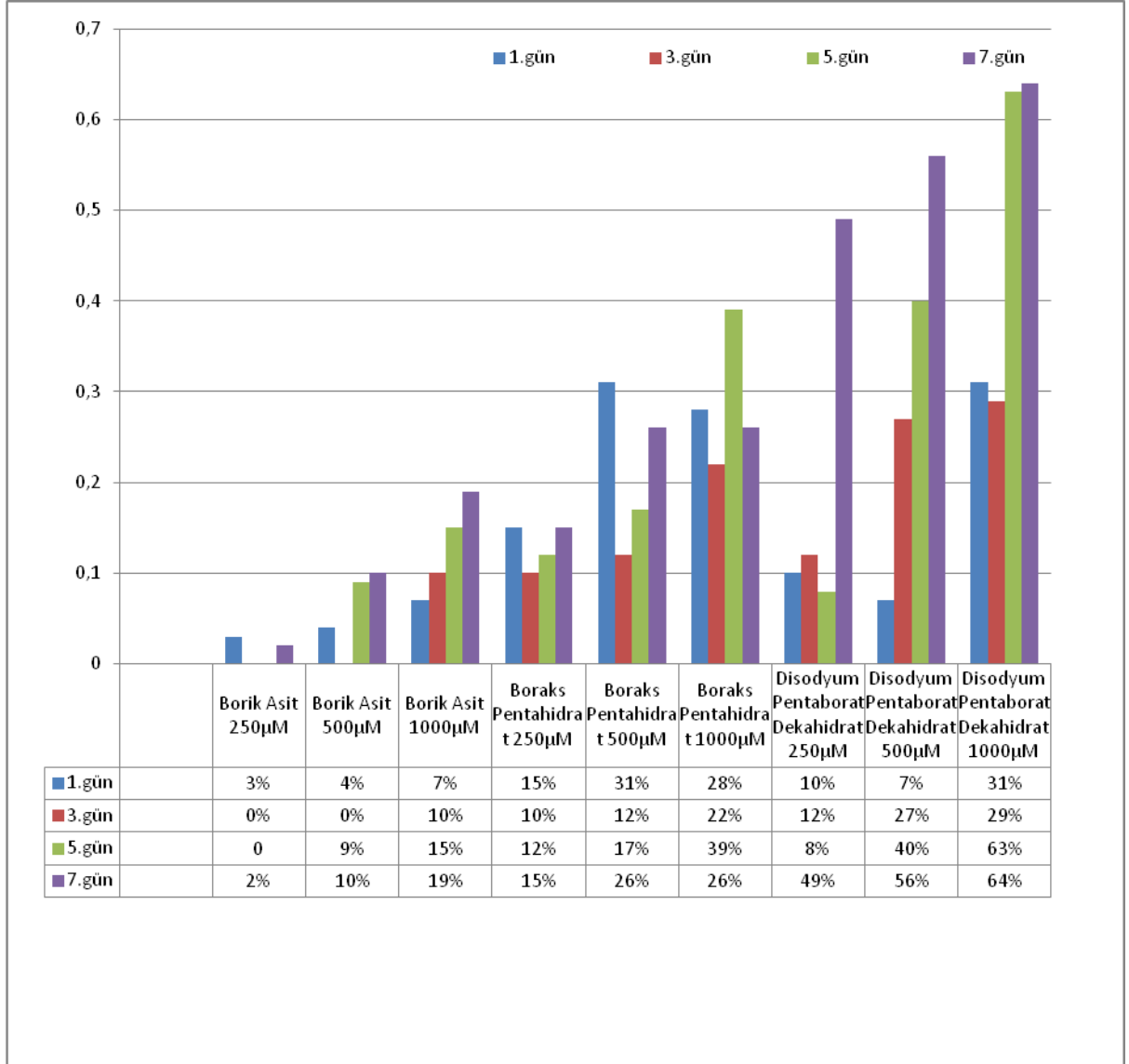
Bor bileşiklerinin HTB-32 ve CCL-62 hücrelerindeki proliferasyonu baskılama yüzdeleri hesaplanarak **Şekil 25** ve **Şekil 26**'de verilmiştir.



Şekil 25. Bor Bileşiklerinin MTT Testi Sonucu **HTB-32** Hücre hattının proliferasyonu üzerine olan etkileri (% olarak baskılama oranları)

Bor uygulaması sonucu HTB-32 hücre hattında meydana gelen baskılamanın belirlenmesi için uygulanan MTT analizinde BA'in 250µM'lık dozunda 1,3,5 ve 7 gün uygulanması ile elde edilen değerlerde proliferasyonu belirgin bir şekilde baskılamadığı diğer taraftan BA'nın 250 µM, 500 µM, 1000 µM'lık dozlarının 1,3 ve 5. gün belirgin bir şekilde proliferasyona etki etmediği hatta proliferasyonun arttığı da görülmüştür. Fakat 7. günde kayda değer bir şekilde proliferasyonun baskılandığı görülmüştür. Bu baskılanma kontrol hücrelerinde de görülmüş ve bu hücrelerin 7. günde tepe fazına girmesi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir.

Diğer bir hücre hattı olan CCL-62 hücrelerinde meydana gelen baskılamamın belirlenmesi için uygulanan MTT analizinde BA'in belirgin bir şekilde proliferasyonu baskılamadığı hatta bazı günler ve dozlarda proliferasyonun arttığı görülmüştür.



Şekil 26. Bor Bileşiklerinin MTT Testi Sonucu CCL-62 Hücre hattının proliferasyonu üzerine olan etkileri (% olarak baskılama oranları)

3.2.2. Kaspaz analizleri:

HTB-32 serviks karsinoma hücre dizine uygulanan BA, BP, DPD bor türevlerinin kaspaz aktivasyonuna olan etkileri istatistiksek olarak değerlendirildiğinde;

1.günde 500µM DPD'nin uygulanması anlamlı olarak saptanırken 1.günde diğer tüm bor türevleri ve dozlarının kaspaz 3/7, kaspaz 8 ve kaspaz 9'un aktivasyonu açısından fark görülmemiştir (*P<0.05).

3.günde , kaspaz 3/7'nin yalnızca 250 µM BA da ve 500 µM DPD de anlamlı olarak aktivasyonu arttırdığı saptanmıştır (*P<0.05).

3.günde, kaspaz 8'in aktivasyonunda ise, 250 µM BA nın ve 500 µM DPD'nin kontrole göre istatistiksel olarak saptanmıştır (*P<0.05).

3.günde kaspaz 9'un aktivasyonu yalnızca DPD'nin 500 µM lık uygulamasının arttırdığı saptanmıştır (*P<0.05).

5.gün kaspaz 3/7 aktivasyonu BA ve DPD açısından her üç dozda anlamlı olurken BP açısından yalnızca 500 µM'lık uygulamada arttığı saptanmıştır (*P<0.05).

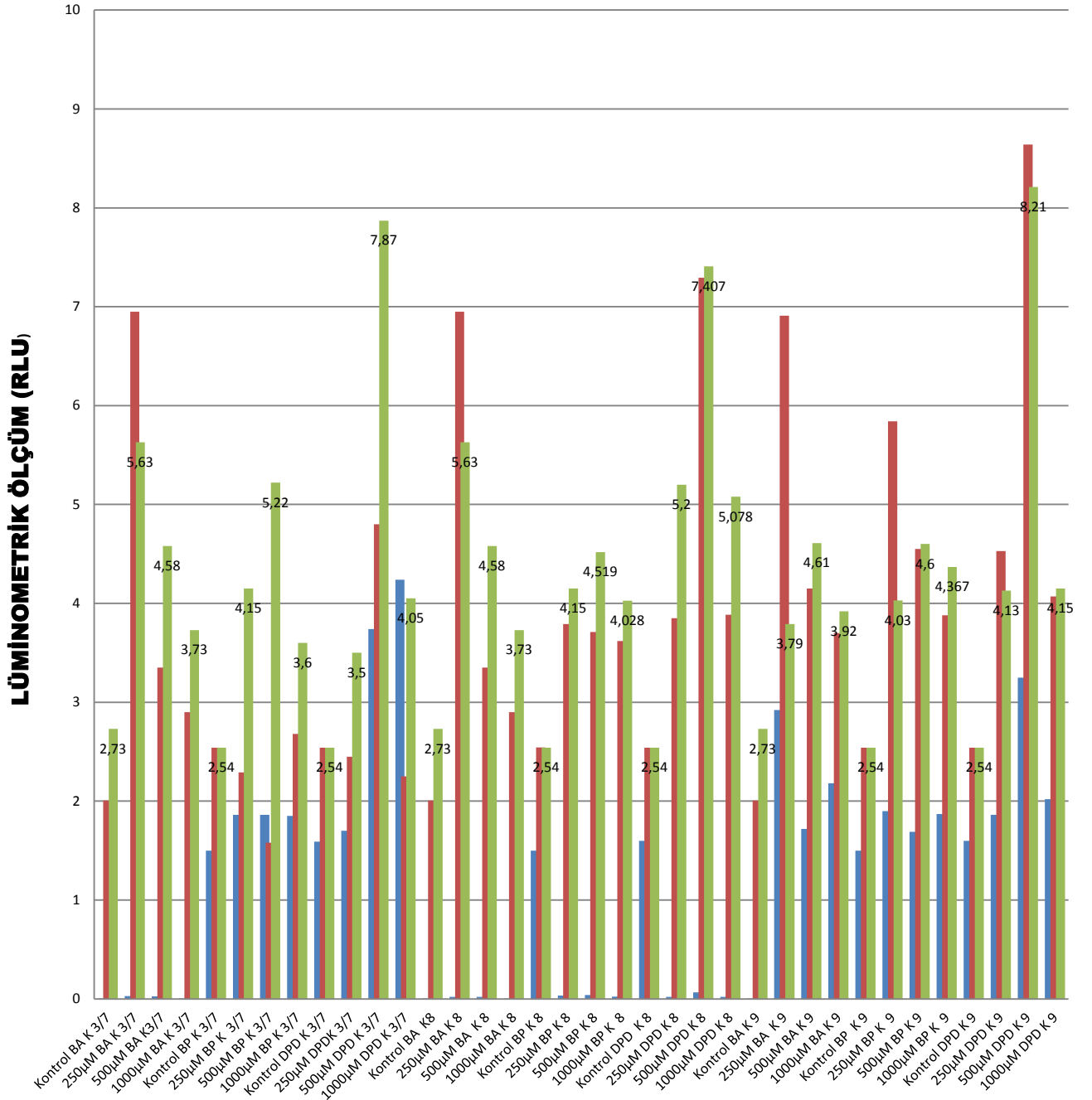
5.gün kaspaz 8'in bor türevleri açısından değerlendirilmesinde BP'nin hiçbir dozda etkisinin olmadığı, oysa BA 250 µM ve 500 µM DPD nin ise 500 ila 1000 µM dozlarda anlamlı olduğu belirlenmiştir (*P<0.05).

5.gün kaspaz 9'un bor türevleri açısından değerlendirilmesinde, yalnızca DPD'nin 500 µM lık dozunda anlamlılık saptanmaktadır (*P<0.05).

Kontrol BA K 3/7	0,005	2.005	2,73
250µM BA K 3/7	0,029	6,95*	5,63*
500µM BA K3/7	0,025	3,35	4,58*
1000µM BA K 3/7	0,005	2,90	3,73*
Kontrol BP K 3/7	1.50	2.54	2.54
250µM BP K 3/7	1,86	2,29	4,15
500µM BP K 3/7	1,86	1,58	5,22*
1000µM BPK 3/7	1,85	2,68	3,6
Kontrol DPD K 3/7	1.59	2.54	2.54
250µM DPDK 3/7	1,70	2,45	3,50*
500µM DPD K 3/7	3,74*	4,80*	7,87*
1000µM DPD K 3/7	4,24	2,25	4,05*
Kontrol BA K8	0,005	2.005	2,73
250µM BA K 8	0,02	6,95*	5,63*
500µM BA K 8	0,02	3,35	4,58*
1000µM BA K 8	0,005	2,90	3,73
Kontrol BP K 8	1.50	2.543	2.540
250µM BP K 8	0,034	3,79	4,15
500µM BP K 8	0,04	3,71	4,519
1000µM BP K 8	0,022	3,62	4,028
Kontrol DPD K 8	1.598	2.54	2.54
250µM DPD K 8	0,019	3,85	5,2
500µM DPD K 8	0,067	7,294*	7,407*
1000µM DPD K 8	0,0216	3,884	5,078*
Kontrol BA K 9	0,005	2.005	2,73
250µM BA K 9	2,92	6,91	3,79
500µM BA K 9	1,72	4,15	4,61
1000µM BA K 9	2,18	3,70	3,92
Kontrol BP K 9	1.50	2.54	2.54
250µM BP K 9	1,90	5,84	4,03
500µM BP K 9	1,690	4,55	4,60
1000µM BP K 9	1,87	3,88	4,367
Kontrol DPD K 9	1.598	2.54	2.54
250µM DPD K 9	1,86	4,53	4,13
500µM DPD K 9	3,25	8,64*	8,21*
1000µM DPD K 9	2,02	4,07	4,15

Tablo 2. HTB-32 Serviks karsinoma hücre dizisi Kaspaz ölçümleri (*P<0.05)

HTB-32 KASPAZ ÖLÇÜMLERİ



Şekil 27. HTB-32 Serviks karsinoma hücre dizisi Kaspaz ölçümleri

	1.GÜN	3.GÜN	5.GÜN
Kontrol BA K 3/7	0,005	2,005	2,73
250µM BA K 3/7	2,231	1,95	9,229*
500µM BA K 3/7	0,983	3,66	8,024*
1000µM BA K 3/7	2,148	1,83	14,71*
Kontrol BP K 3/7	1,50	2,54	2,54
250µM BP K 3/7	1,68	1,36	3,56
500µM BPK 3/7	1,54	1,58	3,40
1000µM BPK 3/7	1,62	1,68	1,23
Kontrol DPD K 3/7	1,59	2,54	2,54
250µM DPDK 3/7	1,90	1,96	4,14
500µM DPD K 3/7	1,74	2,47	8,07*
1000µM DPD K 3/7	1,63	1,72	5,20*
Kontrol BA K8	0,005	2,005	2,73
250µM BA K 8	0,02	6,95	5,63
500µM BA K 8	0,02	3,35	4,58*
1000µM BA K 8	0,005	2,90	3,73*
Kontrol BP K 8	1,50	2,54	2,54
250µM BP K 8	1,554	2,968	8,347*
500µM BP K 8	1,152	1,71	4,682
1000µM BP K 8	3,27	1,75	5,212
Kontrol DPD K 8	1,598	2,54	2,54
250µM DPD K 8	0,856	3,688	4,423*
500µM DPD K 8	1,28	1,713	8,9306*
1000µM DPD K 8	5,32*	1,75	8,944*
Kontrol BA K 9	0,005	2,005	2,73
250µM BA K 9	1,296	1,566	5,715*
500µM BA K 9	1,031	1,846	8,068*
1000µM BA K 9	2,2236	5,979*	9,72*
Kontrol BP K 9	1,50	2,54	2,54
250µM BP K 9	1,47	1,40	3,94
500µM BP K 9	1,19	1,616	5,084*
1000µM BP K 9	2,21	1,98	6,092*
Kontrol DPD K 9	1,598	2,54	2,54005
250µM DPD K 9	0,71	13,96233*	9,077*
500µM DPD K 9	1,43	1,725	38,29*
1000µM DPD K 9	2,44	3,427	9,776*

Tablo 3.CCL-62 kaspaz analizleri

CCL- 62 Hücre dizinde ise;

1.gün ve 3.günde kaspaz 3/7'nin uyarladığımız tüm bor türevlerinde aktivasyonu istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.

1.günde; tüm kaspaz aktivasyonlarına bakıldığında yalnızca 1000 μ M DPD uygulanmasıyla kaspaz 8'de anlamlı bir aktivasyon görülmüştür(*P<0.05).

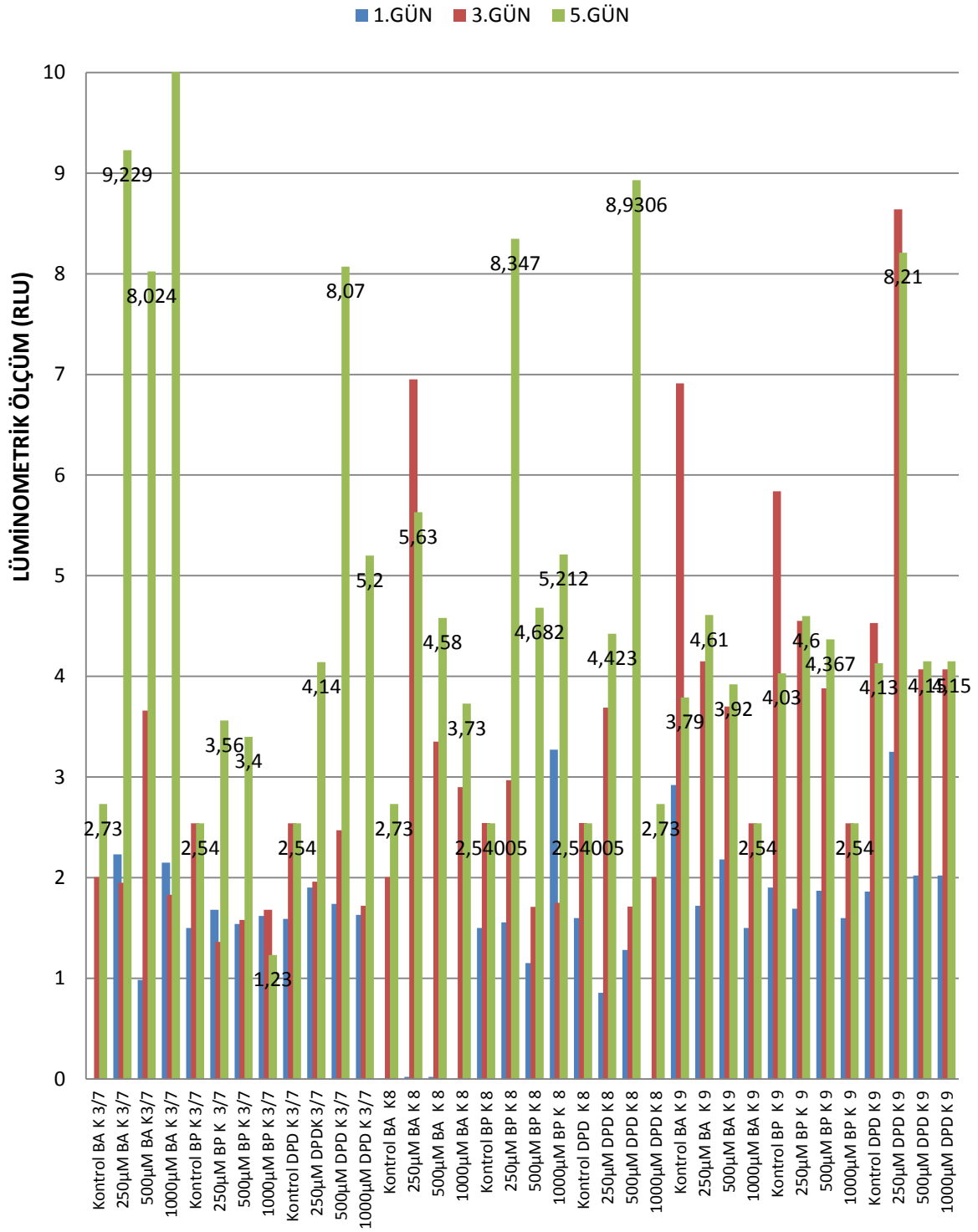
3.günde ise sadece kaspaz 9 aktivasyonunda, 1000 μ M BA ve 250 μ M DPD madde dozlarında anlamlı farklılık görülmüştür (*P<0.05).

5.gün kaspaz 3/7'nin BA uygulamasının tüm dozları anlamlı sonuçlar verirken, BP dozları aktivasyonu arttırmamıştır. Diğer taraftan 500 μ M ve 1000 μ M DPD uygulaması kontrole göre anlamlıdır (*P<0.05).

5. günde kaspaz 8'in aktivasyonu BA'de 500 μ M ve 1000 μ M dozları istatistiksel olarak anlamlı (*P<0.05) olarak değerlendirilirken BP'nin yalnızca 250 μ M dozunda önemlilik saptanmıştır. Oysa DPD'nin her üç dozunun uygulanmasında kontrole göre sonuç anlamlıdır (*P<0.05).

5.gün kaspaz 9 aktivasyonunda BP'nin 250 μ M dozu hariç diğer bor türevlerinin tüm dozlarında kaspaz 9 aktivasyonunun artışında anlamlılık saptanmıştır (*P<0.05).

CCL-62 Kaspaz ölçümleri



Şekil 28. CCL-62 hücre dizisi Kaspaz ölçümleri

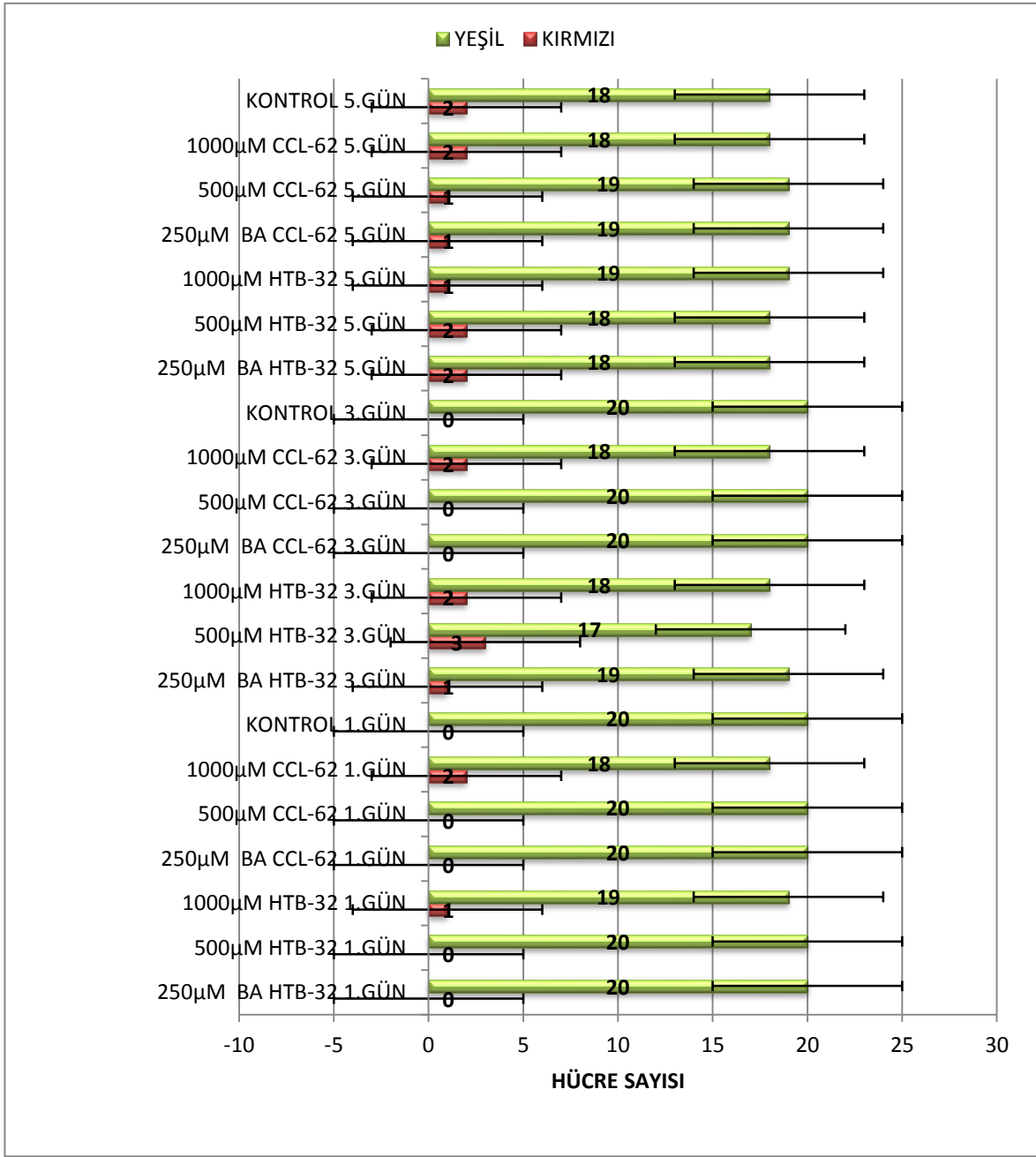
Her iki hücre hattına uyguladığımız bor türevlerini kaspaz aktivasyonları yönünden değerlendirdiğimizde hücre hatları arasında istatistiksel yönden anlamlı fark bulunamamıştır ($P>0,05$).

3.3. Mikroskopik analizler:

3.3.1. Anneksin V FITC

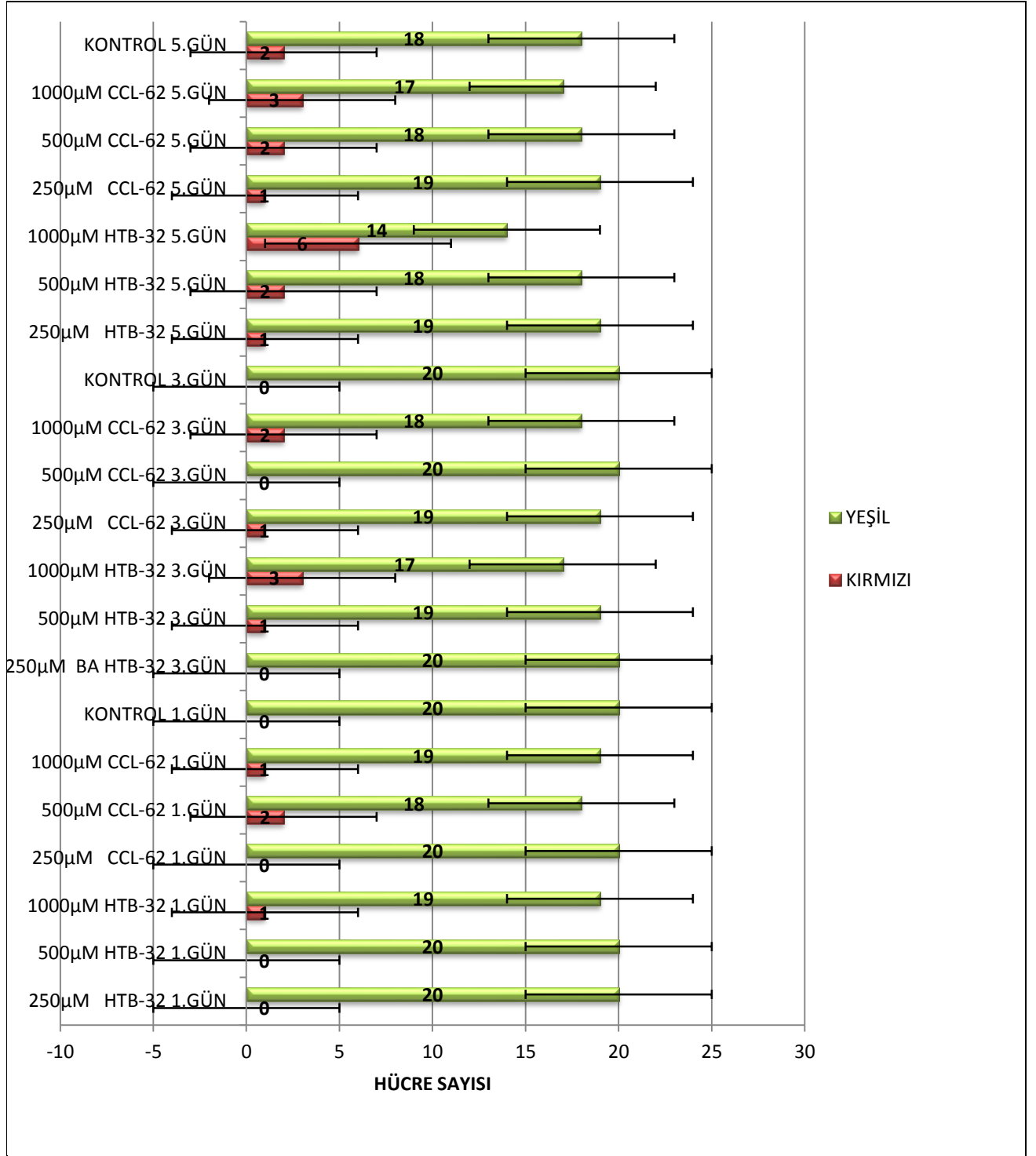
Uygulanan borik asit'in Annexin V ölçümlerinde kırmızı hücreler apoptotik, yeşil olan hücreler ise canlı olarak tanımlanmıştır. HTB32 hücrelerinde DPD nin 250 μM dozunun 1. günü 1000 μM dozun yine 1 ve 5. günün kontrole göre karşılaştırılması sonucunda apoptozis yönünden anlamlı fark saptanmıştır ($P<0,05$). CCL62 hücrelerinde ise 1000 lık dozda ve 5.ölçüm gününde DPD deki olarak apoptosis oranı kontrole göre anlamlıdır ($P<0,05$). Diğer taraftan 3. günde CCL62 hücrelerinde DPD 1000mgr dozunda ve 5.Ölçüm gününde CCL62 ve HTB32 hücrelerinde 1000 μM dozda apoptotik hücre sayısı anlamlıdır ($P<0,005$). Alt grup analizinde CCL62 hücrelerinde DPD nin 1000 μM uygulamasında gün arttıkça apoptosis anlamlı derecede olarak artmaktadır. Bu sonuçlara göre apoptozis; Doz arttıkça artmakla beraber, madde etki sıralaması $\text{DPD}>\text{DP}>\text{BA}$ şeklindedir. Diğer taraftan HTB32 kanser hücreleri CCL62 He La kontaminatı ölümsüz hücre hattına göre daha fazla apoptosis sergilemektedir.

Borik asit:



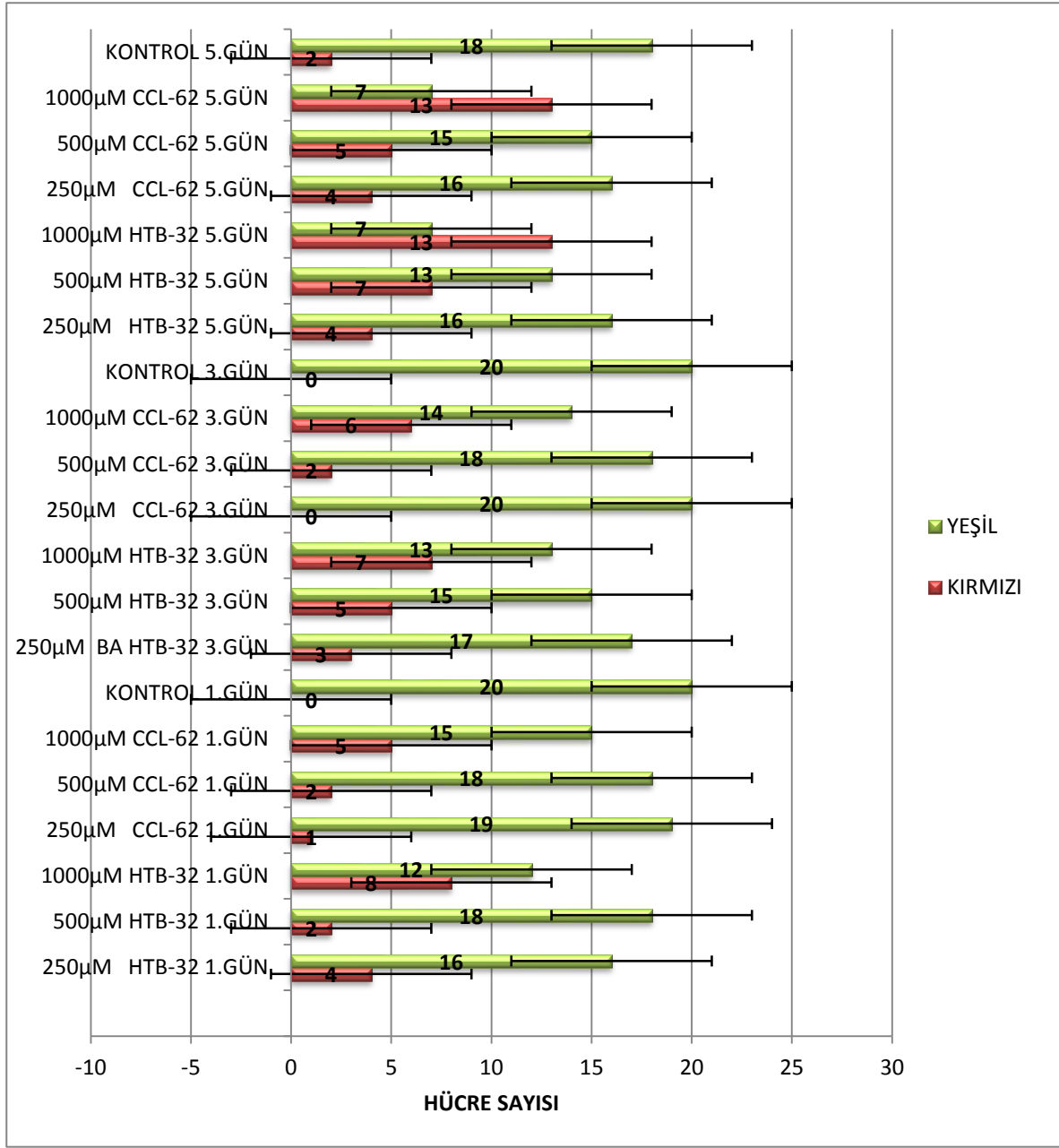
Şekil 29. Borik asit ile Annexin FITC ölçümleri

Boraks pentahidrat (BP) :

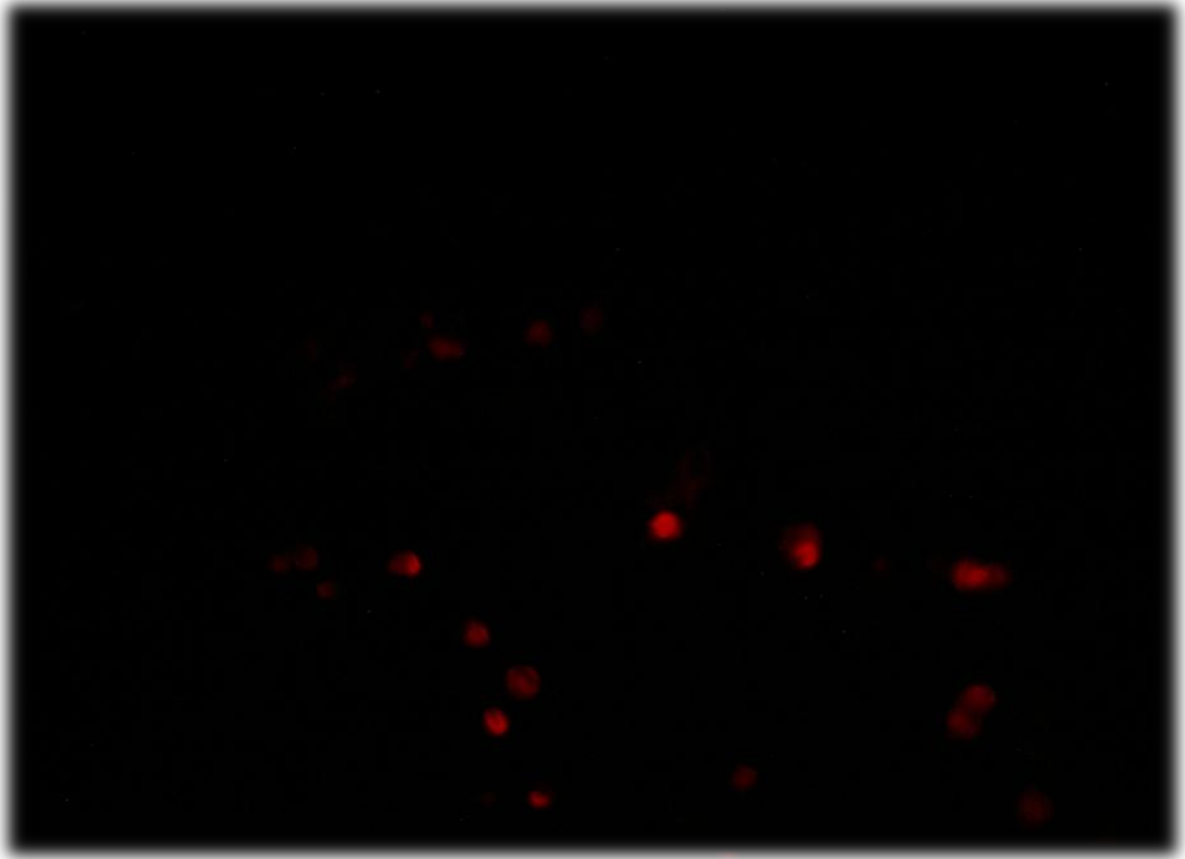


Şekil 30. BP ile Annexin V FITC ölçümleri

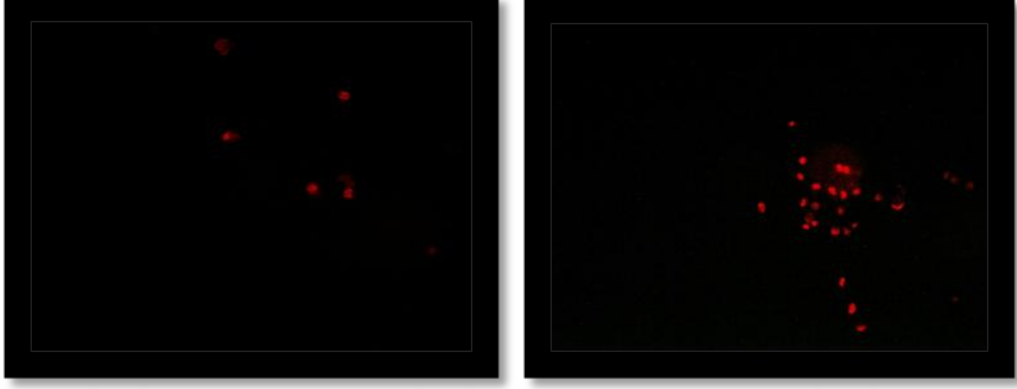
Di sodyum Pentaborat Dekahidrat:



Şekil 31. DPD ile anneksin V FITC ölçümleri



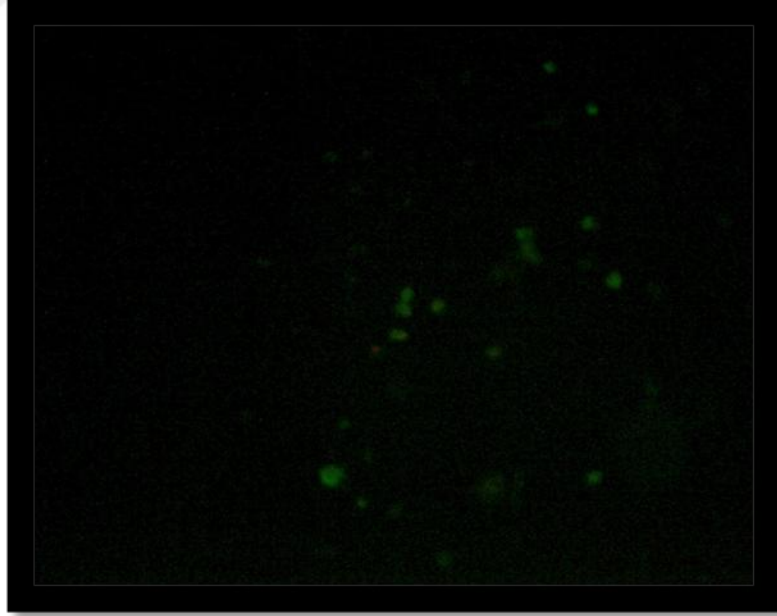
Şekil 32. Annexin V FITC ile apoptotik hücreler (CCL-62,P/14,3.Gün,1000 μ M DPD ile)
(10X objektif ile)



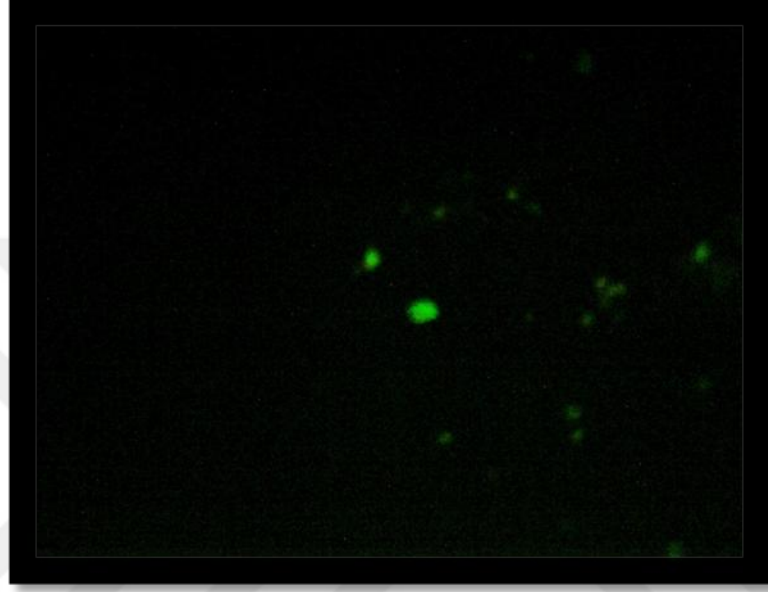
a.

b.

Şekil 33 a-b. Annexin V FITC ile apoptotik hücreler (HTB-32,P/16,5.Gün,1000 μ M DPD ile)
(10X objektif ile)



Şekil 34. Annexin V FITC ile canlı hücreler CCL-62 (P/14,3.Gün,500 μ M BA ile muamele)
(10X objektif ile)



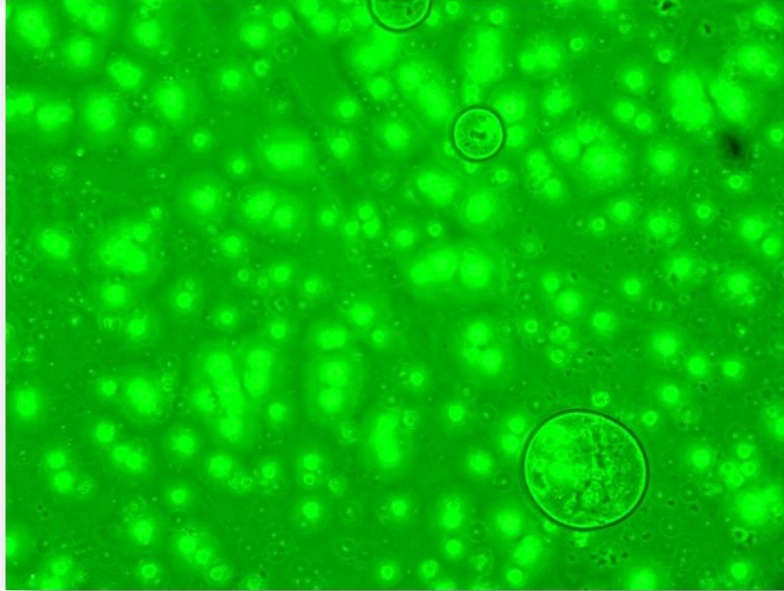
Şekil 35. Annexin V FITC ile canlı hücreler HTB-32 (P/16,3.gün,500µM BA ile muamele)
(10X objektif ile)

3.3.2 Kaspaz Fitc VAD FMK

Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; Hücre bazında ki incelemeye bakılacak olunursa; Hücre tipine göre tüm veri içinde yapılan karşılaştırmada toplam 1080 hücre ışına açısından değerlendirilmiş ve 540 HTB32 hücresinin 79'unda ışına varken, 59 CCL62 hücresinde ışına saptanmıştır. Kontrole göre yapılan karşılaştırmalarda; dağılım anlamlı olarak farklı bulunmuştur. HTB32 hücreleri daha fazla apoptozis göstermiştir (P=0.042).

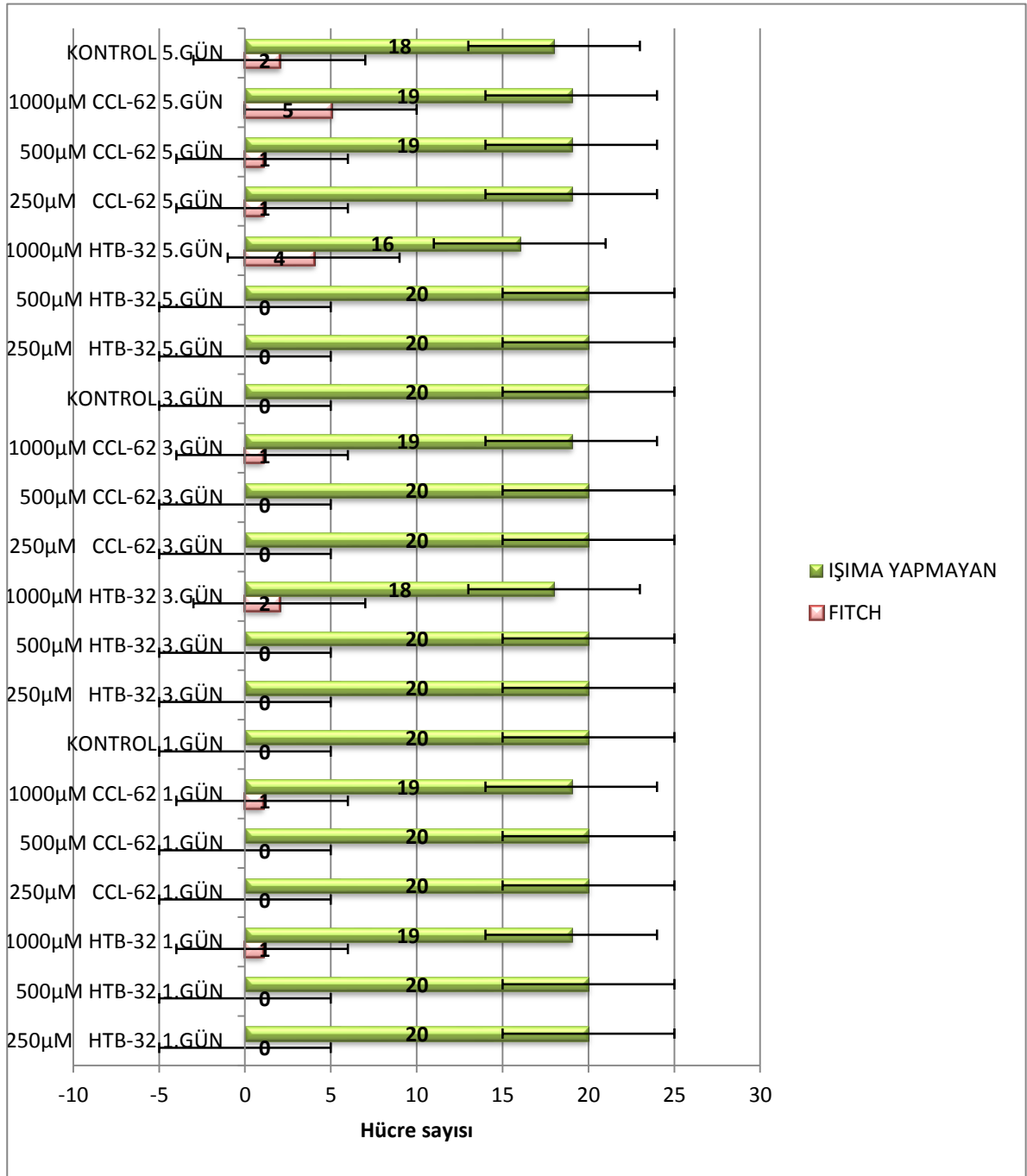
Tüm veri içinde maddeye göre karşılaştırma yapıldığında, apoptozis oluşan hücrelerin dağılımında anlamlı fark bulunmuştur. BA maddesi en az apoptozis oluştururken BP maddesi ikinci sıklıkta, DPD maddesi ise daha fazla apoptozise yol açtığı saptanmıştır.

Maddeye göre alt grup analizi yapıldığında, $p < 0.05$ dağılım farklı bulunmuştur. HTB32 hücrelerinde 250 μ M dozda ve 1.ölçüm gününde, DPD belirgin olarak apoptozis sağlamıştır. HTB32 hücrelerinde 1000 μ M dozda ve 1.ölçüm ve 5. Ölçüm gününde, DPD belirgin olarak apoptozis sağlamıştır. CCL62 hücrelerinde 1000 μ M dozda ve 5.ölçüm gününde DPD belirgin olarak apoptozis sağlamıştır.



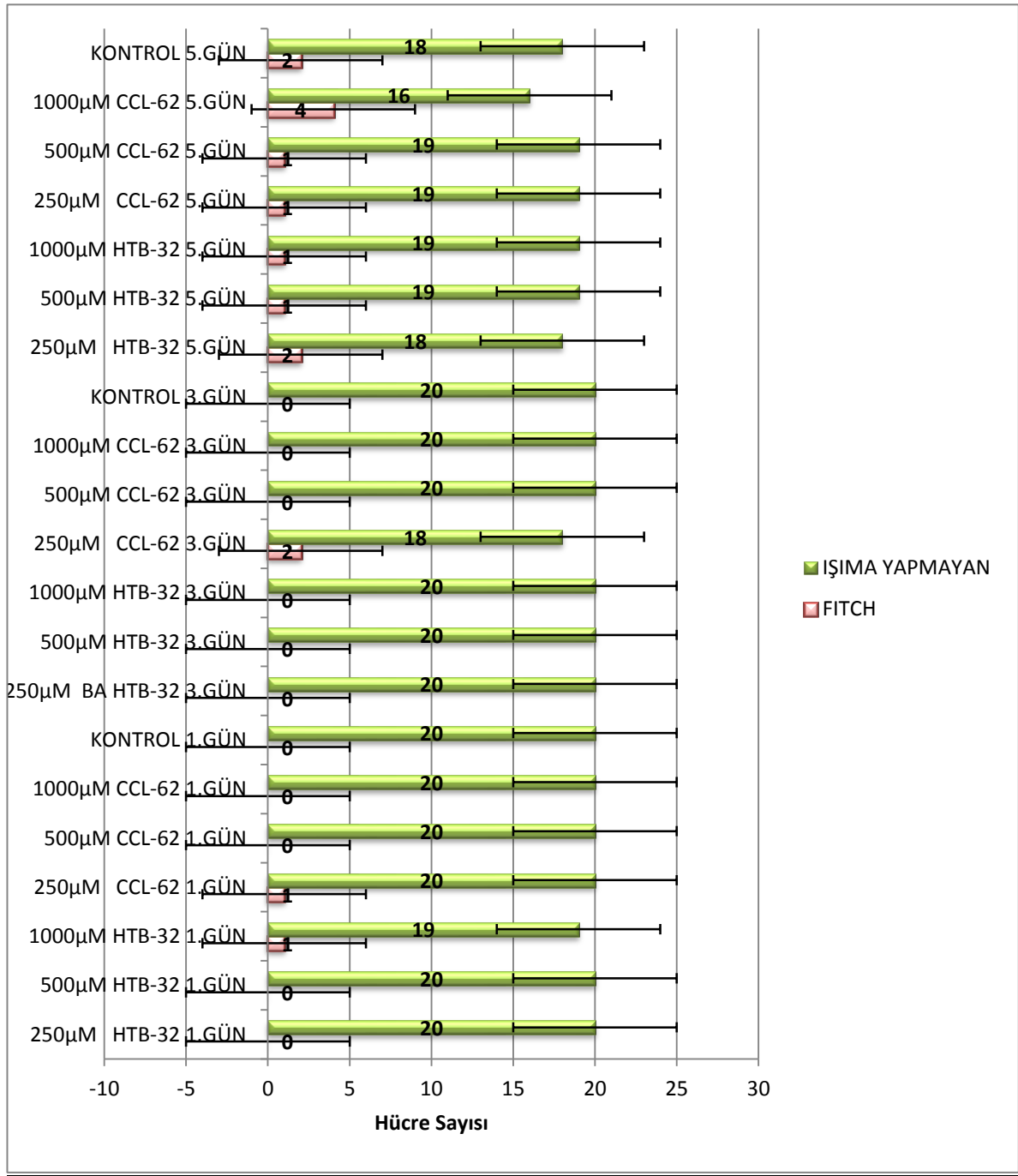
Şekil 36. HTB-32 P/14 1000 μ M DPD 5.gün ölçümü
(10X objektif ile)

Boraks Pentahidrat:



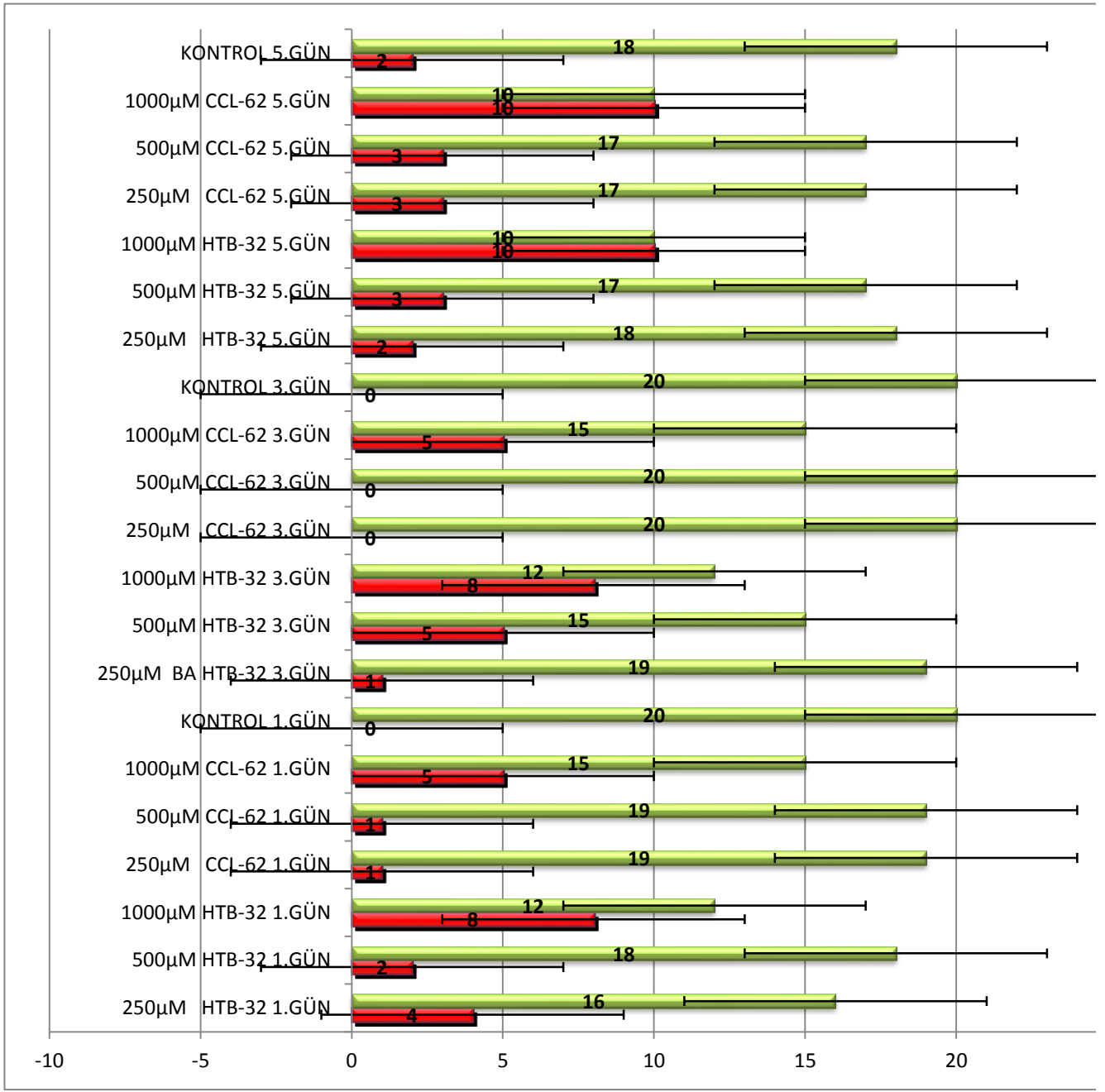
Şekil 37. BP ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü

Borik Asit :



Şekil 38. BA ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü

Di Sodyum Pentaborat Dekahidrat :



Şekil 39. DPD ile Caspase VAD-FITC in situ Marker ölçümü

4.TARTIŞMA

Çalışmamızda Servikal Karsinoma hücre hatları olan HTB-32 (servical carcinoma) ve CCL-62 (HeLa Contaminant) hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatları epitelyal orijine sahip kanser hücreleridir. Bu hücrelere bor bileşikleri olan BA (Borik asit), BP (Boraks Pentahidrat) ve DPD (Disodyum Pentaborat Dekahidrat)' ın 250µM, 500 µM, 1000 µM dozları uygulanmış ve 1, 3, 5 ve 7. günlerde MTT analizi yapılarak hücrelerin proliferasyonuna olan etkileri belirlenmiştir.

Bor uygulaması sonucu HTB-32 hücre hattında meydana gelen baskılamanın belirlenmesi için uygulanan MTT analizinde BA'in 250µM'lık dozunda 1,3,5 ve 7 gün uygulanması ile elde edilen değerlerde proliferasyonu belirgin bir şekilde baskılamadığı diğer taraftan BA'nın 250 µM, 500 µM, 1000 µM'lık dozlarının 1,3 ve 5. gün belirgin bir şekilde proliferasyona etki etmediği hatta proliferasyonun arttığı da görülmüştür. Fakat 7. günde kayda değer bir şekilde proliferasyonun baskılandığı görülmüştür. Bu baskılanma kontrol hücrelerinde de görülmüş ve bu hücrelerin 7. günde tepe fazına girmesi ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir hücre hattı olan CCL-62 hücrelerinde meydana gelen baskılamamın belirlenmesi için uygulanan MTT analizinde BA'in belirgin bir şekilde proliferasyonu baskılamadığı hatta bazı günler ve dozlarda proliferasyonun arttığı görülmüştür. Yapılan farklı çalışmalarda; insan prostat kanseri hücrelerinde, DU-145 adlı hücre hattı kullanılmış ve yapılan bu çalışma ile 1mM borik asit varlığının, büyüme oranını baskıladığı görülmüştür (40). Başka bir çalışmada ise, borik asitin etkisi, östrojen reseptörü negatif insan meme kanseri hücre dizileri olan MDA-MB-231 ve MDA-MB-435'de çalışılmıştır, fakat 1mM'lık borik asit dozu her iki hücreye bir etki göstermemiştir ayrıca, östrojen reseptörü pozitif hücre hatları olan MCF-7 ve T47-D'de de anlamlı bir inhibisyon gözlenmemiştir. Bunun etkisinin kullanılan farklı hücre medyumları olabileceği öngörülmüştür. 7.günde alınan ölçümlerde ise, östrojen reseptörü negatif SK-BR-3 hücre hattında % 15 lik bir büyüme inhibisyonu, östrojen reseptör pozitif hücre hattı ZR-75-1'de ise, % 40 büyüme inhibisyonu görülmüştür. Bu çalışmaların ışığı altında, borik asitin inhibisyon etkisinin, steroid hormon metabolizmasına yanıt olmadığı öngörülmüştür. Bu veriler doğrultusunda, borik asitin tümör büyümesini engelleyen mekanizmadaki rolü anlaşılamamıştır (88).

Moleküler çalışmalarda, borik asitin, riboz, NAD dahil olmak üzere nükleotidlerin parçaları üzerinde bulunan cis-diollere bağlandığı tespit edilmiştir. Buradan yola çıkarak araştırmacılar, borik asitin nükleotidlerle, nükleotid-borat kompleksleri yaparak, nükleotidlerin işleyiş veya kullanımını antiproliferatif olarak etkilediğini düşünmüşlerdir (89,90).

Borik asit uygulamalarını takiben, kullanılan DU-145 (tam büyüme tepkisi) ve ZR-75-1 (kısmi büyüme inhibisyonu ve apoptozis) hücre hatları arasında borik asit yanıtı farklı olmuştur. Hücre hatlarında gözlemlenen bu farklılığın, oluşan nükleotid-borat komplekslerinin, hücre hatlarındaki spesifik hedefler veya hassasiyetleri yansıtıyor olabileceği düşünülmüştür (88). Bu bilgiler ışığında bizim borik asit verilerimiz karşılaştırıldığında her iki hücre hattında belirgin bir hücre inhibisyonu gözlenmemiştir. Bu nedenle bizim borik asit verilerimiz daha önce farklı araştırmacıların yaptığı çalışma sonuçlarıyla uyumlu görülmektedir. Belki HTB-32 nin 7.gün 1000 μM lık inhibisyonu dikkat çekmekte isede hücre hattının 7. günde tepe fazına girdiği gözden kaçmamaktadır (Şekil 25,26).

BP'ın da aynı şekilde 250 μM 'lık dozunda 1.3.5 ve 7. gün uygulanması ile elde edilen değerlerde proliferasyonu belirgin bir şekilde baskılamadığı 500 μM 'lık dozunun 7. Gün belirgin bir şekilde baskıladığı 1000 μM 'lık dozun ise 1,3,5 ve 7 günlerde belirgin bir şekilde hücre hatlarının proliferasyonunu baskıladığı şekil 25, 26 da kolayca fark edilebilmektedir. DPD'nin ise 1, 3, 5 ve 7. günde bütün dozlarının hücre proliferasyonunu etkin bir şekilde baskıladığı sonucuna varılmıştır. Özellikle 1000 μM 'lık dozun maruziyet süresine bağlı olarak 5 ve 7. günlerde % 50 lere yakın bir düzeyde hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. Elde edilen bu verilerle BA hücrelerin proliferasyonunu belirgin bir şekilde baskılamadığı hatta bazı doz ve günlerde proliferasyonu arttırdığı dikkatimizi çekmiştir. BP'nin ise doz ve maruziyet süresine bağlı olarak HTB-32 kanser hücre hattının proliferasyonunu kısmen baskıladığı fakat DPD'ın bütün dozlarının hücrelerin proliferasyonunu etkin bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur. BP'ın ise maruziyet süresi ve doza bağlı olarak BA'e benzer bir şekilde hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. Fakat DPD'ın bütün dozlarında ve günlerde proliferasyonu etkili bir şekilde baskıladığı özellikle 500 μM , 1000 μM 'lık dozlarının maruziyet süresine bağlı olarak %64'lere varan bir şekilde hücrelerin proliferasyonunu baskıladığı görülmüştür. Hücrelerin 7. günde tepe fazına girmesi sebebiyle proliferasyonlarının etkilendiği görülmüş ve sonuçlar buna göre değerlendirilmiştir. Bu verilere göre HTB-32 hücre hattında olduğu gibi BA hücrelerim proliferasyonunu belirgin bir şekilde baskılamadığı, BP'nin doz ve maruziyet süresine bağlı olarak CCL-62 kanser hücre hattının proliferasyonunu kısmen baskıladığı fakat DPD'ın bütün dozlarının özellikle 500 μM , 1000 μM 'lık

dozlarının maruziyet süresiyle orantılı olarak hücrelerin proliferasyonunu etkin bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur.

Kaspazların sistein proteaz enzimleri oldukları bilinmektedir. Düşük intrinsik etkinlik gösteren zimojenler olarak sentezlenirler. Aktif enzim, 20kD luk subünite ilaveten 10kD luk subünit bulunan bir heterotetramerdir. Apoptosis için gerekli olan bu enzimler, kaynağına ya da ölüm uyarısına bakılmaksızın apoptosise giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi ile tespit edilmektedir (74) Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla prokaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla aktive edildiği gibi, kaspazlarda sitokrom c'nin alınmasına neden olabilirler (74,75). Aynı şekilde başlatıcı kaspaz olan kaspaz 8 hücrede diğer enzimlerin salınmasını ve aktive edilmesini sağlayan bir aracıdır. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar, ZR-75-1 hücre kültürü, 7 gün boyunca borik asit ve fenilboronik asit türevleriyle maruziyete bırakılmıştır. Yapılan kaspaz 3 faaliyeti ölçümlerinde, indüklenen ölümünün sitotoksik veya nekrotik bir ölümden ziyade apoptotik yani programlanmış bir ölüm olduğunu doğrulamışlardır (91). Esas efektör kaspazlar olan 3 ve 7 nin aktiflenmesiyle kaspaz süreci devam eder. Ve hücrenin lizisiyle apoptotik süreç tamamlanır (74). Borik asitle Nude fare'de LNCaP hücrelerinin tümör modeli oluşturulmuş bir çalışmada ise, borik asitin bir serin proteaz olan prostat spesifik antijenin aktivasyonunu (PSA) inhibe ettiği görülmüştür. Fakat bu inhibisyonun DU-145 hücresinde görülen mekanizmada farklı olduğu yorumlanmıştır (6, 40). Proteazların diğer bir ailesi serin proteazlardır (75). Çalışmamızda kaspazların borik asitle aktivasyonunun yüksek olmaması serin proteazların inhibisyonu ile bağlantılı olabilir. Ancak borik asit dışındaki DPD de yüksek kaspaz aktivasyonu saptanmıştır. Bu durum bize elementer borun oluşturduğu bileşiklere göre etkinliğinin farklılaştığı düşüncesini uyandırmıştır.

Tablo 2 ve 3 incelediğinde tüm kaspaz aktivasyonlarında DPD nin etkin olduğu görülebilmektedir. Diğer BA ve BP ile birlikte değerlendirildiğinde kaspaz 9 un daha az aktive olduğu görülebilmektedir. Bilindiği üzere kaspaz 9 apoptozisin iç yolağında etkin olan bir enzimdir. Bu durum bor bileşiklerinin dış yoldan daha fazla etkinliğin olabileceği düşüncesini uyandırmaktadır.

Anneksin açısından Bor bileşiklerinin apoptotik etkinliğin değerlendirilmesinde kullandığımız bileşiklerin apoptozise yol açtığını saptamamıza karşın, DPD nin en güçlü şekilde indüksiyonu gerçekleştirdiğini şekil 31, 30 ve 29' da görülebilir. Bu durum kaspaz sonuçlarını dikkate alarak değerlendirildiğinde sonuçlar birbirini destekler niteliktedir.

Apoptozun salgıdan bağımsız bir mekanizmasıda, hücre zarı üzerinde bulunan ‘ölüm reseptörlerinin’ aktivasyonu ile ilişkilidir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde bulunur. Fas ligandı (FasL) da TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle sitotoksik T hücreleri ve Naturel Killer hücreleri üzerinde bulunur. FasL’nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immun tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs işe enfekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar (84). Bor bileşiklerinin Fas Ligant yolağı ile apoptotik etkinliğini araştırdığımızda şekil 39, 38 ve 37’ de görüleceği üzere 3.gün 500µM DPD bileşiğinde HTB32 ve CCL62 arasında anlamlı fark HTB32 kanser hücresi , daha fazla apoptozise yol açtığı görülebilmektedir. Uygulanan maddeye göre ; apoptosis belirgin olarak farklıdır. DPD maddesi BA ve BP maddelerine göre belirgin apoptosis sağlamaktadır. Ayrıca; verilen doza göre apoptosis dağılımı anlamlı farklıdır. 1000µM dozda tüm maddeler için belirgin olarak apoptosis sağlanmıştır (p=0.000). Ölçüm gününe göre ; apoptosis dağılımlarında anlamlı fark bulunmuştur. 5. Günde apoptosis sayısı belirgin olarak fazladır (P=0.00) Özellikle DPD’in her dozu için, 1.günden 5.güne bağlı olarak belirgin olarak artmıştır. Bütün bu veriler kaspaz 3-7, kaspaz 8 ve Annexin V verilerini desteklemektedir. Buna karşın kaspaz -9 un görece olarak diğer kaspazlara göre daha az aktivasyon göstermesi kullandığımız bor bileşiklerinin iç yoldan çok dış yoldan apoptozisi indüklediği yargısını pekiştirmektedir.

Sonuç olarak serviks kanseri (HTB-32) ve He La kontaminatı hücre hatlarında kullandığımız BA, BP ve DPD nin apoptotik yönden değerlendirilmesinde hücre tipine ve bor bileşiğinin içeriğine göre apoptotik indüksiyonun artırıp azalabileceği ve apoptozise hücre dış yolağını etkileyerek yol açabileceğini işaret etmekle birlikte DPD nin güçlü bir apoptotik ajan olduğunu ileri sürebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Naghii. M.R. The significance of dietary boron,with particular reference to athletes. *Nutr. Health*, 1999; 13:31-37.
2. World Health Organization Trace Elements in Human Nutrition and Health. Geneva: WHO. 1996.
3. Hunt C.D. One possible role of dietary boron in higher animals and humans, *Biol. Tr. Elem. Res*,1998; 66: 205–225.
4. Devirian T. A. , Volpe S. L. . The Physiological Effects of Dietary Boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2003;43 (2):219-231.
5. Cui Y. , Winton M.I. , Zhang Z.F. , Rainey C. , Marshall J. , De Kernion J. B. & Eckhert C.D. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 2004; 11, 887–892.
6. Gallardo-Williams et al., Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol*, 2004; 32; 73.
7. Barranco W.T. , Eckhert C.D. . Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate. *Br J Cancer*, 2006; 94, 884–890.
8. Gabriel J. The Biology of cancer. Part 1; What is cancer?. *John Wiley & Sons Ltd*. Second edition, 2007. p;3-11.
9. Knight L. The Biology of cancer. Part 4: The Cell. *John Wiley & Sons Ltd* . , Second edition, 2007 . p;33-45.
10. WHO, (IARC) International Agency for Research on Cancer. Cancer Database, Cancer

Mondial, Globocan 2008, <http://globocan.iarc.fr/>.

11. Jemal A., Thomas A., Murray T. et. al. Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 2002;52:23-47.
12. Nielsen FH. Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 2008 ; 66(4):183–191.
13. Korkmaz M., Uzgören E., Bakırdere S., Aydın F., Ataman OY. Effects of Dietary Boron on Cervical Cytopathology and on Micronucleus Frequency in Exfoliated Buccal Cells, *Environ Toxicol*, 2007;22:17–25.
14. WHO, Boron, World Health Organization, IPCS (Environmental Health Monograph) 204. Geneva: 1998.
15. Butterwick L., De Oude N., Raymond K. Safety assessment of boron in aquatic and terrestrial environments, *Ecotoxicol Environ Saf.*, 1989;17, 339–371.
16. Helvacı C. , Bor Madenlerinin Oluşum Ortamları, Türkiye'nin Potansiyeli ve Ekonomimizdeki Yeri. TÜBA- Bilim ve Düşün Dizisi- 21, s:43.
17. Yılmaz, T.M., Boncukoğlu, R., Yılmaz, A.E., Kocakerim, M.M., “*Bor Endüstrisi Atık Sularından Bulanıklığın Koagülasyonla Giderilmesi*”, III.Uluslararası Bor Sempozyumu, Kasım 2006, Ankara, s.533.
18. Hunt, C.D., Boron. In: Macrae, R., Robinson, R.K., and Sadler, M.J., Eds. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. London: Academic Press, 1993, 440–447.
19. Von Burg, R., Toxicology update, *J. Appl. Tox.*, 1992; 12: 149–152.
20. Litovitz TL., Klein-Schwartz W., Oderda GM., **Schmitz** BF. Clinical manifestations of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions, *Am J Emerg Med*, 1988; 6:209.
21. Korkmaz M., Yenigün M., Bakırdere S., Ataman OY., Keskin S., Müezzinoğlu T and Lekili

- M. Effects of Chronic Boron Exposure on Semen Profile, *Biological Trace Element Research*, 2010 ; DOI: 10.1007/s12011-010-8928-2.
22. Murray FJ., Comparative Review of the Pharmacokinetics of Boric Acid in Rodents and Humans, *Biological Trace Element Research*, 1998;66,331-341.
23. Sutherland B., Strong P. and King JC. Determining human dietary requirements for boron, *Biol. Tr. Elem. Res.*, 1998; 66: 193–204.
24. Abou-Shakra FR., Havercroft JM., and Ward, NI. Lithium and boron in biological tissues and fluids, *Trace Elem. Med.*, 1989 ; 6: 142.
25. WHO, Boron, World Health Organization, IPCS (Environmental Health Monograph) 204. Geneva: 1998.
26. Chapin RE., Ku WW., Kenney MA. and McCoy H. The effects of dietary boric acid on bone strength in rats, *Biol. Tr. Elem. Res.*, 1998; 66: 395–399.
27. Nielsen FH., Hunt CD., Mullen LM. and Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women, *FASEB. J.*, 1987; 87: 394–397.
28. Saylı U., Korkmaz M., Bakırdere S., Ataman OY., Başkan T., Şaylı BS. Knee osteoarthritis and its correlation with daily boron exposure. *Cell Biol Toxicol* , 2008; 24 (Suppl 1):S:81.
29. Naghii MR. and Samman S. The effect of boron on plasma testosterone and plasma lipids in rats, *Nutr. Research*, 1997; 17: 523–531.
30. Alejandro Gonzalez ,Ulrike Peters ,Johanna W. Lampe ,Emily White. Boron intake and prostate cancer risk. *Cancer Causes Control*, 2007; 18:1131–1140.DOI 10.1007/s10552-007-9052-25.
31. Green NR. and Ferrando, AA. Plasma boron and the effects of boron supplementation in

- males, *Environ. Health Perspect*, 1994; 102: 73–77.
32. Newnham, N.E. . Agricultural practices affect arthritis. *Nutrition and Health*. 7(2): 1991; 89 - 100.
33. Naghii, M.R. , Samman, S. (1993). The role of boron in nutrition and metabolism. *Progress in Food & Nutrition Science*. 17(4): 1993; 331 -49.
34. Penland, J. G. . The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological Trace Element Research*. **66**: 1998; 299 -317.
35. Noam, S., Gil A. ,Boric acid reversibly inhibits the second step of pre-mRNA splicing. *FEBS Letters* 552: 2003; 219-224.
36. A. Ricardo, M. A. Carrigan, A. N. Olcott, S. A. Benner. Borate Minerals Stabilize Ribose. 9 Jan. , *Vol. 303 Science*, 2004;
37. Cao Jin. ve ark. . Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22, 2008, p: 189–195.
38. Barranco WT., Hudak PF., Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States), *Cancer Causes Control* , 2007; 18:71–77.
39. Henderson K., Stella,SL., Kobylewski S., Eckhert CD. Receptor Activated Ca²⁺ Release Is Inhibited by Boric Acid in Prostate Cancer Cells, *Plos One*, 2009; 4,6
40. Barranco WT. and Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation, *Cancer Letters*, 2004 ; 216;21–29.
41. R. Scorei ve ark. , Comparative Effects of Boric Acid and Calcium Fructoborate on Breast Cancer Cells .*Biol Trace Elem Res.* , 122:197–205. 2008.
42. Korkmaz M. Ve ark. , Farklı Bor Konsantrasyonlarının Meme Kanseri Hücrelerinin

Büyümesine Olası Etkilerinin Araştırılması . Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, Proje no: Boren-2007-g0150, Temmuz, 2008.

43. Mahabir S., Spitz MR., Barrera SL., Dong YQ, Eastham C. and Forman MR. Dietary Boron and Hormone Replacement Therapy as Risk Factors for Lung Cancer in Women, *Am J Epidemiol*, 2008;167:1070–1080.
44. Korkmaz M., Başkurt S., Karadağ N. Bor Madeninde Çalışan İşçilerdeki Depresyon Düzeyinin İrdelenmesi, *3. Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitabı*, 2006, Syf: 469.
45. Güner H., Taşkiran Ç. Serviks Kanseri Epidemiyolojisi Ve Human Papillomavirüs *J Turk Soc Obstet Gynecol*, 2007;4;1:11-19
46. Molecular biology of cancer, Chapter 1. Editor: Georgia Bushell and Harriet Milles. Ppp:4-6. ISBN:1-8599-6247-5. 2004.
47. Cancer biology, Part 4: The Biochemistry and cell biology of cancer. Raymond W. Ruddan. P:132-256. ISBN-13: 978-0-19-517543-1.2007.
48. Lowitz Barry B., Casciat Dennis A. . *Medical Oncology & Principles of Cancer Biology*. ISBN-10: 0805340033 . 2005.
49. Parkin DM, et al. *Int J Cancer Worldwide CA mortality* 1999;80:827–41.
50. Pisani P, et al. *Int J Cancer Worldwide CA mortality*, 1999;83:18–29.
51. Wright TC Jr, Schiffman M. adding a test for human papillomavirus DNA to cervicalcancer screening. *N Engl J Med*. 2003;348:489-90.
52. NCCN Clinical Practical Guidelines in Oncology: Cervical cancer. V.1.2010. National Comprehensive Cancer Network, Inc. Available at www.nccn.org. Accessed December 28, 2009.

53. Malik A., The Role of Human Papilloma Virus (HPV) in the aetiology of Cervical Cancer. *J.P.M.A.* Vol. 55, No. 12, December 2005.
54. Winkelstein W.Jr. "Smoking and cervical cancer current status:a review". *Am J Epidemiol.* 1990, 131;6 : 945-957.
55. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant viruslike particles interacts with heparin and cell surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem*;274:5810-2; 1999.
56. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*;21:4754-62, 2002.
57. Bosch F.X., Munoz N., Sanjose S., Izarzugaza I., Gili M., Viladiu P., Tormo M.J., Moreo P., Ascunce N. and Gonzalez L.C. "Risk factors of cervical cancer in Colombia and Spain". *Int J Cancer.* 1992, 52;5 : 750-758.
58. Miller A.B., Nazeer S., Fonn S., Brandup L.A., Rehman R., Cronje H., Sankaranarayanan R., Koroltchouk V., Syrjänen K., Singer A. and Onsrud M., "Report on consensus conference on cervical cancer screening and management". *Int Cancer*, 86;3 : 440-447, 2000.
59. Münger K. , Papillomaviruses. [Encyclopedia of Cancer \(Second Edition\)](#) Pages 393-401; 2003.
60. M. Safak and K. Khalili, Polyomaviruses and Papillomaviruses. *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition) Pages 469-483. 2009.
61. P.F. Lambert and A. Collins. Papillomaviruses: Molecular Biology of Human Viruses. *Encyclopedia of Virology* (Third Edition) Pages 18-26. 2008.
62. Lambert P. ve ark. , Papillomaviruses – human (papillomaviridae) ; *Molecular Biology.*

63. Matthias N. Ve ark. , Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Proteins Inhibit Differentiation-dependent Expression of Transforming Growth Factor- β 2 in Cervical Keratinocytes. *Cancer Res.* , August 8, 60; 4289. 2000.
64. Gregory, C. D. and Brown, S. B. , *Apoptosis: eating sensibly. Nat Cell Biol*, 7, 1161–1163. 2005.
65. Basaran, A., *Tıbbi biyoloji ders kitabı, Günes & Nobel Tıp Kitapevi, Eskisehir*, 543 s. 2005.
66. Guimaraes, C.A. and Linden, R., Programmed cell death apoptosis and alternative deathstyles, *Eur. J. Biochem.*, , 271, 1638-1650 p. 2004.
67. Bras, M., Queenan, B. and Susin, S.A., Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying, *Biochemistry (Moscow)*, 70, 2, 231-239 p. 2005.
68. Cooper, G.M. and Hausman, R.E., *Hücre Moleküler Yaklaşım, İzmir Tıp Kitapevi, İzmir*, 699 s. 2006.
69. Elmore S. , Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. , *Toxicol Pathol* , June vol. 35 no. 4 495-516. 2007.
70. David Hughes and Huseyin Mehmet (Eds), *Cell Proliferation and Apoptosis, BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford*. P: 242. 2003.
71. Esposti, M.D. and Dive, C., Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003- 304, p; 455-461. 2003.
72. Gabriel J. *The Biology of cancer.* , *John Wiley & Sons Ltd*. Second edition, p; 38-41. 2007.
73. Bunz F. *The Principles of cancer genetics*. Springer Science + Business Media B.V. 2008.

- 74.** Dean G. Tang and James P. Kehrer. , Part 4: Carcinogenesis; Balance Between Apoptosis and Survival Pathways. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases, Molecular Mechanisms, Volume 1*, Edited by Rakesh Srivastava. p; 97-118. 2007.
- 75.** Hernandez Lorraine D. Ve ark. , Part; Caspases and Cell Death. *Cell Death* , Editors ;Gerry Melino. John Wiley & Sons Ltd., p; 30-37. 2010.
- 76.** Horak C. ve ark. , Part 3; Metastasis; The Evasion of Apoptosis. *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases, Molecular Mechanisms, Volume 1* , Edited by Rakesh Srivastava. p; 74-107. 2007.
- 77.** Letai, A. G. , Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 8, 121–132. 2008.
- 78.** Burlacu, A., Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cell. Mol. Med.*, 7, 3, 249-257. 2003.
- 79.** Gulbins, E., Dreschers, S. and Bock, J., Role of mitochondria in apoptosis, *Experimental Physiology*, 88.1, 85-90 p. 2003.
- 80.** Krammer P., Part; Death Receptors. *Cell Death* , Editors ;Gerry Melino. John Wiley & Sons Ltd., p; 110-116. 2010.
- 81.** Staley K. , Blaschke A. J. , Chun J. . Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*, 4: 66 -75. 1997.
- 82.** Altunkaynak B. Z. , Özbek E., Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir ?. *Tıp Araştırmaları Dergisi*: 6 (2) :93 -104. 2008.
- 83.** Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J., tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c, *Genes & Development*, 14, 2060-2071 p. 2000.

84. Rashed M M, Ragab N M. , The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas. *Turk. J. Haematol.*, 21 (3): 141-147. 2004.
85. Kemerink GJ, Liem IH, Hofstra L, et al. Patient dosimetry of intravenously administered ^{99m}Tc-annexin V. *J Nucl Med.* 2001;42:382–387.9.
86. Lahorte C, Dumont F, Slegers G, Van de Wiele C, Dierckx RA, Philippe J. Synthesis and in vitro stability of I-123-labelled annexin V: a potential agent for SPECT imaging of apoptotic cells. *J Labelled Compds Radiopharm.* 2000;43:739 –751.
87. Lahorte C, Slegers G, Philippe J, Van de Wiele C, Dierckx RA. Synthesis and in vitro evaluation of I-123 labelled human recombinant annexin V. *Biomol Eng.* 2001;17:51–53.
88. Meacham L. S. et al, **Boric Acid Inhibits Cell Growth** in Breast and Prostate Cancer Cell Lines, *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, 2007; 299—306.
89. Kim D.H., Marbois B.N., Faull K.F., and Eckhert C.D., 2003 Esterification of borate with NAD⁺ and NADH as studied by electrospray ionization mass spectrometry and ¹¹B NMR spectroscopy, *J. Mass Spectrom.* 38: 632-640.
90. Ralston N.V.C. and Hunt C.D., 2001 Diadenosine phosphates and S-adenosylmethione: novel boron binding biomolecules detected by capillary electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 1527: 20-30.
91. Wallace A, Meacham S, Abel-Santos E, Fiscus R. Boric acid and focal adhesion kinase: a mechanism to induce apoptosis in breast and prostate cancer cells. *West Reg Mtg Am Chem Soc.* 2008: 61883.