

T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAŞ BOYUN KANSERİ HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİTİN TÜMÖR SUPRES-
SÖR GEN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

KÜBRA FAKİOĞLU

Tez Danışmanı:

Doç. Dr Esra GÜNDÜZ

Bu tez TUBİTAK 1002 projesi (Proje No: 213S010) kapsamında desteklenmiştir

ANKARA-2015

T.C. TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAŞ BOYUN KANSERİ HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİTİN TÜMÖR SUPRES-
SÖR GEN EKSPRESYONLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Bu tez TUBİTAK 1002 projesi (Proje No: 213S010) kapsamında desteklenmiştir

KÜBRA FAKİOĞLU

Tez Danışmanı:

Doç. Dr Esra GÜNDÜZ

ANKARA-2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Kübra Fakioğlu

ONAY

Kübra Fakioğlu tarafından hazırlanan "Baş Boyun Kanseri Hücre Hatlarında Borik Asitin Tümör Supressör Gen Ekspresyonlarına Etkisinin İncelenmesi" başlıklı bu çalışma, 16.06.2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (oybirliği/oyçokluğu) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından *Tıbbi Genetik Anabilim* dalında *Yüksek Lisans* tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Esra Gündüz (Başkan)



Doç. Dr. Beyhan Cengiz



Yrd. Doç. Dr. Muradiye Acar

ÖNSÖZ

Bu tezin bilimsel kurgusunu oluşturup, deney adımlarında ve sonuçların değerlendirilip yorumlanmasında bilgi ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım başta tez danışmanım sayın Doç. Dr Esra Gündüz ve Prof. Dr. Mehmet Gündüz'e, özellikle eğitimimin başından beri akademik ve laboratuvar yani bu uğurda öğrenmem gereken çoğu bilgide emeği olan Yrd. Doç. Dr Muradiye Acar'a ve Yrd. Doç. Dr Ömer Faruk Hatipoğlu' na ve tabii ki tezimde emeği olsun olmasın bütün laboratuvar da çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu yaşıma kadar benim maddi manevi her daim arkamda olan annem ve babama ve abim ve kardeşime ve tezimin yazım döneminde hayatıma giren ve ilk zorlu destek sınavını veren eşime teşekkürlerimi borç bilirim.

Haziran 2015

Kübra Fakıoğlu

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada son zamanlarda bir çok alanda kullanılan ve alternatif tedavide yeni bir bakış açısı olabilecek olan borik asitin baş boyun kanseri hücre hatlarında proliferasyon ve tümör supressör gen ekspresyonlarına etkisi araştırılmıştır

Materyal ve Metod: baş boyun kanseri hücre hattı olan UT-SCC 6A, 6B, 9A, 16A, 16B,24A, 54C, 74A, ve 74B hücre hatları 200ug/ml ile 1800ug/ml dozları arasında borik asit ile muamele edildi ve XTT assay ile uygun doz tayini yapıldı. Ardından uygun doz ile muamele edilen hücrelerden trizol ile RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA lar cDNA'ya çevrildi. P53, RB1, ING1 ve ING3 primerlerinin çalışma sıcaklığını tespit etmek için gradient PCR yapıldı. Real-time PCR da kullanılmak üzere standart hazırlamak için gradient PCR sonrası jel ekstraksiyonu yapıldı. Uygun çalışma programı ayarlanarak elde edilen örneklerin ekspresyon analizi real-time PCR İle yapıldı.

Bulgular: Kullandığımız hücre hatlarında UT-SCC UT-SCC 6A, 6B, 9A, 16A, 16B,24A, 54C, 74A ve 74B hücre hatlarının hepsinde de borik asit proliferasyonu önemli oranda düşürdüğü tespit edilmiştir. UT-SCC 6A hücre hattında en etkin doz 1000ug/ml, UT-SCC 6B hücre hattında en etkin doz 1800ug/ml, UT-SCC 16A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml, UT-SCC 16B hücre hattında en etkin doz 1000ug/ml, UT-SCC 24A hücre hattında en etkin doz 1600ug/ml, UT-SCC 54C hücre hattında en etkin doz 1800ug/ml, UT-SCC 74A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml, UT-SCC 74B hücre hattında en etkin doz 800ug/ml ve UT-SCC 9A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml olarak bulunmuştur. Bu değerler borik asit ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığı istatistiksel olarak Mann Whitney U testi ile kontrol edildi. Ve p değerleri 0,05'den küçük bulundu. Bu sonucun anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Etkin dozlar bulunduktan sonra bu hücre hatlarında p53, Rb, ING 1 ve ING 3 gen ekspresyonları incelenmiştir. Bu ekspresyon çalışması sonucunda UT-SCC 6A, 54C ve 24A hücre hatlarında Rb gen ekspresyonu yaklaşık 2 kat azalmıştır. UT-SCC 16A ve 74A hücre hatlarında p53 gen ekspresyonu yaklaşık 2 kat azalmıştır. ING ailesi sonuçları ise ING 1 gen ekspresyonu için UT-SCC 16B ve 54C hücre hatlarında yaklaşık 2 kat azalma görülmüştür. ING 3 geni için ise UT-SCC 54C hücre hattında yaklaşık 5 kat azalma görülmüştür. Hücre hatlarında kontrol ile borik asit uygulanmış hücre hatları arasında anlamlı bir azalma olup olmadığını anlamak için istatistiksel test yapıldı ve p değeri 0.05'den küçük bulundu ve ekspresyon azalmaları anlamlılığa en yakın olarak Mann Whitney U testi ile karar verilmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak borik asitin prostat kanseri üzerinde proliferasyonu inhibe edici etkisi baş boyun kanseri hücre hatlarında da görülmüştür. Bu etkinin hücre döngüsünde ciddi rolü olan önemli tümör supressör genler üzerindeki etkisinde ekspresyon azalmaları görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında borik asit alternatif kanser tedavi şekli olmaya aday bir maddedir denebilmesi için ileri düzeyde çalışmalar gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Baş boyun kanserler, hücre proliferasyonu, tümör supressör gen, p53, Rb, ING 1 ve ING3

ABSTRACT

Aim: Boric acid is a very common chemical used in a wide variety of industries and applications. In this study, the use of boric acid as a potential alternative cancer therapy was investigated by examining its effect on head and neck cancer cell line proliferation and tumor suppressor gene expression.

Materials and Methods: Head and neck cancer cell lines UT-SCC 6A, 6B, 9A, 16A, 16B, 24A, 54C, 74A, and 74B were treated with varying doses of boric acid, ranging from 200 ug/mL to 1800 ug/mL and XTT assay was used to measure the dose response. Subsequently, RNA was isolated from treated cells using the Trizol method. cDNA was made from the isolated RNA and then, using gradient PCR, primer melting temperature was determined for P53, RB1, ING1 and ING3 genes. Following gradient PCR, gel extraction of PCR product was performed for use as standards in real-time PCR. Real-time PCR was then performed to analyze gene expression in the samples.

Results: Boric acid treatment caused a significant decrease in proliferation in all of the head and neck cancer cell lines investigated, including UT-SCC 6A, 6B, 9A, 16A, 16B, 24A, 54C, 74A, and 74B. The most effective doses for the cell lines were as follows: UT-SCC 6A 1000 ug/mL, UT-SCC 6B 1800 ug/mL, UT-SCC 16A 800 ug/mL, UT-SCC 16B 1000 ug/mL, UT-SCC 24A 1600 ug/mL, UT-SCC 54C 1800 ug/mL, UT-SCC 74A and 74B 800 ug/mL, UT-SCC 9A 800 ug/mL. Results from boric acid treatment and untreated controls were analyzed for statistical significance using Mann Whitney U test. The results approached statistical significance with p value of 0.05. After determining the effective doses, cell lines were treated with boric acid and gene expression of P53, RB, ING1 and ING3 were analyzed. RB gene expression was decreased in several of the cell lines examined including UT-SCC 6A, 54C and 24A (2-fold decrease) Also, p53 gene expression was found to be decreased in two of the cell lines: UT-SCC 16A (2-fold decrease) and UT-SCC 74A (2-fold decrease). ING1 gene expression was decreased in UT-SCC 16B (1.5-fold) and UT-SCC 54C (3-fold). ING3 gene expression was also decreased in one cell line: UT-SCC 54C (5-fold decrease). The changes in gene expression levels were tested for statistical significance using Mann Whitney U test and the results are significant at $p \leq 0.05$.

Conclusion: In short, similar to results seen in prostate cancer in terms of inhibition of proliferation, boric acid reduced levels of cell proliferation in head and neck cancer cell lines. These results strongly indicate that several tumor suppressor genes important in cell cycle control play a significant role in the observed effect. In light of these results, boric acid appears to be a candidate alternative therapeutic agent for cancer. Of course, further experiments are necessary in order to strengthen this conclusion.

Keywords: head and neck cancer, cell proliferation, tumor suppressor gene, p53, Rb, ING1, ING3

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	x
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. BÖLÜM : BAŞ BOYUN KANSERLERİ	4
2.1. BAŞ BOYUN KANSERLERİ	4
2.2. BAŞ BOYUN KANSER ÇEŞİTLERİ	4
2.3. RİSK FAKTÖRLERİ	5
2.4. HİSTOPATOLOJİ	5
2.4.1. Adenokarsinoma	5
2.4.2. Skuamöz hücreli karsinom	5
2.5. SEMPTOMLAR.....	6
2.6. EVRELEME	6
2.7. TEDAVİ.....	8
3. BÖLÜM : BORİK ASİT	9
3.1. BOR.....	9
3.2. BOR ELEMENTİNİN FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ.....	9
3.3. BORUN TARİHÇESİ	10
3.4.TÜRKİYE'DE BOR MADENCİLİĞİ.....	10
3.5. BOR MİNERALLERİ	10
3.5.1. BORİK ASİT	11
3.5.1.1. BORİK ASİTİN ÇEVRE VE CANLILAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	11
3.5.1.2.BORİK ASİTİN KULLANIM ALANLARI VE FAYDALARI	11

3.5.1.2.1.Cam ve Cam Elyafı Yapımı	11
3.5.1.2.2 Seramik	12
3.5.1.2.3 Deterjan	12
3.5.1.2.5 Tarım	12
3.5.1.2.6 Nükleer Enerji.....	12
3.5.1.2.7 Emprenye ve Koruma	12
3.5.1.2.8 Enerji Depolama	13
3.5.1.2.9 Tıp.....	13
3.5.1.3 Borik asitin kanser hücrelerine etkisi	13
4. BÖLÜM: HÜCRE SIKLUSU (HÜCRE PROLİFERASYONU) VE HÜCRE	
BÖLÜNMESİNİN REGÜLASYONU	15
4.1. Siklinler	15
4.2. Kontrol Noktaları	16
4.2.1.RB GENİ(Retinoblastoma).....	17
4.2.1.1Gen lokalizasyonu	17
4.2.1.2 Yapı ve Fonksiyonu	17
4.2.1.3 Baş Boyun Kanserlerindeki Rolü	17
4.2.2 p53 GENİ.....	19
4.2.2.1Gen lokalizasyonu	19
4.2.2.2Yapı ve Fonksiyonu	19
4.2.2.3Baş Boyun Kanserlerindeki Rolü	19
4.2.3ING AİLESİ.....	19
4.2.3.1Genel bilgiler	19
4.2.3.2ING ailesi gen yapısı	20
4.2.3.3ING1 Geni	20
4.2.3.4ING3 Geni	21

5. BÖLÜM: MATERYAL VE METOD.....	23
5.1. Hücre kültürü protokolü	23
5.1.1 Hücre ekim işlemleri	24
5.1.2 Medyum Değişimi	24
5.1.3 Harvest İşlemi.....	24
5.1.4 Hücre sayımı	25
5.1.5 Bor Muamelesi	26
5.1.6 XTTAssay	26
5.2. TRİZOL ile hücreden RNA izolasyonu.....	26
5.3. cDNA Protokolü	27
5.4. Beta actin, p53, Rb, Ing1, Ing3 primerlerin hazırlanması	28
5.5. Gradyent PCR	29
5.6. Agaroz Jel Elektroforezi	29
5.7. Jel Ekstraksiyonu	30
5.8 Real-time PCR için Standartların Hazırlanması	31
5.9. Real-timePCR	32
6. BÖLÜM: BULGULAR	34
6.1. XTT sonuçları	34
6.2. Gradyent PCR bulguları.....	40
6.3. Real-time PCR sonuçları.....	40
6.3.1 P53 geni için ekspresyon sonuçları	41
6.3.2 RB geni için ekspresyon sonuçları	42
6.3.3 ING3 geni ekspresyon sonuçları	43
6.3.4 ING 1 geni ekspresyon sonuçları	44
7.BÖLÜM: TARTIŞMA	43
8.BÖLÜM: SONUÇ	51
9.BÖLÜM: KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR

Kısaltma	Açık yazılışı
BNCT	Boron neutron capture therapy
CDK	Cyclin dependent kinase
CDI	Cyclin dependent kinase inhibitor
CDNA	Complementer DNA
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMEM	High Glucose Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
HNSCC	Head and neck squamos cancer cell
HPV	Human papilloma virus
IGF	Inhibitor of growth factor
ING	Inhibitor of growth
NCR	Novel conserved region
NLS	Nuclear localization signal
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimerase chain reaction
PHD	Plant homeodomain
PSA	Prostate specific antigen
RB	Retinablastoma
TNM	Tumor nodes metastasis

TABLO LİSTESİ

Tablo 1:Baş boyun kanserleri.....	4
Tablo 2:Baş boyun kanserlerinde tümör evreleme.....	6
Tablo 3: TNM evreleme sistemi.....	7
Tablo 4: Bor elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	9
Tablo 5: Siklin çeşitlerinin yapıma ve yıkılma fazları.....	15
Tablo 6: Baş boyun kanseri hücre hatları özellikleri.....	23
Tablo 7:Kullanılan primerlerin sekansları.....	28
Tablo 8: Pcr solüsyonları kullanım miktarları	29
Tablo 9: Pcr koşulları	30
Tablo 10: Real-time pcr koşulları	32

RESİM LİSTESİ

Resim 1:P53, ING3 ve ING1 geni için Gradyent PCR agaroz jel görüntüsü.....	41
Resim 2: BETA ACTIN ve RB1 geni için Gradyent PCR agaroz jel görüntüsü	41

GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1: UT-SCC 6A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	35
Grafik 2: UT-SCC 6B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	35
Grafik 3: UT-SCC 16A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	36
Grafik 4: UT-SCC 16B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	37

Grafik 5: UT-SCC 24A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	37
Grafik 6: UT-SCC 54C hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	38
Grafik 7: UT-SCC 74A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	39
Grafik 8: UT-SCC 74B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	40
Grafik 9: UT-SCC 9A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği.....	40
Grafik 10: UT-SCC 9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında p53 ekspresyon grafiği	42
Grafik 11: UT-SCC 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında RB geni ekspresyon grafiği	43
Grafik 12: UT-SCC-9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında ING 3 ekspresyon grafiği	44
Grafik 13: UT-SCC-9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında ING 1 ekspresyon grafiği	45

1.GİRİŞ

Üst solunum yolu kanserleri arasında larinks, özofagus, farinks, ağız ve burun boşluğu kanserleri bulunur ve bu kanser çeşitlerinin tamamına baş boyun kanserleri denir. Baş boyun kanserleri bütün kanser çeşitlerinin %15 ini oluşturur. Kadınlara oranla erkeklerde daha sık görülen bir kanser türüdür. Risk faktörleri arasında çevre ve yaşam şekli önemli yer tutar. Alkol ve sigara kullanımı başta olmak üzere buhar, duman ve iritan maddelere maruziyet etiolojisinde önemli rol oynar. Semptomları arasında ise boyun bölgesinde oluşan kitle, ağrı, ağızdan kan gelmesi, nefeste kötü koku, sinüslerin tıkanması, dilde yara oluşumu gösterilebilir.

Baş boyun kanserlerinin biyolojik davranışı agresiftir. Bu sebepten ötürü baş boyun kanserlerinden herhangi birine yaklananlar da aynı alanda başka yerlerde görülme olasılığı oldukça yüksektir. Baş boyun kanserlerinin histopatolojisine bakıldığında ise %90 ını skuamöz hücreli baş boyun kanserlerinin oluşturduğu tesbit edilmiştir. Baş boyun kanserlerinin %60-70 oranında erken tanı konulamamaktadır. Tedavide ise klasik yöntemlerden radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır. Bu noktada kanser tedavilerinde alternatif tedavi yöntemleri arayışı hız kazanmakta ve bilim adamları bitkisel ve kimyasal kaynaklı olabilecek tedavi amaçlı çalışmalara her geçen gün yenisi eklemektedir. Biz de dünyanın en zengin bor yataklarına sahip ülkemizde, son yıllarda farklı birçok çalışma alanı olduğu keşfedilen borun baş boyun kanserindeki etkisini araştırmayı hedefledik.

Borik asit periyodik cetvelin 5. elementi ve 3A grubu içerisinde tek ametaldir. Ham maddesi borakstır ve boraksın en geniş kaynakları Türkiye’de bulunmaktadır. Bor cam sanayisinden seramik yapımına, tarım uygulamalarından temizlik ürünlerine kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda borun kemik, mineral, lipid, enerji metabolizması ile immün sistem ve endokrin sistem için esansiyel olabileceği bildirilmiştir. Son yıllarda ise sağlık alanında kullanma fikri doğmuş ve ilk olarak BNCT(Boron Neutron Capture Therapy) kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavi yönteminde kanser hücreleri hedef alınmakta ve normal hücrelere minimum zarar verdiği için tercih sebebi olmaktadır. Bu bilgiler

ışığında borun sadece bu tedavi yöntemi ile değil de direk kendisinin bu etkiyi sağlayabileceği fikri doğmuş ve yapılan bir çalışmada prostat kanseri hücre hatlarında borik asitin proliferasyonu durdurduğu bulunmuştur. Hücrenin G1, S, G2, M fazlarından geçerek kendi kopyasını oluşturma işlemi olan proliferasyon sırasında hücre kontrol noktaları (check point) üzerinden kontrol edilir. Bu kontrol noktalarında bulunan genler sayesinde hücre herhangi bir hasara uğramadan sağlıklı hücreler meydana getirir. Kontrol noktalarda oluşan herhangi bozukluk hasarlı DNA ya sahip hücreler oluşturur ve kanserleşmeye varan ilk adım hücrede atılmış olur. Hücredeki kontrolsüz çoğalmayı baskılayan genler tümör süpresör genlerdir. P53, RB ve ING ailesi kanserleşme sürecinde önemli tümör süpresör genlerdir.

P53 geni 17. Kromozomda yerleşmiştir. DNA bağlayıcı bölgesi ve transaktivasyon bölgesi ile bir transkripsiyon faktörü olan bu gen, hücre çoğalmasını baskılayan diğer genleri regüle etmekte ve apoptozda rol aldığı düşünülmektedir. Mutasyona uğramamış normal p53 proteini hücre siklusunun G1-S fazında kontrol nokta monitörü olarak iş görür ve

DNA sız zarar görmüş hücrenin hücre siklusunda ilerlemesini önler. Bu şekilde defektif hücrelerin çoğalması engellenmiş olur. Değişime uğramamış aktivitesi normal olan wild type p53 proteini resessif bir tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir.

RB ise 13.kromozomun uzun kolu üzerinde (13q14) yerleşmiştir. Hücre siklusunda anahtar rolü vardır. Her hücre tipinde eksprese edilir. Normal işlevi hücre siklusunun G1 fazının sonunda bulunan bir kontrol noktasında durdurur. Bu olayı transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak yapar. Eğer bölünme sinyali alırsa fosforillenir ve E2F ailesini serbest bırakır hücre G1 den S fazına sonrada M fazına geçerek döngüyü tamamlar.

Son olarak da ING ailesi (inhibitor of growth family) 5 üyesi (ING 1-5) ve birden çok splice varyant ya da isoformları bulunur. Bu ailenin eksprese olmama durumu apoptozise, hücre döngüsünün tutulmasına veya hücre yaşlanması gibi olaylara sebep olabilir. ING1 geninin meme, gastrik, özofagus, akciğer kanseri gibi birçok kanserde ekspresyonunun azaldığı ya da özelliğini yitirdiği gözlenmiştir.

ING3 geni ise 46.8 kDa lık bir protein kodlar hücre döngüsünde ve apoptozis de görevlidir. Ayrıca yapılan bir çalışmada düşük seviyede bulunan ING3 mRNA nın baş boyun kanserinde agresifliği artırdığı bulunmuştur. Özellikle ING3 ve ING1 genleri skuamöz hücreli baş boyun kanserine spesifik çalışılmış ve ekspresyonlarında değişiklikler gözlenmiştir.

Biz de çalışmamızda prostat kanser hücrelerinde etkisi çalışılmış olan borik asitin daha önce hiç denenmediği skuamöz hücreli baş boyun kanseri hücre hatlarındaki etkisini incelemeyi hedefliyoruz. Bu tedavisel etkiyi özellikle moleküler düzeyde aydınlatarak literatüre önemli düzeyde katkı yapacağımıza inanıyoruz. Yapacağımız bu araştırma ile baş boyun kanserinde borik asit kullanımının etkisini göstermeyi amaçlıyoruz.

2. BAŞ BOYUN KANSERLERİ

2.1 BAŞ BOYUN KANSERLERİ HAKKINDA GENEL BİLGİLER

Baş boyun kanserleri, birden çok faktörün etkisiyle oluşan ve bütün dünya ülkelerinde farklı oranlarda gözlenen bir kanser türüdür. En sık görülen kanser türleri arasında 6. sırada yer almaktadır [1]. Amerika Birlesik Devletlerinde tiroid hariç tutulduğunda erkeklerde tanımlanan tüm malignansilerin % 8.5, kadınlarda da % 3,2' sini oluşturdukları bildirilmektedir. Yine bu ülkede her yıl 45.000 dolayında yeni vaka gözleendiği, baş boyun kanserinden ölümlerin ise her yıl 12.000 civarında olduğu rapor edilmektedir [2]. Baş boyun kanserleri oldukça çeşitlilik göstermektedir. Bu sebepten ötürü buldukları bölge ve yerleşimlerine göre çeşitli şekillerde isimlendirilir.

2.2 BAŞ BOYUN KANSER ÇEŞİTLERİ

Tablo 1. Baş boyun kanserleri

1.DUDAK KANSERLERİ
2.ORAL KAVİTE KANSERLERİ
3.ROFARİNKS KANSERLERİ
4.TÜKRÜK BEZİ KANSERLERİ
5.BURUN, PARANAZAL, SİNÜS KANSERLERİ
6.NAZOFARİNKS KANSERLERİ
7.LARİNKS KANSERLERİ
8.HİPOFARİNKS KANSERLERİ
9.SERVİKAL ÖZOFAGUS KANSERLERİ
10. TİROİD KANSERLERİ

Baş boyun kanserleri içinde en sık görünen kanser türleri oral kavite, larinks ve dudak kanserleridir.

2.3 RİSK FAKTÖRLERİ

Baş boyun kanserlerinin tanısının % 60-70 oranında geç konulması nedeniyle fonksiyonel ve kozmetik açıdan kabul edilmesi zor sonuçların ortaya çıkmasının yanı sıra düşük sağ kalım oranları ile karşılaşmaktadır.

Baş boyun kanserlerinin etiyojisine bakıldığında birçok faktörün etki ettiği görülmektedir. Bunlar arasında tütün kullanımı larenks, hipofarenks ve orofarenks gibi üst solunum yolu tümörlerinde önemli miktarda yatkınlık oluşturmaktadır [3, 4].

Nazofarengeal bölgede ırksal bir yatkınlık söz konusu iken, dudak kanserinde uzun süreli güneş ışığına maruziyet risk faktörü olarak gösterilmektedir [5]. Bunlarla birlikte HPV, yetersiz beslenme, yaş ve cinsiyet de baş boyun kanseri oluşumunda risk faktörleri arasında gösterilmektedir [6].

2.4 HİSTOPATOLOJİ

Genel olarak baş boyun kanserli hastalar bir veya daha fazla semptom ile hastaneye başvururlar. Kesin tanı için biyopsi yapılan bölgeyle beraber hücre yapısı da önemlidir. Bu sebeple baş boyun kanserinin histopatolojik incelemeleri 2 grup altında yapılmaktadır.

2.4.1 Adenokarsinoma

Baş boyun kanserinin yaklaşık %10'unu adenokarsinomlar oluşturur. Adenokarsinoma bezsel dokularda ortaya çıkar.

2.4.2 Skuamöz hücreli karsinom

Yassı hücreli karsinom da denir. Birçok organdan köken alabilir. Skuamöz hücreli kanserler muköz membranları da kapsayacak şekilde vücudun her tarafında görülebilir. Ama güneşe maruz kalan bölümlerde daha sık meydana gelir.

Baş boyun kanserleri içerisinde skuamöz hücreli baş boyun kanseri dünyada en sık görülen 6. kanser türüdür [7]. Hastaneye başvuran hastaların içinde üçte ikisi ileri evrededir [8]. Baş boyun kanserlerinin %90'ını skuamöz hücreli baş boyun kanserleri oluşturur [9].

Tedavi ve cerrahinin gelişmesine rağmen son 40 yılda sağ kalım oranında iyileşme görülmektedir [10]. İleri evre hastalık görülen kişilerde iki yıl içerisinde %50-60 oranında bölgesel nüks ve %20-30 oranında uzak metastaz görülmektedir [11]

2.5 SEMPTOMLAR

Baş boyun kanserleri kanserli bölgede veya kanserli bölge dışındaki yerlerde bazı semptomlar ile varlığını gösterebilir. Nazofarenks, dil ve hipofarenks kanserleri boyunda şişlik ile belirti verir. Dil, dudak, cilt ve oral kavite tümörlerinde uzun süreli iyileşmeyen yaralar ve kanamalı lezyonlar sık görülen semptomlar arasındadır. Nazal kavite tümörleri için burun tıkanıklığı ve kanamalı burun akıntısı sık görülen semptomlar arasında iken nazofarenks tümörlerinde burun tıkanıklığı yanısıra işitme kaybı da görülebilir. Larenks kanserinde ses kısıklığı ve solunum sıkıntısı, hipofarenks kanserlerinde ise yutma güclüğü sık görülen semptomlar arasındadır. Bütün bu semptomların yanında genel olarak baş boyun kanserlerinde konuşma bozukluğu, koku alma bozukluğu, ağız kokusu, yüzde şişlik, ses kısıklığı ve nefes darlığı da görülebilen semptomlar arasındadır.

2.6 EVRELEME

Baş boyun kanserlerinde evreleme aşağıdaki tabloda özetlendiği üzere 4 başlık altında toplanmıştır.

Tablo 2:Baş boyun kanserlerinde tümör evreleme

Evre I	T1N0M0
Evre II	T2N0M0
Evre III	T3N0M0, T1,T2,T3 (N1M0)
Evre IV	T4N0M0 Tüm N2 ler T4N1M0 Tüm N3 ler Tüm M1 ler

Baş boyun kanserlerinde kullanılan TNM evrelemede geçen kısaltmaların anlamı ise aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 3: TNM evreleme sistemi

T sınıflandırılması (Primer tümör değerlendirmeleri)	N sınıflandırılması (lenf nodu değerlendirmeleri)	M sınıflandırılması (uzak metastaz değerlendirmeleri)
T1 tümör geliştiği bölgede sınırlı, ölçülebilir en küçük tümörü (<2cm)	N0 Palpe edilebilir lenf nodu yok	M0: Uzak metastaz yok
T2 (2-4cm) ve T3 (4-6 cm) tümörler giderek daha büyük tümörleri	N1 Tek, ipsilateral, < 3 cm, lenf nodu	M1: Uzak metastaz var
T4 >6 cm ve/veya kırıldak, kemik, kas gibi derin dokuların invazyonunu işaret eder.	N2 a- Tek, ipsilateral > 3 cm-<6cm'lik lenf nodu b- Mutiple ipsilateral lenf nodu hiç biri 6 cm'den büyük değil c- Bilateral veya kontrilateral lenf nodu, hiç biri 6 cm den büyük değil	
	N3 > 6 cm lenf nodu varlığı	

2.7 TEDAVİ

Baş boyun kanserlerinde kanser çeşidine uygun tedaviyi belirleyen bazı faktörler vardır:

1. Tümör lokalizasyonu,
2. Hastalığın evresi,
3. Histopatolojik tip ve tümör farklılaşımı gibi diğer prognostik faktörler,
4. Elde mevcut imkanlar, alternatif seçenekler,

5. Hasta ile ilgili özellikler (hasta yaşı, cinsiyeti, psikolojik ve mental durumu, mesleği ve başta kardiyopulmoner sistem olmak üzere sistemlerin durumu, hasta performansı ve immünolojik durumu),

6. Tedavi ile ilgili potansiyel komplikasyonlar,

Bu hususlar göze alınarak ve hastanın hastalık evresinin belirlenmesinin ardından uygulanacak tedaviye karar verilir.

Oral kavite ve orofarinks kanserinde erken evrede (Evre I-II) tedavi de cerrahi veya radyoterapi kullanılabilirken ileri evrede (Evre III-IV) her ikisi birden kullanılmaktadır [12].

Hipofarinks, larinks ve dudak kanserlerinde tedavi de erken evrede radyoterapi veya cerrahi kullanılırken ileri evrede cerrahi sonrası kemoradyoterapi kullanılmaktadır.

3. BORİK ASİT

3.1 BOR

Bor, ametal (metal olmayan) sınıfında B harfi ile gösterilen bir kimyasal elementtir. Aslında metal ile ametal arasındaki bir sınırdadır. Bor ilk defa 1808 yılında Gay-Lussac, Louis Jacques Thenard ve Sir Davy tarafından bor oksidin potasyum ile ısıtılmasıyla elde edilmiştir. Daha saf bor, ancak bromit veya klorit formlarının tantalyum flamenti vasıtasıyla hidrojen ile reaksiyona sokulmasıyla elde edilmektedir. Bor ismi borun tuzu olan boraks'dan türetilmiştir.

Periyodik cetvelin 3A grubu ilk ve en hafif üyesidir. Atom numarası 5 ve temel hal elektron konfigürasyonu $1s^2 2s^2 2p^1$ 'dir. İlk üç iyonlaşma enerjisi 800.6, 2427.1 ve 3659.7 kJ/mol ve grup 3A'nın diğer elementlerinin iyonlaşma enerjilerinden büyüktür.

3.2 BOR ELEMENTİNİN FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Tablo 4: Bor elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ	ATOM ÖZELLİKLERİ	DİĞER ÖZELLİKLERİ
Maddenin hali: katı	Kristal yapısı: rombohedral	Elektrik direnci: $150 \text{ n}\Omega \cdot \text{m}$ (20°C 'de)
Yoğunluk: 2.34 g/cm^3	Yükseltgenme seviyeleri: 3	Isı iletkenlik: $27,4 \text{ W/(m}\cdot\text{K)}$
Ergime noktası: 2349°K - 2076°C	Elektronegatifliği: 2,04 Pauling ölçeği	Isıl genişleme: $5\text{-}7 \mu\text{m/(m}\cdot\text{K)}$
Kaynama noktası: 4200°K - 3927°C	İyonlaşma enerjisi: $800,6 \text{ kJ/mol}$	Ses hızı: 16200 m/s
Ergime ısısı: 50.2 kJ/mol	Atom yarıçapı: 85 pm	
Buharlaşma ısısı: 480 kJ/mol	Kovalent yarıçapı: 82 pm	
Isı kapasitesi: $11.087 \text{ J (mol}\cdot\text{K)}$	Van der waals yarıçapı: 208 pm	

3.3 BORUN TARİHÇESİ

İlk olarak tarihte Babiller 4000 yıl önce boraks ithal etmişlerdir. Mısırlılar boru tıpta, mumyalamada ve metalurji de kullandıkları bilinmektedir. Eski Yunanlılar ve Romalılar boratı temizlik malzemesi olarak kullanmışlardır. İlk boraks kaynağı Tibet Göllerinde bulunmuştur.

Elementel bor 1808 yılında Fransız Kimyacı Gay-Lussac ile Baron Louis Thenard ve Sir Humphry Davy bulmuştur.

13.yy da modern bor endüstrisi başlamıştır. 1852 'de ilk boraks madenciliği başlamıştır. Türkiye'de ilk işletme 1865 yılında başlamıştır.

3.4 TÜRKİYE' DE BOR MADENCİLİĞİ

Türkiye'de bulunan borat yatakları dünya rezervlerinin %60-70'ini oluşturmaktadır. Bu rezervleri de Bigadiç, Emet, Kırka ve Kestelek bölgesinde bulunan bor madenleri oluşturur.

3.5 BOR MİNERALLERİ

- Kristal suyu içeren boratlar
- Bileşik boratlar
- Susuz boratlar
- Borofluoritler
- Borosilikat mineralleri
- Turmalin grubu mineraller
- Ticari bor mineralleri
- Borik asit

3.5.1 Borik Asit

Borik asit, aynı zamanda borasis asit, ortoborik asit ya da acidyum boryum olarak da adlandırılır. Atom numarası 5 ve periyodik sistemde III A grubunda bulunur. Kimyasal formülü $B(OH)_3$ dür. Borik asitin moleküler ağırlığı ise 61.832 g/mol dür.

3.5.1.1 BORİK ASİTİN ÇEVRE VE CANLILAR ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Bor elementi 1923 yılında bitkiler için esansiyel kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra borun kemik, mineral, lipid, enerji metabolizması ile immün sistem için de esansiyel olabileceği bildiren yayımlar bulunmaktadır [13-17]. Borun metabolizması bilinmemesine rağmen borun cis-hidroksil grupları içeren biyosubstratlarla reaksiyona girmesi sonucu hücre zarı fonksiyonları ve stabilitesinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür [18].

Bor biyolojide memelilere düşük düzeyde toksik etki yaparken, eklem bacaklılarda etkili bir maddedir. Bitkilerde eser miktarda bulunması hücre duvarının sertleşmesi için gereklidir. Ama fazlası toksik etki yapar ve verimi düşürür.

Borun hayvanlar üzerine etkisi üzerine yapılan birçok çalışma bulunmaktadır. Ve bu çalışmaların sonucu borik asit'in ve boraks'ın genotoksik olmadığını göstermiştir [19]. Bu çalışmaların devamında bor bileşikleriyle temas da bulunulması halinde kansere yol açmadığı ve genleri değiştirmediği bulunmuştur.

3.5.1.2 BORİK ASİTİN KULLANIM ALANLARI VE FAYDALARI

3.5.1.2.1 Cam ve Cam Elyafı Yapımı

Borik asit özel camların (fırın camları, laboratuvar cam malzemeleri) yapımında kullanılır. Borik asit bu camların ısıya, kimyasallara ve mekanik etkilere karşı dayanım özelliklerini artırır. Plastiklerde, lastik ve kağıtta kullanılan cam elyaf yapımında da kullanılmaktadır.

3.5.1.2.2 Seramik

Seramik sırların temel yapısında bağlayıcı özellik gösterdiği için önemlidir. İçine katılan

yapının mekanik ve kimyasal özelliklerini artırdığı için ürünlerin fiziksel daRBeler karşısında kırılma ve çizilme direncini artırır.

3.5.1.2.3 Deterjan

Borik asit temizlik alanında mikrop öldürücü ve beyazlatıcı amaçlarıyla kullanılır. Ayrıca yıkama süresini ve sıcaklığını düşürücü etki gösterir.

3.5.1.2.4 Tarım

Düşük bor içerikli topraklarda tek başına ya da gübre ile beraber kullanılır. Bitkiler bu boru üreme döngüsünde kullanılmaktadırlar. Aynı zamanda tarımsal alanda bor istenmeyen otların temizlenmesini için ilaç yapımında kullanılmaktadır.

3.5.1.2.5 Nükleer Enerji

Atom reaktörlerinde borlu çelikler, bor karbürler ve titanbor alaşımları kullanılır. Paslanmaz borlu çelik, nötron absorbanı olarak tercih edilir.

3.5.1.2.6 Emprenye ve Koruma

Borik asit kuru ya da yağ ahşapların nemden koruma ve çürümeleri önleme amaçlı kullanılır. Özellikle denizcilikte yosun, mantar, balçık gibi etmenlere karşı korumada başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bunun yanı sıra borik asit tuz ile karıştırılarak dana ve koyun gibi hayvanların derilerine uygulanarak bakteri gelişimi ve böceklere karşı savunmada kullanılır.

3.5.1.2.7 Enerji Depolama

Borik asit binalarda tavan malzemesine ilave olarak konulduğunda güneş ışınlarını emerek evlerin ısınmasını sağlayabilmektedir. Buna ilaveten bor, demir ve bazı toprak elementleri-

nin kombinasyonu ile %70 enerji tasarrufu sağlanmaktadır. Bu ürün de bilgisayar disk sürücülerinde, otomobillerde direk akım motorlarında ve ev eşyalarında kullanılmaktadır.

3.5.1.2.8 Tıp

Küçük yanık ve kesiklerde antiseptik, sargılamada ve bakteri oluşumunu engelleyici ilaçların yapısına katılır.

3.5.1.3 BORİK ASİTİN KANSER HÜCRELERİNE ETKİSİ

Kanser son yıllarda en fazla karşılaşılan sağlık sorunudur. Bu nedenle kanser hastalarına yönelik tedavi araştırmaları da hız kazanmıştır. Gerek klasik yöntemlerin geliştirilmesi gerekse alternatif tıp araştırmaları son hız devam etmektedir. Günümüzde kanser tedavilerine yönelik alternatif tedavi araştırmalarına da her geçen gün yenisi eklenmektedir.

Borik asitin insan sağlığına bu kadar yararından sonra kanser tedavilerinde nasıl etki edeceği üzerine çalışmalar başlatılmıştır. Bunun üzerine kanser tedavilerinde ilk olarak BNCT (Boron neutron capture therapy) kullanılmıştır. Bu tedavi yönteminde kanser hücreleri hedef alınmakta ve normal hücrelere minimum zarar verdiği için tercih sebebi olmaktadır. Boron nötron tedavisi boron-10 ile izotopunun alfa parçacıkları ve lityum-7 ile düşük enerjili termal nötron ile ışımaya tutulduğunda ortaya çıkan nükleer reaksiyona dayanır. Yüksek gradeli gliomalarda ve metastatik beyin tümörlerinde kullanımı oldukça yaygındır [20].

Element halde bulunan neredeyse tamamını su ve yenilen bitkisel kaynaklı yiyeceklerden alınır ve gastrointestinal sistemde emilerek kana geçer ve kanda sirküle olur [21]. Bu durumda borik asitin vücuda herhangi zararlı etkisi bu zamana kadar bulunmamıştır.

Son on yıl içerisinde yapılan çalışmalarda da prostat kanserine karşı kimyasal koruyucu ajan olduğu desteklenmektedir. Gallardo-Williams ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada nude mice'lara prostat kanser hücreleri verilerek prostat kanserli model oluşturulmuştur. Daha sonra tümörler belirli büyüklüğe geldiğinde borik asit uygulaması yapılmıştır. Sonuç olarak tümör boyutunun % 25-38 oranında küçüldüğü gözlenmiştir. Bunun yanın-

da plazma PSA (Prostate specific antigen) değerlerinde de %88 azalma ve IGF-1'in dokularda konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir [22]. Bunun üzerine 1987 yılında Bone ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada borik asitin serin proteaz aktivitesini inhibe ettiği ve PSA'nın aktif bölgesine bağlanarak inhibe ettiğini göstermiştir [23].

Kanser çalışmalarında araştırılan borik asitin prostat ve akciğer kanserlerine yakalanma riskini azalttığı bulunmuştur [24, 25].

Yine 2004 yılında Barranco ve Echert'in yaptığı bir çalışmada borik asitin LNCaP ve androjen bağımsız prostat kanser hücre hatları olan DU145 VE PC3 hücre hatlarında proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu da inhibe ettiği gösterilmiştir [26, 27].

Yine yapılan bir çalışmaya göre kandaki borik asit miktarının artması ile hücre içi Ca sinyal ve depolanması azaltılır ve bunun sonucunda ise prostat kanseri yakalanma riski azalır. Bu sonuca borik asit afinitesinin kütle spektrometresi sonucu ulaşımlardır [28].

4. HÜCRE SIKLUSU (HÜCRE PROLİFERASYONU) VE HÜCRE BÖLÜNMESİNİN REGÜLASYONU

Hücre döngüsünü düzenleyen iki önemli mekanizma bulunmaktadır.

4.1 Siklinler

Canlılığın ilk göstergesi bir hücrenin bölünerek kendisine birebir benzeyen iki yeni hücre oluşturması işlemidir. Hücreler bu bölünme işlemini G1, G2, S ve M fazları olmak üzere 4 fazda gerçekleştirir. Hücre bir bölünme sinyali almazsa aktif bu fazlara girmez ve dinlenme fazı dediğimiz G0 evresinde beklerler. Hücre bölünme sinyali aldığı anda 'signal transduction cascade' adı verilen mekanizma devreye girer ve bu mekanizma ya transkripsiyonu kontrol eden bir substratı fosforiller ya da doğrudan transkripsiyonu modüle eder. Böylece hücre mitozu girmiş olur. Ama hücreler birden bölünme işlemi gerçekleştiremez. Bu sebeple hücreler bölünmeden önce bir hazırlık safhası geçirirler. Bu hazırlık safhasında hücreler hacimce büyür ve bölünme için gerekli proteinler (örn. Siklin) ve makromoleküller (örn. DNA) sentezlenir. Bu hazırlık safhasına genel olarak interfaz denir. İnterfaz kendi içinde G1, S ve G2 den oluşur. G1 ve G2 kısaltmaları 'gap' (ara, boşluk) sözcüğünden gelir. S fazı DNA sentezi fazını gösterir. M fazı artık mitozun yani bölünmenin olduğu fazdır. G0 fazı ise siklus da yer almaz ama fazı tamamladıktan sonra siklusa girer ve yer aldığı fazdır.

Hücre siklusu kendine özgü proteinlerle kontrol edilir. Bunlar siklinler, siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK) ve siklin-bağımlı kinaz inhibitörleridir (CDI). Siklinler (A, B1, D ve E) döngü sırasında bir taraftan yapılırlarken bir taraftan yıkılırlar. Bu yapım ve yıkım ilişkide olduğu CDK'ların aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar. Çünkü CDK'lar tek başlarına inaktif durumdadırlar. Ancak siklin'e bağlandıkları zaman aktif forma geçerler. CDI' lar ise ya siklinlere, ya CDK' lara ya da siklin-CDK kompleksine bağlanarak CDK' ların aktivitelerini inhibe eder. Siklinlerin seviyeleri transkripsiyon düzeyinde düzenlenir. Hangi tip siklinin hangi fazda sentez edilip hangi fazda yıkıldığı aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5: Siklin çeşitlerinin yapılma ve yıkılma fazları

Siklin D	Başlama siklini Mitojen ya da büyüme faktörleri ile eksprese olur bunlar uzaklaştığında yıkılırlar
Siklin E	G1/S fazı sınırında sentezlenir, hücre S fazına girdiğinde yıkılır
Siklin A	S fazı boyunca sentez edilir, anafaz sırasında yıkılır.
Siklin B1	S fazı geç dönemde sentezlenir, G2 den M fazına geçerken max olur ve anafazda yıkılır.

4.3 Kontrol Noktaları

Hücrenin G1, S, G2, M fazlarından geçerek kendi kopyasını oluşturma işlemi olan proliferasyon sırasında hücre kontrol noktaları (check point) üzerinden kontrol edilir. Bu kontrol noktalarında bulunan genler sayesinde hücre herhangi bir hasara uğramadan sağlıklı hücreler meydana getirir. Kontrol noktalarında oluşan herhangi bir bozukluk, hasarlı DNA'ya sahip hücrenin kontrolden kaçmasına ve kanserleşmeye varabilecek ilk adımı atmış olmasına sebep olabilir.

Hücredeki kontrolsüz çoğalmayı baskılayan genler tümör süpresör genlerdir. Proto-onkogenler ise hücre çoğalması için gerekli gen grubudur. Tümör süpresör genler ve onkogenlerin arasındaki denge ile hücre kontrollü bir çoğalma sürecinde olur. p53, RB1, p16, p21 ve ING ailesi iyi bilinen tümör süpresör genler arasındadır [29, 30].

4.3.1 RB GENİ (Retinoblastoma)

4.3.1.1 Gen lokalizasyonu

Retinoblastoma geni ilk tanımlanan bir tümör supressör gendir. 1986 yılında tanımlanmış ve klonlanmıştır [31]. RB geni 13. kromozomun uzun kolu (13q14) üzerinde lokalize olmuştur.

4.3.1.2 Yapı ve Fonksiyonu

Retinoblastoma her hücre tipinde eksprese edilir. Aktif formu hücre siklusunda G1'den S'e geçerken fren görevi yapar. Yani hücre siklusunda RB geni aktif olduğunda tümör gelişimi görülmez [32]. RB hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde anahtar bir role sahiptir. Farklılaşmasını tamamlamış, dinlenme fazındaki veya yaşlı hücrelerde RB geni eksprese edilir ve defosforile halde bulunur.

Retinoblastoma normal işlevi gereği hücre döngüsünü yani proliferasyonu G1 fazının sonunda bulunan kontrol noktasında durdurur. RB'nin hücre proliferasyonunda bu durdurucu etkisini hücrenin G1'den S fazına geçişini sağlayan bir transkripsiyon faktörü ailesi olan E2F ailesini bağlayarak yani inaktifleştirerek gerçekleştirir. Dolayısıyla E2F ailesinin inaktifleşmesi sonucu hücre bir sonraki S fazına geçemez ve döngü durur. Ama eğer istirahat fazı olan G0 fazındaki bir hücre bölünme sinyali almışsa RB'nin normalde G1 fazı süresince hipofosforile durumunda olan formu G1 fazının sonuna doğru CDK'ların etkisi ile fosforillenir ve M fazına kadar bu formda kalır. Dolayısıyla da fosforile durumdaki RB artık E2F transkripsiyon faktörünü bağlayamayacağından E2F ailesi serbest kalır ve hücre bir sonraki faz olan S fazına geçer ve döngü devam eder.

4.3.1.3 Baş Boyun Kanserlerindeki Rolü

RB geni allelleri üzerinde oluşan bir kayıp ya da mutasyon akciğer kanseri [33], meme kanseri [34] ve mesane kanseri [35] gibi kanserlerde sıklıkla görülmektedir.

Yapılan bir çalışmada pRB ekspresyonu immunohistokimya yöntemi ile çalışılmış ve pRB'nin ekspresyon kaybının düşük sağkalım ile ilişkilendirildiği sonucuna varılmıştır [36].

Bilindiği üzere human papilloma virüs baş boyun kanserlerinin etiyolojisinde önemli bir yer tutar. Bununla beraber yapılan bir çalışmada HPV pozitif olan baş boyun kanserlerinde pRB ekspresyonu azalmıştır [37].

4.3.2 p53 GENİ

4.3.2.1 Gen lokalizasyonu

p53 geni 17. kromozomun kısa kolu (17p13) üzerinde yerleşmiştir ve p53 mutasyonları insan kanserleri üzerinde en çok çalışılan mutasyonlardır.

4.3.2.2 Yapı ve Fonksiyonu

393 amino asitten oluşan, ağırlığı 53kD olan bir tümör supressör genidir. p53 geni 11 ekzondan oluşmaktadır. P53 geni DNA bağlayıcı bölgesi ve transaktivasyon bölümü olan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre proliferasyonunu baskılayan diğer genleri regüle eder ve apoptozda rol aldığı düşünülmektedir. Normal işlevini yapan p53 geni hücre döngüsünde G1/S fazında kontrol noktasında görev alır ve DNA'sı zarar görmüş hücrenin döngüye devam etmesini engeller. Böylelikle yapısal olarak bozukluğa sahip hücrenin çoğalması engellenmiş olur.

4.3.2.3 Baş Boyun Kanserlerindeki Rolü

p53 geni baş boyun kanserlerinde sıklıkla çalışılan moleküler markır bir genidir [38]. p53 mutasyonu ve protein ekspresyonu baş boyun kanseri hastalarının patogenezinde karşımıza çıkar [39]. Baş boyun kanserlerine ait hem tümör dokularında hem de hücre kültürü çalışmalarında p53 genine ait delesyon ve mutasyonlar görülmektedir [40-42].

Yapılan bir çalışmada displazik lezyonlarda %45, insitu karsinomlarda %21, T1, 2, 3, 4 olgularda %56-89 oranında p53 mutasyonu bildirilmiştir [43] Baş boyun kanserleri arasında oral kavite kanserlerinde p53 mutasyon oranı diğerlerine göre daha fazla olduğu yine bir çalışmada gösterilmiştir [44]. P53 mutasyonu görülen baş boyun kanserli olgularda p53 mutasyonu göstermeyenlere göre daha kısa sürede ve daha yüksek oranda lokal rekürrens gösterilmiştir [45]

Yapılan detaylı araştırmalarda larinks kanseri vakalarında p53'ün genel ortalama ekspresyonu %51-80 arasında değiştiği gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca p53'ün malign transformasyonun erken dönemlerinde etkin olduğu ancak tümör progresyonu, rekürrensler ve genel sürvi üzerinde belirleyici rolü olmadığı ileri sürülmektedir [46].

Özofagus kanseri üzerine yapılan çalışmalarda özofagus kanseri hastaların %57'sinde p53 mutasyonu bulunmuştur [47]. Yine bu konu üzerinde yapılan bir çalışmada ise p53 mutasyonu özofagus kanserinin erken evrelerinde tespit edildiği ve multifokal özofagus karsinogenesinde özofagusun farklı bölgelerinde bağımsız mutasyonların esas anahtar mekanizma olduğu öne sürülmüştür [48].

4.3.2 ING AİLESİ

4.3.2.1 Genel bilgiler

ING (inhibitor of growth) ailesi proteinleri iyi korunmuş bir yapıya sahiptir. ING ailesinin 5 üyesi bulunmaktadır. Bunlar ING1, ING2, ING3, ING4 ve ING5'dir ve bunların yanında birçok splicing varyantı veya isoformları bulunmaktadır [49]. ING ailesini üyeleri apoptozis, hücre döngüsü durdurma veya hücre yaşlanması sırasında overeksprese olurlar. Bu bilgiler ışığında da bu ailenin proteinlerinin uzun süredir tümör supresör oldukları düşünülmektedir [49]. Birçok çalışmada ING gen ailesinin tümör supresör özelliği gösterilmiştir [50-54]. Ancak son zamanlarda siRNA ve knockout fareler kullanılarak yapılan çalışmalar ING ailesi üyelerini anlamada ilk söylenen özelliklerin değiştiğini göstermiştir. Yapılan analizler sonucu ING1 knockout fare kullanılarak yapılan bir çalışmada da ING1'in apoptozisin etkisine karşı koru-

yucu olduğu bildirilmiştir [55]. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ING2'nin kolorektal kanserde overeksprese olduğu ve kolon kanserinde hücre invazyonunu MMP13 bağımlı yolak ile indüklediği gösterilmiştir [56]. Yine yapılan bir çalışmaya göre normal fibroblast hücrelerinde ING2 geninin siRNA ile knockdown yapılması sonucu yaşlanmayı indüklediği [57] ve birçok hücre hattında apoptoz veya hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir [58]. Bu bilgiler ek olarak ING4 ve ING5 geni siRNA ile knockdown yapıldığında hücre döngüsünde G2/M fazından G1 fazına geçişte ve DNA replikasyonu sırasında bir inhibitör etki ettiği gösterilmiştir [59]. Böylelikle ING proteinlerinin hücre döngüsü sırasında önemli rol oynadığı desteklenmektedir. Bütün bu çalışmalar ING ailesi üyelerin farklı hücre ve koşullarda farklı davranabileceğini göstermektedir.

Bütün ING ailesi üyeleri C terminalinde PHD (plant homeodomain), NLS (nuclear localization signal) ve fonksiyonu henüz bilinmeyen NCR (novel conserved region) yapısı içermektedir. PHD domaini kromatin tekrar modellenmesinde etki gösterir [60].

4.3.2.2 ING1 Geni Kanserdeki Rolü

İlk olarak ING1 geni tümör supressör gen olan p53 ile ilişkilendirilerek tanımlandı [50]. ING1 geni tanımlanana kadar yapılan deneyler fizyolojik olmayan in vitro ortamlarda denenmiştir. Yapılan deneyler sonrasında da görülmüş ki ING1 geni overekspresyonu sonucu hücre homeostazisini bozmak, hücre döngüsünü durdurmaya öncülük etmek, apoptoz ve senesense sebep olmak gibi özellikler ortaya çıkarılmıştır [61, 62].

ING1 geni p47ING1a, p33ING1b, p24ING1c, p27ING1d olmak üzere dört izoform kodlanmaktadır. Bunlardan normal dokuda en yaygın eksprese olanı p33ING1b' dir [63].

Yapılan bir çalışmaya göre mesane kanseri hastalarında düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiştir [64]. Yine önemli bir çalışmada ING1'in isoformu olan p33ING1b'nin overekspresyonu sonucu p53 ekspresyonunun suprese olduğu görülmüştür [65]. Son zamanlarda iki grup tarafından yapılan çalışmalarda ise ING1 ve p53 geni arasında ilişki tespit edilememiştir. Bu grubun bulguları arasında p33ING1b varyantının özelliğini kaybetmesi Bax geninin ekspresyonu-

nu indüklediği, DNA hasarını artırdığı, bununla birlikte apoptozun indüklendiği bulunmaktadır [55, 66]. ING1 geni 13. kromozomda(13q33-34) lokalizedir [67]. Bu bölgenin çeşitli insan tümörleri gelişiminde ilişiği olduğu gösterilmiştir [68].

ING1 geni yapısında mSin3-HDAC kompleksi, BRG-based SWI-SNF kompleksi ve NuA4/Tip60 kompleksi bulunmaktadır [69]. Ayrıca PCNA, GADD45, P53 ve DMAP1 gibi çeşitli proteinlerle ilişkilendirilmiştir [70]. Birçok çalışmada göstermiştir ki meme kanseri, over kanseri, skuamöz hücreli özofagus kanseri ve baş boyun kanserinde ING1 geninin ekspresyonu azalmakta ya da mutasyona veya delesyona uğramaktadır [49].

4.3.2.3 ING3 Geni Kanserdeki Rolü

ING3 geni bu ailenin üçüncü üyesi olarak tanımlanmıştır [71]. ING3 geninin ailenin diğer üyelerine nazaran amino asit dizisi ve rolü en belirgin olanıdır [72]. ING3 geni de ailenin diğer üyeleri ile aynı domainlere sahiptir ancak ING3 geni aralarında en büyük moleküler ağırlığa sahip olan üyedir.

ING3 geni 46.8 kDA protein kodlayan bir gendir. ING3 geninin p53 aracılı transkripsiyonun modülasyonu, hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [71].

RKO hücrelerinde ING3 geninin ekspresyonu koloni oluşumunu ve S fazındaki hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir [73].

Yapılan bir çalışma sonucu baş boyun kanseri ve cilt melonomasında ING3 geninin downregülasyonu ve hücre anormal lokalizasyonu rapor edilmiştir [51, 74, 75]. ING3 geni bu kanserlerde tümör supresör özellik gösterir. Melanom hücrelerinde ING3 geninin aşırı ekspresyonu UV kaynaklı Fas/caspase-8 yolu ile apoptozu indükler [76].

ING3 geni NuA4/Tip60 HAT kompleksinin bir üyesi olarak çalışır. Bu kompleks de histon H4 ve H2A N-terminal kuyruğunu asetiller ve H3K4 de diğer üyeler gibi bağlanır [59].

ING3 geninin mRNA seviyesindeki düşüş agresif bir baş boyun kanserini gösterebilir. Kötü huylu tümörlerde ING3'ün nükleer ekspresyonu azalır ve bağımsız bir prognostik faktör olabilir [52].

Skuamoz hücreli baş boyun kanseri ile yapılan çalışmalarda ING3 genini mRNA seviyesinde %50-76 oranında düşüş görülmektedir. Gunduz ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ise ING3 mRNA seviyesindeki düşüşün yüksek mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [74].

5. MATERYAL VE METODLAR

Deneylerde UT-SCC-6A, 6B, 9A, 16A, 16B, 24A, 54A, 74A VE 74B skuamöz hücreli baş boyun kanseri hücre hatları kullanıldı. Turku üniversitesinden gelen hücrelerimiz laboratuvarımıza kazandırıldı. Hücrelerinin temini konusunda yardımını esirgemeyen Prof. Dr. Reider Grenman'a teşekkürlerimizi sunarız. Bu hücrelerin bazı özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. Hücrelerin kültürünün yapılabilmesi için ticari DMEM/High Glucose medyumunu kullanıldı.

Tablo 6: Baş boyun kanseri hücre hatları özellikleri

Hücre hattı	Cinsiyet	Yaş	Alınan Bölge	TNM	Tip	Grade
UT-SCC-6A	Bayan	51	supraglottik larinks	T ₂ N ₁ M ₀	Primer re-kürrens	G1
UT-SCC-6B	Bayan	51	6 nolu hat metastazı	T ₂ N ₁ M ₀	Metastaz	G1
UT-SCC-16A	Bayan	77	Dil	T ₃ N ₀ M ₀	Primer	G3
UT-SCC-16B	Bayan	77	16 nolu hat metastazı	T ₃ N ₀ M ₀	Metastaz	G3
UT-SCC-60A	Erkek	59	tonsil	T ₄ N ₁ M ₀	Primer	G1
UT-SCC-60B	Erkek	59	60 nolu hat metastazı	T ₄ N ₁ M ₀	metastaz	G1
UT-SCC-74A	Erkek	31	Dil	T ₃ N ₁ M ₀	Primer	G1-G2
UT-SCC-74B	Erkek	31	74 nolu hat metastazı	rN2	Metastaz	G2
UT-SCC-54B	F		Oral kavite metastaz	T2N0M0	Metastaz	
UTSCC-9	M	81	Dil	T2N1M0	Primer	G1
UTSCC-24A	M	41	Dil	T2N1M0	Primer	G2

5.1 Hücre kültürü protokolü

500 ML DMEM/High Glukoz (HY-SH30243.01) medyumun içerisine: 50 mL FBS (Wisent- 080110 veya HY- CH30160.02), 5mL penisilin/streptomisin (HY-SV30010), 4 mL L-Glutamin (Wisent-609-065-ZL) ve 0,5mL Plasmosin (ant-mpt (Invivogen) eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. Çalışmaya başlamadan yarım saat önce kabinin UV ışığı açılarak kabin sterilize edildi. Kabin, çalışma öncesinde % 70'lik alkol ile temizlendi. Önce ateş yakıldı, daha sonra havalandırma açıldı. Her çalışma bitiminde çöp kovası boşaltılarak tıbbi atığa atıldı

5.1.1 Hücre ekim işlemleri

- Isıtıcı 37°C'ye ayarlandı.
- Stok hücreler alınarak 37 °C'deki ısıtıcıda 2 dakika bekletildi.
- Cryovial tüplerin etrafı alkol ile temizlenip, kapak o şekilde açıldı.
- 8ml medyum konan falkon tüpünün içine stok solüsyonu içindeki hücreler boşaltıldı.
- 125xg de 6 dk santrifüj edildi. • Süpernatant atıldı. •
- Hücrelerin üzerine 12 mL medyum konuldu. Kaç tane dish'e ekim yapılacaksa ona göre hücrelerin üzerine medyum eklendi (1 dish için 2 mL olacak şekilde). •
- Pipetaj yapılarak hücreler çözüldü ve 12 mL medyum bulunan dishlerin içerisine 2 mL hücre eklendi, karıştırıldı ve 37°C % 5 CO₂'lik etüve konuldu.
- Ekilen hücreler inkübatöre konuldu.

5.1.2 Medyum Değişimi

- Medyum 37 °C'de ısıtıldı.
- Dish'deki medyum boşaltıldı.
- 10 mL medyum eklenip ve etüve konuldu.
- 2-3 günde bir medyum değiştirildi.

5.1.3Harvest İşlemi

- Flasktaki medyum boşaltıldı.
- Flaska 10 ml 1xPBS ilave edilerek varsa ölü hücreler uzaklaştırıldı.
- 1.5 mL tripsin-EDTA (HY-SV30031.01) eklenip, etüve konuldu, hücrelerin kalkması sağlandı (Trypsin-EDTA ısıyla aktivitesi artan bir kimyasaldır.)
- 8.5 mL medyum eklenip, pipetaj yapılarak falkon tüpe aktarıldı.

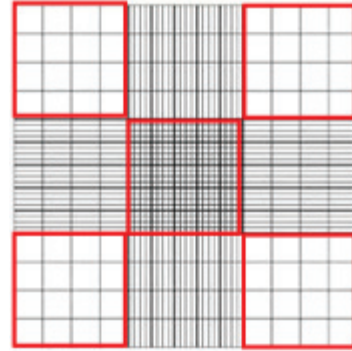
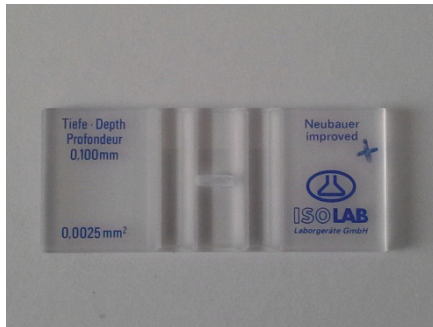
- 1100 rpm'de 25 °C'de 6 dk. santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldı ve medyum eklendi, tekrar santrifüj edildi.
- Medyumun tamamı hücrelere zarar vermeden dikkatlice çekildi. • Medyumda hücreler çözülüp eşit bir şekilde hücre kültür tabaklarına (well=kuyucuk) tekrar ekildi.

5.1.4 Hücre sayımı

1. 100 ul Tryphan Blue, 100 ul hücre örneği ile karıştırıldı.
2. Hemositometre yardımı ile toplam hücre sayısı elde edildi.
3. Hemositometrede 5 alan sayıldı ve konsantrasyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Konsantrasyon (hücre/ml) = (Toplam yaşayan hücre sayısı/5)*Seyreltme Faktörü*10⁴

4. 96 well plate'e her well de 50.000 ya da 100.000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi.



96 Well Plate Dizaynı:

İstenilen yoğunluğa ulaşan iki hücre hattı her well de 50.000 veya 100.000 hücre olacak şekilde 96 well plate'e ekildi. Plate dizaynı aşağıdaki gibidir.



5.1.5 Bor Muamelesi:

- Ticari olarak satın alınan borik asit DMSO içerisinde çözülerek son konsantrasyon 100mg/ml olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı.(10mL DMSO içerisinde 1gr borik asit çözüldü.)

- Her hücre borik asitin farklı konsantrasyonu (200 µg/ml, 400 µg/ml, 600 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml, 1200 µg/ml, 1400 µg/ml, 1600 µg/ml, 1800 µg/ml) ile muamele edildi ve her deney 3-4 kopya ile gerçekleştirildi.

- Borik asit uygulanmasından sonra hücreler 24 saat 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi.

- Daha sonra XTT işlemine geçildi.

5.1.6 XTT Assay

Cell proliferation kit kullanılarak XTT assay yapıldı (ROCHE, Cat. No 11 465 015 001) •

- 5 ml "XTT labeling reagent" 0.1 ml "electron coupling reagent" ile karıştırılarak XTT assay için gerekli karışım hazırlandı. Hücreler üçerli gruplar halinde 96 well plate'in kuyucuklarına ekildi.

- 96 well plate'in her bir kuyucuğuna 50 ul bu karışımdan konularak 4, 6, 8, 12, 24 saat inkübe edildi.

- Absorbans değerleri 490 nm de ELISA okuyucu ile okundu.
- Bu işlem farklı zamanlarda olmak üzere iki kez yapıldı

5.2 TRİZOL ile hücreden RNA izolasyonu

Her hücre hattı için XTT yöntemi ile dozlar ve saatler belirlendikten sonra hücrelere uygulandı ve aşağıdaki protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı.

1. Medyum boşaltıldı.
2. 1XPBS'le (2 mL) iki kez yıkandı.
3. Her bir tabağa 1 mL TRİZOL(Invitrogen, Cat. No.15596-026) ilave edilir. Pipet ucuy-la iyice kazındı.
4. 2 mL'lik endorf tüplere alındı.
5. 200 µL kloroform (Merck, 102431) eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı.
6. 12.000xg'de 15 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
7. Üstteki şeffaf kısım (süpernatant) yeni endorf tüpe aktarıldı.
8. 500 µL 2-propanol (Merck, cat. No.100995) eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.
- 9.12.000xg'de 10 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
10. Süpernatant RNA'ya zarar vermeden dikkatlice atıldı. % 75'lik etanolden (Merck, cat. No. 100993) 1000 µL eklendi. Hafifçe sallandı.
11. 7500 xg'de 5 dk +4 °C'de santrifüj yapıldı.
12. Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaşması için 10-15 dk oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletildi.
13. 100-200 µL PCR-grade DEPC (Invitrogen, 46-2224) su eklenerek RNA pipetejla çözüldü.
14. RNA bir sonraki deney için hazır hale getirildi.

5.3 cDNA Protokolü

- Tüm RNA'lar sabit bir sayıya eşitlendi (0,5-1-2-3-4 μg gibi)
- Hesaplama işlemi şöyle yapıldı;

Örneğin izole ettiğiniz RNA değeri $X=274,2 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olsun. Bunu 1 μg 'ma eşitlemek istiyorsanız,

$$274,2 \text{ ng} = 0,274 \mu\text{g}$$

(0,274'ü neyle çarparsam 1'e eşitlenir diye hesap yapılır)

$$0,274 \times 3,65 \approx 1,0001 \mu\text{g}$$

3,65 μl = alınacak RNA miktarı

- Hesaplamaları yaptıktan sonra çalışmaya geçildi.

1. Örnek sayısı kadar 1,5 ml'lik ependorf tüp çıkartıldı.
2. Her tüpe ayrı ayrı 1 μl oligo(dT)₁₈ primer konuldu.
3. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu.
4. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su (kitin içinde mevcut) sırasıyla ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 2 μl ise 11 μl 'ye tamamlayacak şekilde yani 9 μl su tüplere konur).
5. Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde aşağıdaki oranlarda mix hazırlandı.

Bir örnek için hazırlanacak miktarlar (örnek sayısı ile çarpılarak mix hazırlanır).

- | | |
|--|-----------------|
| • 5X Reaction Buffer | 4 μl |
| • Ribolock™ RNase Inhibitor(20 u/ μl) | 1 μl |
| • 10mM DNTP Mix | 2 μl |
| • RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase(200 u/ μl) | 1 μl |

6. Hazırlanan mix örnek tüplerinin üstüne 8 μl olacak şekilde dağıtıldı.

Toplam volüm 20 μl olacak (12 önceden vardı 8 μl mix ekledik toplam 20 μl oldu).

7. 42 °C 60 dk inkübasyona bırakıldı. Sonra 70°C de 5 dk bekletildi. Spin atırıldı.
8. Elde elden cDNA lar -70 derecede saklandı.

5.4 Beta aktin, P53, RB, ING1 VE ING3 Primerlerinin hazırlanması

Beta actin ve Ing 3 geni için kullanılan primerler için makale taraması yapılarak daha önce yapılan bir çalışmadan alınmıştır [74]. Ing 1, p53 ve rb geni için primerler ekspresyon çalışmasında kullanılmak üzere NCBI Primer designing tool programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Aşağıdaki tabloda kullanılan primerlerin sekansları gösterilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan primerlerin sekansları

GEN ADI		PRİMER
β-aktin	FORWARD	GGCCAACCGCGAGAAGATGAC
	REVERSE	GCTCGTAGCTCTTCTCCAGGG
ING3	FORWARD	CAGCCTCTTCTAACAATGCCTA
	REVERSE	CTTCATCAAACAAAAGGACCACC
ING1	FORWARD	AGTTTCAGGCCGCATCTCTG
	REVERSE	CTCCTGGCTGCGGATCA
RB	FORWARD	AACATCTCCCAGGAGAGTCCA
	REVERSE	CCAAGGTCCTGAGATCCTCATT
P53	FORWARD	TTTAAGGTTTTTACTGTGAGGGATG
	REVERSE	GCATTTACAGATATGGGCCTTG

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda 1xTE (Tris-EDTA) eklenerek 100 pmol/mL'lik stok çözeltiler hazırlanır. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 20 µL alınarak 80 µL 1xTE tamponu eklenir.

5.5 Gradyent PCR

Real-time PCR da kullanılacak olan primerlerimizin çalışma sıcaklığını bulmak için aşağıdaki solüsyonlar ve program kullanılarak gradiyent PCR yapıldı.

Tablo 8: Pcr solüsyonları kullanım miktarları

SOLÜSYONLAR	MİKTAR
NH4 BUFFER	2,5µL
MgCl	2,5µL
dNTP	0,5µL
PRİMER (REVERSE)	0,5µL
PRİMER (FORWARD)	0,5µL
TAQ POLİMERAZ	0,2µL
NUCLEASE FREE WATER	16,3µL

Gradyent PCR yapmak için belirlenen β -ACTIN, ING1, ING3, P53 VE RB1 genleri için belirlenen program koşulları şu şekildedir:

Tablo 9: Pcr koşulları

INITIAL DENATURATION	95°C	5dk	1cycle
DENATURATION	95°C	30sn	
	5 3 -		
ANNEALING	67°C	30sn	32 cycle
EXTENSION	72°C	1dk	
FINAL EXTENSION	72°C	5dk	1cycle

5.6 Agaroz Jel Elektrofrez

PCR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü.

- 100mL 1xTAE (Tris/Asetik Asit /EDTA) tamponunun içine
- 2 gr agaroz (Invitrogen kat no: 16500-100g) konuldu.
- Mikrodalga fırında homojen olana kadar tutuldu.
- 1.2µL ethidium bromide (Merck, 11608.0030) ilave edildikten sonra jel kalıba dökülerek donmaya bırakıldı.

- PCR ürünlerinden 5µL alınarak 1µL 6xLoadING dye(Thermo, #R0611) ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.
- Jel, 110 V'de yaklaşık 15-20 dk. yürütüldükten sonra UV transliminatörde görüntülendi.

5.7 Jel Ekstraksiyonu

Quick Gel Extraction Kit (Qiagen, cat. No 28704) ile yapıldı.

- Jel ekstraksiyonu yapılacak PCR ürünleri (20µL) yeni hazırlanmış taze kalın taraklı jele yüklendi.
- Dimerlerin uzaklaşması için mümkün olan en uzun süre yürütüldü.
- Karanlık odada bantlara bakılıp, hangisinin alınacağına karar verildi.
- DNA bantları bant kesici (extractor) ile dikkatlice alındı.
- Kesilen jel parçası tartılıp ependorf tüpe aktarıldı.
- Örneğin; 1 Jel 40 mg = 40µL hesabına göre kaç kuyucuk kesildi ise 2 ya da 3 oranda 2x40, 3x40 düşünüldü.
- 40x örnek sayısı kadar QG tamponu eklendi (QIAGEN).
- 50 °C de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
- Jel parçaları tamamen eriyene kadar 2-3 dakikada bir vortex yapıldı (Jel parçaları eridikten sonra tamponun rengi sarı olmalı, eğer turuncu ya da mor renk oluşursa renk sarı olana kadar 10µL 3M sodyum asetat eklenir.).
- Süpernatant mor kapaklı spin kolona aktarıldı ve 13.000 rpm'de 1dk. santrifüj edildi.
- Alttaki toplama tüpü boşaltılıp tekrar takıldı.
- İçindeki alkolün tamamen uzaklaşması için boş olarak tekrar santrifüj yapıldı.
- Spin kolon yeni ependorf tüpe oturtuldu. Toplama tüpleri atıldı.
- 30µL EB buffer (QIAGEN) eklendi. 4dk. oda sıcaklığında bekletildi.
- 13.000 rpm'de 1dk. santrifüjlendi. DNA değeri spektrofotometrede okutuldu.

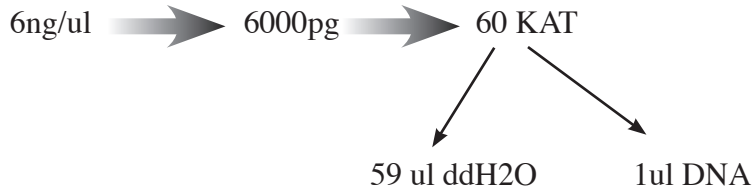
5.8 Real-time PCR için Standartların Hazırlanması

Jel ekstraksiyonu yapılan DNA'lardan standart hazırlandı.

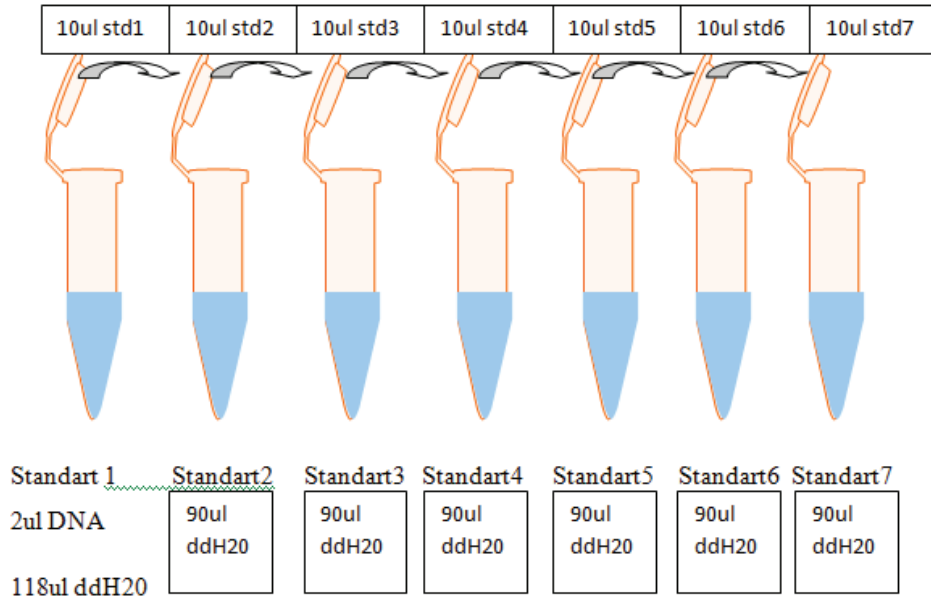
Primere ait jel ekstraksiyonu yaptıktan sonra spektrofotometrede konsantrasyon ve kalite ölçümü yapıldı.

ÖRNEK:

Beta Aktin geninin jel ekstraksiyon sonucu:



Şeklinde hesaplama ile sulandırma katsayısı bulundu. Ve aşağıda verilen miktarlarda seri dilüsyon yapıldı.



Şeklinde sulandırma yapılarak standartlar çalışmaya hazır hale getirildi.

5.9.Real-time PCR

Real-time PCR'da kullanılan syber green ışıktan etkilendiği için çalışma alanı karanlık olmalı, metal bloklarda ve aşağıdaki miktarlarda (bir örnek için) çalışılmalıdır.

Tablo 10: Real-time pcr koşulları

BİLEŞENLER	MİKTAR
Primer (forward)	0.5µl
Primer (reverse)	0.5µl
cDNA	2.5µl
Cyber Green Master mix	12.5µl
Nükleaz-free su	9µl
TOPLAM	25µl

Real Time PCR'da cihaza çalışılan gene göre program girildi.

Denatürasyon için 15'' 94 °C,

Annealing 30'' (her gen için normal PCR'daki çalışma sıcaklığının 2°C altı seçildi).

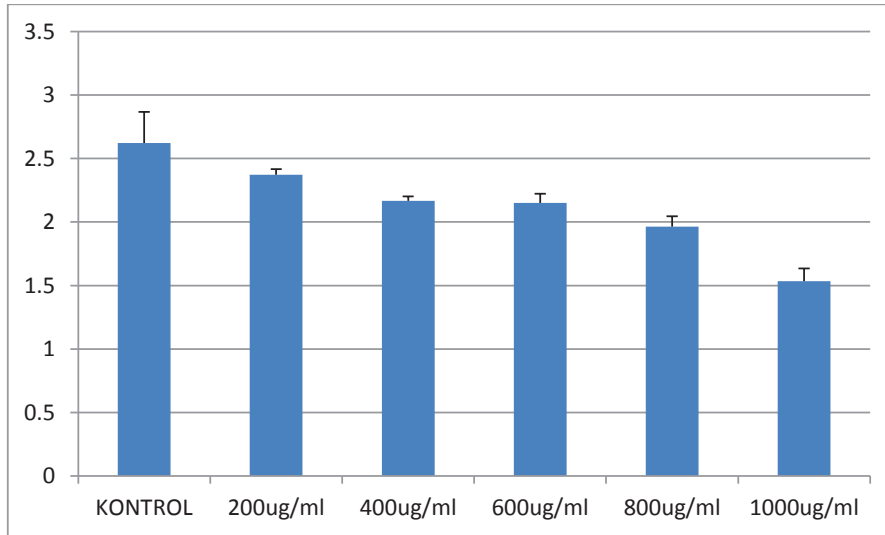
Extention 30'' 72 °C, cycle çalışmaya göre 45 seçildi.

Aynı şekilde houskeeping gen olan β -aktin ile normalize edildi.

Real time çalışmalarında her bir hücre hattı üçerli gruplar halinde ve iki farklı zamanda çalışılmıştır. Analizde okunan P53, RB, ING1, ING3 ve β -aktin değerleri excel programında yerleştirilip bu çalışmalar sonunda değerlerin oranlamaları, ortalama değerleri hesaplanıp ekspresyon değişimi incelendi.

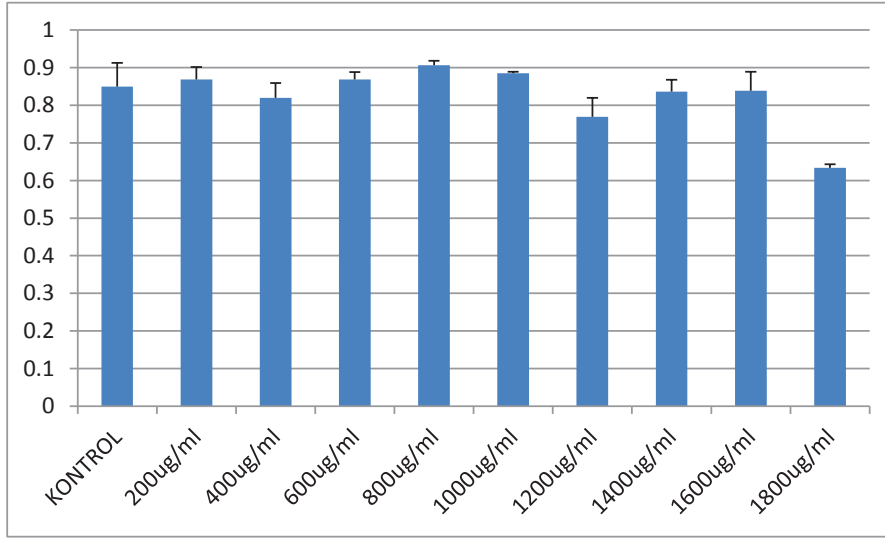
6. BULGULAR

6.1 Deneylerde UT-SCC-6A, 6B, 9A, 16A, 16B, 24A, 54A, 74A VE 74B skuamöz hücreli baş boyun kanseri hücre hatları kullanıldı. İlk olarak her bir hücre hattında toksik borik asit dozu XTT assay ile belirlendi. Deneyler yapılırken her bir hücre hattı için üçlü gruplar tasarlandı ve çalışma iki ayrı zamanda üçlü gruplar şeklinde çalışmalar yapıldı. Bu çalışmaların sonuçlarının ortalaması alınarak istatistiksel veriler elde edilmiştir. UT-SCC 6A hücre hattında en etkin doz 1000ug/ml (Grafik 1) bulunurken, UT-SCC 6B hücre hattında en etkin doz 1800ug/ml (Grafik 2) bulunmuştur. UT-SCC 16A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml (Grafik 3) bulunurken UT-SCC 16B hücre hattında en etkin doz 1000ug/ml (Grafik 4) bulunmuştur. Bu sonuçlarda aynı hücreye ait olan primer ve metastaz yapıda hücre hatlarının borik asit verdiği tepkinin farklılığı ortaya konmuştur. UT-SCC 24A hücre hattında en etkin doz 1600ug/ml (Grafik 5), UT-SCC 54C hücre hattında en etkin doz 1800ug/ml (Grafik 6), UT-SCC 74A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml (Grafik 7), UT-SCC 74B hücre hattında en etkin doz 800ug/ml (Grafik 8) ve UT-SCC 9A hücre hattında en etkin doz 800ug/ml (Grafik 9) olarak bulunmuştur. Hücrelere ait proliferasyon grafikleri aşağıda verilmiştir.

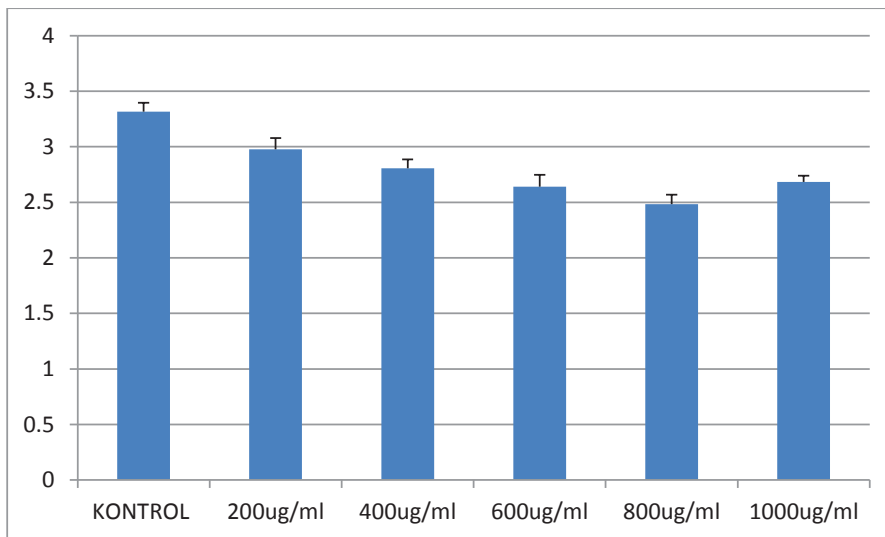


Grafik 1: UT-SCC-6A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlarda borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 1000ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 1000ug/ml borik asit veri-

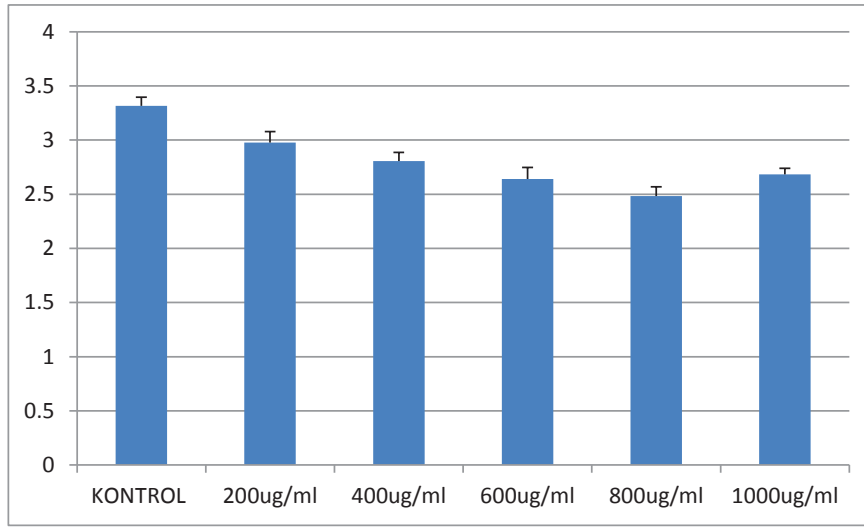
len gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiş ve p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



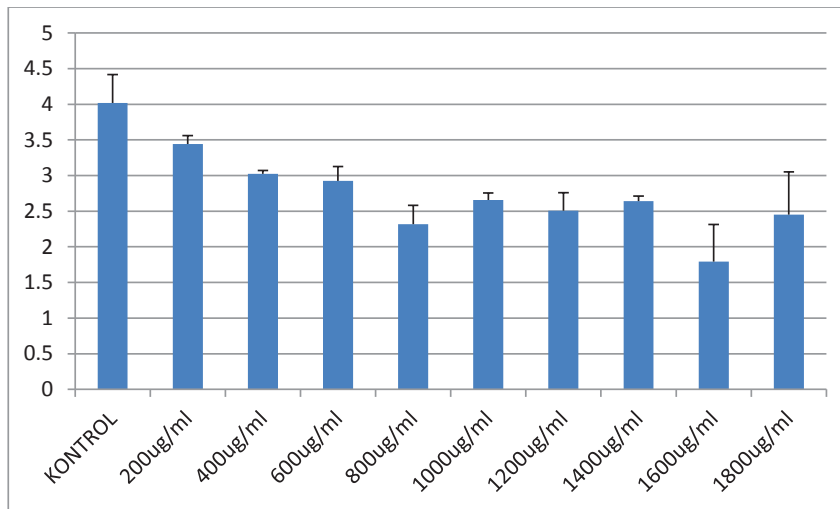
Grafik 2: UT-SCC-6B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlarda borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 1800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 1800ug/ml borik asit verilen gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



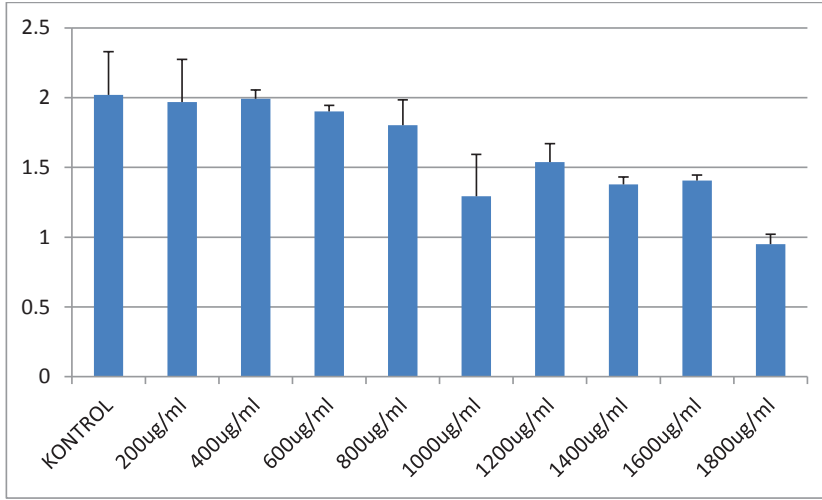
Grafik 3: UT-SCC-16A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlar-
da borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney
sonucu etkin doz olarak 800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 800ug/ml borik asit verilen
gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p değeri
0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U tes-
ti ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



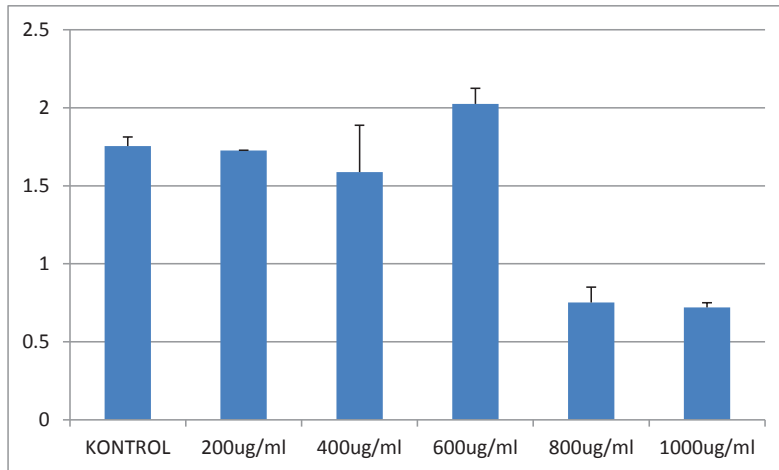
Grafik 4: UT-SCC-16B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlar-
da borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney
sonucu etkin doz olarak 1000ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 1000ug/ml borik asit veri-
len gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p de-
ğeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U
testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



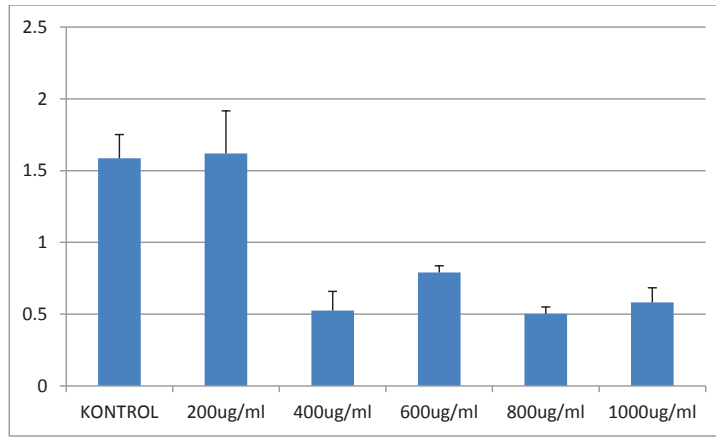
Grafik 5: UT-SCC-24A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlar- da borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 1600ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 1600ug/ml borik asit veri- len gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p de- ğeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



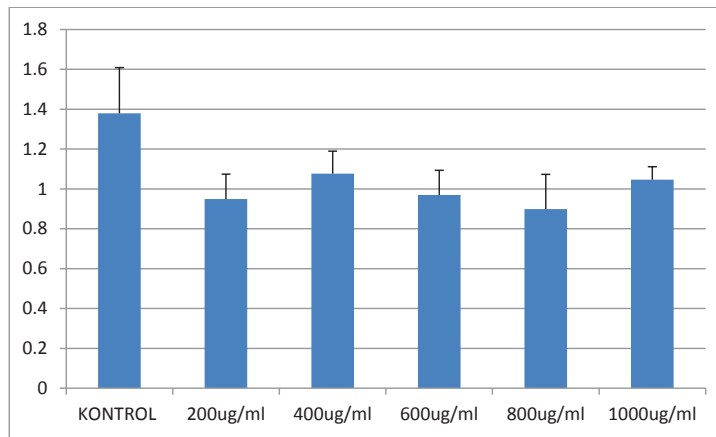
Grafik 6: UT-SCC-54C hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlar- da borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 1800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 1800ug/ml borik asit veri- len gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p de- ğeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



Grafik 7: UT-SCC-74A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlarda borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 800ug/ml borik asit verilen gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



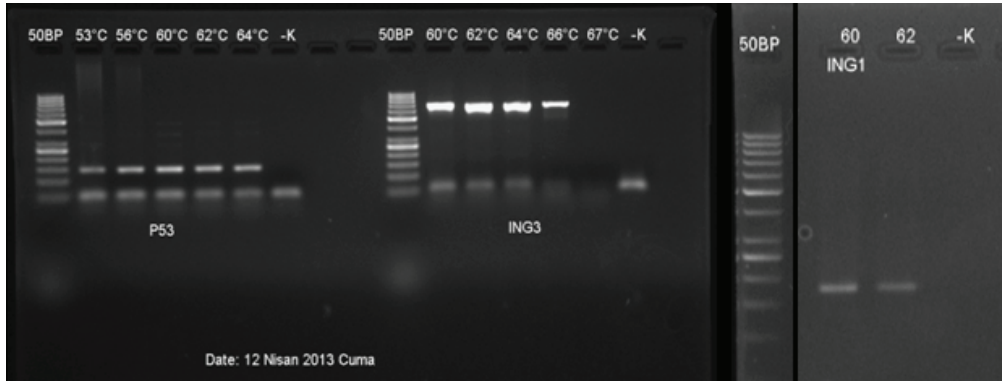
Grafik 8: UT-SCC-74B hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlarda borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 800ug/ml borik asit verilen gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.



Grafik 9: UT-SCC-9A hücre hattına sahip proliferasyon grafiği sonucunda farklı dozlar- da borik asit miktarları verilerek hücrede değişen canlı hücre sayıları gösterilmiştir. Bu deney sonucu etkin doz olarak 800ug/ml'ye karar verilmiştir. Kontrol ve 800ug/ml borik asit verilen gruplar arasında fark anlamlı olup olmadığı Mann Whitney U testi ile incelenmiştir. p değeri 0,05'den küçük bulunmuştur. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U tes- ti ile yapıldı. P<0.05 olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

6.2 Gradyent PCR bulguları

Beta actin, p53, Rb1, Ing1 ve Ing3 genleri için 54°C ile 68°C arasındaki sıcaklıklarda gardiyent PCR kuruldu. Gradyent PCR sonrası ürünler jele yüklenerek bant görüntüleri elde edildi.



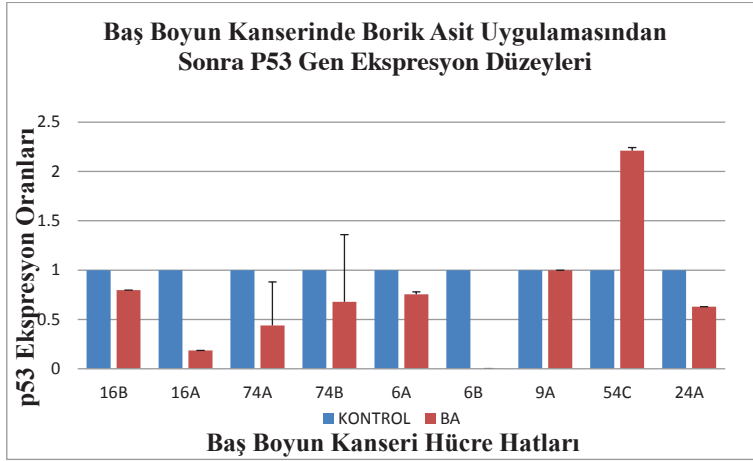
Resim 1:P53, ING3 ve ING 1 geni için Gradyent PCR agaroz jel görüntüsü sonucu p53 geni için çalışma sıcaklığı 60°C, ING3 geni için 62°C'ye ve ING 1 geni için çalışma sıcaklı- ğı 60°C karar verildi.



Resim 2: Beta Aktin ve RB1 geni için Gradyent PCR agaroz jel görüntüsü sonucu Beta Aktin geni için çalışma sıcaklığı 60°C ve RB1 geni için 62°C ye karar verildi.

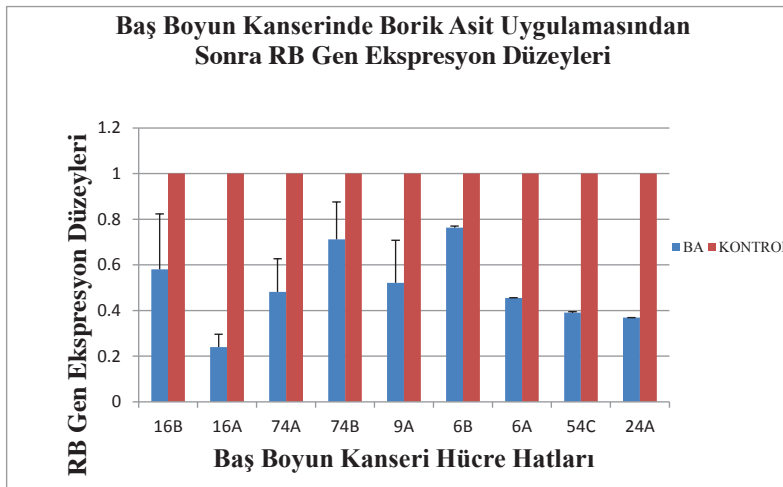
6.3 Real-time PCR sonuçları

6.3.1 P53 geni için ekspresyon sonuçları



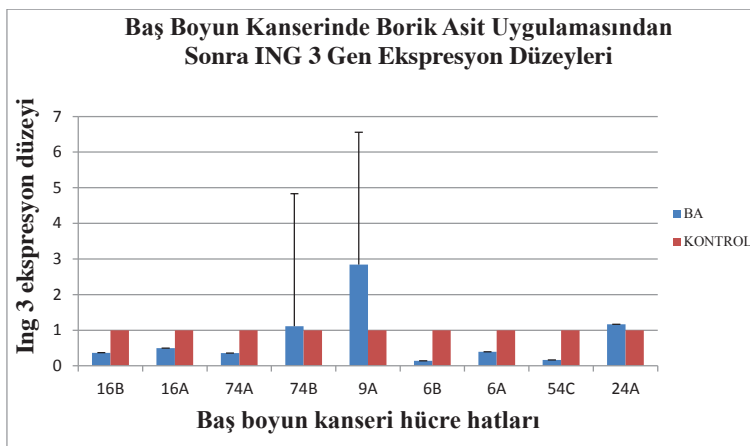
Grafik 10: UT-SCC-9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında p53 ekspresyon grafiği sonucu UT-SCC-9A hücre hattında herhangi bir ekspresyon değişimi görülmezken UT-SCC 54C hücre hattında ekspresyon artışı görülmektedir. Bunun yanında diğer hücre hatları olan UT-SCC-16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, ve 24A hücre hatlarında P53 geni ekspresyon azalışı gözlenmektedir. Bu sonuçların içinde UT-SCC 16A ve 74A hücre hatlarında $p=0.03$ bulundu. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P<0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

6.3.2 RB geni için ekspresyon sonuçları



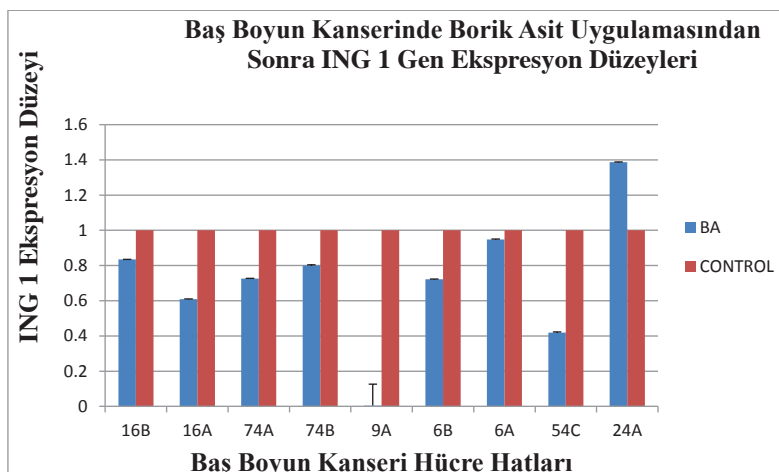
Grafik 11: UT-SCC-9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında ekspresyon grafiği sonucu RB 1 geni ekspresyon azalışı gözlenmektedir. Bu sonuçların içinde ise UT-SCC-6A, 54C ve 24A hücre hatlarında $p=0.01$ bulundu. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P<0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

6.3.3 ING3 geni ekspresyon sonuçları



Grafik 12: UT-SCC-16A, 16B, 74A, 6A, 6B, 54C ve hücre hatlarında ekspresyon grafiği sonucu ING3 geni ekspresyon azalışı gözlenirken UT-SCC-9A, 24A ve 74B hücre hatlarında ekspresyon artışı görülmektedir. Bu sonuçların içinde ise UT-SCC-54C hücre hattında $p=0.04$ bulundu. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P<0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

6.3.4 ING1 geni ekspresyon sonuçları



Grafik 13: UT-SCC-9A, 16A, 16B, 74A, 74B, 6A, 6B, 54C ve 24A hücre hatlarında ekspresyon grafiği sonucu ING1 geni ekspresyon azalışı gözlenmektedir. Aksine UT-SCC 24A hücre hattında ise bir ekspresyon artışı gözlenmektedir. Ama istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç teşkil etmemektedir. Bu sonuçların içinde ise UT-SCC-16B ve 54C hücre hatlarında $p=0.04$ bulundu. İstatistik analizleri SPSS 21.0 yazılımında Mann-Whitney U testi ile yapıldı. $P<0.05$ olarak bulunan değerler anlamlı sonuç olarak kabul edildi.

7. TARTIŞMA

Üst solunum yolu kanserleri arasında larinks, özofagus, farinks, ağız ve burun boşluğu kanserleri bulunur. Baş boyun kanserleri en sık görülen kanser türleri arasında 6. sırada yer almaktadır [77]. Amerika Birleşik Devletlerinde tiroid hariç tutulduğunda erkeklerde tanınan tüm malignansilerin % 8,5, kadınlarda da % 3,2'sini oluşturdukları bildirilmektedir. Yine bu ülkede her yıl 45.000 dolayında yeni vaka gözleendiği, baş boyun kanserlerinden ölümlerin ise her yıl 12.000 civarında olduğu rapor edilmektedir [2]. Risk faktörleri arasında çevre ve yaşam şekli önemli yer tutar. Alkol ve sigara kullanımı başta olmak üzere buhar, duman ve iritan maddelere maruziyet etiyojijisinde önemli rol oynar. Uzun süreli güneş ışığına maruziyet dudak kanseri için risk faktörüdür. Uzun süreli radyasyon maruziyet sonucu ise tiroid kanseri için ciddi risk oluşturur. Semptomları arasında ise boyun bölgesinde oluşan kitle, ağrı, ağızdan kan gelmesi, nefeste kötü koku, sinüslerin tıkanması, dilde yara oluşumu gösterilebilir.

Baş boyun kanserlerinin biyolojik davranışı agresiftir. Doktor muayenesi sonucu hasta hikayesinde baş boyun kanseri olan bir hastada ilk beş yıl içinde ikinci baş boyun kanseri geliştirme olasılığı çok yüksektir [78]. Baş boyun kanserlerinin %90'nını skuamöz hücreli baş boyun kanserleri oluşturur [9]. Tedavi ve cerrahinin gelişmesine rağmen son 40 yılda ölüm oranında hiçbir iyileşme görülmemektedir [10]. İleri evre hastalık görülen kişilerde iki yıl içerisinde %50-60 oranında bölgesel nüks ve %20-30 oranında uzak metastaz görülmektedir [11]Baş boyun kanserlerinin %60-70 oranında erken tanı konulamamaktadır. Tedavide ise standart olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır.

Kanser tedavilerinde kullanılan radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler genellikle tam tedavi sağlamamaktadır. Üstelik 5 yıl içinde tekrar görülme sıklığı oldukça fazladır ve kanser türleri arasında değişiklik gösterir. Mevcut tedavilerin yeterli olmayışı bilim adamları alternatif tedavi ya da daha etkili tedavi yollarını bulmaya teşvik etmektedir.

Alternatif tedavi yöntemleri araştırılırken dikkat edilen en önemli noktalardan biri potansiyel tedavinin sağlıklı hücrelere herhangi bir zararlı etkisi olmamalıdır. Borik asit de bu alternatif tedaviye aday olabilecek bir kimyasaldır.

Borik asit periyodik cetvelin 5. elementi ve 3A grubu içerisinde tek ametaldir. Ham maddesi boraktır ve boraksın en geniş kaynakları Türkiye’de bulunmaktadır. Bor minerallerinden biridir. Bor cam sanayisinden seramik yapımına, tarım uygulamalarından temizlik ürünlerine kadar birçok alanda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda borun kemik [79, 80], mineral [81, 82], lipid [15], enerji metabolizması [83], immün sistem [17] ve endokrin sistem [84, 85] için esansiyel olabileceği bildirilmiştir.

Son yıllarda ise sağlık alanında kullanma fikri doğmuş ve ilk olarak BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavi yönteminde kanser hücreleri hedef alınmakta ve normal hücrelere minimum zarar verdiği için tercih sebebi olmaktadır. Boron nötron tedavisi boron-10 ile izotopunun alfa parçacıkları ve lityum-7 ile düşük enerjili termal nötron ile ışımaya tutulduğunda ortaya çıkan nükleer reaksiyona dayanır. Yüksek gradeli gliomalarda ve metastatik beyin tümörlerinde kullanımı oldukça yaygındır [20].

Bu bilgiler ışığında borun sadece bu tedavi yöntemi ile değil de direk kendisinin bu etkiyi sağlayabileceği fikri doğmuş ve yapılan bir çalışmada prostat kanseri hücre hatlarında borik asitin proliferasyonu durdurduğu bulunmuştur. Gallardo-Williams ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bu çalışmada nude mice’lara prostat kanser hücreleri verilerek prostat kanserli model oluşturulmuş. Daha sonra tümörler belirli büyüklüğe geldiğinde borik asit uygulaması yapılmıştır. Sonuç olarak tümör boyutunun %25-38 oranında küçüldüğü gözlenmiştir. Bunun yanında plazma PSA (Prostate specific antigen) değerlerinde %88 azalma ve IGF-1’in dokularda konsantrasyonunun azaldığı tespit edilmiştir [22]. Bu çalışmadan yıllar önce-1987 yılında Bone ve arkadaşları yaptıkları çalışmada borik asitin serin proteaz aktivitesini inhibe ettiği ve PSA’nın aktif bölgesine bağlanarak inhibe ettiğini göstermişlerdi [23]. 2004 yılında yapılan çalışma, 1987 yılındaki çalışmaya nazaran daha güncel ve farede üzerinde olduğu için borik asitin *in vivo* ortamdaki etkisi hakkında doğrudan bilgi vermektedir. Prostat kanseri üzerine yapılan bu iki çalışmanın bize söylediği iki önemli mesaj vardır. İlki, bor prostat kanser tedavisinde olumlu etkisi olan kimyasal bir ajandır, çünkü prostat kanser markırı seviyesinde düşüşe sebep olmuştur. İkincisi ise borun diğer kanser türlerinde de tedavi edici bir kimyasal ajan olarak kullanılması ve olumlu etkisinin olması yüksek ihtimaldir. Kanserin biyolojisine bakıl-

dığında temelde tek bir tip davranış görülmektedir, o da kanser hücrelerinin hücre kontrolünden uzak bir şekilde sonsuz büyümeleridir. Eğer literatürde herhangi bir çalışmada etkili yeni bir kimyasal bulunur ise diğer kanser tiplerinde de denenmelidir. Biz de bu amaçla projemizde borik asiti birçok farklı baş boyun kanseri hücre hattında denedik. Projemizin çıkış noktası daha önceden yapılan kanser-borik asit çalışmaları olup motivasyonumuz ise ülkemizin oldukça zengin bor kaynaklarının olmasıdır. Projemiz neticesinde görüldüğü üzere borik asitin ilk aşamada *in vitro* ortamda yapılan deneylerde baş boyun kanseri üzerinde tedavi edici etkisi vardır. Bir sonraki aşamada ise Gallardo-Williams ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmaya benzer şekilde baş boyun kanseri fare modelleri oluşturup borik asitin *in vivo* etkisine karar vermeyi hedefliyoruz. Fare modelleri ile eş zamanlı olarak yapılabilen bir başka çalışma modeli ise prostat kanseri hastaların diyetinde borun kullanılmasıdır. Hastalarda gıda takviyesi olarak kullanılan borun prostat kanseri hastalarında riski azalttığı tespit edilmiştir. Yine benzer şekilde 2008 yılında Mahabir ve arkadaşlarının akciğer kanseri hasta örneklerinde yaptıkları bir çalışmada ise bor gıda takviyesi olarak hastalara verilmiş ve belirli bir süre sonra hastaların risk durumu tespit edilmiştir. Borun akciğer kanseri riskini azaltan olumlu bir kimyasal olduğu bu çalışma ile görülmüştür [24].

2004 yılında Barranco ve Echert'in yaptığı bir çalışmada borik asitin LNCaP ve androjen bağımsız prostat kanser hücre hatları olan DU145 VE PC3 hücre hatlarında proliferasyonu, invazyonu ve migrasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamız ile benzer bir mantık yürütülmüştür. Birkaç farklı hücre hattında borik asitin etkisi kıyaslanmıştır. Hücre hatları, primer tümörler gibi kullanılan kimyasala farklı tepkiler gösterebilmektedir. Nitekim bu çalışma neticesinde DU-145 hücrelerinde proliferasyonun azaldığı tespit edilmiştir. Barranco ve arkadaşları DU-145 hücre hattında çalışmaya devam etmiş ve 2006 yılında borik asitin etki mekanizmasına dair orjinal bir çalışma ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada siklin proteinlerinin ve MAPK proteinin ekspresyonunun borik asit uygulanan hücre hatlarında azaldığı gösterilmiştir. Ancak bizim projemizde özellikle ilgilendiğimiz RB, P53 ve ING genleri ile ilgili bir bilgi bu makalede bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki DU-145 hücre hattı P53 mutanttır, bizim çalışmamızdaki 9A hücre hattı da P53 mutanttır. Bu şekilde birkaç hücre hattının

tarandığı çalışmalarda en az bir mutant hücre hattının denenmesi çalışmanın güvenilirliği açısından iyi olacaktır [24, 26].

Prostat kanseri hücre hatlarında Barranco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 60-100 uM borik asit konsantrasyonunun hücre proliferasyonunun inhibe ettiği bulunmuştur [26]. Aynı çalışmada daha yüksek konsantrasyonlar çalışılarak sağlıklı prostat kanseri hücre hatlarına 500-1000 uM borik asit uygulanarak proliferasyona etkisi araştırılmış ve bu yüksek konsantrasyonların normal hücrenin proliferasyonunda inhibe ettiği gösterilmiştir. Bizde çalışmamızda baş boyun kanseri hücre hatlarını kullanarak 200µg/ml-1800µg/ml konsantrasyonlar uygulayarak proliferasyon deneyi gerçekleştirdik. Bu deneyler sonucunda UT-SCC-74A, 74B, 9A ve 16A hücre hatlarında 800µg/ml konsantrasyonunda proliferasyona en fazla etki ettiği bulunmuştur. UT-SCC-6B ve 54C hücre hatlarında ise 1800 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği sonucu ortaya çıkmıştır. UT-SCC-6A ve 16B hücre hatlarında 1000 µg/ml konsantrasyonun hücre proliferasyonunu etkilediği görülmüştür. Burada aynı hücre hatlarının primer ve metastaz özelliklerinden borik asit miktarları farklı çıkmıştır. UT-SCC-6A hücre hattı primer kültür özelliğinde olduğu için grafik 1 de görüldüğü üzere proliferasyonun 1000 µg/ml konsantrasyon ile etkilendiği bulunmuştur. Aynı hücre hattının metastaz özellikteki UT-SCC-6B hücre hattı 1800 µg/ml konsantrasyonda etkilediği görülmüştür (Grafik 2). Bunun üzerine metastaz özellikteki hücrelerin daha agresif yapıda olup daha çok çoğalma isteğinde oldukları için daha yoğun borik asit konsantrasyonundan etkilenmiştir. Yine UT-SCC-16A primer kültür olan hücre hattı grafik 3 de görüldüğü 800µg/ml konsantrasyondan etkilenirken metastaz yapıda olan UT-SCC-16B hücre hattı 1000 µg/ml konsantrasyonda hücre proliferasyonu inhibe edildiği görülmektedir (Grafik 4). Böylelikle hücre yapıları arasındaki farklılık etki eden borik asit konsantrasyonunu da değiştirdiği gözlemlenmiştir. Yine Barranco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan esinlenerek biz de bir kontrol hücresinde bu konsantrasyon aralıklarını görmek istedik ve Cos7 hücre hattında 200µg/ml -1800µg/ml arasında konsantrasyonlar kullanarak proliferasyon deneyi yaptık ve sonucunda bu hücre hattının yüksek konsantrasyonlar dahil proliferasyonda ciddi bir inhibisyon görülmemiştir. Ancak bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde olduğundan data göstermedik. Bu ön çalışmanın destekli tekrarları yapılacaktır.

Hücrenin G1, S, G2, M fazlarından geçerek kendi kopyasını oluşturma işlemi olan proliferasyon sırasında hücre kontrol noktaları (check point) üzerinden kontrol edilir. Bu kontrol noktalarında bulunan genler sayesinde hücre herhangi bir hasara uğramadan sağlıklı hücreler meydana getirir. Kontrol noktalarda oluşan herhangi bozukluk hasarlı DNA'ya sahip hücreler oluşturur ve kanserleşmeye varan ilk adım hücrede atılmış olur. Hücredeki kontrolsüz çoğalmayı baskılayan genler tümör supresör genlerdir. Kanser oluşumunda genetik faktörlerin etkisini onkogenler ve tümör supresör genler sayesinde belirli ana başlıklar halinde toplayabiliriz. Onkogenler gerektiğinde hücrenin çoğalması için gerekli gen grubudur. Tümör supresör genler ise onkogeni dengeleyen bir gruptur. Tümör supresör genler arasında p53, RB1, p16, p21 ve ING ailesi gösterilebilir [29, 30]. Biz de projemizde onkogenlerden ziyade özellikle P53, RB ve ING genlerinin borik asit ile etkisini araştırdık.

Retinoblastoma geni bir tümör supresördür. 1986 yılında tanımlanmış ve klonlanmıştır [31]. RB geni 13. kromozomun uzun kolu (13q14) üzerinde lokalize olmuştur. RB geni aktif olduğunda tümör gelişmez [32]. RB hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde anahar bir role sahiptir. Farklılaşmasını tamamlamış, dinlenme fazındaki veya yaşlı hücrelerde RB geni eksprese edilir ve defosforile halde bulunur. RB geni allelleri üzerinde oluşan bir kayıp ya da mutasyon akciğer kanseri, meme kanseri ve mesane kanseri gibi kanserlerde sıklıkla görülmektedir. Harbour ve arkadaşlarının 1988 yılında Science dergisinde yayınladıkları çalışmada RB geninin ekspresyonunun küçük hücreli akciğer kanserinde %60 oranında yok olduğu bulunmuştur [31]. Aynı yıl yine Science dergisinde meme kanseri ile RB genini içeren bir çalışmaya göre RB geni meme kanserinde inaktive olmaktadır [34]. Ayrıca bu gen üzerine literatürde farklı birçok kanseri ile ilgili çalışma mevcuttur. Baş boyun kanserinde RB geni ile ilgili birçok çalışma vardır ancak bu çalışmalar genelde mutasyon incelemektedir. Biz ise borik asit uygulanan ve uygulanmayan baş boyun kanserlerinde tümör supresör genlerinden biri olan RB'nin ekspresyonunu araştırdık. Ekspresyon araştıran başka bir çalışmaya literatürde rastlanmadığı için sonuçlarımız hem kontrol grubu hem de borik asit uygulanan grup adına önemlidir.

Çalışmamız sonucunda UT-SCC-6A, 54C ve 24A hücre hattında, borik asit uygulanan grubun RB gen ekspresyonunda yaklaşık 2 kat azalma görülmektedir. Hücre hatlarında kontrol ile borik asit uygulanmış hücre hatları arasında anlamlı bir azalma olup olmadığını anlamak için istatistiksel test yapılmış, p değeri 0.05'den küçük bulunmuş ve ekspresyon azalışlarındaki anlamlılığa Mann Whitney U testi ile karar verilmiştir. Sonuçlarımızın literatürde ilk olmasının yanı sıra borik asit uygulanan kanser hücrelerinde daha önce RB ekspresyonu hiç araştırılmamıştır. Borik asitin RB ekspresyonunu azaltması gen düzeyinde değil de belki de protein düzeyinde bir etki yaptığı sorusunu akıllara getirmektedir. Bu sebeple çalışmaların genişletilerek devam ettirilmesi gerekir.

P53 geni ise 393 amino asidi kodlayan bir genidir. Ağırlığı 53kD olan bir tümör supresör genidir. 11 ekzondan oluşmaktadır. P53 geni DNA bağlayıcı bölgesi ve transaktivasyon bölümü olan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücre proliferasyonunu baskılayan diğer genleri regüle eder ve apoptozda rol aldığı düşünülmektedir. Normal işlevini yapan p53 geni hücre döngüsünde G1/S fazında kontrol noktasında görev alır ve DNA'sı zarar görmüş hücrenin döngüye devam etmesini engeller. Böylelikle yapısal olarak bozukluğa sahip hücrenin çoğalması engellenmiş olur. P53 geni baş boyun kanserlerinde sıklıkla çalışılan moleküler markır bir genidir [38]. P53 mutasyonu ve protein ekspresyonu baş boyun kanseri hastalarının patogenezinde karşımıza çıkar [39].

Bizim çalışmamız sonucunda ise p53 gen ekspresyonu için UT-SCC-16A ve 74A hücre hattında yaklaşık 2 kat azalma görülmektedir. Hücre hatlarında kontrol ile borik asit uygulanmış hücre hatları arasında anlamlı bir artış olup olmadığını anlamak için istatistiksel test yapıldı ve p değeri 0.05'den küçük bulundu ve ekspresyon azalışlarının anlamlılığı Mann Whitney U testi ile karar verilmiştir. Borik asit uygulanan kanser hücrelerinde en önemli tümör baskılayıcı genlerden olan P53 geninin ekspresyonu azalmış bir şekilde bulunmuştur. Yine aynı şekilde RB geni ekspresyonundan da azalma bulunmuştur. Bu durum da borik asitin P53-RB genleri üzerinde gen düzeyinde ekspresyon azaltıcı etkisi görülmektedir.

Bir diğerk önemli tümör baskılayıcı gen olarak ING1 geni ise ilk olarak p53 ile ilişkilendirilerek tanımlandı [50]. ING1 geni tanımlanana kadar yapılan deneyler fizyolojik olmayan *in vitro* ortamlarda denenmiştir. Yapılan deneyler sonrasında da görülmüş ki ING1 geni overekspresyonu sonucu hücre homeostazisini bozmak, hücre döngüsünü durdurmaya öncülük etmek, apoptoz ve senesense sebep olmak gibi özellikler ortaya çıkarılmıştır [61, 62]. Yapılan bir çalışmaya göre mesane kanseri hastalarında düşük hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir [64]. Yine diğerk başka bir çalışmada ING1'in isoformu olan p33ING1b'nin overekspresyonu sonucu p53 ekspresyonunun suprese olduğu görülmüştür [65]. Son zamanlarda iki grup tarafından yapılan çalışmalarda ise ING1 ve p53 geni arasında hiçbir ilişki tespit edilememiştir. Bu grubun bulguları arasında p33ING1 varyantının özelliğini kaybetmesi Bax geninin ekspresyonunu indüklediği, DNA hasarını artırdığı, bununla birlikte apoptozun indüklendiği bulunmaktadır [55, 66].

Çalışmamız sonucu ise ING1 geni için UT-SCC-16B ve 54C hücre hattında yaklaşık 2 kat azalma görülmüştür. Hücre hatlarında kontrol ile borik asit uygulanmış hücre hatları arasında anlamlı bir azalma olup olmadığını anlamak için istatistiksel test yapılmış ve anlamlı neticeler elde edilmiştir. Özellikle UT-SCC-54C hücre hattında ING1 geninde azalma gösterirken P53 gen ekspresyonunda aynı oranda artma göstermesi bu iki genin ilişkisinin ispatı adına da önemlidir.

ING3 geni ING ailesinin üçüncü üyesi olarak tanımlanmıştır [71]. ING3 geninin ailenin diğerk üyelerine nazaran amino asit dizisi ve rolü en belirgin olanıdır [72]. ING3 geni de ailenin diğerk üyeleri ile aynı domainlere sahiptir ancak ING3 geni aralarında en büyük moleküler ağırlığa sahiptir. Böylece yapısında bölgesinde domain bulundurmamasına rağmen en uzun tek bölge sahiptir. Bu sebepten ötürü diğerk aile üyeleri arasında ING3 geni daha belirgin role sahiptir. Yapılan bir çalışma sonucu baş boyun kanseri ve cilt melanomasında ING3 geninin downregulasyonu ve hücre sel anormal lokalizasyonu rapor edilmiştir [51, 74, 75]. ING3 geni bu kanserlerde tümör supresör özellik gösterir. ING3 geni NuA4/Tip60 HAT kompleksinin bir üyesi olarak çalışır. Bu kompleks de histon H4 ve H2A N-terminal kuyruğunu asetiller ve H3K4 de diğerk üyeler gibi bağlanır [59].

Biz çalışmamız sonucunda ise ING3 geninin UT-SCC-54C hücre hattında yaklaşık 5 kat azalma görülmüştür. Hücre hatlarında kontrol ile borik asit uygulanmış hücre hatları arasında anlamlı bir azalma olup olmadığını anlamak için istatistiksel test yapıldı ve önemli derece anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca UT-SCC-54C hücre hattında 5 kat azalmanın tespit edilmesi önemlidir. Diğer genlerde bu derece çok azalma bulunmamıştır.

Aynı zamanda UT-SCC-54C hücre hattında bulunan ekspresyon azalması hem ING1 hem de ING3 geninde gözlenmiştir. Bu da aynı gen ailesine verilen cevabın aynı olduğunu gösteren önemli bir çalışma olmuştur.

8. SONUÇ

Borik asitin prostat kanseri üzerinde proliferasyonu inhibe edici etkisi baş boyun kanseri hücre hatlarında da görülmüştür. Yaptığımız bu çalışmamızda baş boyun kanseri hücre hatlarından UT-SCC-6A, 6B, 9A, 16A, 16B, 24A, 54C,74A ve 74B hücre hatları kullanılmıştır. Ve bu hücre hatlarında her birinde borik asitin farklı konsantrasyonu sonucu proliferasyon etkisi gösterilmiştir. Primer ve metastaz hücre hatlarının borik asite vermiş olduğu yanıtın farkı ortaya kondu. Daha sonra bu etkinin hücre döngüsünde ciddi rolü olan önemli tümör supresör genler olan p53, RB, ING1 ve ING3 geni üzerindeki etkisi incelendi. Bunun üzerine hücre hatlarının borik asitin uygulamasından sonra bu genlerin ekspresyonu azaldığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında borik asitin gen düzeyinde değilde protein düzeyinde etkisi olabileceği fikrini doğurmaktadır. Böylelikle alternatif kanser tedavi yöntemlerinden biri olabilme düşüncesi doğmaktadır. Bu deneyler hayvan deneyleri ile desteklenerek daha geniş çapta araştırmalarla tıp literatürüne geçmeye aday bir alternatif veya destekleyici bir tedavi olabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Stewart BW, K.P., *In World Health Organization: World cancer report*. Cancer facts & figures, 2003.
2. Poole, M.E., et al., *Chemoradiation for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck for organ preservation and palliation*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2001. **127**(12): p. 1446-50.
3. Vaughan, C.W., et al., *Carcinogenesis in the upper aerodigestive tract*. Otolaryngol Clin North Am, 1980. **13**(3): p. 403-12.
4. Sellars, S.L., *Epidemiology of oral cancer*. Otolaryngol Clin North Am, 1979. **12**(1): p. 45-55.
5. Grant, W.B., *Does solar ultraviolet irradiation affect cancer mortality rates in China?* Asian Pac J Cancer Prev, 2007. **8**(2): p. 236-42.
6. Ragin, C.C., F. Modugno, and S.M. Gollin, *The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus*. J Dent Res, 2007. **86**(2): p. 104-14.
7. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
8. Cooper, J.S., et al., *National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update*. Head Neck, 2009. **31**(6): p. 748-58.
9. Eagle, H., *Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB*. Proc Soc Exp Biol Med, 1955. **89**(3): p. 362-4.
10. Lin, C.J., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection*. Head Neck, 2007. **29**(2): p. 163-88.
11. Posner, M.R., et al., *Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach*. Semin Oncol, 2004. **31**(6): p. 778-85.

12. Levine PA, S.D., *Neoplasms of the oral cavity*. Bailey BJ (ed) *Head and Neck Surgery – Otolaryngology*, 1998: p. pp 1523–1539.
13. Wilson, J.H. and P.L. Ruzler, *Effects of dietary boron supplementation on laying hens*. *Br Poult Sci*, 1996. **37**(4): p. 723-9.
14. Hunt, C.D., *Dietary boron modified the effects of magnesium and molybdenum on mineral metabolism in the cholecalciferol-deficient chick*. *Biol Trace Elem Res*, 1989. **22**(2): p. 201-20.
15. Hall, I.H., et al., *The effects of boron hypolipidemic agents on LDL and HDL receptor binding and related enzyme activities of rat hepatocytes, aorta cells and human fibroblasts*. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1989. **65**(3): p. 297-317.
16. Hunt, C.D. and J.L. Herbel, *Boron affects energy metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat*. *Magnes Trace Elem*, 1991. **10**(5-6): p. 374-86.
17. Armstrong, T.A., J.W. Spears, and K.E. Lloyd, *Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts*. *J Anim Sci*, 2001. **79**(6): p. 1549-56.
18. Nielsen, F.H., *Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation*. *FASEB J*, 1991. **5**(12): p. 2661-7.
19. Dieter, M.P., *Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 mice*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102 Suppl 7**: p. 93-7.
20. Barth, R.F., et al., *Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality*. *Neurosurgery*, 1999. **44**(3): p. 433-50; discussion 450-1.
21. Price, C.J., et al., *Blood boron concentrations in pregnant rats fed boric acid throughout gestation*. *Reprod Toxicol*, 1997. **11**(6): p. 833-42.
22. Gallardo-Williams, M.T., 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**(1): p. 73-8.

23. Bone, R., et al., *Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid*. *Biochemistry*, 1987. **26**(24): p. 7609-14.
24. Mahabir, S., et al., *Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women*. *Am J Epidemiol*, 2008. **167**(9): p. 1070-80.
25. Cui, Y., et al., *Dietary boron intake and prostate cancer risk*. *Oncol Rep*, 2004. **11**(4): p. 887-92.
26. Barranco, W.T. and C.D. Eckhert, *Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation*. *Cancer Lett*, 2004. **216**(1): p. 21-9.
27. Barranco, W.T. and C.D. Eckhert, *Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(6): p. 884-90.
28. Kim, D.H., et al., *Esterification of borate with NAD⁺ and NADH as studied by electrospray ionization mass spectrometry and 11B NMR spectroscopy*. *J Mass Spectrom*, 2003. **38**(6): p. 632-40.
29. Gold, K.A. and E.S. Kim, *Role of molecular markers and gene profiling in head and neck cancers*. *Curr Opin Oncol*, 2009. **21**(3): p. 206-11.
30. Gunduz, M., et al., *The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008. **8**(4): p. 275-84.
31. Friend, S.H., et al., *A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma*. *Nature*, 1986. **323**(6089): p. 643-6.
32. Sellers, W.R. and W.G. Kaelin, Jr., *Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(11): p. 3301-12.
33. Harbour, J.W., et al., *Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC*. *Science*, 1988. **241**(4863): p. 353-7.
34. Lee, E.Y., et al., *Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers*. *Science*, 1988. **241**(4862): p. 218-21.
35. Yandell, D.W., et al., *Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(25): p. 1689-95.

36. zur Hausen, A., et al., *Retinoblastoma-protein (pRb) expression and prognosis in squamous-cell carcinomas of the esophagus*. Int J Cancer, 1999. **84**(6): p. 618-22.
37. Wiest, T., et al., *Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control*. Oncogene, 2002. **21**(10): p. 1510-7.
38. van Houten, V.M., et al., *Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer*. J Pathol, 2002. **198**(4): p. 476-86.
39. Nathan, C.O., et al., *Correlation of p53 and the proto-oncogene eIF4E in larynx cancers: prognostic implications*. Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3599-604.
40. Wood, N.B., et al., *Mutation of p53 in squamous cell cancer of the head and neck: relationship to tumor cell proliferation*. Laryngoscope, 1997. **107**(6): p. 827-33.
41. Gupta, V.K., et al., *Multiple regions of deletion on chromosome arm 13q in head-and-neck squamous-cell carcinoma*. Int J Cancer, 1999. **84**(5): p. 453-7.
42. Kiuru, A., et al., *p53 mutations in human head and neck cancer cell lines*. Acta Otolaryngol Suppl, 1997. **529**: p. 237-40.
43. Shin, D.M., et al., *Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis*. Cancer Res, 1994. **54**(2): p. 321-6.
44. Brachman, D.G., *Molecular biology of head and neck cancer*. Semin Oncol, 1994. **21**(3): p. 320-9.
45. Brachman, D.G., et al., *Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer*. Cancer Res, 1992. **52**(17): p. 4832-6.
46. Strand, S. and P.R. Galle, *Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications*. Mol Med Today, 1998. **4**(2): p. 63-8.
47. Chaves, P., et al., *p53 protein immunoexpression in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent epithelium*. J Surg Oncol, 1997. **65**(1): p. 3-9.

48. Wang, L.D., et al., *p53 protein accumulation and gene mutations in multifocal esophageal pre-cancerous lesions from symptom free subjects in a high incidence area for esophageal carcinoma in Henan, China*. *Cancer*, 1996. **77**(7): p. 1244-9.
49. Ythier, D., et al., *The new tumor suppressor genes ING: genomic structure and status in cancer*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(7): p. 1483-90.
50. Garkavtsev, I., et al., *The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control*. *Nature*, 1998. **391**(6664): p. 295-8.
51. Gunduz, M., et al., *Allelic loss and reduced expression of the ING3, a candidate tumor suppressor gene at 7q31, in human head and neck cancers*. *Oncogene*, 2002. **21**(28): p. 4462-70.
52. Gunduz, M., et al., *Frequent deletion and down-regulation of ING4, a candidate tumor suppressor gene at 12p13, in head and neck squamous cell carcinomas*. *Gene*, 2005. **356**: p. 109-17.
53. Okano, T., et al., *Alterations in novel candidate tumor suppressor genes, ING1 and ING2 in human lung cancer*. *Oncol Rep*, 2006. **15**(3): p. 545-9.
54. Li, X., K. Kikuchi, and Y. Takano, *ING Genes Work as Tumor Suppressor Genes in the Carcinogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *J Oncol*, 2011. **2011**: p. 963614.
55. Kichina, J.V., et al., *Targeted disruption of the mouse ing1 locus results in reduced body size, hypersensitivity to radiation and elevated incidence of lymphomas*. *Oncogene*, 2006. **25**(6): p. 857-66.
56. Kumamoto, K., et al., *ING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression*. *Int J Cancer*, 2009. **125**(6): p. 1306-15.
57. Kumamoto, K., et al., *Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence*. *Cancer Res*, 2008. **68**(9): p. 3193-203.
58. Unoki, M., et al., *A novel ING2 isoform, ING2b, synergizes with ING2a to prevent cell cycle arrest and apoptosis*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(28): p. 3868-74.

59. Doyon, Y., et al., *ING tumor suppressor proteins are critical regulators of chromatin acetylation required for genome expression and perpetuation*. Mol Cell, 2006. **21**(1): p. 51-64.
60. Pascual, J., et al., *Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor*. J Mol Biol, 2000. **304**(5): p. 723-9.
61. Helbing, C.C., et al., *A novel candidate tumor suppressor, ING1, is involved in the regulation of apoptosis*. Cancer Res, 1997. **57**(7): p. 1255-8.
62. Scott, M., et al., *UV-induced binding of ING1 to PCNA regulates the induction of apoptosis*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 19): p. 3455-62.
63. Saito, A., et al., *p24/ING1-ALT1 and p47/ING1-ALT2, distinct alternative transcripts of p33/ING1*. J Hum Genet, 2000. **45**(3): p. 177-81.
64. Sanchez-Carbayo, M., et al., *Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays*. Am J Pathol, 2003. **163**(2): p. 505-16.
65. Zeremski, M., et al., *Structure and regulation of the mouse ing1 gene. Three alternative transcripts encode two phd finger proteins that have opposite effects on p53 function*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 32172-81.
66. Coles, A.H., et al., *Deletion of p37Ing1 in mice reveals a p53-independent role for Ing1 in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis*. Cancer Res, 2007. **67**(5): p. 2054-61.
67. Garkavtsev, I., D. Demetrick, and K. Riabowol, *Cellular localization and chromosome mapping of a novel candidate tumor suppressor gene (ING1)*. Cytogenet Cell Genet, 1997. **76**(3-4): p. 176-8.
68. Toyama, T., et al., *Suppression of ING1 expression in sporadic breast cancer*. Oncogene, 1999. **18**(37): p. 5187-93.
69. Feng, X., Y. Hara, and K. Riabowol, *Different HATS of the ING1 gene family*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(11): p. 532-8.

70. Pena, P.V., et al., *Histone H3K4me3 binding is required for the DNA repair and apoptotic activities of ING1 tumor suppressor*. J Mol Biol, 2008. **380**(2): p. 303-12.
71. Nagashima, M., et al., *A novel PHD-finger motif protein, p47ING3, modulates p53-mediated transcription, cell cycle control, and apoptosis*. Oncogene, 2003. **22**(3): p. 343-50.
72. He, G.H., et al., *Phylogenetic analysis of the ING family of PHD finger proteins*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(1): p. 104-16.
73. Coles, A.H. and S.N. Jones, *The ING gene family in the regulation of cell growth and tumorigenesis*. J Cell Physiol, 2009. **218**(1): p. 45-57.
74. Gunduz, M., et al., *Downregulation of ING3 mRNA expression predicts poor prognosis in head and neck cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(3): p. 531-8.
75. Wang, Y., et al., *Prognostic significance of nuclear ING3 expression in human cutaneous melanoma*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(14): p. 4111-6.
76. Wang, Y. and G. Li, *ING3 promotes UV-induced apoptosis via Fas/caspase-8 pathway in melanoma cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(17): p. 11887-93.
77. Fjelde, A., *Human tumor cells in tissue culture*. Cancer, 1955. **8**(4): p. 845-51.
78. Goldsher, M., et al., *Laryngeal carcinoma associated with multiple additional primary tumors*. Immunologic studies. Arch Otolaryngol, 1977. **103**(9): p. 550-2.
79. Armstrong, T.A., et al., *Long-term effects of boron supplementation on reproductive characteristics and bone mechanical properties in gilts*. J Anim Sci, 2002. **80**(1): p. 154-61.
80. Benderdour, M., et al., *In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds*. J Trace Elem Med Biol, 1998. **12**(1): p. 2-7.
81. Dupre, J.N., et al., *Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D-deficient diet*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 7**: p. 55-8.
82. Hegsted, M., et al., *Effect of boron on vitamin D deficient rats*. Biol Trace Elem Res, 1991. **28**(3): p. 243-55.

83. Hunt, C.D. and J.L. Herbel, *Effects of dietary boron on calcium and mineral metabolism in the streptozotocin-injected, vitamin D3-deprived rat*. *Magn Trace Elem*, 1991. **10**(5-6): p. 387-408.
84. Naghii, M.R. and S. Samman, *The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects*. *Biol Trace Elem Res*, 1997. **56**(3): p. 273-86.
85. Nielsen, F.H., et al., *Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women*. *FASEB J*, 1987. **1**(5): p. 394-7.