

Borotungstat Bileşğinin İnsan Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki
Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Elif Gözde Gökkaya

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2019

The Investigation of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Borotungstat on
Human Prostate Cancer (LNCaP) Cell Lines

Elif Gözde Gökkaya

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2019

Borotungstat Bileşiğinin İnsan Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki
Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi

Elif Gözde Gökkaya

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan

Ocak 2019

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Elif Gözde GÖKKAYA'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Borotungstat Bileşiğinin İnsan Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye : Prof. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. A. Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum “Borotungstat Bileşiğinin İnsan Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Sitotoksik Ve Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi, tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 10.01.2019

Elif Gözde GÖKKAYA

İmza

ÖZET

Çalışmamızda bir polioksometalat türevi olan borotungstatın 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri hücre dizisi (LNCaP) üzerindeki morfolojik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sitotoksik etki Nötral Kırmızısı (NR) ve 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid (MTT) testi kullanılarak konsantrasyona ve zamana bağlı olarak incelenmiştir. Çalışmamızda borotungstat ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluorurasil (5-FU) konsantrasyonları 1:1 oranında kombine kullanılarak hücre çoğalması üzerindeki antogonistik ve sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Son olarak hücre ölümünün apoptotik süreç ile gerçekleşip gerçekleşmediği ELISA yöntemiyle araştırılmıştır.

Borotungstatın hücre morfolojisi üzerindeki etkilerinin 24 saatte 50, 48 saatte ise 25 μM konsantrasyonundan itibaren başladığı gözlenmiştir. NR yöntemine göre IC_{50} değerleri 24 ve 48 saat için sırasıyla 160 ve 27 μM ; MTT yöntemine göre ise 115 ve 51 μM olarak hesaplanmıştır. 5-FU'ın denenen konsantrasyonlarında ise hem 24 hem de 48 saatte herhangi bir IC_{50} değeri belirlenememiştir. Kombine olarak denenen konsantrasyonların IC_{50} değerleri ise 24 saatte 68, 48 saatte ise 21 μM olarak hesaplanmıştır. Yapılan deneylerde 24 saatte 100 μM , 48 saatte ise 50 μM konsantrasyonundan sonra sinerjistik etkinin başladığı gözlenmiştir.

Hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik etki ise 50 ve 100 μM borotungstat konsantrasyonlarında araştırıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak apoptotik etkinin arttığı gözlenirken herhangi bir nekrotik etki gözlenmemiştir.

Sonuç olarak borotungstatın farklı konsantrasyonlarının LNCaP hücre hattı üzerinde hücre morfolojisini değiştirdiği, hücre çoğalmasını baskıladığı ilk kez gözlenmiştir. Ayrıca borotungstatın 5-FU ile birlikte kombine kullanımının ise yüksek konsantrasyonlarda hücre çoğalması üzerinde sinerjistik etki oluşturduğu ilk kez belirlenmiştir. Son olarak hücre ölümü üzerindeki etkisinin apoptoz vasıtasıyla gerçekleştirdiği de belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Borotungstat, polioksometalat, prostat kanseri, sitotoksiste, apoptoz

SUMMARY

In our study, the morphological and cytotoxic effects of 1, 10, 25, 50, 100, 150 and 200 μM concentrations of borotungstate on human prostate cancer cells (LNCaP) were investigated. The cytotoxic effects on cell proliferation were investigated by dose and time using Neutral Red (NR) and 3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. In addition, 5-Fluoruracil (5-FU), as the positive control, in combination with borotungstate, were investigated for their antagonistic and synergistic effects on cell proliferation. Finally, cell death was performed by apoptotic/necrotic process was investigated by ELISA.

It was observed that the effects of borotungstate on cell morphology started to show at 50 and 25 μM for 24 and 48 hours respectively. While NR method recorded IC_{50} values of 160 and 27 μM for 24 and 48 hours respectively; that of MTT method were calculated as 115 and 51 μM . No IC_{50} value was determined for the 5-FU's at both 24 and 48 hours. IC_{50} values of combined doses were calculated as 68 and 21 μM for two different time periods. The synergistic effects were observed first at 100 and 50 μM concentration for 24 and 48 hours respectively. In the cells, 50 and 100 μM borotungstate concentrations increased apoptotic effects concentrations depended manner.

In conclusion, different doses of borotungstate were observed to cause changes in the cell morphology of LNCaP and suppressed cell proliferation dose and time depended manner. Furthermore, borotungstate in combination with 5-FU at high doses showed synergistic effect. Cell death was effected by apoptosis.

Keywords: Borotungstate, Polyoxometalates, Prostate Cancer, Cytotoxicity, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgilerini, deneyimlerini ve yardımlarını benden esirgemeyerek bana katkıda bulunan çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle bana destek olan çalışma arkadaşlarım Hira UĞURLUGÜNGÖR ve Merve YILDIZ’a, çalışmalarım sırasında her türlü yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Eda GÖLEBATMAZ ve Elif SARILAR’a teşekkür ederim.

Son olarak ise tüm hayatım boyunca sevgilerini, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, görüşleri ve tecrübeleriyle bana ışık tutan ebedi danışmanlarım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	x
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Prostat Kanseri	3
2.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri	5
2.2.1. Yaş ve aile öyküsü	5
2.2.2. Irk	6
2.2.3. Hormonal faktörler	6
2.2.4. Beslenme	9
2.2.5. Sigara ve alkol kullanımı	9
2.2.6. Glutasyon S-Transferaz P1 (GSTP1).....	10
2.3. Prostat Kanserinin Tanısı	11
2.3.1. Dijital rektal muayene (DRE)	11
2.3.2. Prostat spesifik antijen (PSA)	11
2.3.3. Biyopsi.....	12
2.4. Prostat Kanseri Tedavisi	12
2.5. Bor	15
2.5.1. Borun kullanım alanları	15
2.5.1.1. <u>İnşaat alanında kullanımı</u>	15
2.5.1.2. <u>Tarım alanında kullanımı</u>	16
2.5.1.3. <u>Tekstil alanında kullanımı</u>	16
2.5.1.4. <u>Cam endüstrisinde kullanımı</u>	16

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.1.5. <u>Metalürji alanında kullanımı</u>	16
2.5.1.6. <u>Sağlık alanının kullanımı</u>	17
2.6. Polioksometalatlar	19
2.7. Borotungstat	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Hücrelerin Kültüre Alınması ve Çoğaltılması.....	22
3.2. Hücrelerin Deneye Alınması.....	22
3.3. Hücrelerin Ekimi	23
3.4. Borotungstat ve Pozitif Kontrol konsantrasyonlarının Hazırlanması.....	23
3.5. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi.....	24
3.6. Hücre Çoğalmasının Lizozomal Aktiviteye Bağlı Olarak İncelenmesi	24
3.7. Hücre Çoğalmasının Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak İncelenmesi.....	26
3.7.1. Borotungstat ve 5-FU konsantrasyonlarının Kombine Olarak Hazırlanması.....	28
3.8. Hücre Ölümünün Belirlenmesi.....	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Borotungstat'ın Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi	31
4.2. Borotungstat'ın Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Lizozomal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi	38
4.3. Borotungstat'ın Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi	40
4.4. 5-Fluorasil'in (5-FU) Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi	43
4.5. Borotungstat ve 5-FU konsantrasyonlarının Kombine Uygulanması Sonucu Oluşan Antagonistik/Sinerjistik Etkisinin Araştırılması	46
4.6. Hücre Ölümünün Belirlenmesi.....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
KAYNAKLAR DİZİNİ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Prostat'ın anatomisi.	3
2.2. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen kanser türleri.	4
2.3. Normal prostat ve büyümüş prostat (BPH).	5
2.4. Androjen Reseptörleri mekanizması.	7
2.5. Sisplatin kimyasal yapısı.	14
2.6. 5-Fluorourasil kimyasal yapısı.	15
2.7. Borotungstat maddesinin kimyasal yapısı.	20
3.1. MTT boyasının mitokondride formazana dönüşümü.	27
3.2. Kit çalışma prensibi.	29
4.1. Borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen kontrol grubu hücrelerindeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	31
4.2. 50 µM borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	32
4.3. 100 µM borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	32
4.4. 150 µM borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	33
4.5. 200 µM borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	33
4.6. Borotungstat konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilen kontrol grubu hücrelerindeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	34
4.7. 25 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	35
4.8. 50 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	35
4.9. 100 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	36
4.10. 150 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11. 200 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi.	37
4.12. Borotungstat'ın 50 µM konsantrasyonu ile 24 saat süreyle muamele edilen LNCaP hücrelerinin zarlarında oluşan apoptotik kabarcıklar.	38
4.13. Borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki 24 saat lizozomal aktiviteye etkisi.	39
4.14. Borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki 48 saat lizozomal aktiviteye etkisi.	39
4.15. Borotungstat'ın LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi.	41
4.16. Borotungstat'ın LNCaP hücre dizisi üzerinde 48 saatteki etkisi.	41
4.17. 5-FU'ın LNCaP hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik etkisi.	44
4.18. 5-FU'ın LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi.	45
4.19. Kombine olarak uygulanan maddelerin LNCaP hücre dizisi üzerinde 24 saatteki etkisi.	46
4.20. Kombine olarak uygulanan maddelerin LNCaP hücre dizisi üzerinde 48saatteki etkisi.	47
4.21. LNCaP hücre dizisinde borotungstat, 5-FU ve kombine (borotungstat + 5-FU) uygulamaların 24 saat için yüzde hücre sağ kalım oranları.	47
4.22. LNCaP hücre dizisinde borotungstat, 5-FU ve kombine (borotungstat + 5-FU) uygulamaların 48 saat için yüzde hücre sağkalım oranları.	48
4.23. Borotungstatın LNCaP hücre dizisi üzerindeki apoptotik etkisi.	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Deneyde uygulanan madde konsantrasyonları.	24
3.2. Deneyde kullanılan kombine uygulama konsantrasyonları.	28



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklamalar

%	Yüzde
°C	Celcius degree (Santigrat derece)
µL	mikrolitre (10^{-6} litre)
µm	mikrometre (10^{-6} metre)
µM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm ²	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
nm	nanometre
rpm	rounds per minute (dakikadaki devir sayısı)
g	gravity (göreceli santrifüj kuvveti)

Kısaltmalar

Açıklamalar

5-FU	5-Fluourasil
786-O	İnsan böbrek kanseri hücre dizisi
A549	İnsan akciğer karsinomu hücre dizisi
ABD	Amerika birleşik devletleri
ADT	Androjen baskılama tedavisi
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
AR	Androjen reseptörü
ARE	Androjen tepki elementleri
ATCC	Amerikan kültür koleksiyonundan
B	Bor
BA	Borik asit
BP	Boraks pentahidrat

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

Açıklamalar

Caco2	İnsan kolon kanseri hücre dizisi
CCL-62	İnsan amniyotik epitelyal hücre dizisi
DHT	5 α -dihidrotestosteron
DLD-1	İnsan kolon kanseri hücre dizisi
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPD	Disodyum pentaborat dekahidrat
DRE	Dijital rektal muayene
DU-145	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
ECC-1	Endometriyal adenokarsinoma hücre dizisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Östrojen reseptörü
FBS	Fetal bovine serum (Fetal dana serumu)
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GR	Glukokortikoid reseptörü
GSTP1	Glutasyon S-Transferaz P1
HBSS	Hank's Balance Salt Solution (Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu)
HeLa	İnsan serviks karsinom hücre dizisi
HPAEpiC	İnsan alveolar epitel hücreleri
HT-29	İnsan kolon kanseri hücre dizisi
HT29	İnsan kolorektal kanser hücre dizisi
IARC	Uluslararası Kanser Ajansı
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon/doz
LH	Luteinize edici hormonun
LHRH	Lüteinleştirici hormon-salıcı hormon
LNCaP	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
MCF7	İnsan meme karsinom hücre dizisi
Mo	Molibden

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar****Açıklamalar**

MÖ	Milattan Önce
MR	Mineralokortikoid reseptör
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid
NR	Nötral red (Nötral kırmızısı)
PBS	Fosfat buffer saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)
PC3	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
PNT1-A	İnsan prostat epitelyal hücre dizisi
POM	Polioksometalat
PR	Progesteron reseptörü
PSA	Prostat spesifik antijen
SHBG	Seks hormonu bağlayıcı globülin
SPSS	Statistics program for social and science
USEPA	Amerika birleşik devletleri çevre koruma ajansı
vd.	Ve diğerleri
W	Tungsten
WHO	Dünya sağlık örgütü

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, farklı etkenlerle genetik olarak değişikliğe uğrayan hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması olarak tanımlanmaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012). İnsanlık tarihi kadar eski olan bu hastalık ile ilgili ilk kayıtlara MÖ 3000 yılından itibaren rastlanmaktadır. Hastalığın tedavisi ile ilgili pek çok aşama kaydedilmiş olmasına rağmen bazı kanser türleri dışında hastalığın tedavisinde henüz tam bir başarı elde edilememiştir. Bu nedenle günümüzde hala hastalığın etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için araştırmalar devam etmektedir (Baykara, 2016).

Prostat kanseri erkeklerde idrar kesesinin altında yer alan ceviz büyüklüğündeki prostat dokusundaki hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlamasıyla oluşan bir hastalıktır. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre dünyada görülme sıklığı en yüksek ikinci kanser türüdür. Prostat kanserinin tedavisi için cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi kullanılsa da bu yöntemler her zaman tedavide etkili bir sonuç vermemektedir. Bu durum bilim insanlarını hastalığın tedavisinde kullanılabilecek yeni yöntemlerin ve/veya ilaçların araştırılmasına teşvik etmektedir.

Yeni sentez edilen ve yapılarında metal içeren kimyasal kompleksler *in vitro* ortamlarda farklı kanser türlerinin çoğalması üzerindeki etkileri araştırılmış ve çoğunun güçlü sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Yıldız vd., 2017). Polioksometalatlar (POMs), metal oksit türevleridir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda birçok POM türevinin kanserli hücre hatları üzerinde sitotoksik etkinliği gösterilmiştir (Menon vd., 2011).

Bor, doğada serbest halde bulunmayan, atom numarası 5 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip bir eser elementtir. Bor suda bor formunda bulunurken, besinlerde borik asit formunda bulunur ve insanlar için mikro besin elementidir (Demirtaş, 2010). Bor elementi gastrointestinal sistemde içme suyu ve bitki kaynaklı gıdalardan neredeyse tamamen emilir ve kanda borik asit olarak dolaşır. Yapılan çalışmalarda borik asitin prostat kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Barranco vd., 2006, Eckhert vd., 2004).

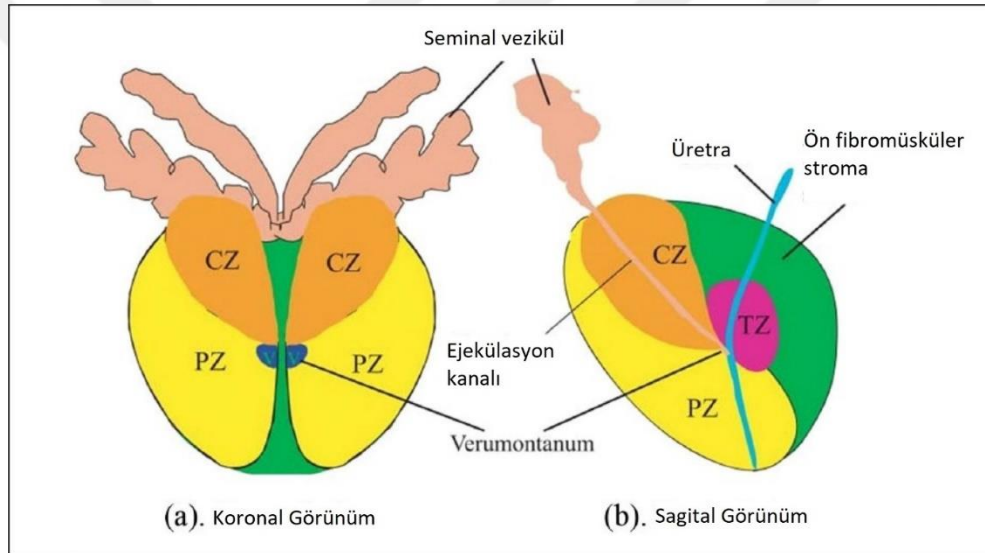
Çalışmamızda ilk olarak bir polioksometalat türevi olan ve yapısında bor elementi bulunan borotungstat maddesinin 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisi üzerindeki morfolojik etkileri belirlenmiştir. Daha sonra çalışmamızda hücre çoğalması üzerindeki sitotoksik etkileri Nötral Kırmızısı (NR) ve 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid (MTT) testi kullanılarak konsantrasyona ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Borotungstat ile pozitif kontrol olarak kullanılan 5-Fluourasil (5-FU) aynı konsantrasyonlarda kombine kullanılarak hücre çoğalması üzerindeki antagonistik ve sinerjistik etkileri MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Son olarak borotungstatın 50 ve 100 μM konsantrasyonlarının hücre ölümü üzerindeki apoptotik/nekrotik etkileri ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.



2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

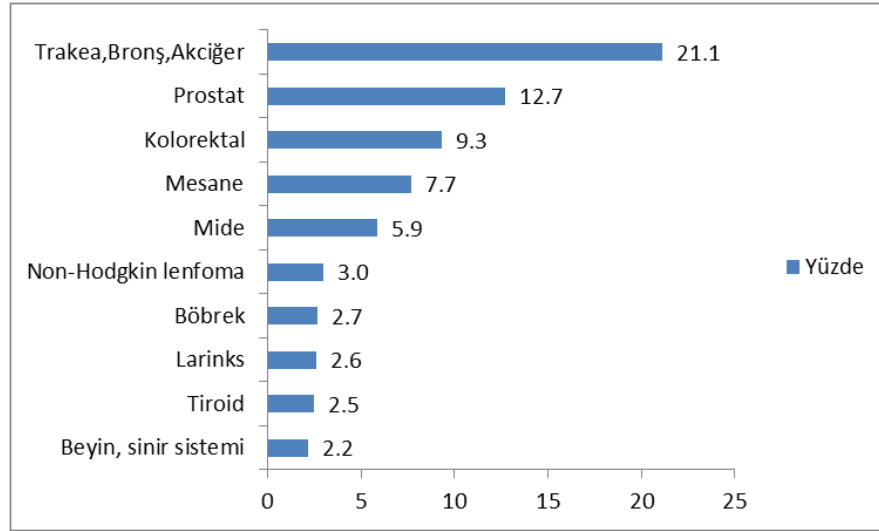
2.1. Prostat Kanseri

Prostat, erkeklerde idrar kesesinin altında yer alan ceviz büyüklüğünde bir organdır. Normal prostat 18 gr ağırlığında, 3 cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde ve 2 cm kalınlığında olup içerisinden prostatiküretra geçmektedir (Wein vd., 2014). Prostat 1968 yılında McNeal tarafından Şekil 2.1’de görüldüğü üzere, transizyonel zon, periferal zon, santral zon ve ön fibromüsküler stroma olmak üzere dört bölgeye ayrılmıştır (Selman, 2011).



Şekil 2.1. Prostat'ın anatomisi (CZ: Santral Zon, PZ: Periferal Zon, TZ: Transizyonel Zon) (Palmeri vd., 2015).

Prostat kanseri, prostat bezindeki hücrelerin malign büyümesi sonucu ortaya çıkmaktadır. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan verilerine göre tüm dünyada akciğer kanserinden sonra görülme sıklığı en yüksek ikinci kanser türüdür (Globocan, 2012). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu'ndan alınan istatistiklere göre ise Türkiye’de erkeklerde en sık görülen ikinci kanser çeşididir (Şekil 2.2).

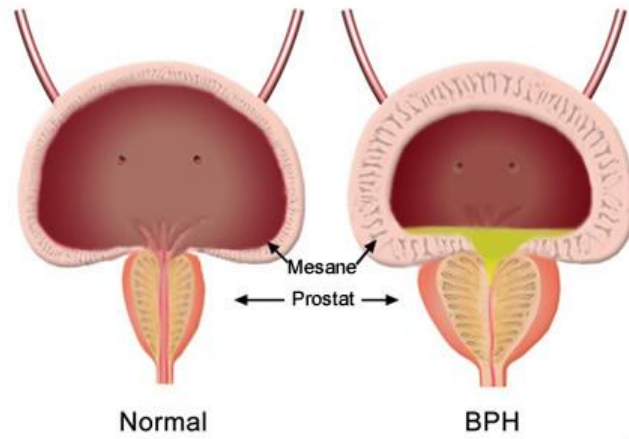


Şekil 2.2. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen kanser türleri (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, 2017).

Prostat kanserinin görülme sıklığı erkeklerde yaşa bağlı olarak artmaktadır. Erkeklerde 50 yaşından sonra risk artmakla birlikte teşhis koyulan vakaların yaklaşık olarak % 85'i 65 yaşın üzerindedir (Grönberg, 2003).

Prostat kanserleri hücre hatları genel olarak 3 türe ayrılmaktadır; LNCaP, PC3 ve DU-145. LNCaP hücre dizisi, insan prostat adenokarsinomudur, lenf nodu metastazı yapmaktadır ve androjen bağımlıdır. PC3 hücre dizisi, insan prostat adenokarsinomudur ve 4. evre androjen bağımsızdır. DU-145 hücre dizisi ise insan prostat karsinomudur, beyin metastazı yapmaktadır ve hormon bağımsız çoğalmaktadır (Avcı vd., 2013)

Prostat dokusunda prostatitis ve Bening Prostat Hiperplazisi (BPH) gibi non-malign hastalıklar da görülebilir. BPH, prostat bezindeki stromal ve epitelyal elemanların aşırı büyüyerek prostat hacminin artmasını ifade etmektedir (Şekil 2.3, Dönmez ve Mungan, 2011). BPH, dünyada erkeklerde en çok görülen benign hastalıktır ve görülme sıklığı (insidans) yaşa bağlı olarak artmaktadır (Jedinak vd., 2015).



Şekil 2.3. Normal prostat ve büyümüş prostat (BPH) (Anonim, 2018).

Avrupa ulusal kayıt verilerine göre 50 yaş üzerindeki erkeklerin % 62'sinde BPH görülmektedir. BPH görülme oranı yaşa bağlı olarak artmaktadır. 31-40 yaş arasındaki erkeklerin % 8'inde BPH bulguları gözlenirken, 51-60 yaş arasındaki erkeklerin % 50'sinde, 61-70 yaş arasındaki erkeklerin % 70'inde ve 81-90 yaş arasındaki erkeklerin % 90'ında bu bulgular görülmüştür (Acar, 2009).

2.2. Prostat Kanseri Risk Faktörleri

Prostat kanseri pek çok farklı etken tarafından tetiklenen bir hastalıktır. Yaş ve aile öyküsü, ırk, hormonal faktörler, beslenme, sigara ve alkol kullanımı gibi faktörlerin prostat kanseri riskini arttırdığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006).

2.2.1. Yaş ve aile öyküsü

Prostat kanseri insidansı ilerleyen yaşla birlikte katlanarak artar. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde prostat kanseri teşhisi konulan erkek hastaların % 80'i 65 yaş üstüdür. Çok sayıda çalışma birinci dereceden akrabalarında prostat kanseri öyküsü olan erkek hastalarda hastalık riskinin yaklaşık 3 kat arttığını göstermiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006).

Prostat kanseri geçişi ailesel olabilmektedir. Ailesel prostat kanseri; bir ailede birden fazla prostat kanseri tanısı olmasını ifade etmektedir. Prostat kanseri vakaların % 20'si aileseldir. Ailesel prostat kanserinin temeli prostat kanserine yatkınlık genlerinin kalıtsal olarak aktarılması olabileceği gibi, aynı çevresel faktörlere maruz kalma sonucu da olabilir. Ailesel ve kalıtsal prostat kanseri terimleri genetik yatkınlık sebebiyle prostat kanseri için yüksek risk olduğunu ifade etmektedir fakat aynı anlama gelmemektedir. Kalıtsal prostat kanserinde otozomal dominant, X'e bağlı veya otozomal resesif kalıtsal aktarımın olduğu ifade edilmektedir. Ailesel Prostat kanserinde ise Mendel kurallarına uygun kalıtım olması önemli değildir (Hsing ve Chokkalingam, 2006). Yapılan bir başka çalışmada ise prostat kanserinin % 42'sinin genetik faktörlerle açıklanabileceği rapor edilmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006).

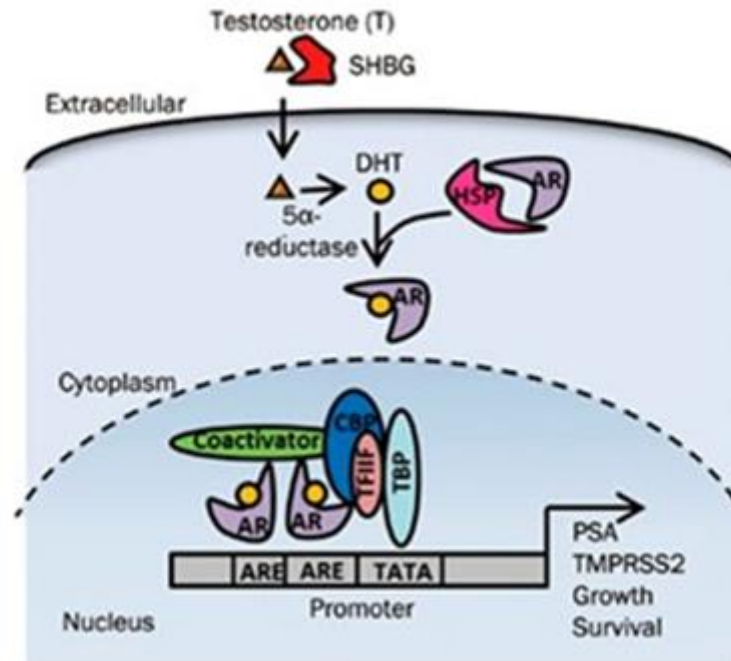
2.2.2. Irk

Yapılan araştırmalara göre Afro-Amerikalılar dünyadaki en yüksek prostat kanseri insidansına sahiptir. Çinli erkekler ise Afro-Amerikalılara göre yaklaşık 60 kat daha düşük riske sahiptirler. Prostat kanserinin 5 yıllık sağ kalım oranı siyahilerde % 62 iken beyazlarda % 72 olarak belirlenmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006, Jemal vd., 2008).

2.2.3. Hormonal faktörler

Prostat dokusunun gelişimi, farklılaşması ve devamlılığı için androjenlere ihtiyaç duyuduğu belirlenmiştir. Androjenler, prostat üzerindeki bu etkilerini Androjen Reseptörleri (AR) aracılığıyla gerçekleştirmektedirler (al ve şimşir, 2005). Erkek cinsel farklılaşması, androjenlerin yokluğunda veya işlevsel bir androjen reseptörü (AR) olmadan gerçekleşemez. Erkeklerde AR fonksiyonu kaybı, androjen duyarsızlık sendromu ile sonuçlanır. Androjen reseptörü, östrojen reseptörü (ER), glukokortikoid reseptörü (GR), progesteron reseptörü (PR) ve mineralokortikoid reseptör (MR) gibi reseptörlerin steroid hormon grubuna aittir. AR, spesifik genlerin ifadesini kontrol eden bir ligand bağımlı transkripsiyon faktörüdür. AR'nin kendi doğal ligandlarının 5 α -dihidrotestosteron (DHT) ve testosterona bağlanması, erkek cinsel gelişimini ve farklılaşmasını başlatır. Androjenlerin ve AR'nin mevcut eylem modeli şekil 2.4'te gösterilmiştir. Testosteron gibi androjenler, ön hipofiz bezi tarafından üretilen luteinize edici hormonun (LH) regölasyonu altında öncelikle testislerdeki Leydig

hücreleri tarafından sentezlenir. LH salgısı, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) tarafından düzenlenir. Testosteron üretildikten sonra, çoğunlukla serum seks hormonu bağlayıcı globulin (SHBG) ve albümine bağlı olarak dolaşır. Sadece serbest form prostat hücrelerine girer (Tan vd., 2014).



Şekil 2.4. Androjen Reseptörleri mekanizması (Tan vd., 2014).

Testosteron, 5α-redüktaz enzimi tarafından dihidrotestosterona (DHT) dönüştürüldüğü prostat epitelyal hücrelerine yayılır. DHT, transkripsiyon faktörlerinin nükleer hormon reseptörü ailesinin bir üyesi olan AR'ye bağlanır. Ligand bağlanması üzerine, AR çekirdeğe translokasyon yapar, homodimerizasyona uğrar ve PSA gibi AR-hedef genlerinin promotörleri içindeki androjen tepki elementlerine (ARE) bağlanır. AR daha sonra kofaktörleri toplar ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, metabolizmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Dadwal vd., 2018).

Androjen reseptörlerini kontrol eden proteinin X kromozomu üzerindeki AR geni tarafından kodlandığı bulunmuştur. Dihidrotestosteron'un (DHT) ise AR ile bağlanarak prostat hücresi içerisinde DHT-AR kompleksi oluşturduğu ve bu kompleksin DNA'daki

androjen yanıt elemanına bağlanarak DNA sentezini ve hücre proliferasyonunu uyardığı belirlenmiştir (Çal ve Şimşir, 2005).

Testosteron ve dihidrotestosteron hormonlarının yokluğunda dokunun apoptoza girdiği görülmüştür. Fakat prostat kanseri hücrelerinin bazı adaptasyon mekanizmaları geliştirerek hızla yaşamlarını devam ettirebildikleri de belirlenmiştir. Bu durumun hücrelerin geçirmiş oldukları genetik değişiklikler sonucunda androjenden bağımsız olarak çoğalabilme özelliğini kazanmalarıyla gerçekleştiği belirlenmiştir (Çal ve Şimşir, 2005).

Prostat kanseri ilerlemesi, hücre çoğalması/ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Prostat kanserinde proliferasyon hızı hücre ölüm oranından daha yüksektir. Androjenler ve AR bu oranın ana düzenleyicileridir. Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesi, androjenik uyarıma bağlıdır. AR'nin prostat kanserindeki etkisi bu reseptöre olan ilginin artmasına neden olmuştur. Yaklaşık 70 yıl önce, Charles Huggins orşiektomi (testislerin çıkarılması) yapılan hastalardaki androjen yoksunluğunun prostat kanserinin gerilemesine neden olduğunu göstermiştir. Böylece DHT ve testosteron gibi androjen hormonlarının bloke edilmesi ile prostat kanserinin tedavi edilebileceği belirlenmiştir (Tan vd., 2014).

Laboratuvar çalışmaları, androjen hormonlardan biri olan testosteron uygulamasının sıçanlarda prostat kanserine neden olduğunu ve androjenlerin hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. Bununla beraber ilginç bir şekilde bugüne kadar yapılan farklı çalışmalarda dolaşımdaki androjen miktarının prostat kanseri ile ilgisi araştırılmış ve sadece bir çalışmada yüksek serum testosteron düzeyinin prostat kanseri riskini arttırdığı gözlenmiştir (Hsing ve Chokkalingam, 2006).

Androjenden yoksun bırakılarak yapılan tedavinin amacı prostat kanseri hücrelerini androjenden yoksun bırakarak androjenlerin dolaşımdaki miktarını önemli ölçüde azaltmayı hedeflemektedir (normal aralığın %5'i kadar azaltma). Bu işlemde, testislerin cerrahi olarak çıkartılması (kastasyon) veya kimyasal olarak, luteinizan hormon salgılatıcı hormon agonistleri ya da flutamid, nilutamid ve bikalutamid gibi birinci jenerasyon antiandrojen ilaçları kullanılarak AR'ye DHT bağlanmasını bloke etmesi sağlanır (Dadwal vd., 2018).

Bununla birlikte, bu tip bir tedavinin etkisi geçicidir. Çünkü hastalar genellikle artmış AR ekspresyon seviyelerinden veya AR'nin antiandrojenlere karşı dirençli olmasına neden olan mutasyonlardan kaynaklanan kastrasyona dirençli bir form geliştirdiklerinden hastalık nükseder ve hücreler androjenden bağımsız olarak çoğalma özelliği kazanırlar (Çal ve Şimşir, 2005). Hastalık süreci boyunca AR aşırı eksprese edilmeye devam etmektedir ve bu aşırı ekspresyon ileri evre androjen bağımsız hastalarda bile gözlenmektedir. AR yoğunluğunun artmasıyla AR geninde de değişiklikler görülmektedir. Bu değişiklikler genellikle nokta mutasyonudur. AR sadece androjenler tarafından aktive edilirken bu mutasyonlar sonucunda artık farklı steroidler tarafından da aktive edilebilir hale gelmektedir (Gnanapragasam vd., 2000).

2.2.4. Beslenme

Çalışmalar, prostat kanseri ve beslenme arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bazı diyet modellerinin, prostat kanseri riskini ve/veya ilerlemesini azalttığı konusunda çalışmalar bulunmaktadır (Grosso vd., 2017, Ruiz ve Hernández, 2014). Sebze, zeytinyağı, kompleks karbonhidratlar, yağsız et ve antioksidanlar bakımından yüksek olan akdeniz diyetlerinin kardiyovasküler hastalık ve obezitenin önlenmesi için hastalara tavsiye edildiği bilinmektedir. Bununla beraber bu beslenme tipinin prostat kanserinin önlenmesinde de etkili olduğu görülmüştür. Akdeniz diyetinde balık ve omega-3 yağ asidi tüketimi daha düşük prostat kanseri riskiyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca metastatik olmayan prostat kanseri tanısı konulan hastalar akdeniz diyetine uygun beslendiğinde hayatta kalma olasılığının arttığı görülmüştür. Bununla birlikte, kırmızı et, işlenmiş et, kızartılmış balık, patates kızartması, yüksek yağlı süt ve beyaz ekmek gibi besinler içeren batı tipibeslenmenin prostat kanseri için yüksek bir risk oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca soya ve yeşil çay bazlı fitokimyasalların yüksek tüketimine sahip olan Asya ülkelerinde prostat kanseri insidansının, batı tipi beslenen ülkelere kıyasla daha düşük olduğu da görülmüştür (Lin, 2015, Ruiz ve Hernández, 2014).

2.2.5. Sigara ve alkol kullanımı

Sigara kullanımı tüm kanser türleriyle % 80 oranında ilişkilidir (Reiter ve deKernion, 2005). Yapılan gözlemsel bir grup çalışmada, sigara kullanımının prostat kanseri

insidansından ziyade yayılımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Yang vd., 2015).Yapılan bir diğer grup çalışmasına göre ise yeni prostat kanseri teşhisi koyulmuş hastalarda tütün kullanımının prostat kanserinden ölüm oranını arttırdığı belirtilmiştir (Wilson vd., 2016). Bununla birlikte sigara dumanının ise insan prostat kanseri (PC3) hücre dizisi üzerinde hücre büyümesini ve VEGF sekresyonunu arttırdığı belirtilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda bile olsa düzenli olarak sigara dumanına maruz kalınmasının kişi sigara kullanmasa da ileri evre ve yüksek dereceli prostat kanseri için risk oluşturduğu rapor edilmiştir (Yang vd., 2015).

Aşırı alkol tüketiminin prostat kanseri için ağır risk oluşturduğu görülmüştür. Alkol kullanımı yaşa göre değişebildiğinden, alkol kullanımının prostat kanseri riskine etkisine bakmak için zamana bağlı değerlendirmelere ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Geriye dönük çalışmaların kısıtlılıklarını gidermek için ağır alkol kullanıcıları arasında kantitatif değerlendirme ile grup çalışmalarına ihtiyaç vardır (Dennis ve Hayes, 2001).

2.2.6. Glutasyon S-Transferaz P1 (GSTP1)

Çeşitli sebepler ile oluşan reaktif oksijen türleri lipit, protein ve DNA gibi önemli hücre bileşenlerine zarar verirler (Ma, 2010). Son çalışmalar Glutasyon S-transferazların çeşitli kanser tiplerinin gelişimiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Wei vd., 2013).Glutasyon S-Transferaz P1 (GSTP1) gen ailesi, hücreleri oksidatif strese korumak için serbest radikalleri inaktive eden enzimlerin salgılanmasını sağlar (Şahin vd., 2017). GSTP1, prostat dokusunda çoğunlukla bazal prostat epitelyumunda eksprese edilmektedir. GSTP1'in prostat kanserine yatkınlıkta önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Wei vd., 2013). Normal prostat dokusundan alınan örneklerde GSTP1 ekspresyonu yüksek seviyelerdeyken prostat kanseri dokusundan alınan örneklerde hipermetilasyona uğrayarak ekspresyonun azaldığı görülmüştür. GSTP1'in hipermetilasyona uğrayarak ekspresyonunun azalmasına prostat kanserinde oldukça sık rastlanmaktadır (Şahin vd., 2017). GSTP1 fonksiyonunun erken kaybının, prostat karsinogenezinde rol oynayan oksidan ve heterosiklikamin karsinojenlere karşı daha fazla hassasiyete neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, GSTP1 genetik polimorfizmine bağlı GSTP1 fonksiyonundaki kalıtsal farklılığın, prostat karsinogeneziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Wei vd., 2013). GSTP1 metilasyon seviyesi prostat kanseri seviyesi ve prostat kanseri nüksü ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, prostat kanseri dokusunda GSTP1 promotör metilasyonunun daha yüksek olması yüksek nüks riski ile

ilişkili bulunmuştur. GSTP1 metilasyon seviyesindeki artış prostat kanserinin, BPH'tan ayırt edilmesini sağlamaktadır (Maldonado vd., 2014).

2.3. Prostat Kanserinin Tanısı

Prostat kanseri tanısı dijital rektal muayene (DRE), serum Prostat Spesifik Antijen (PSA) konsantrasyonu ve biyopsi uygulamaları sonucunda konulur. Yapılan bir araştırmaya göre bu testler içerisinde PSA ölçümü düşük hata oranına sahipken PSA ölçümü ile rektal muayenenin birlikte değerlendirilmesi en düşük hata oranına sahiptir (Catalona, 1991).

2.3.1. Dijital rektal muayene (DRE)

Prostat bezinin büyüklüğü ve sertliği hakkında bilgi veren bir inceleme yöntemidir. Prostat kanseri varlığında prostat serttir ve boyutunda artış oluşur. Fakat bu durum kansere spesifik olmayıp kanser tanısı için daha ileri tetkiklere ihtiyaç duyulmaktadır (Kirby ve Madhavan, 2010; Loeb ve Catalona, 2007).

2.3.2. Prostat spesifik antijen (PSA)

Prostat spesifik antijen (PSA) 30kDa ağırlığında, 237 amino asit ve bir karbonhidrat zincirinden oluşan proteazaisi üyesi enzimdir. PSA, normal ve malign prostat epitel hücreleri tarafından salgılanmaktadır. Fakat patolojik koşullar altındamiktarında oldukça büyük bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle prostat kanserinin erken teşhisinde PSA miktarı sıklıklabiyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca prostat kanserinin tedaviye yanıt verip vermediğinin belirlenmesinde genellikle PSA oranına bakılarak hastalığın tedavi süreci kontrol edilmektedir (Tomao vd., 2014).

PSA malign prostat epitel hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda ($>4.0\text{ng/mL}$) salgılanır. Yüksek PSA değeri yalnızca kanser olgularında değil prostatit ve BPH olgularında da gözlenmektedir. Bu nedenle PSA miktarındaki artış her zaman prostat kanserinin spesifik belirteci olarak değerlendirilemez. Bu sebeple prostat kanseri teşhisi ancak biyopsi ile konulabilmektedir. ABD ve Avrupa'da normal PSA değeri 4 ng/mL olarak

kabul edilmekte ve bu değerin üzerinde değerlere sahip hastalar biyopsiye yönlendirilmektedir (Zeliadt vd., 2011).

2.3.3. Biyopsi

Prostat kanseri kesin tanısı ancak biyopsi ile konulabilmektedir. İğne biyopsisi yöntemiyle dokudan alınan parça histolojik incelemeye tabi tutularak teşhis koyulmasına yardımcı olur. Rektal muayene sonuçlarına göre biyopsi uygulamasına karar verme konusunda kabul edilmiş genel bir görüş varken, PSA değerine göre biyopsi uygulamasına karar verme konusunda kabul edilmiş genel bir değer bulunmamaktadır. (Ünsal vd., 2006)

ABD’de 4 ng/mL PSA değeri hastalara biyopsi yapılabilmesi için uygun görülmekteyken Ulusal Kapsamlı Kansere Ağ (National Comprehensive Cancer Network-NCCN)’na göre 2,5 ng/mL’nin üzerindeki hastalara prostat biyopsisi yapılması önerilmektedir. Ülkemizde de bu değer 2,5 ng/mL olarak kabul edilmekte ve bu değer üzerindeki hastalara genelde biyopsi uygulanmaktadır (Zeliadt vd., 2011, Bodakçi vd., 2012, Ceylan vd., 2017).

2.4. Prostat Kanseri Tedavisi

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi prostat kanserinde de hastalığın erken tanısı büyük önem taşımaktadır. Prostat kanserinin tedavisine karar verilirken hastanın genel durumu, hastalığın evresi ve biyolojik özelliklerinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Tüm bunlar bir arada değerlendirilerek hastalara en uygun tedavi yönteminin seçilmesine karar verilir.

Brakiterapi prostat kanseri tedavisinde kullanılan bir radyoterapi türüdür. Radyasyon kaynağının tümörün içine veya yakınına yerleştirilmesiyle uygulanan bir tedavi yöntemidir. Eski bir tedavi yöntemi olmasına rağmen, henüz uzun süreli çalışmalar yayınlanmamıştır (Yılmaz ve Ünsal, 2013). Radyoterapi yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte yapılan bazı çalışmalarda prostat kanserli hastalarda hormonal tedavi ile birlikte uygulanan radyoterapinin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. (Nomiya vd., 2013)

En sık uygulanan tedavi yöntemlerinden biri androjen baskılama tedavisidir (ADT). Androjen bağımlı tümörler başlangıçta yüksek androjen seviyelerinden kaynaklandığı için androjenlerin baskılanmasıyla tedavi edilebilmektedir. Daha önceleri hastalığın tedavisinde tedavi yöntemi olarak löprolid (Lupron), goserelin (Zoladex), buserelinvenafarelin gibi lüteinleştirici hormon-salıcı hormon (LHRH) agonistleri kullanılmıştır. Bu agonistler kabaca serumdaki testosteron seviyesini düşürmeyi amaçlar. Yapılan çalışmalarda LHRH agonistleri kullanımının hastalarda % 70-80 arasında tümör büyümesini azalttığı bulunmuştur. Ancak LHRH agonistleri kullanımının ateş basması, cinsel işlev bozukluğu gibi yan etkilere neden olduğu saptanmıştır. Fakat ABD başta olmak üzere birçok ülkede bu tedavi yöntemi aktif olarak kullanılmaktadır (Denmeade ve Isaacs, 2002).

Bir diğer ADT yöntemi ise androjen bloke edici steroid ajanlardır. Siproteron asetat gibi steroid ajanlar libido ve cinsel işlevlerde azalma, karaciğer hiperplazisi gibi yan etkilere neden olmaktadır. Flutamid, nilutamid, bikalutamid gibi steroid olmayan ajanlar ise bu tür yan etkilere neden olmazken serumda testosteron artışına neden olmaktadır. Bu anti-androjenlerle LHRH agonistlerinin kombine kullanımının ise yan etkileri azalttığı gözlenmiştir (Denmeade ve Isaacs, 2002).

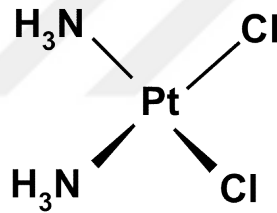
Hastalığın ilerleyen evrelerinde kanser hücreleri hormonlardan bağımsız olarak büyümeye devam ederek hormon dirençli hale geldiği gözlenmiştir. Prostat kanseri hormon dirençli hale gelen hastalarda kemoterapi uygulamaları yapılmaktadır. Fakat bununla birlikte hastalığın ilerlemesini önlemek amacıyla hormon tedavisiyle birlikte de uygulanabilmektedir (Gleave ve Kelly, 2005). Yapılan çalışmalarda hastalığın erken evrelerinde kemoterapiye başlanmasının sağ kalımı arttırdığı gözlenmiştir (Akınsal ve Sofikerim, 2010). Kemoterapötik ilaçlar adjuvan ve neoadjuvan tedaviler için kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda kemoterapinin hastalığın seyri ve tedavisi üzerinde başarılı sonuçlar gösterdiği gözlenirse de yapılan çalışma sayılarının yetersizliği nedeniyle deneysel tedaviden öteye geçememektedir. Daha fazla hasta sayılı ve uzun soluklu araştırmalar bu tedavinin önünü açacaktır (Gleave ve Kelly, 2005).

Kemoterapide kullanılan ilaçlardan biri olan dosetakselin şiddetli derecede saç dökülmesine neden olduğu belirtilmektedir. Bunun yanında en önemli yan etkisi ise kemik iliği üzerine etki etmesi olduğu belirtilmiştir. Yan etkilerinin şiddetine göre verilen

konsantrasyonun azaltılması veya tedaviye ara verilmesi gerekebilmektedir (Akınsal ve Sofikerim, 2010).

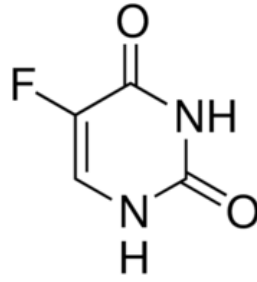
Estramustin kemoterapötik ajan olarak kullanılan bir diğer ilaçtır. Oral yolla alındığı için diğer ilaçlara göre daha avantajlıdır. En çok gözlenen yan etkileri gastrointestinal ve kardiyovasküler toksisitelerdir. Bazı diğer kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etki oluşturduğundan genelde kombine tedavilerde tercih edilmektedir (Akınsal ve Sofikerim, 2010).

Sıklıkla kullanılan bir diğer ilaç ise sisplatindir. Sisplatin (cis-diamindikloroplatinum, CDDP) DNA çift zincirlerinin arasına ve zincir içine çapraz bağlanır (Şekil 2.5). Kanser hücrelerinde DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozarak etki eder. En önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Bazı hastalarda tek doz sisplatin sonrasında akut böbrek yetmezliği olduğu gözlenmiştir (Erkurt vd., 2009).



Şekil 2.5. Sisplatin kimyasal yapısı (Erkurt vd., 2009).

Bizim de araştırmamızda kullanmış olduğumuz 5-Fluorouracil (5-FU) ise prostat malignitelerin kemoterapisinde kullanılan sitotoksik bir ajandır (Şekil 2.6). Nükleozit metabolizmasına müdahale eden geniş spektrumlu bir moleküldür. DNA ve RNA'ya bağlanarak timidilatsentaz inhibitörü olarak görev yapar ve apoptozu başlatır. Sıklıkla kullanılmasına rağmen hızlı metabolizmasından dolayı yarı ömrü kısadır ve geniş spektrumlu olmasından dolayı geniş bir *in vivo* dağılım sergiler (Bijnsdorp vd., 2010). Sitotoksik etkisini gösterebilmesi için bir monofosfat formu olan florodeoksiüridinmonofosfat (FdUMP)'a aktive edilmelidir. FdUMP kararlı bir üçlü kompleks oluşturarak timidilatsentazın güçlü ters inhibitörü olarak etki gösterir. 5-FU, trifosfat formları (florüridintrifosfat (FUTP) ve florodeoksiüridintrifosfat (FdUTP)) aracılığıyla RNA ve DNA ile etkileşerek etki eder (El-Hammadi vd., 2016).



Şekil 2.6. 5-Fluorouracil kimyasal yapısı (Avcı ve Tunçbilek, 2017).

2.5. Bor

Bor, atom numarası 5, atom ağırlığı 10,8 gram, erime noktası 2300 °C olan bir elementtir. Metalle ametal arası olan yarı iletken özelliklere sahiptir. Doğada serbest halde bulunmaz. Genelde diğer elementlerle borik asit formunda bulunmaktadır. Oksijenle bağ yapmaya yatkın olduğu için doğada pek çok bor-oksijen bileşiği bulunmaktadır (Demirtaş, 2010).

Türkiye dünya bor rezervinin yaklaşık % 72'sine sahiptir. Sahip olduğu bor cevherlerinin kalitesi ile de dünyanın önde gelen ülkelerindendir (Demirtaş, 2010). Türkiye'deki bor rezervlerinin çoğunluğu ülkemizin batı kesimlerinde yer almaktadır. Eskişehir, Bursa, Balıkesir'de bor madenlerinin olduğu bilinmektedir (Yılmaz, 2002).

2.5.1. Bor'un Kullanım Alanları

Bor sanayi sektöründe yaklaşık 300 farklı üründe kullanılmaktadır (Demirtaş, 2010). Bor, inşaat, tarım, tekstil gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda borun insan sağlığı için önemi de anlaşılmıştır. Sağlık alanında kanser, kemik erimesi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği yönünde farklı araştırmalar yapılmaktadır (Yakıncı ve Kök, 2016).

2.5.1.1. İnşaat alanında kullanımı

Bor ürünleri inşaat sektöründe çatı kaplama malzemeleri, selülozik yalıtım malzemeleri ve çimento katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gazete kağıtları ve pamuk

gibi atıkların borik asit veya borik asit ve boraks karışımı gibi malzemelerle muamele edilmesiyle elde edilen selülozik yalıtım malzemeleri ABD ve İskandinav ülkelerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Yakıncı ve Kök, 2016).

2.5.1.2. Tarım alanında kullanımı

Bor, bitki beslenmesinde önemli bir mikro besin elementidir. Bitkiler tarafından topraktan ya da yer altı sularından emilen borun çoğunluğu hücre duvarında birikerek devamlılığını sağlar. Nükleik asit sentezi ve dolayısıyla da protein sentezi için oldukça önemlidir. Borun az olduğu ortamlarda bitkilerin kök gelişiminde, çiçek ve meyve oluşumunda yavaşlama ve gerileme olduğu görülmektedir. Normalin üzerinde bor beslenmesi olan bitkilerde ise toksik etki göstermektedir. Ayrıca bor bakımından fazla beslenen bitkilerde solunum şiddetinin arttığı görülmektedir (Uygan ve Çetin, 2004).

2.5.1.3. Tekstil alanında kullanımı

Bor, yanmayı geciktirici özelliğinden dolayı cam elyaf halinde tekstil sektöründe kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra kumaş boyalarında kullanıldığı gibi kumaşlarda ağartıcı olarak da kullanılabilmektedir (Yakıncı ve Kök, 2016).

2.5.1.4. Cam endüstrisinde kullanımı

Tüm dünyada bor kullanımının %42'si cam endüstrisindedir. Boro silikat camlar, tekstil cam elyafı ve yalıtım cam elyafı cam endüstrisinde bor bileşiklerinin ana kullanım yeridir. Bor oksit, susuz boraks, borik asit gibi bor bileşikleri halinde veya boraks ya da kolemanit gibi mineraller şeklinde cama katılmaktadır. Bor genişmeyi düşürdüğü için ısıl şoklara dayanıklılığı arttırmaktadır. Özellikle cam elyafı, elektrik, tarım, gıda, taşımacılık, endüstriyel uygulamalar gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Yakıncı ve Kök, 2016).

2.5.1.5. Metalürji alanında kullanımı

Bor, erime sıcaklığını düşürme, çeliği sertleştirme ve fırın tuğlalarının aşınmasını azaltma gibi özelliklerinden dolayı metalürji sanayinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca

kaplama sanayinde kullanılan elektrolitlerin oluşturulması ve lehimleme işlemlerinde de tercih edilmektedir (Yakıncı ve Kök, 2016).

2.5.1.6. Sağlık alanında kullanımı

Bor insan vücuduna ağız ve solunum yolu ile girebilir. Borun canlılara geçmesi ise pek çok şekillerde olabilir. Canlılar, sudaki bor mineralleriyle temas ederek, bor yataklarından zengin havzalardaki yeraltı ve yerüstü sularını içerek ya da kullanarak, bor yoğunlukları yüksek yiyecek ve içecekleri tüketerek alabilmektedirler (Demirtaş, 2010).

ABD ve Avrupa’da yapılan araştırmalara göre insanlar bir öğün yemekte ortalama 1-2 mg bor almaktadırlar. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) yetişkin sağlıklı bir insanın beslenme yoluyla günde 1-13 mg bor alabileceğini belirtmiştir. Bor insan sağlığı için toksik bir mineral değildir. Örneğin yapılan çalışmalarda 88,8 gram bor alımının bile insan sağlığı açısından ciddi bir hasara neden olmadığı belirlenmiştir. Fakat literatürde kısa sürede çok yüksek miktarda bor alımı veya tozuna maruz kalınması sonunda kusma, ishal, baş dönmesi, titremeler gibi zehirlenme belirtilerinin gözlemlendiği görülmüştür. Bazı vakalarda ise deride döküntü, karaciğer, böbrek ve merkezi sinir sisteminde bozukluklar ortaya çıktığı rapor edilmiştir (Demirtaş, 2010).

Yapılan farmakokinetik araştırmalarda borun gastrointestinal sistemden genelde borik asit olarak hızlıca ve yaklaşık olarak tamamının (>%90) emildiği kanıtlanmıştır (Jensen vd., 1984). Çocuklar, yetişkinler ve deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda ise hasar görmemiş deri üzerinden bor alımının olmadığı rapor edilmiştir (Friis-Hansen, 1982).

Besinler ve içme suları ile bor alımının normal bir sonucu olarak insan dokularında ve vücut sıvılarında bor bulunabilmektedir. Borun kemiklerde birikmeyip gözenmiştir. Ayrıca kas, kalp, akciğer ve bağırsakta da az miktarda da olsa bor bulunduğu belirtilmiştir. ABD Çevre Koruma Ajansı (USEPA) ve WHO standartlarına göre, içme ve kullanma sularındaki sınır değeri 0,3 mg/L olarak belirtilmiştir. Fakat ETİ Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü ARGE Daire Başkanlığı, Çevre Müdürlüğü tarafından bor üretim alanında uzman tıp bilim adamlarına yaptırılan bilimsel araştırmalarda içme sularındaki 1 mg/L

seviyesindeki değerlerin toksik olmadığı gözlenmiştir. Araştırmalara göre düşük konsantrasyonlarda bor ve bor bileşikleri toksik olmayıp, özellikle borik asit ve sodyum boratlar antiseptik özelliklere sahiptir (Demirtaş, 2010).

Boratlar düşük konsantrasyonlarda emilimleri sırasında mukozal yüzeylerde ve fizyolojik pH derecesinde borik aside dönüştürölmektedir. Borik asidin farklı biyolojik moleköller ile kompleksler oluşturabileceği de rapor edilmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalar borik asidin hidroksil, amino ve tiyol gruplarına karşı ilgisi olduğunu ortaya koymaktadır (USEPA, 2004).

Yapılan bir çalışmada sıçanlar öncelikle tarım ilacı olarak sıklıkla kullanılan ve vücutta oksidatif stres oluşturan malatyon (malathione) toksisitesine maruz bırakılmıştır. Daha sonra sıçanlar bora maruz bırakıldığında böbrek, karaciğer ve beyin dokuları ile kanda glutatyon düzeyini, süperoksitdismutaz ve katalaz aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir. Böylece borun oksidatif stresi azalttığı ve doku hasarını önleyebileceği rapor edilmiştir (Yarat, 2017).

Borun yara iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada bazı borbileşiklerinin sıçanlarda ikinci derece yanık yaralarının iyileşmesini sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada borun bakteri, maya ve mantarlara karşı antimikrobiyal bir etki gösterdiği de rapor edilmiştir (Kuru ve Yarat, 2017).

Yapılan araştırmalara göre borun vücuttaki kalsitonin, 17 β estradiol, triiodothyronin, 25- hidroksikolekalsiferol ve testosteron gibi bazı hormonların düzeyinde değişiklik yaptığı bildirilmiştir. Östrojen, post menopozal dönemdeki kadınlarda estradiol konsantrasyonunu arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmaya göre bu dönemdeki kadınlarda borun az alınmasının bu dönüşümün baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmaya göre postmenopozal dönem kadınlarda ve 45 yaş üstü erkeklerde beslenmeyle yetersiz bor alınması sonucunda serum kalsitriol düzeyinde azalma olduğu rapor edilmiştir (Gezmen-Karadağ ve Türközü, 2014).

Yapılan çalışmalarda borun, tiroid hormonunun aktivasyonuna ve metabolizmasına da etki ettiği belirtilmiştir. Tiroid hormonunun reseptörleri ve hücre membranını uyararak bu etkiyi yaptığı rapor edilmiştir (Gezmen-Karadağ ve Türközü, 2014).

Yapılan çalışmalar borun kanser hastalığı üzerinde de etkili olduğunu ispat etmektedir. Yapılan bir çalışmada borik asitin insan prostat kanserinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (Eckhert ve Barranco, 2004). Yine yapılan farklı bir çalışmada borik asitin prostat kanseri hücreleri üzerinde morfolojik etkileri olduğu gösterilmiştir (Eckhert ve Barranco, 2006). Bir diğer çalışmada ise borun farklı bileşiklerinin (borik asit, boraks pentahidrat, disodyumpentaboratdekahidrat) serviks kanseri hücre dizilerinden biri olan HeLa hücreleri ile kontamine edilen insan amniyotikepitelyal hücre dizisinde (CCL 62) hücre proliferasyonunu baskıladığı belirtilmiştir (Kahraman vd., 2013). Farklı bir çalışmada ise tungsten borid nanopartiküllerinin (WB ve W₂B karışımı)insan alveolar epitel hücreleri (HPAEpiC) üzerinde hücre çoğalmasını baskılayıcı etkileri olduğu bildirilmiştir (Türkez vd., 2017).

2.6. Polioksometalatlar

Polioksometalatlar (POM), geçiş metalleri ve oksijen atomlarından oluşan negatif yüklü kümelerdir ve yapısı iki asırdan fazla süredir bilinmektedir (Wenxiu vd., 2011;Song ve Tsunashima, 2012). Boyut, şekil, polarite, yüzey yük dağılımı ve redoks potansiyeli bakımından çeşitlilikleri nedeniyle hedef makromoleküllerle kolayca etkileşebilmekte ve bağlanabilmektedirler(Shah vd., 2014). POM'ların çok çeşitli dinamik moleküler yapı göstermesi, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olması nedeniyle geniş uygulama alanlarına sahiptir. Dolayısıyla araştırmacılar, özellikle yüzey, elektronik, enerji, çevre, yaşam bilimleri ve günlük hayatımızla yakından ilişkili gelişmekte olan alanlara dikkat çekerek, POM tabanlı moleküler ve kompozit materyaller üzerinde çalışmalar yapmaktadırlar (Song ve Tsunashima, 2012).

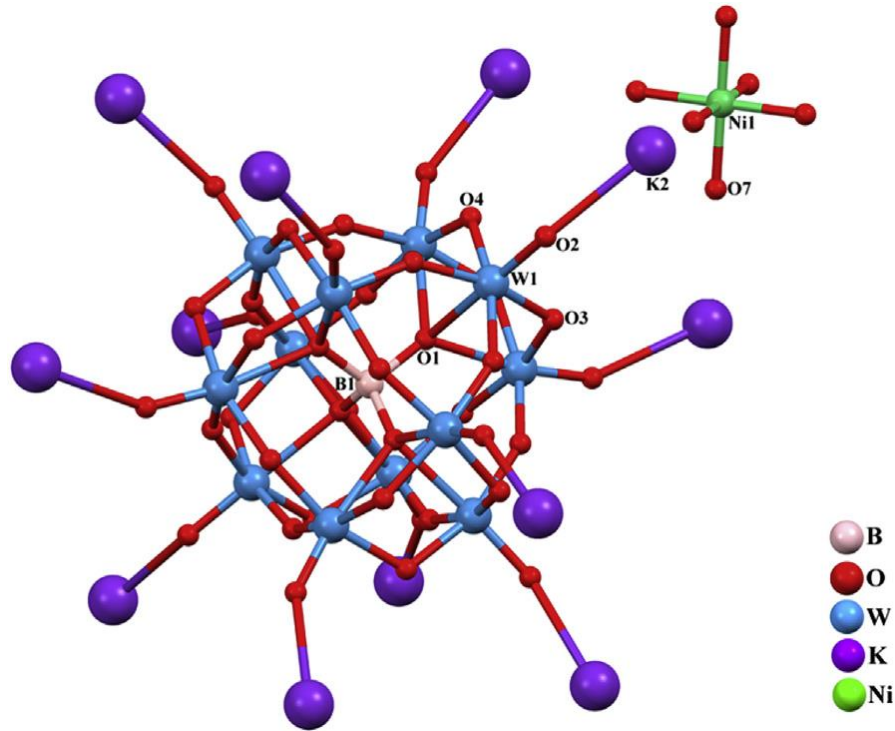
Sentezlenen farklı POM'ların özellikle metal iyonlarıyla bağlantı yaptığı bilinmektedir. Özellikle bu tip POM'ların kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksiteleri araştırıldığında özellikle Molibden (Mo) veya Tungsten (W) içerdiği belirlenmiştir (Wenxiu vd., 2011). Yapılan çalışmalarda POM'ların pankreas kanseri, lösemi, hepatosellüler

karsinom, kolon karsinoması, yumurtalık kanseri, mide kanseri gibi çeşitli kanser türlerini tedavi etme potansiyeline sahip olduğu tespit edilmiştir (Shah vd., 2014).

Farklı bir çalışmada ise POM'ların antitümör aktivitesinin insan kolorektal kanser (HT29) hücre dizisinde, siklofosamid ve 5-FU gibi klinik uygulamalarda kullanılan klasik antitümör ilaçların aktivitesine benzediği ancak toksisitenin 5-FU'den çok daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, potansiyel terapötik faydalarına rağmen, POM temelli hibrid ilaç örnekleri çok nadirdir. Bu nedenle daha uzun süreli ve detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Fu vd., 2015).

2.7. Borotungstat

Borotungstat, $(K_{16}[Ni(H_2O)_6]_2[BW_{12}O_{40}]_4 \cdot 48H_2O)$ Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde yeni sentez edilmiş bir POM türevidir.. Madde, oda sıcaklığında sentezlenmiş ve X-ışını tek kristal diferaksiyonları, element analizleri, IR spektrumları ve termogravimetrik analizleri yapılarak karakterize edilmiştir. Molekülün üç boyutlu yapısı Şekil 2.7'de gösterilmiştir (Olgun vd., 2017).



Şekil 2.7 Borotungstat maddesinin kimyasal yapısı (Olgun vd., 2017).

Borotungstatın herhangi bir kanser hücre dizisi üzerindeki olası sitotoksik etkileri araştırılmamıştır. Bu amaçla çalışmamızda prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisi üzerindeki borotungstatın farklı konsantrasyonlarının ilk olarak morfolojik daha sonra sitotoksik aktivitesi iki farklı sitotoksisite tayini yöntemi kullanılarak konsantrasyona ve zamana bağlı olarak araştırılmıştır. Kullanılan hücre dizisi prostat kanserinin androjen bağımlı adenokarsinoma türü içerisinde yer almaktadır. Daha sonra ise prostat kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-FU ile birlikte kombine verilmesi durumunda prostat kanseri hücrelerinin çoğalması üzerindeki antagonistik/sinerjistik etkileri incelenmiştir. Ardından borotungstatın iki farklı konsantrasyonunun hücre dizisi üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hücrelerin Kültüre Alınması ve Çoğaltılması

Deneylerde Amerikan Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alınarak, -196°C’de dondurularak saklanan insan prostat kanseri (LNCaP; CRL1740™) hücre dizisi kullanılmıştır. Hücreler steril kabin içine alındıktan sonra oda sıcaklığında çözölmüş ve daha sonra 15 ml’lik falkon tüplere aktarılmış ve üzerine % 10 Fetal Dana Serum (FBS, Sigma-Aldrich), % 1 penisilin-streptomisin çözöltisi (Sigma-Aldrich) ve Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) içeren 10 mL besi ortamı ilave edilmiştir. Daha sonra +10°C, 5 dakika, 1200 devir/dakikasantrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak hücrelerin bulunduğı pellet%10 Fetal Dana Serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin çözöltisi ve Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) besi ortamı içeren 25 cm²’lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için kültür kapları 37°C’de, % 5 CO₂ ve % 100 nem içeren karbondioksitli inkübatöre (Thermo) kaldırılmıştır.

Hücreler iki günde bir 10 mL taze besi ortamı ile beslenerek çoğalmaları ters ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse, TC100) gözlenmiştir. Hücreler %70-80 oranında yoğunluğa ulaştığında pasajlanarak 75 cm²’lik kültür kaplarına aktarılmıştır. Hücrelerin besi ortamı iki günde bir değıştirilmiş ve haftada bir kez pasajlanmıştır. Bu sayede hücrelerin devamlılığı sağlanmıştır.

3.2. Hücrelerin Deneye Alınması

Deneye alınacak hücreler 3 mL’lik % 0,25’lik Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich) solüsyonu ile 5 dakika boyunca muamele edilmiştir. Muamele süresi sonunda mikroskop altında kontrol edilen hücreler tabandan ayrıldıktan sonra içinde 9 mL besi yeri bulunan santrifüj tüpüne aktarılmış,+10°C, 5 dakika, 1200 devir/dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak hücre pelleti 2 mL besi yeri içerisinde pipet yardımıyla homojenize edilmiştir. Daha sonra hücre sayımı için Tripan Mavisi Boyası (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Bu boyama yöntemi canlı hücreler ile ölü hücreleri birbirinden ayıran bir yöntemdir. Ölü hücreler Tripan Mavisi Boyasını hücre zar bütönlüğü bozulduğu için içlerine

alırken, canlı hücreler hücre zarı sağlam olduğu için hücre içine almazlar (Uliasz ve Hewett, 2000). Bu sayede canlı/ölü hücre oranı belirlenebilir. Canlı hücre sayısını belirlemek için 0,5 μL Tripan mavisi boyası, 0,3 μL Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich) ve 0,2 μL hücre süspansiyonu bulunan karışım 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiş ve 10 μL alınarak hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) sayılmıştır.

3.3. Hücrelerin Ekimi

Hücreler hücre sayım cihazında sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarına, 100 μL içerisinde her bir kuyucukta 1×10^4 canlı hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ekim yapılan kültür kapları 37 °C'de, % 5 CO_2 ve %100 nem içeren karbondioksitli inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

3.4. Borotungstat ve Pozitif Kontrol Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Deneylerde kullanılan Borotungstat maddesi Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde sentez edilmiştir. Borotungstat 5 mL distile su içerisinde çözülerek 10 mM'lık ana stok solüsyonu hazırlanmıştır. Deneylerde Borotungstat'ın ana stok solüsyonundan DMEM içerisinde seyreltilmesi ile hazırlanan 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM 'lık konsantrasyonları kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Negatif kontrol grubu olarak ise herhangi bir konsantrasyon içermeyen sadece besi ortamı içeren gruplar seçilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak 5-Fluorurasil (5-FU, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Toz halde ticari olarak satın alınan 5-FU, Dimetil Sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 10 mM'lık ana stok solüsyon hazırlanmıştır. Deneylerde ana stok solüsyondan DMEM kullanılarak seyreltilen 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM 'lık 5-FU dozları kullanılmıştır. (Çizelge 3.1). Çalışmada 200 μM 'lık 5-FU dozu içinde bulunan DMSO'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek için çözücü kontrol grubu da denenmiştir. Negatif kontrol grubu olarak ise herhangi bir doz içermeyen sadece besi ortamı içeren gruplar seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneyde uygulanan madde dozları.

Kontrol grubu: Sadece besi ortamı	Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
Borotungstat 1 μM konsantrasyon grubu	5-FU 1 μM doz grubu
Borotungstat 10 μM konsantrasyon grubu	5-FU 10 μM doz grubu
Borotungstat 25 μM konsantrasyon grubu	5-FU 25 μM doz grubu
Borotungstat 50 μM konsantrasyon grubu	5-FU 50 μM doz grubu
Borotungstat 100 μM konsantrasyon grubu	5-FU 100 μM doz grubu
Borotungstat 150 μM konsantrasyon grubu	5-FU 150 μM doz grubu
Borotungstat 200 μM konsantrasyon grubu	5-FU 200 μM doz grubu
	5-FU 200 μM DMSO doz grubu

24 saatlik inkübasyon süresinin sonunda borotungstat ve 5-FU dozları her bir kuyucuğa 100 μL hacim içerisinde ilave edilmiştir. Çalışmada 24 ve 48 saat süre ile denenen dozların hücre canlılığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyucuk kullanılacak şekilde deney planlanmıştır.

3.5. Hücrelerin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Çalışmamızda borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre morfolojisi üzerindeki konsantrasyona ve zamana bağlı etkilerini belirlemek amacı ile 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 μL besi ortamı içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda borotungstat konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ters ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Gözlenen hücresel değişiklikler ise “Kameram 21” programıyla görüntülenmiştir.

3.6. Hücre Çoğalmasının Lizozomal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

Borotungstat konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerindeki lizozomal etkisini tespit etmek için lizozomal aktiviteye bağlı 3-amino-7-dimetil-2-metilphenazin hidroklorid (Nötral Kırmızı1) testi kullanılmıştır. Nötral kırmızı1 (NR, Sigma-Aldrich), canlı hücrelerin lizozomunda biriken, suda çözünen ve kolorimetrik hücre canlılığını belirlemede kullanılan

katyonik bir boyadır. (Borenfreund and Puerner, 1984; Popiolkiewicz, et al., 2005; Weyermann, et al., 2005). Boyanın hücre içine alınımı endositozla gerçekleşir (Putnam, et al., 2002). Hücrelerin lizozomal membranlarında oluşan hasar sonucunda boyanın hücre içine alınması güçleşir. Dolayısıyla lizozomal membranları hasara uğrayan hücreler endositoz yapamaz ve sağlıklı hücrelerle ölü hücreler birbirinden ayrılmış olur.

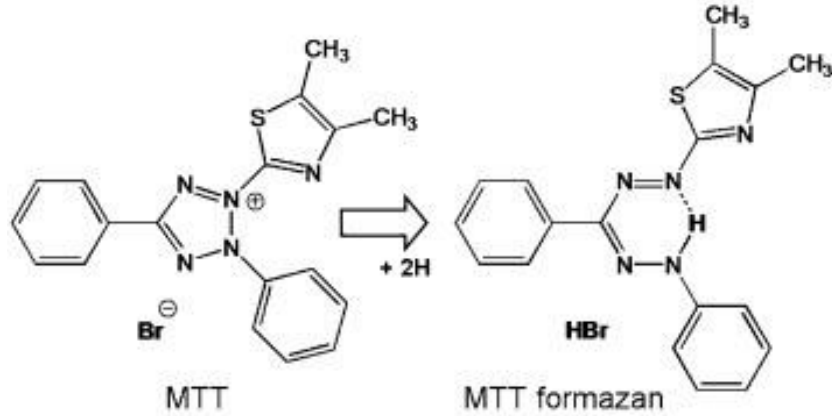
Araştırmamızda LNCaP hücreleri üzerinde borotungstat konsantrasyonlarının konsantrasyona ve zamana bağlı etkilerini belirlemek amacı ile 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodu sonunda borotungstat konsantrasyonları kuyucuklara eklenmiştir. Kültür kapları 24. ve 48. saatin sonunda inkübatörden çıkarılarak kuyucuklardaki besi ortamı uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuk 100 µL Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS, Sigma-Aldrich) ile yıkanmıştır. Ardından tüm kuyucuklara 1:100 oranında DMEM ile çözülerek hazırlanmış 100 µL Nötral Kırmızısı eklenerek 37 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm kuyucuklardaki boya uzaklaştırılarak 100 µL PBS ile yıkanmış ve ardından 1 mL formaldehit:1 mL kalsiyum klorürden oluşan fiksatif solüsyon eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardaki fiksatif solüsyonu uzaklaştırılarak 1 mL asetik asit:99 mL %50’lik etanol ile hazırlanan okutma solüsyonundan 100 µL tüm kuyucuklara eklenerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kültür kapları ELISA okuyucuda (BioTek, Powerwave XS) solüsyonun homojen hale gelmesi için 1 dakika çalkalanmış ve 540 nm dalga boyunda okunmuştur (Komissarova, et al., 2005).

Deneyler 3 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler Statistics Program for Social and Science Version 23 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey’in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. SPSS analizinden hesaplanan sonuçlar kullanılarak kontrole kıyaslandığında hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan konsantrasyon hesaplanarak IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca grafiklerin hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office, 2016) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılıklar çizilen grafiklerde uygun işaretler (*) ile gösterilmiştir.

3.7. Hücre Çoğalmasının Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

Borotungstat ve 5-FU dozlarının hücre çoğalması üzerindeki sitotoksik etkisini tespit etmek için mitokondriyal aktiviteye bağlı 3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazoliumbromid (MTT) testi kullanılmıştır. MTT (Applichem) boyası canlı hücreler tarafından hücre içine alınarak mitokondride formazana dönüştürülebilen bir boyadır (Stepanenko and Dmitrenko, 2015). Canlı hücrelerde, MTT boyasının tetrazolium içeren halkası, mitokondride bulunan süksinatdehidrogenaz enzimi yardımıyla parçalanarak suda çözilemeyen formazan kristallerine dönüştürülmektedir (Şekil 3.1). Bu kristaller hücre zarının içerisinde toplanmaktadır. Oluşan formazan uygun çözücüler ile çözülüp serbest kaldığında kolorimetrik olarak ölçülebilmektedir. Canlı hücreler MTT boyasını formazana dönüştürebilirken, ölü ya da mitokondrisi hasar görmüş hücreler ise formazana dönüştüremez. Bu nedenle oluşan formazan kristalinin yoğunluğu hücre canlılığının spektrofotometrik olarak ölçülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Abe and Matsuki, 2000).

Denenen borotungstat ve 5-FU konsantrasyonlarının konsantrasyona ve zamana bağlı etkilerini incelemek için 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda konsantrasyonlar kuyucuklara eklenmiştir. 24. ve 48. saatin sonunda 96 kuyucuklu kültür kapları inkübatörden çıkarılarak her bir kuyucuğa 20 µL MTT (5 mg/mL) eklenmiş ve 3 saat 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kültür kaplarındaki besi yeri uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenip karanlıkta 5 dakika bekletilerek oluşan formazan kristallerinin hücre dışına çıkması sağlanmıştır. Daha sonra kültür kapları ELISA okuyucuda 550 nm dalga boyunda okunmuştur (Oztopcu-Vatan vd.,2017).



Şekil 3.1. MTT boyasının mitokondride formazana dönüşümü (Stockert, et al., 2012).

MTT ürünü olan formazan yaşayan hücre sayısı ile bağlantılı olduğundan, ilaç verilen kuyularda okunan optik yoğunluk kontrole göre yaşayan hücrelerin yüzdesine çevrildi. Bu işlem aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Yıldız-Özer, 2018).

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{\text{Her bir kuyucuktaki madde verilen hücre absorbanısı} \times 100}{\text{Kontrol hücrelerinin ortalama absorbanısı}}$$

Prostat kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri de 5-FU'dir. Hücreler 5-FU dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş daha sonra her bir kuyuya 20 μL MTT (5 mg/mL) eklenmiş ve 3 saat 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda kültür kaplarındaki besi yeri uzaklaştırılarak ve her bir kuyucuğa 100 μL DMSO eklenmiş ve 5 dakika karanlıkta bekletilerek oluşan formazan kristallerinin hücre dışına çıkması sağlanmıştır. Ardından kültür kapları ELISA okuyucuda 550 nm dalga boyunda okunmuştur.

Her bir deney en az 3 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen veriler Statistics Program for Social and Science Version 23 (SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. SPSS analizinden hesaplanan sonuçlar kullanılarak kontrole kıyaslandığında hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan doz hesaplanarak IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca grafiklerin

hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office, 2016) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılıklar çizilen grafiklerde uygun işaretler (*) ile gösterilmiştir.

3.7.1 Borotungstat ve 5-FU Konsantrasyonlarının Kombine Olarak Uygulanması

Çalışmada borotungstat ile birlikte kombine olarak verilen 5-FU arasındaki antagonistik/sinerjistik etkileşimler insan prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisi üzerinde araştırılmıştır. Borotungstat ve 5-FU dozlarının 24 ve 48 saat süre ile 1:1 oranında uygulanması sonucunda oluşan çoğalmayı baskılayıcı etki MTT yöntemi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.2). Deneyler 3 kez tekrar edilmiştir

Elde edilen veriler Statistics Program for Social and Science Version 2 3(SPSS) programında, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ardından Tukey'in çok yönlü karşılaştırma yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. SPSS analizinden hesaplanan sonuçlar kullanılarak kontrolle kıyaslandığında hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan doz hesaplanarak IC_{50} değeri olarak belirlenmiştir. Ayrıca grafiklerin hazırlanmasında ise Microsoft Excel (Office, 2016) programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılıklar çizilen grafiklerde uygun işaretler (*) ile gösterilmiştir.

Çizelge 3.2.Deneyde kullanılan kombine uygulama dozları.

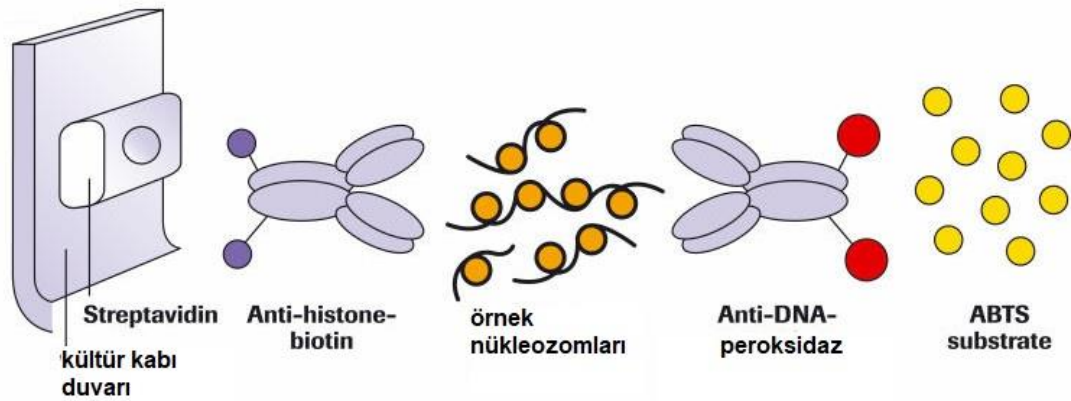
Kontrol grubu: Sadece besi ortamı
Borotungstat ve 5-FU 1 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 10 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 25 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 50 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 100 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 150 μ M doz grubu
Borotungstat ve 5-FU 200 μ M doz grubu

Borotungstat ve 5-FU arasındaki antagonistik/sinerjistik etkileşim ise ilaç etkileşim katsayısı (CDI) formülüne göre hesaplanmıştır (Yıldız-Ozer, 2018).

$$\text{CDI: } \frac{\text{Kombine Doz Absorbansı} \times 100}{\text{Borotungstat Absorbansı} \times 5\text{-FU Absorbansı}}$$

3.8. Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Hücre ölüm şeklinin (apoptoz veya nekroz) belirlenebilmesi için bu deneyde Roche Cell Death ELISA Plus Kit kullanılmıştır. Bu kit mononükleozom ve oligonükleozomların fotometrik olarak tayini esasına dayanmaktadır. Kit içerisinde çıkan anti-histon-biotin antikoru nükleozomunhiston kısmına bağlanır ve biotin kısmı ise streptavidin kaplı kuyuya bağlanarak immünokompleksi kuyuya sabitler. Anti-DNA-POD antikoru ise nükleozomun DNA kısmına bağlanmaktadır. ABTS-substratın anti-DNA-POD ile bağlanmasıyla kompleks tamamlanmış olur ve fotometrik olarak nükleozomların kantitatif tespiti gerçekleşir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2.Kit çalışma prensibi (Anonim, 2016).

Hücre ölüm şeklini belirlemek amacıyla 96 kuyucuklu kültür kaplarına 100 µL besi ortamı içerisinde 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler MTT verilerine bakılarak seçilen 50 ve 100 µM borotungstat konsantrasyonları ile muamele edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda 96 kuyucuklu kültür kabı inkübatörden alınarak 25°C’de, 200g’de, 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından nekrozun belirlenmesi için seçilen kuyuların süpernatantı çekilerek bir ependorf tüpüne alınmıştır. Apoptoz belirlenmesi için ise seçilen kuyulara 200 µL lizis tamponu eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda kültür kabı 25°C, 200 g’de, 10 dakika daha santrifüj edilmiştir. Süre sonunda kit içerisinde çıkan streptavidin kaplı kuyulara 80 µL immunoreagent ajan eklendikten sonra üzerlerine 20 µL örnek eklenmiştir. Streptavidin kaplı kuyuların üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat, 300 devir/dakika çalkalanmıştır.

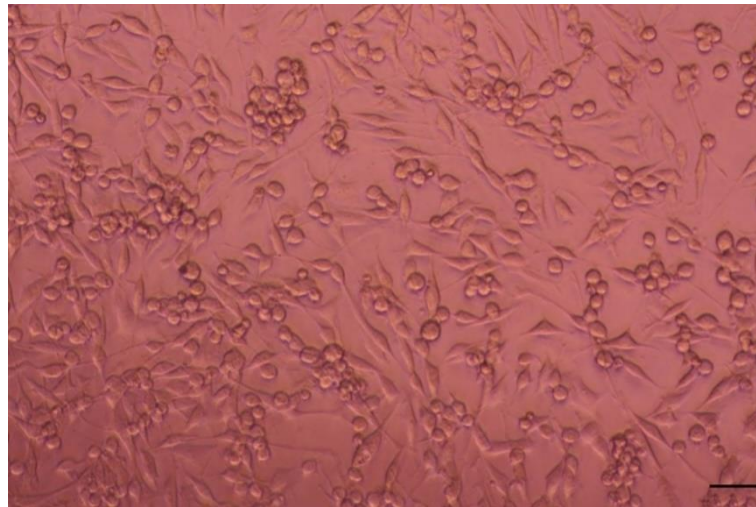
Süre sonunda örnekler alınarak içeriği boşaltılmıştır. Ardından tüm kuyular 300 µL inkübasyon tamponu ile 3 kez yıkandıktan sonra her kuyuya 100 µL ABTS solüsyon eklenerek karanlıkta, 250 devir/dakika, 10 dakika çalkalanmıştır. Süre sonunda reaksiyonu durdurmak için 100 µL kuyulara ABTS-Stop Solüsyon eklenmiştir. Ardından örnekler ELISA okuyucuda 405 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen veriler GraphPad Prism 6 programında, Student’s t-Test yöntemiyle istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

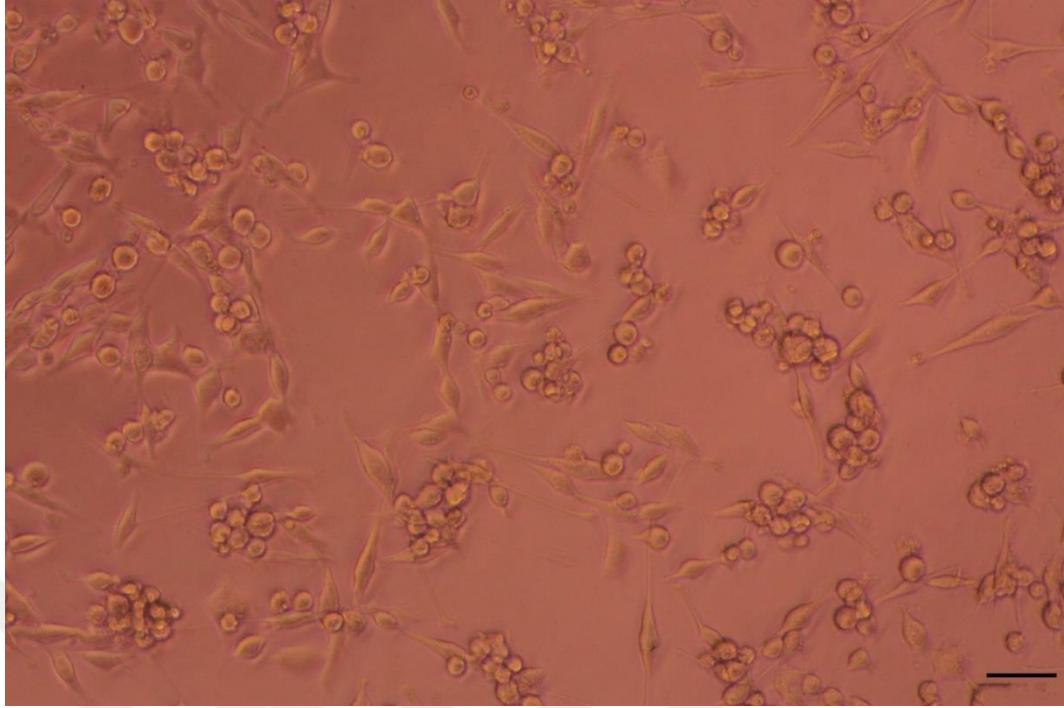
4.1 Borotungstat'ın Prostat Kanseri (LNCaP) Hücre Dizisi Üzerindeki Morfolojik Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki 24 ve 48 saatlik morfolojik etkileri ters ışık mikroskobuyla incelenmiştir. Borotungstat konsantrasyonları ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerinin 24 saatlik görüntülenmesi Şekil 4.1' de görülmektedir.

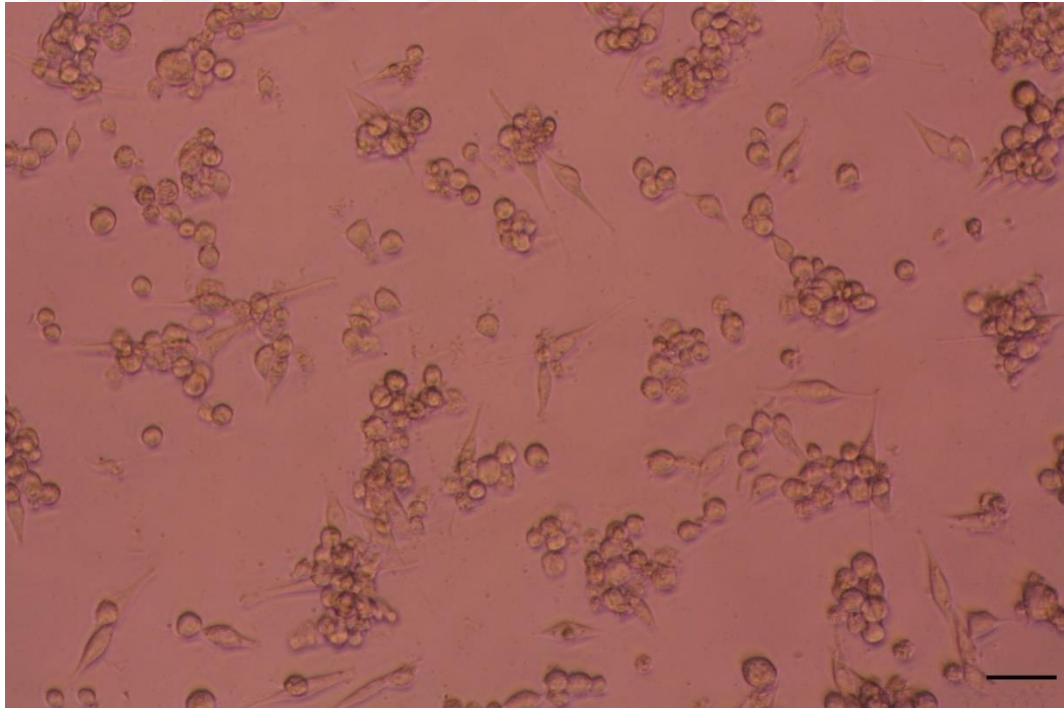
Borotungstat'ın 1, 10 ve 25 μM 'lık konsantrasyonlarının 24 saatte LNCaP hücre dizisi üzerinde herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Borotungstat'ın neden olduğu morfolojik değişikliklerin 24 saatte 50 μM konsantrasyonundan (Şekil 4.2) itibaren başladığı kontrol grubu ile kıyaslandığında gözlenmiştir. Normalde mekik görünümde olan hücrelerin yuvarlaklaştığı ve hücre sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak özellikle 100 μM konsantrasyonundan (Şekil 4.3) itibaren 150 μM konsantrasyonu (Şekil 4.4) ve 200 μM konsantrasyonunda da (Şekil 4.5) hücre morfolojilerinin artarak bozulduğu ve hücre sayısının azaldığı belirlenmiştir.



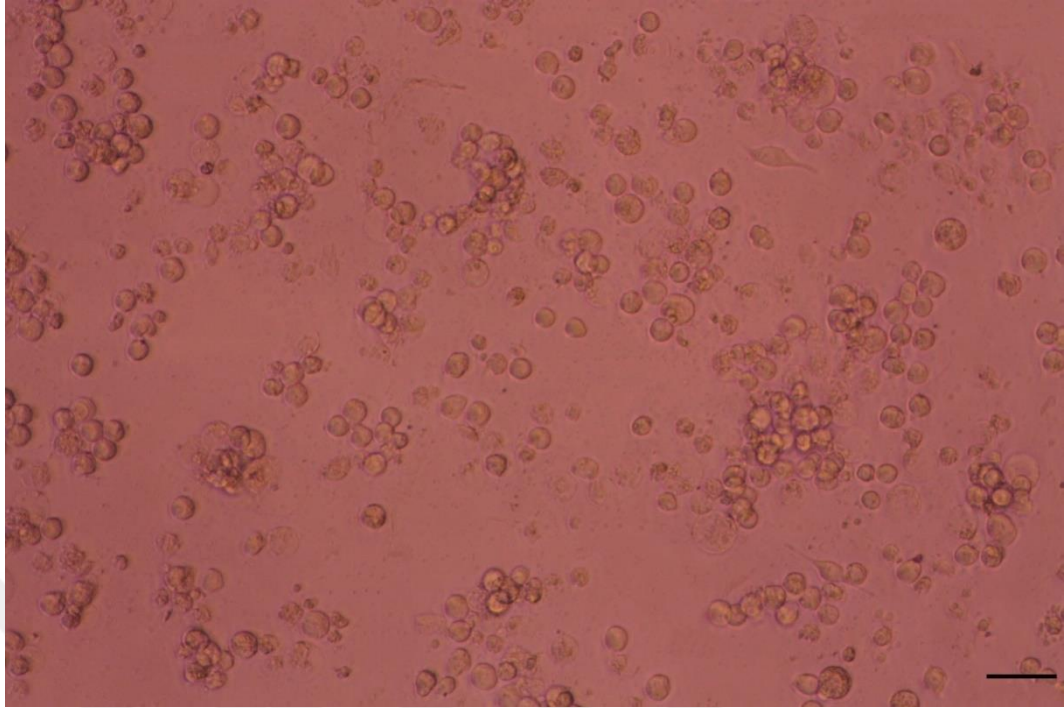
Şekil 4.1. Borotungstat konsantrasyonu ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerinin 24 saatlik görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μm .



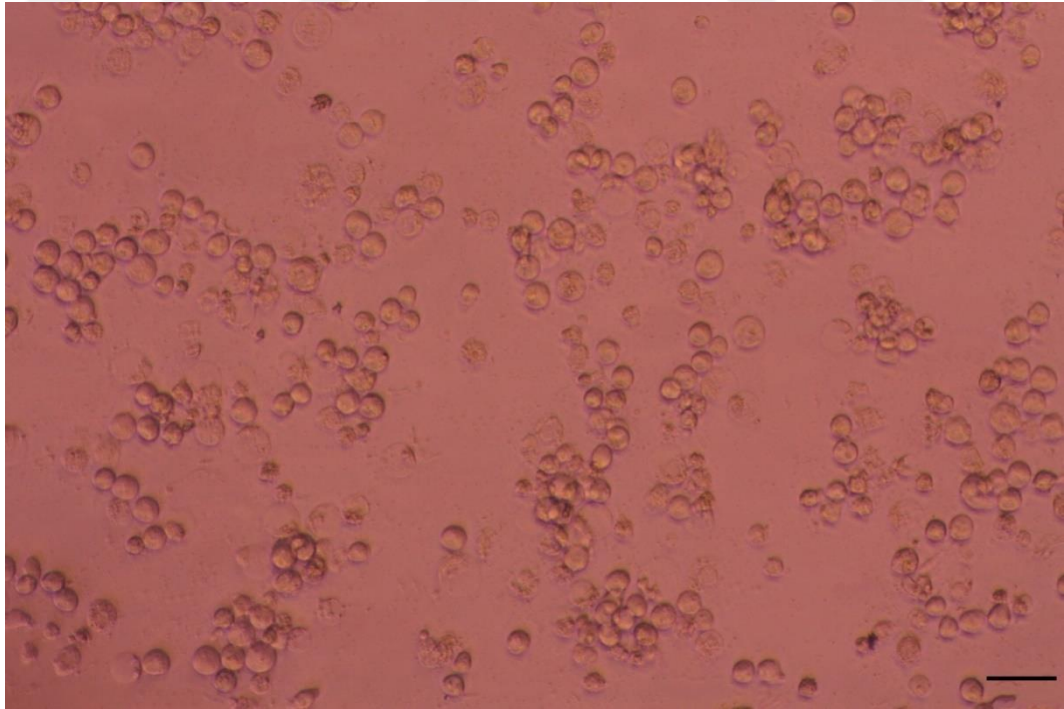
Şekil 4.2. 50 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.



Şekil 4.3. 100 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.

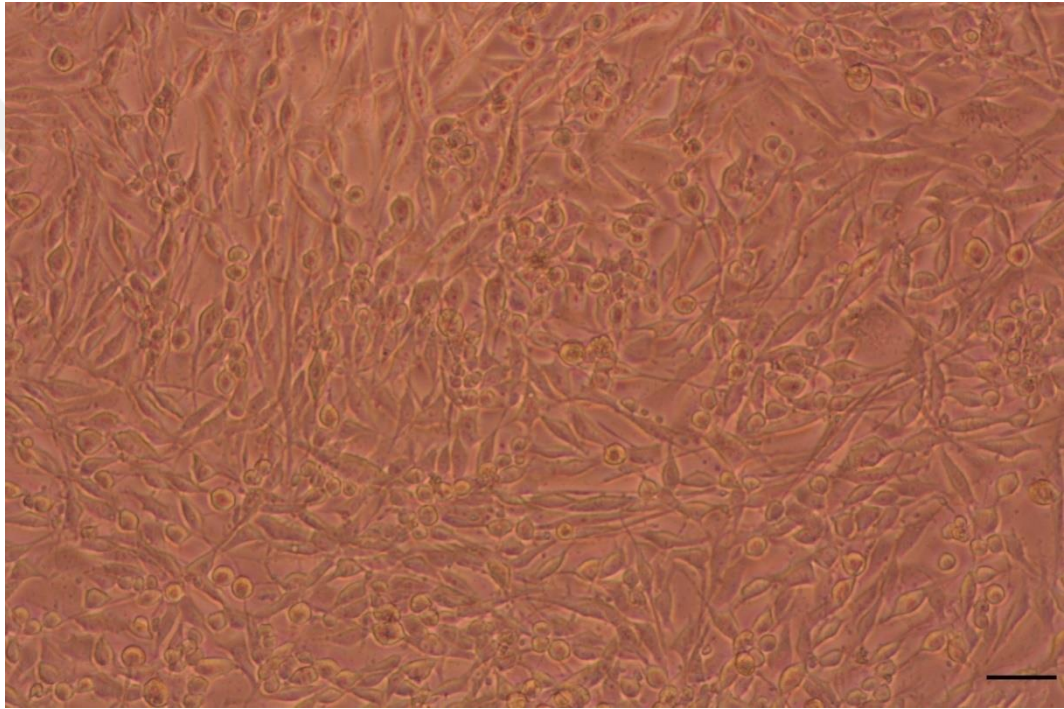


Şekil 4.4. 150 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.

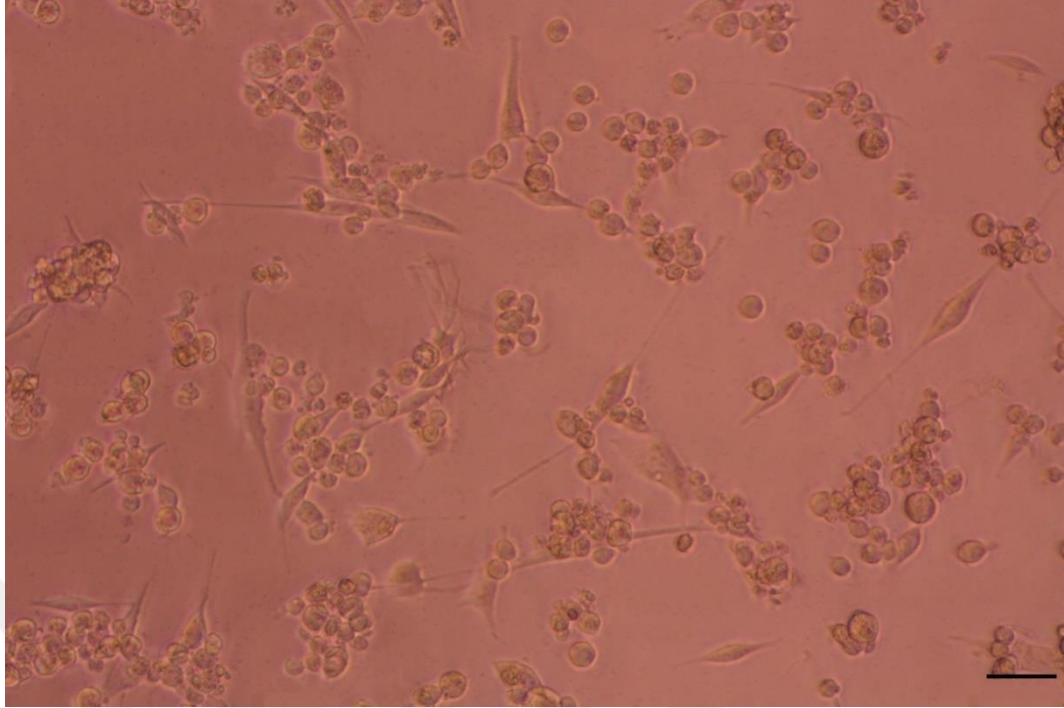


Şekil 4.5. 200 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.

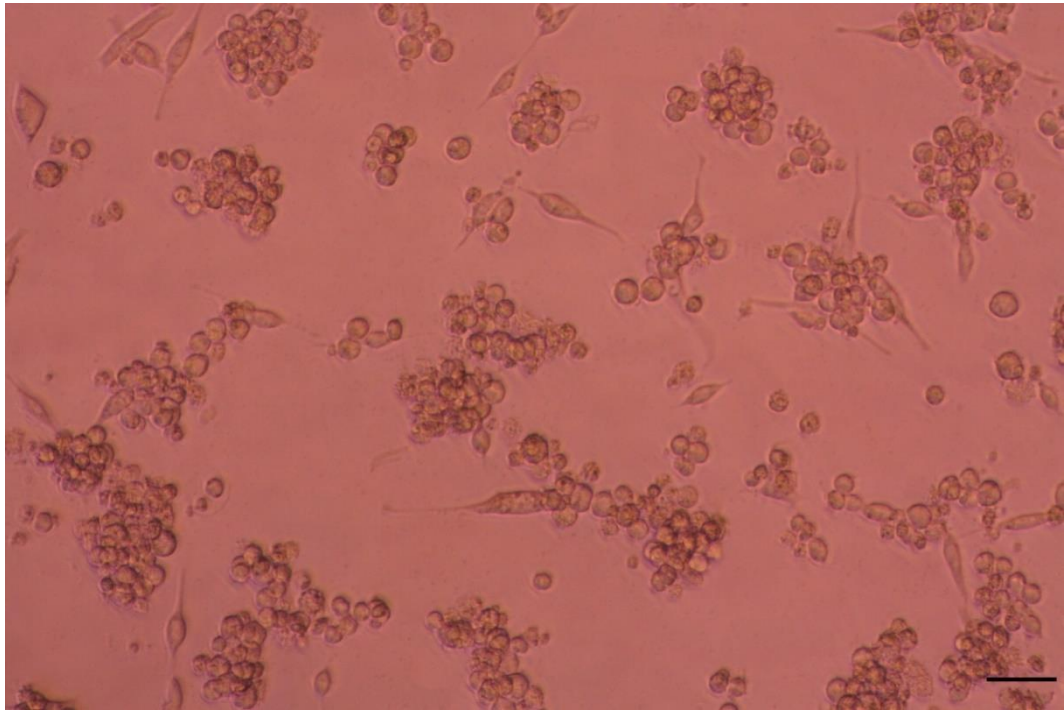
Borotungstat konsantrasyonları ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerinin 48 saatlik görüntülenmesi Şekil 4.6' da görülmektedir. Borotungstat'ın 1 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarının 48 saatte LNCaP hücre dizisi üzerinde herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmadığı, morfolojik değişikliklerin 48 saatte 25 μM konsantrasyonundan itibaren başladığı gözlenmiştir (Şekil 4.7). Özellikle 50 μM konsantrasyonundan itibaren kontrol hücreleriyle kıyaslandığında normal mekik şeklinde olan hücre morfolojilerinin yuvarlaklaştığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ayrıca hücreler arasındaki bağlantıların ve hücre sayılarının konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.9, 4.10, 4.11).



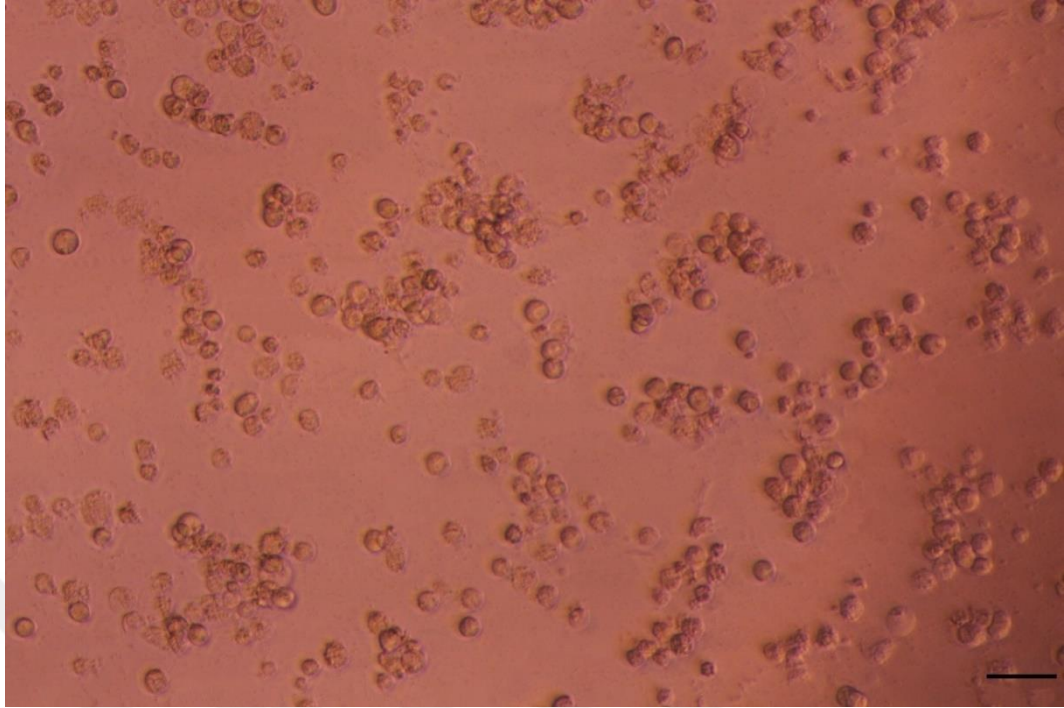
Şekil 4.6. Borotungstat konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmeyen kontrol grubu hücrelerindeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μm .



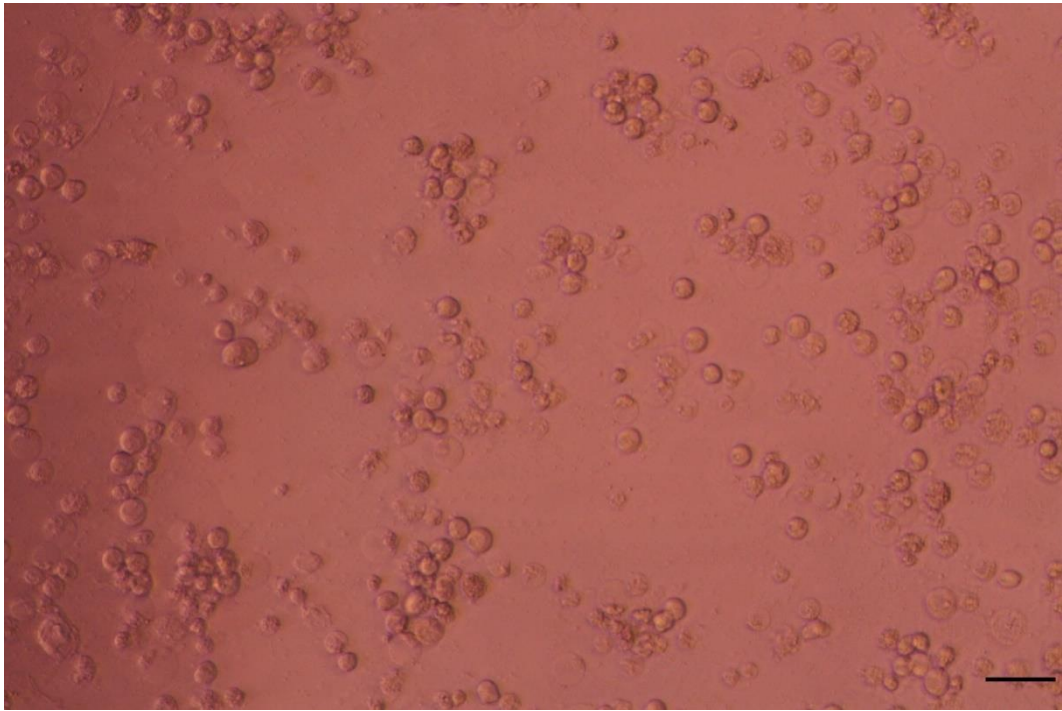
Şekil 4.7. 25 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.



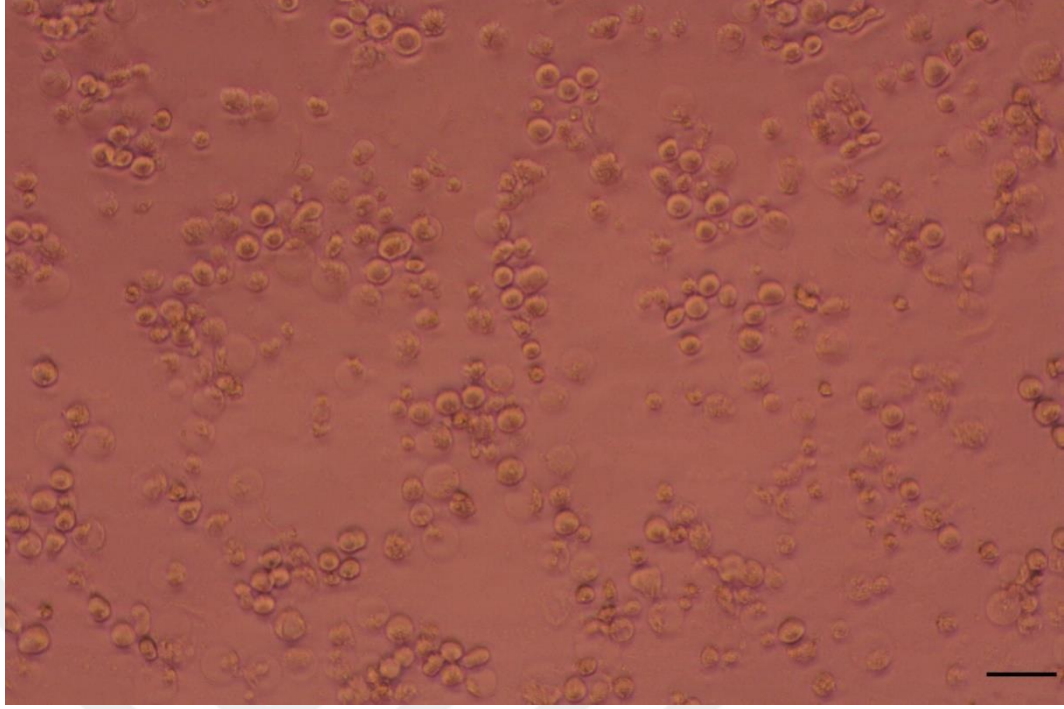
Şekil 4.8. 50 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.



Şekil 4.9. 100 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.



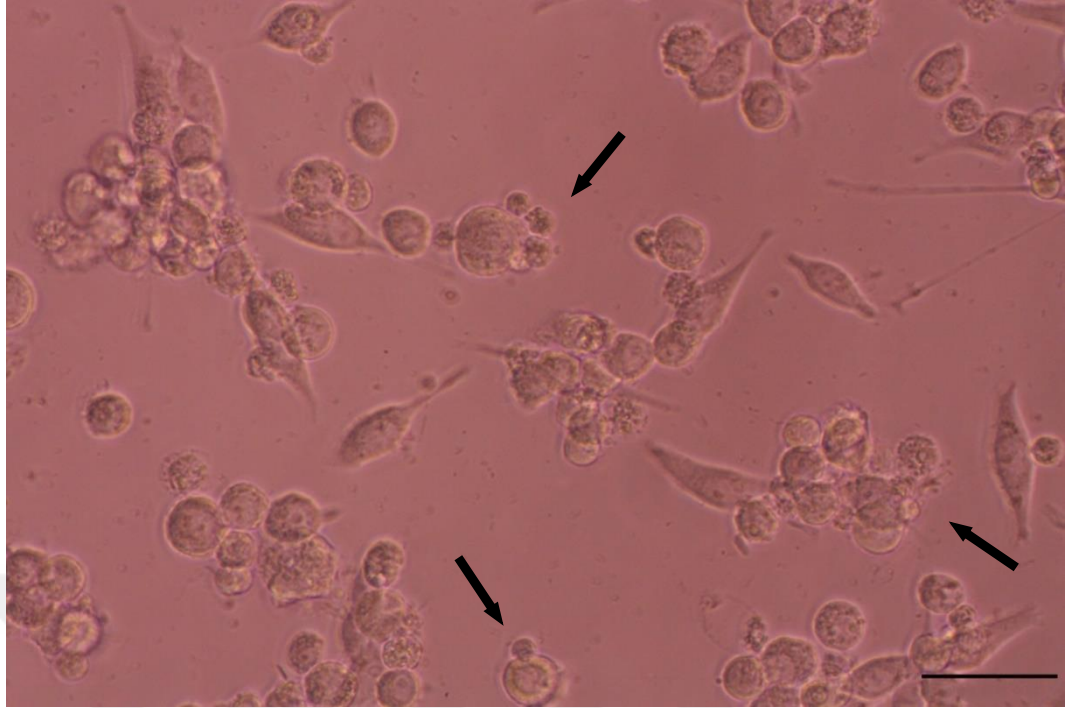
Şekil 4.10. 150 μ M borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μ m.



Şekil 4.11. 200 μM bortezomib konsantrasyonu ile 48 saat muamele edilen hücrelerdeki morfolojik etkilerin görüntülenmesi (100x) Skala bar: 50 μm .

Yapılan literatür araştırmasında bortezomib'in herhangi bir hücre dizisi üzerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda bortezomib'in LNCaP hücre morfolojisi üzerindeki konsantrasyona ve zamana bağlı olarak morfolojik etkisi ilk kez gösterilmiştir. Bununla beraber borik asit ile ilgili yapılan bir çalışmada ise androjen bağımsız prostat kanseri (DU-145) hücre dizisi üzerinde bazı morfolojik değişikliklere neden olduğu belirtilmiştir. Çalışmada 250 ve 1000 μM borik asite maruz bırakılan hücrelerin düz bir görünüme sahip olduğu ve çeşitli hücre içi vezikül birikimlerinin olduğu rapor edilmiştir (Barranco ve Eckhert, 2006).

Çalışmamızda 24 saat süreyle uygulanan 25 μM bortezomib konsantrasyonundan itibaren hücrelerde apoptotik hücre morfolojisine benzer görüntüler tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



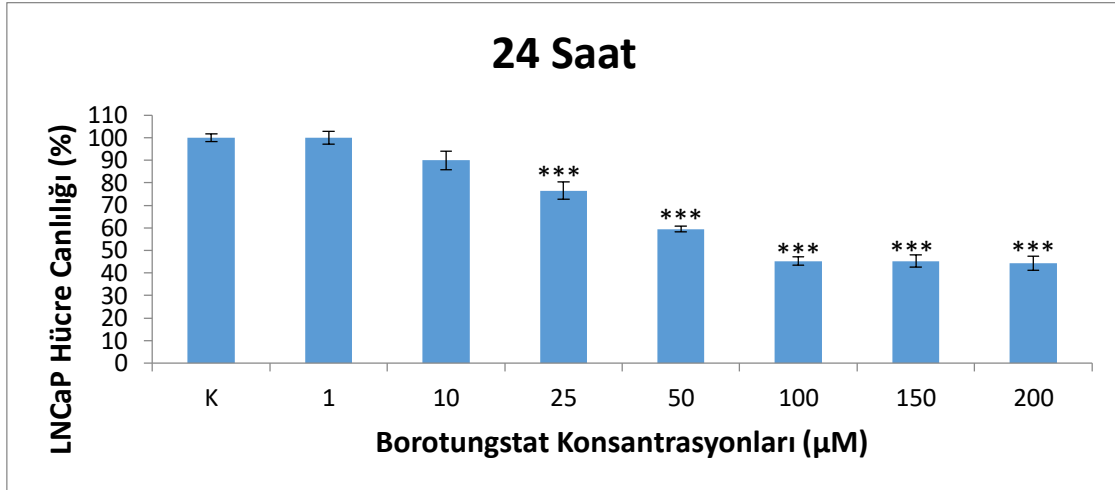
Şekil 4.12. Borotungstat'ın 50 μM konsantrasyonu ile 24 saat süreyle muamele edilen LNCaP hücrelerinin zarlarında oluşan apoptotik kabarcıklar (200x). Skala bar: 50 μm , ok (→) hücre zarında görülen apoptotik kabarcıkları göstermektedir.

Araştırmamızda borotungstat konsantrasyonlarının konsantrasyona ve zamana bağlı olarak LNCaP hücrelerinde morfolojik değişikliklere sebep olduğu gözlenmiştir.

4.2. Borotungstat'ın Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Lizozomal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

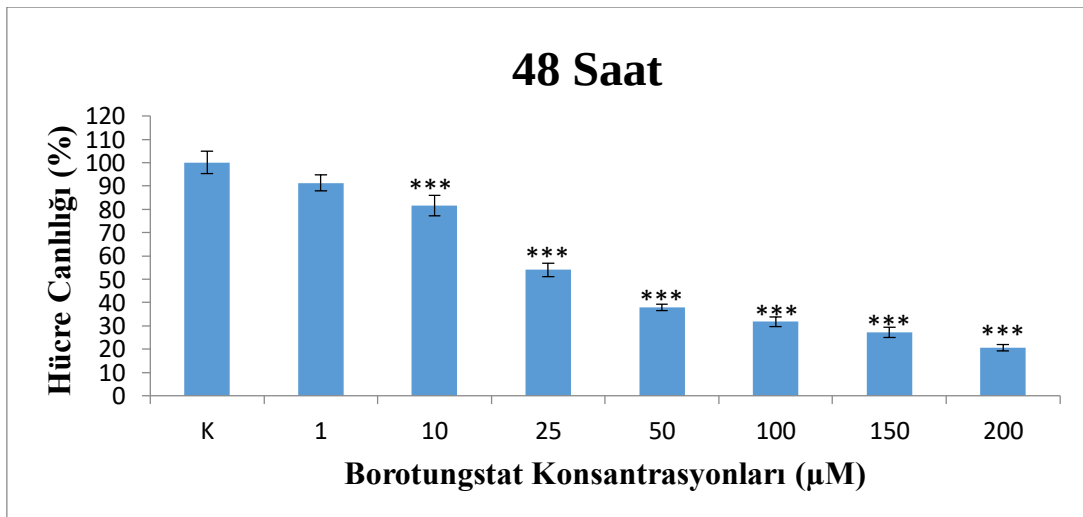
Prostat kanseri (LNCaP) hücreleri 24 ve 48 saat süreyle borotungstatın 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM 'lık konsantrasyonları ile muamele edilmiştir. Borotungstatın hücre çoğalması üzerindeki etkilerinin lizozomal aktiviteye bağlı olarak belirlenmesi için Nötral Red (NR) yöntemi kullanılmıştır.

Borotungstatın 1 ve 10 μM konsantrasyonunun 24 saatte hücre canlılığı üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ($p>0,05$), 25, 50, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarında ise kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla % 25, 41, 48, 48, 56 oranında hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.13). IC_{50} değeri ise 24 saat için 160 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki 24 saat lizozomal aktiviteye etkisi Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; ***: $p < 0,001$).

LNCaP hücreleri 1 µM borotungstat konsantrasyonu ile 48 saat süreyle maruz bırakıldığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında anlamlı bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Buna rağmen; 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında ise kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla % 18, 46, 62, 68, 73, 79 oranında hücre canlılığını baskıladığı hesaplanmıştır ($p < 0,001$; Şekil 4.14). IC_{50} değeri ise 48 saat için 27 µM olarak hesaplanmıştır.



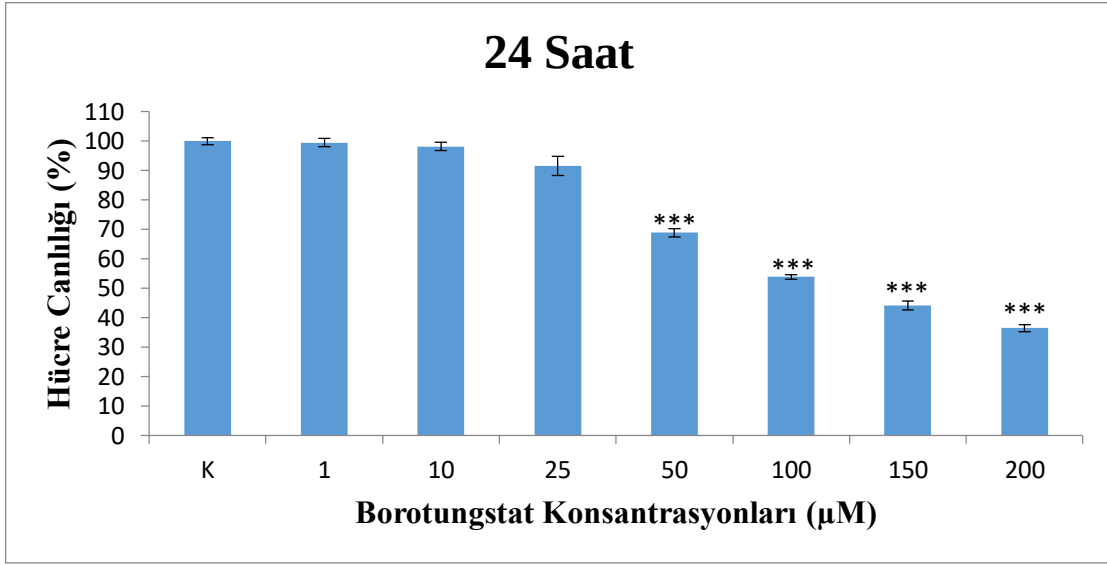
Şekil 4.14. Borotungstat konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki 48 saat lizozomal aktiviteye etkisi Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir. (K: Kontrol; ***: $p < 0,001$).

Yapılan literatür taramalarında borotungstat veya borun hücredeki lizozomal etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Fakat yapılan farklı bir çalışmadatungsten borid nano partiküllerinin (WB ve W₂B karışımı) insan alveolarepitel hücreleri (HPAEpiC) üzerindeki hücre canlılığı NR yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmada tungsten borid karışımının 80 mg/L'lik konsantrasyon HPAEpiC hücreleri üzerinde toksik bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Ancak 320 mg/L'lik konsantrasyonun hücrelerin yaklaşık % 50'sini öldürdüğü tespit edilmiştir (Türkez vd., 2017). Borotungstatın yapısında hem Bor (B) hem de Tungsten (W) bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmada da her iki maddeyi yapısında bulunduran nano partiküllerin de lizozomlar üzerinde toksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

4.3. Borotungstatın Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

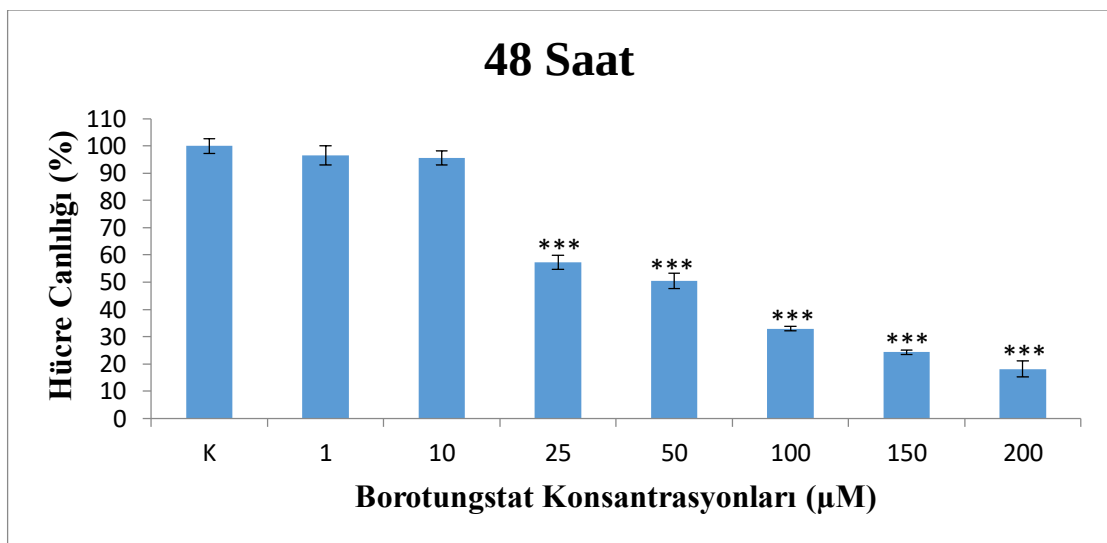
Borotungstatın prostat kanseri (LNCaP) hücrelerinin çoğalması üzerindeki etkilerinin mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır. LNCaP hücreleri 24 ve 48 saat süreyle 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µM'lık borotungstat konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır.

LNCaP hücreleri 1, 10 ve 25 µM borotungstat konsantrasyonları ile 24 saat süreyle maruz bırakıldığında hücre çoğalmasında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Buna rağmen, 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla % 31, 46, 56 ve 63 oranında hücre canlılığını baskıladığı hesaplanmıştır ($p<0,001$; Şekil 4.15). Hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan konsantrasyon olarak ifade edilen IC₅₀ değeri ise 24 saat için 115 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. Borotungstat'ın LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 24 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

LNCaP hücreleri 1 ve 10 µM borotungstat konsantrasyonları ile 48 saat süreyle maruz bırakıldığında hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Buna rağmen 25, 50, 100, 150 ve 200 µM konsantrasyonlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla % 43, 50, 67, 76 ve 82 oranında hücre canlılığını baskıladığı hesaplanmıştır ($p<0,001$ Şekil 4.16). IC_{50} değeri ise 48 saat için 51 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16. Borotungstat'ın LNCaP hücre dizisi üzerinde 48 saatteki etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

Yapılan çalışmada denenen borotungstat konsantrasyonlarının prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisi üzerinde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu ilk kez gösterilmiştir. Hücre canlılığındaki azalmanın mitokondriyal hasar sonucu olduğu da MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Yapılan literatür çalışmalarında borlu bileşiklerin ve polioksometalatların hücre canlılığı üzerine etkisinin genellikle MTT testi kullanılarak tespit edildiği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre kitosan/polioksometalat nano-kompleksinin serviks kanseri (KB), insan meme kanseri (MCF-7), insan androjen bağımsız prostat kanseri (PC3) ve insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri (A549) hücre dizisi üzerinde 24 saatteki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada yapılan MTT testi sonuçlarına göre bu kompleksin MCF-7, A549, PC3 ve KB hücre dizisi üzerindeki IC₅₀ değerleri sırasıyla 46 µg/mL, 50 µg/mL 67 µg/mL ve 79 µg/mL olarak bildirilmiştir. Çalışmada kitosan/polioksometalat nano-kompleksinin en çok MCF-7 hücre dizisi üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Menon vd., 2011).

Bir başka çalışmada ise borik asit (BA), Boraks Pentahidrat (BP) ve Disodyum Pentaborat Dekahidrat (DPD) maddelerinin 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonları kullanılarak HeLa ile kontamine edilen insan amniyotik epitelyal hücre dizisi (CCL-62) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Araştırmaya göre 5 gün süreyle denenen borik asit ve boraks pentahidrat dozlarının hücre çoğalmasını baskıladığı fakat IC₅₀ değerinin ise hesaplanamadığı bildirilmiştir. DPD'nin ise IC₅₀ değeri verilmemesine rağmen 1000 µM dozunun 5. günde hücre canlılığını % 30'lara kadar baskıladığı rapor edilmiştir (Kahraman vd., 2013).

Yapılan bir diğer çalışmada ise borik asitin 100, 250, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarının insan prostat kanseri (LNCaP, PC3, DU-145) hücre dizileri üzerindeki hücre çoğalmasını baskılayıcı etkilerine bakılmıştır. Hücreler 8 gün borik asite maruz bırakıldıktan sonra DU-145 hücre dizisinde hücre çoğalması 100, 250, 500, 1000 µM konsantrasyonlarında sırasıyla % 32, 62, 87 ve 98 oranında baskılandığı belirtilmiştir. LNCaP hücre dizisinde hücre çoğalması 100, 250, 500, 1000 µM dozlarında sırasıyla % 40, 51, 59 ve 77 oranında baskılanırken PC-3 hücre dizisi 500 µM konsantrasyonunda % 29 ve 100 µM dozunda % 52 oranında baskılandığı rapor edilmiştir. Araştırmada hormon bağımlı

prostat kanseri hücre dizisi olan DU-145'in borik asite karşı en yüksek hassasiyeti gösterdiği belirtilirken hücre dizilerinin IC₅₀ değerleri bildirilmemiştir (Barranco ve Eckhert, 2004).

Yapılan başka bir çalışmada ise tungsten borid nano partiküllerinin (WB ve W₂B karışımı) 0,625, 1, 25, 2,5, 5, 10, 20, 80, 160, 320, 640 ve 1280 mg/L konsantrasyonlarının 72 saatteki etkisi insan alveolar epitel hücreleri (HPAEpiC) üzerindeki hücre canlılığı MTT yöntemi ile test edilmiştir. Hücrelerin en az % 20'sini öldüren konsantrasyon olarak bilinen IC₂₀ 79,090 mg/L olarak hesaplanmıştır (Türkez vd., 2017).

Başka bir çalışmada ise bor-florid kompleksinin ([L(BF₂)₂]) 2, 5, 10, 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonları insan meme kanseri (MCF-7), insan androjen bağımsız prostat kanseri (PC3 ve DU-145), insan rahim ağzı kanseri (HeLa), insan kolon kanseri (DLD-1), insan kolon kanseri (HT-29), insan prostat epitelyal (PNT1-A), endometriyal adenokarsinoma (ECC-1) hücre hatları üzerinde hücre canlılığı MTT yöntemi ile test edilmiştir. Deney sonunda bor-florid kompleksinin en çok ECC-1 hücre dizisi üzerinde etkili olduğu belirlenmiş ve IC₅₀ değeri 38,36 µM olarak rapor edilmişti (Tülüce vd., 2017)

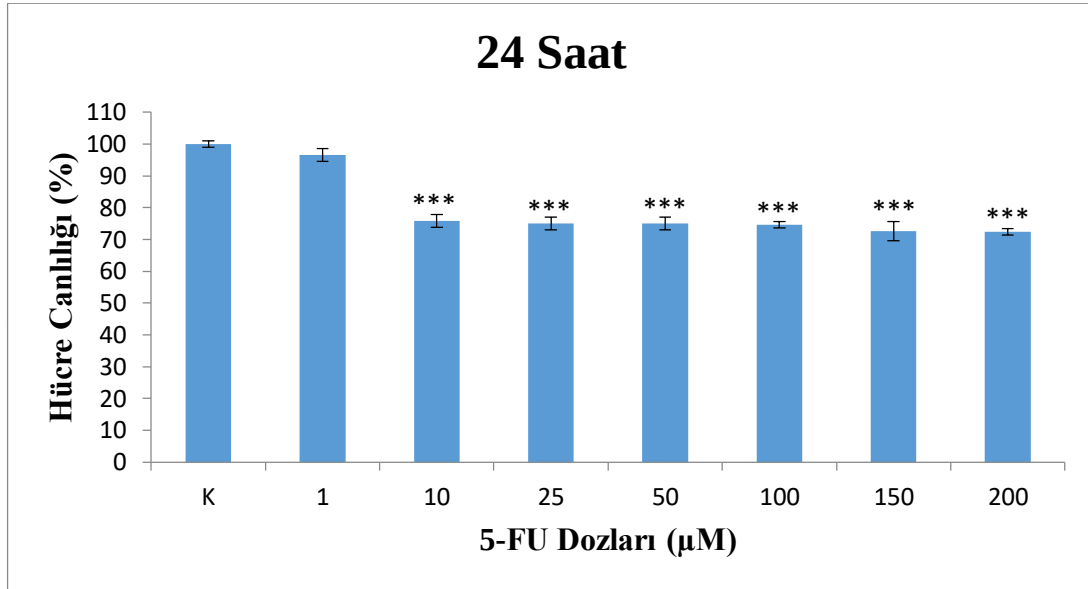
Yapılan literatür taramalarında borotungstatın hücredeki mitokondriyal etkisi ile ilgili *in vivo* veya *in vitro* herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat bor ile yapılan farklı çalışmalarda farklı konsantrasyonlarda ve zaman dilimlerinde hücre canlılığı üzerinde çalışmamıza benzer şekilde mitokondriyal aktiviteyi etkileyerek toksik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

4.4. 5-Fluourasil'in (5-FU) Hücre Çoğalması Üzerindeki Etkilerinin Mitokondriyal Aktiviteye Bağlı Olarak Belirlenmesi

Prostat kanseri tedavisinde anti-kanser bir ilaç olarak sıklıkla kullanılan 5-Fluourasil (5-FU) çalışmada pozitif kontrol olarak seçilmiştir. 5-FU'in 24 ve 48 saat süreyle uygulanan 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µM dozlarının LNCaP hücreleri üzerindeki çoğalmayı baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

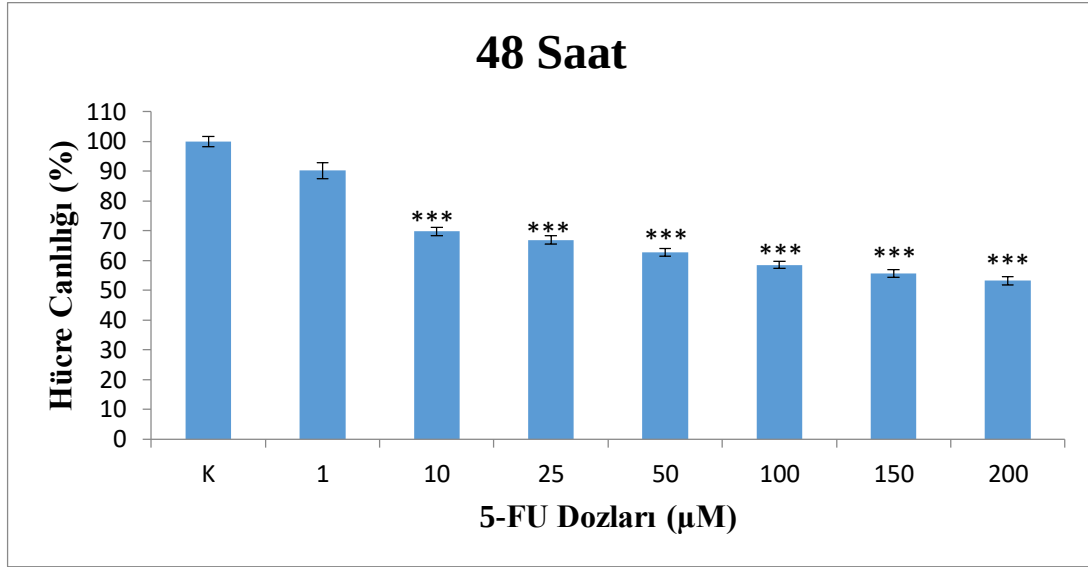
Hücreleri 1 µM 5-FU dozuyla 24 saat süreyle muamele edildiğinde hücre canlılığında bir azalmaya neden olmadığı belirlendi. Buna rağmen 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µM 5-FU

dozları ile muamele edildiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla % 24, 25, 25, 26, 27 ve 28 oranında hücre çoğalmasını baskıladığı gözlenmiştir ($p<0,001$ Şekil 4.17). Hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan doz olarak ifade edilen IC_{50} değeri ise 24 saatlik uygulamada hesaplanamamıştır.



Şekil 4.17. 5-FU'in LNCaP hücre dizisi üzerindeki 24 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

LNCaP hücrelerinde 5-FU'in 1 µM dozu ile 48 saat süreyle muamele edildiğinde hücre canlılığı üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. Fakat 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 µM dozlarının hücre çoğalmasını sırasıyla % 30, 33, 37, 41, 44 ve 47 oranında baskıladığı kontrol grubu ile kıyaslandığında gözlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.18). Hücrelerin % 50 oranında ölümüne neden olan doz olarak ifade edilen IC_{50} değeri ise 48 saatlik muamele süresi sonundada hesaplanamamıştır.



Şekil 4.18. 5-FU'in LNCaP hücre çoğalması üzerindeki 48 saatlik etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p < 0,001$).

Denenen 5-FU dozlarının doza ve zamana bağlı olarak LNCaP hücreleri üzerinde hücre canlılığını baskılayıcı etkisinin olduğu belirlenmiştir. Fakat bu etkinin borotungstat ile kıyaslandığında oldukça sınırlı olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmada sitotoksik aktivite bakımından borotungstat ile 5-FU dozları karşılaştırıldığında benzer dozlarda borotungstatın hücre canlılığı üzerinde daha yüksek bir sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

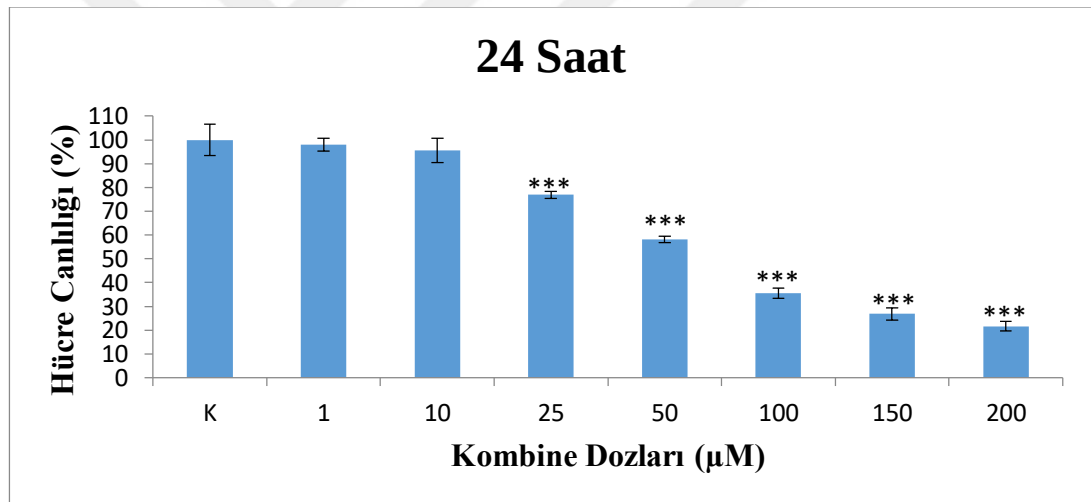
Yapılan literatür taramalarında 5-FU'in kanser araştırmalarında sıklıkla kullanıldığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada 5-FU'in insan böbrek kanseri (786-O) hücre dizisi üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Çalışmada 5-FU'in 25, 50 ve 100µM'lık dozları kullanılarak 24 ve 48 saatteki etkilerine bakılmıştır. Çalışmada doza ve zamana bağlı etki görülmüş ve 48 saat sonunda hücre canlılığının daha fazla baskılandığı rapor edilmiştir. Yine aynı çalışmaya göre 5-FU'in hücrelerin % 50'sinden fazlasının öldürdüğü belirtilmiş fakat IC_{50} değerleri belirtilmemiştir (Zheng vd., 2018).

Yapılan bir diğer araştırmada ise 5-FU'in 50, 100, 150 ve 200 µg/mL dozlarının insan prostat kanseri (PC3) hücre dizisi üzerinde 24 saatteki etkilerine bakılmıştır. Çalışmada 5-FU'in hücrelerin % 50'sini öldüren dozunun 814,1 µg/mL olması gerektiği belirtilmiştir (Yang vd., 2012).

4.5. Borotungstat ve 5-FU Dozlarının Kombine Uygulanması Sonucu Oluşan Antagonistik/Sinerjistik Etkisinin Araştırılması

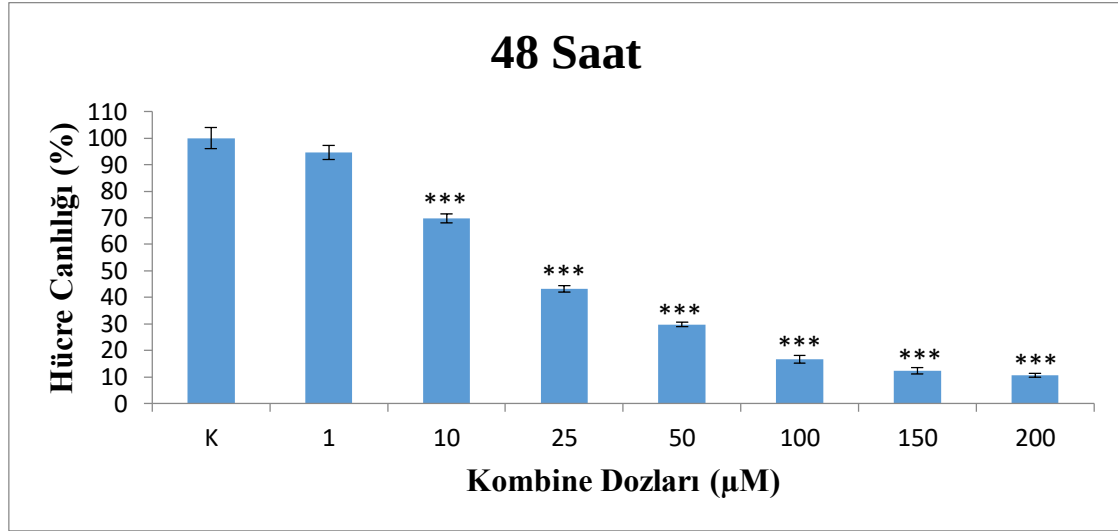
Çalışmada kombine uygulama için maddelerin 1:1 oranında hazırlanan konsantrasyonları kullanılmıştır.

Çalışmada 24 saat süreyle denenen 1 ve 10 μM 'lık kombine (borotungstat + 5-FU) dozların LNCaP hücrelerinin canlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı, bununla beraber 25, 50, 100, 150 ve 200 μM dozlarının ise kontrol grubuna kıyasla sırasıyla % 23, 42, 64, 73 ve 78 oranında hücre çoğalmasını baskıladığı gözlenmiştir. ($p<0,001$ Şekil 4.19). Kontrole kıyasla % 50 oranında sitotoksik etki gösteren IC_{50} değeri ise 68 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.19. Kombine olarak uygulanan maddelerin LNCaP hücre dizisi üzerinde 24 saatteki etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

Çalışmada 48 saat süreyle denenen 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM (borotungstat + 5-FU) dozlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında sırasıyla % 30, 57, 70, 83, 88 ve 89 oranında LNCaP hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı gözlenmiştir. ($p<0,001$ Şekil 4.20). Kontrole kıyasla % 50 oranında sitotoksik etki gösteren IC_{50} değeri ise 21 μM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. Kombine olarak uygulanan maddelerin LNCaP hücre dizisi üzerinde 48 saatteki etkisi. K: Kontrol. Kontrol grubu % 100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

LNCaP hücrelerindeki ilaç etkileşimi katsayısı formülüne göre yapılan hesaplama sonucu sinerjistik ve antagonistik etkiler hesaplanmıştır. Yapılan hesaplama göre borotungstat ve 5-FU'in kombine uygulamasında 24 saatte 1, 10, 25 ve 50 µM dozlarında antagonistik bir etki gösterirken, 100 µM dozundan itibaren sinerjistik etki gösterdiği hesaplanmıştır (Şekil 4.21).

LNCaP 24 SAAT				
	Borotungstat	5-FU	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 µM	99,5	96,6	97,9	1,02
10 µM	98,2	75,8	95,6	1,28
25 µM	91,6	73,2	76,9	1,14
50 µM	68,9	75,5	58,2	1,11
100 µM	53,9	74,6	35,6	0,88
150 µM	44,1	72,7	26,8	0,83
200 µM	36	72,4	21,6	0,81

Şekil 4.21. LNCaP hücre dizisinde borotungstat, 5-FU ve kombine (borotungstat + 5-FU) uygulamaların 24 saat için yüzde hücre sağ kalım oranları. Kontrol grubu % 100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı, (Sinerjistik etki: $CDI<1$, antagonistik etki: $CDI>1$).

Borotungstat ve 5-FU'in kombine uygulamasında 48 saatte 1, 10 ve 25 μM konsantrasyonlarında antagonistik bir etki gösterirken, 50, 100 ve 150 μM dozundan itibaren sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna rağmen kombine uygulamanın 48 saatteki 200 μM konsantrasyonunda ise tekrar antagonistik etki olduğu gözlenmiştir. (Sinerjistik etki: $\text{CDI} < 1$, antagonistik etki: $\text{CDI} > 1$) (Şekil 4.22).

LNCaP 48 SAAT				
	Borotungstat	5-FU	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 μM	96,5	90,2	94,6	1,09
10 μM	95,6	69,8	69,7	1,04
25 μM	57,2	66,9	43,2	1,12
50 μM	50,5	62,7	29,8	0,94
100 μM	32,9	58,5	16,6	0,86
150 μM	24,3	55,7	12,3	0,9
200 μM	18,1	53,2	10,6	1,1

Şekil 4.22. LNCaP hücre dizisinde borotungstat, 5-FU ve kombine (borotungstat + 5-FU) uygulamaların 48 saat için yüzde hücre sağkalım oranları. Kontrol grubu % 100 kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşim katsayısı, (Sinerjistik etki: $\text{CDI} < 1$, antagonistik etki: $\text{CDI} > 1$).

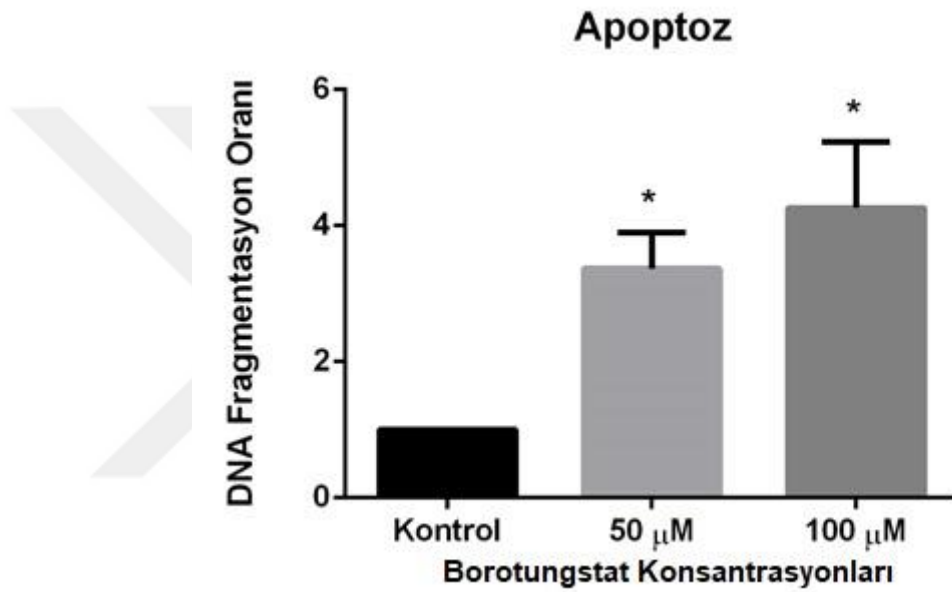
Yapılan literatür araştırmasında kanserli hücre dizileri üzerinde borotungustat ya da polioksometalatlarla ilgili herhangi bir kombine madde denemesi çalışmasına rastlanmamıştır. Araştırmamızın verileri incelendiğinde 24 ve 48 saatlik borotungustat ile 5-FU'in kombine uygulamasının düşük dozlarda antogonistik etki oluştururken, yüksek dozlarda sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu şekilde kombine uygulanmanın 5-FU'in etkinliğini arttıracığı ilk kez ortaya konmuştur. Bu nedenle çalışmamız prostat kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçla boratungustatın etkileşimini ortaya koyan ilk çalışma olma özelliği göstermektedir.

4.6. Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Çalışmada son olarak borotungstatın MTT yöntemine göre hücre canlılığı üzerinde etkili olduğu belirlenen 50 ve 100 μM konsantrasyonlarının LNCaP hücreleri üzerinde

apoptotik ve nekrotik etkilerini araştırılmıştır. Hücre ölümünü belirlemek amacıyla ticari olarak satın alınan hücre ölümü belirleme kiti (Roche Cell Death ELISA Plus) kullanılmıştır.

Çalışmada 24 saat süreyle denenen 50 μ M borotungstat konsantrasyonunda apoptotik etkinin kontrole kıyasla 3.4 kat, 100 μ M konsantrasyonunda ise 4.3 kat arttığı görülmüştür (***: $p<0,001$, Şekil 4.13). Çalışmada 24 saat süreyle denenen 50 μ M ve 100 μ M borotungstat konsantrasyonlarının kontrol ile kıyaslandığında herhangi bir nekrotik etkisinin olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.23. Borotungstatın LNCaP hücre dizisi üzerindeki apoptotik etkisi ($p<0.001$).

Yapılan çalışmada denenen borotungstat konsantrasyonlarının prostat kanseri (LNCaP) hücre dizisi üzerinde doza bağlı olarak apoptotik etkiyi arttırdığı ilk kez gösterilmiştir. Prostat kanseri üzerinde apoptotik etki gösterdiği ise ELISA yöntemi ile belirlenmiştir.

Yapılan literatür taramalarında borlu bileşiklerin kanser hücre hatları üzerinde apoptotik etkiyi arttırdığı gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada bor-florid kompleksinin ($[L(BF_2)_2]$) endometriyal adenokarsinoma (ECC-1) hücre dizisi üzerindeki apoptotik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada yapılan ELISA, comet ve jel elektroforez yöntemine göre bor-florid kompleksinin hücre apoptozunu indüklediği belirtilmiştir. ELISA sonuçlarına göre ise

5 µM konsantrasyonundan itibaren doza bağılı olarak DNA hasarını arttırdığı gözlenmiştir (Tülüce vd., 2017).

Yapılan farklı bir çalışmada ise bir polioksometalat türevinin ($K_2Na[AsMo_6O_{21}(O_2CCH_2NH_3)_3] \cdot 6H_2O$) 80 µg/m L konsantrasyonunun insan meme kanseri (MCF-7) hücre dizisi üzerinde 24 saatteki apoptotik etkisi flow sitometri yöntemi ile araştırılmıştır. Çalışmada polioksometalat türevinin MCF-7 hücre dizisinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücre apoptozunu indüklediği belirtilmiştir (Cao vd., 2017).

Başka bir çalışmada ise ilk kez sentezlenen borlu bir bileşiğin (N(4)-[B-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan)methyl]-2'-deoxycytidine) 10, 20 ve 40 mM konsantrasyonlarının glioblastoma (U-118 MG) hücre dizisi üzerinde 48 saatteki etkileri Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay yöntemi ile araştırılmıştır. Araştırmada, borlu bileşiğin U-118 MG hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-7 seviyelerinde artışa neden olduğu ve apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Uram vd., 2017).

Yapılan bir diğer çalışmada ise kanser hastalarında tedavi amaçlı kullanılan bortezomib ve proteozom inhibitörü olan ixazomib maddelerinin flow sitometri yöntemi ile apoptotik etkileri incelenmiştir. Çalışmada borlu bileşikler olan bortezomib ve ixazomib maddelerinin 1, 5, 10, and 20 µM konsantrasyonlarının insan kolon kanseri (Caco2) hücre dizisinde 24 ve 48 saatteki etkileri incelenmiştir. Çalışma sonunda Caco2 hücre dizisinde kaspaz-3 seviyelerinde artış olduğu ve maddelerin apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Engür ve Dikmen, 2017).

Yapılan literatür taramalarında borotungstatın hücredeki apoptotik etkisi ile ilgili *in vivo* veya *in vitro* herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat farklı bor bileşikleriyle yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyon ve hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir.

Çalışmamız borotungstatın LNCaP hücre dizisi üzerindeki etkilerini inceleyen ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Araştırmamızda borotungstatın LNCaP hücre dizisi üzerindeki morfolojik etkisi ilk defa gösterilmiştir. Çalışmamızda borotungstatın LNCaP

hücre dizisi üzerindeki hücre çoğalmasını baskılayıcı özelliği mitokondriyal ve lizozomal aktiviteye bağlı olarak incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre borotungstatın hücre çoğalmasını konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hem mitokondriyal hem de lizozomal aktiviteyle baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca borotungstatın LNCaP hücre dizisi üzerinde konsantrasyona bağlı olarak apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Çalışmamızın ileride bor türevleri, polioksometalat türevleri veya borotungstat ile yapılacak *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Yapılacak olan detaylı çalışmalarla borotungstat maddesi yeni bir kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına öncülük edeceğini düşünmekteyiz.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Prostat kanseri prostat dokusundaki hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaya başlamasıyla oluşan, tüm dünyada erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür. Prostat kanseri tedavisinde kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri sıklıkla kullanılsa da güçlü yan etkileri bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle prostat kanseri tedavisinde daha etkili, yan etkileri daha az tedavi yöntemleri geliştirilmesi gerekmektedir.

Bor elementi doğada serbest halde bulunmayan elementlerden biridir. Bor insanlar ve bitkiler için mikro besin elementi grubunda yer almaktadır. Borun çeşitli formlarının çeşitli kanser türleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Polioksometalatlar ise geçiş metalleri ve oksijen atomlarından oluşan kimyasal gruplardır. Sentezlenen polioksometalat türevlerinin kanserli hücrelerin çoğalması üzerinde etkili olduğunun belirlenmesi ile günümüzde halen farklı polioksometalat türevlerinin sitotoksik etkileri araştırılmaya devam etmektedir.

Bu çalışmamızda ilk olarak borlu bir polioksometalat türevi olan borotungstat maddesinin 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μM konsantrasyonlarının LNCaP hücre dizisi üzerindeki morfolojik etkileri ters ışık mikroskopunda incelenmiştir. Konsantrasyona ve zamana bağlı olarak maddenin normal hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu belirlenmiştir.

Ardından maddenin sitotoksik etkileri NR ve MTT yöntemleri ile konsantrasyona ve zaman bağlı olarak araştırılmıştır. İlk 24 saatteki IC_{50} değerleri NR yönteminde 160 μM , MTT yönteminde ise 115 μM olarak hesaplanmıştır. 48 saatteki IC_{50} değerleri ise, NR yönteminde 27 μM , MTT yönteminde ise 51 μM olarak bulunmuştur. Dolayısıyla borotungstatın her iki uygulama süresinde de sitotoksik etkiyi hücrelerin hem lizozom hem de mitokondrilerinde de hasar yaratarak oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda sadece 24 ve 48 saatlik uygulamalar denenmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda farklı uygulama süreleride denenerek sitotoksik etkideki değişiklikler tespit edilebilir. Ayrıca yapılacak farklı

çalışmalarla borotungstatın farklı kanser hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkileri de *in vitro* olarak incelenebilir.

Çalışmamızda prostat kanserinin tedavisinde kemoteröpatik ilaç olarak kullanılan 5-FU'nun 1, 10, 25, 50, 100, 150 ve 200 μ M dozlarının sitotoksik etkisi aynı konsantrasyonlarda uygulanan borotungstat konsantrasyonları ile karşılaştırılmış ve borotungstatın 5-FU'e göre çok daha etkili olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla borotungstatın günümüzde etkili bir kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda borotungstat ile 5-FU dozlarının 1:1 oranında kombine olarak uygulanmıştır. İlk 24 saatlik uygulama da 1, 10, 25 ve 50 μ M dozlarında antagonistik bir etki gözlenirken, 100, 150 ve 200 μ M dozlarında ise sinerjistik etki gösterdiği hesaplanmıştır. Bununla beraber 48 saatte 1, 10 ve 25 μ M dozlarında antagonistik bir etki gösterirken, 50, 100 ve 150 μ M dozundan itibaren sinerjistik etki gösterdiği belirlenmiştir. 24 ve 48 saat'lik uygulamalarda doz artışına bağlı olarak görülen sinerjistik etki, borotungstatın farklı kemoteropötik ajanlarla birlikte uygulanabileceğini göstermektedir. Bu nedenle ileride farklı ajanlarla yapılacak kombine ilaç denemelerinde ilaç etkinliğini artırıp artmayacağı farklı bir çalışmanın konusu olabilir. Ayrıca ilaç direnci geliştiren hücrelerde de borotungstatın kombine olarak verilmesinin ilaç etkinliğini arttıracaklarını düşünmekteyiz.

Ayrıca çalışmamızda borotungstatın prostat kanseri hücre dizisi üzerinde apoptotik etkiyi arttırdığı belirlenmiştir. Borotungstatın apoptozu hangi yolakla indüklediği ile ilgili yapılacak olan farklı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle apoptotik süreçte yer alan hangi genler üzerinde gen ekspresyonunda değişikliklere neden olduğu incelenerek etki mekanizması hakkında daha detaylı bilgilere ulaşılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; çalışmamızın sonuçlarının polioksometalat türevleri veya borotungstat ile yapılacak *in vivo* ve/veya *in vitro* çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz. Yapılacak olan detaylı çalışmalarla borotungstat maddesi yeni bir kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini ve yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abe, K., Matsuki, N., 2000, Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, *Neuroscience Research*, 38, 325–329.
- Acar, O., 2009, BPH ile Prostat Kanseri Arasındaki İlişkiye Ait Kanıt Var Mı? Bir Literatür Derlemesinin Bulguları, *Üroonkoloji Bülteni*, 4, 47-51.
- Akınsal, E., Sofikerim, M., 2010, Prostat Kanseri ve Kemoterapi, *Türk Üroloji Seminerleri*, 1, 207–210.
- Avcı, Ç.B., Süslüer Yılmaz, S., Şığva Doğan, Ö., Söğütlü, F., Dünder, M., vd., 2013, Rapamisinin Prostat Kanseri Hücre Hatlarındaki Etkisi, *Ege Tıp Dergisi* 52 (1), 7-14.
- Avcı, T., Tunçbilek, M., 2017, Kolorektal Kanser Tedavisinde Yeni İlaç Kombinasyonu: Trifluridin ve Tipirasil, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 37 (4), 191-200.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D., 2004, Boric Acid Inhibits Human Prostate Cancer Cell Proliferation, *Cancer Letters*, 216, 21–29.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D., 2006, Cellular Changes İn Boric Acid-Treated DU-145 Prostate Cancer Cells, *British Journal Of Cancer*, 94, 884–890.
- Baykara, O., 2016, Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165.
- Bijnsdorp, I.V., Peters, G.J., Temmink, O.H., Fukushima, M., and Kruij, F.A., 2010, Differential Activation Of Cell Death And Autophagy Results İn An Increased Cytotoxic Potential For Trifluorothymidine Compared To 5-Fluorouracil İn Colon Cancer Cells, *International Journal of Cancer*, 126, 2457–2468.
- Bodakçı, M.N., Bozkurt, Y., Atar, M., Hatipoğlu, N.K., Penbegül, N., vd., 2012, Düşük Prostat Spesifik Antijen Değeri Olan Hastalara Yapılan Transrektal Prostat Biyopsi Sonuçları, *Dicle Tıp Dergisi*, 39 (2), 238-241.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A., A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures For Cytotoxicity Assays (HTD/NR-90), *Journal Of Tissue Culture Methods*, 9 (1), 7-9
- Cao, H., Li1, C., Qi1, W., Meng1, X., Tian, R., vd., 2017, Synthesis, Cytotoxicity And Antitumour Mechanism Investigations Of Polyoxometalate Doped Silica Nanospheres On Breast Cancer MCF-7 Cells, *Plos One*, 12 (7).
- Ceylan, Y., Günlüsoy, B., Şefik, E., Aydoğdu, Ö., Değirmenci, T., 2017, Prostat Spesifik Antijen 2.5 - 4 ng/mL Aralığında PSA Ve Prostat Biyopsi Sonuçlarının Değerlendirilmesi, *Bozok Tıp Dergisi*, 7 (3), 11-15.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çal, Ç. Ve Şimşir, A., 2005, Prostate Kanseri Hücrelerinde Androjen Baskılama Tedavisine Direnç Gelişiminin Mekanizmaları, Türk Üroloji Dergisi, 31 (1), 21-30
- Dadwal, U.C., Chang, E.S., Sankar, U., 2018, Androgen Receptor-CaMKK2 Axis in Prostate Cancer and Bone Microenvironment, Frontiers in Endocrinology, doi: 10.3389/fendo.2018.00335 (in press).
- Demirtaş, A., 2010, Bor'un İnsan Beslenmesi ve Sağlığı Açısından Önemi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41 (1), 75-80.
- Denmeade, S.R and Isaacs, J.T., 2002, A History Of Prostate Cancer Treatment, Nature Cancer Reviews 2 (5), 389-396.
- Dennis, L.K and Hayes R.B., 2001, Alcohol and Prostate Cancer, Epidemiologic Reviews, 23 (1), 110-114.
- Dönmez Yılmaz, B., Ünsal, M., 2013, Brakiterapi, Okmeydanı Tıp Dergisi 29 (1), 35–40.
- Dönmez, İ., Mungan, N.A., 2011, BPH Prevalansı Ve Ülke Gerçekleri, Üroonkoloji Bülteni, 4, 11-14.
- El-Hammadi, M.M., Delgado, A.V., Melguizo, C., Prados, J.C., Arias, J.L., 2017, Folic acid-Decorated And PEGylated PLGA Nanoparticles For Improving The Antitumour Activity Of 5-Fluorouracil, International Journal of Pharmaceutics, 516, 61-70.
- Engür, S., Dikmen, M., 2017, The Evaluation Of The Anti-Cancer Activity Of Ixazomib On Caco2 Colon Solid Tumor Cells, Comparison With Bortezomib, Acta Clinica Belgica, 72 (6), 391-398.
- Erkurt, M.A., Kuku, İ., Kaya, E., Aydoğdu, İ., 2009, Kanser Kemoterapisi ve Böbrek, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 16 (1), 63-68.
- Fu, L., Gao, H., Yan, M., Li, S., Li, X., 2015, Polyoxometalate-Based Organic-Inorganic Hybrids as Antitumor Drugs, Small Journal, 11 (24), 2938–2945
- Gezmen-Karadağ, M., Türközü, D., 2014, Diyetle Bor Alımının Sağlık İle Etkileşimi: Güncel Bakış, Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 3 (2), 770-785.
- Gleave, M., and Kelly, W.K., 2005, High-Risk Localized Prostate Cancer: A Case for Early Chemotherapy, Journal Of Clinical Oncology, 23 (32), 8186–8191.
- Gnanapragasam, V.J., Mccahy, P.J., Neal, D.E., Robson, C.N., 2000, Insulin-Like Growth Factor II And Androgen Receptor Expression In The Prostate, BJU International, 86, 731-735

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grosso, G., Bella, F., Godos, J., Sciacca, S., Del Rio, D., vd., 2017, Possible Role Of Diet In Cancer: Systematic Review And Multiple Meta-Analyses Of Dietary Patterns, Lifestyle Factors, And Cancer Risk, *Nutrition Reviews*, 75 (6), 405–419.
- Grönberg, H., 2003, Prostate Cancer Epidemiology, *The Lancet*, 361, 859–864.
- Hsing, A.W., and Chokkalingam, A.P., 2006, Prostate Cancer Epidemiology, *Frontiers in Bioscience*, 11, 1388–1413.
- Jedinak, A., Curatolo, A., Zurakowski, D., Dillon, S., Bhasin, M.K., 2015, Novel Non-Invasive Biomarkers That Distinguish Between Benign Prostate Hyperplasia And Prostate Cancer, *BMC Cancer*, 15 (259).
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., vd., 2008, Cancer Statistics, *A Cancer Journal for Clinicians*, 58, 71–96.
- Kahraman, E., Gürhan, İ.D., Korkmaz M., 2013, Farklı Bor Bileşiklerinin CCL 62 (HeLa Kontaminant) İnsan Amniyotik Epitelyal Hücre Hatlarında Olası Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, *Medicine Science*, 2 (1), 454-468.
- Komissarova, E.V., Saha, S.K., Rossman, T.G., 2005, Dead Or Dying: The Importance Of Time In Cytotoxicity Assays Using Arsenite As An Example, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202, 99–107.
- Kuru, R., Yarat, A., 2017, Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış, *Clinical and Experimental Health Sciences*, 7, 107-114.
- Lin, P., Aronson, W., Freedland, S.J., 2015, Nutrition, dietary interventions and prostate cancer: the latest evidence, *BMC Medicine*, 13 (3).
- Loeb, S., Catalona, W.J., 2007, Prostate-Specific Antigen In Clinical Practice, *Cancer Letters*, 249, 30–39.
- Ma, Q., 2010, Transcriptional Responses To Oxidative Stress: Pathological And Toxicological Implications, *Pharmacology & Therapeutics*, 125, 376–393.
- Maldonado, L., Brait, M., Loyo, M., Sullenberger, L., Wang, K., vd., 2014, *GSTP1* Promoter Methylation is Associated with Recurrence in Early Stage Prostate Cancer, *The Journal of Urology*, 192 (5), 1542–1548.
- Menon, D., Thomas, R.T., Narayanan, S., Maya, S., Jayakumar, R., vd., 2011, A Novel Chitosan/Polyoxometalate Nano-Complex For Anti-Cancer Applications, *Carbohydrate Polymers*, 84, 887–893.
- Nomiya, T., Tsuji, H., Toyama, S., Maruyama, K., Nemoto, K., vd., 2013, Management Of High-Risk Prostate Cancer: Radiation Therapy And Hormonal Therapy, *Cancer Treatment Reviews*, 39, 872–878.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olgun, A., Çolak, A.T., Gübbük, H., Şahin, O., Kanar, E., 2017, A New Keggin-Type Polyoxometalate Catalyst For Degradation Of Aqueous Organic Contaminants, *Journal of Molecular Structure*, 1134, 78-84
- Palmeri, M.L., Miller, Z.A., Glass, T.J., Garcia-Reyes, K., Gupta, R.T., 2015, B-Mode and Acoustic Radiation Force Impulse (ARFI) Imaging of Prostate Zonal Anatomy: Comparison with 3T T2-Weighted MR Imaging, *Ultrasonic Imaging*, 37 (1), 22–41.
- Popiołkiewicz, J., Polkowski, K., Skierski, J.S., Mazurek, A.P., 2005, In Vitro Toxicity Evaluation In The Development Of New Anticancer Drugs-Genistein Glycosides, *Cancer Letters*, 229(1), 67-75
- Ruiz, R.B., Hernández, P.S., 2014, Diet And Cancer: Risk Factors And Epidemiological Evidence, *Maturitas*, 77, 202-208.
- Selman, S.H., The McNeal Prostate: A Review, *The Journal of Urology*, 78 (6), 1224–1228.
- Shah, H.S., Al-Oweini, R., Haider, A., Kortz, U., Iqbal, J., 2014, Cytotoxicity And Enzyme Inhibition Studies Of Polyoxometalates And Their Chitosan Nanoassemblies, *Toxicology Reports*, 1, 341-352.
- Song, Y., Tsunashima, R., 2012, Recent Advances On Polyoxometalate-Based Molecular And Composite Materials, *Chemical Society Reviews* 41 (22), 7325–7648.
- Stepanenko, A.A., Dmitrenko, V.V., 2015, Pitfalls of the MTT assay: Direct And Off-Target Effects Of Inhibitors Can Result In Over/Underestimation Of Cell Viability, *Gene*, 574, 193–203.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castroa, A., Canete, M., Horobinb, R.W., Villanueva, A., 2012, MTT Assay For Cell Viability: Intracellular Localization Of The Formazan Product Is In Lipid Droplets, *Acta Histochemica*, 114, 785–796.
- Şahin, H., Çetinkaya, M., Deliktaş, H., Prostat Kanserinde; Üriner, Serum ve Doku Biyomarkerlerinde Yeni Gelişmeler Nelerdir?, *Üroonkoloji Bülteni*, 16, 95-100.
- Tan, M.H.E., LI, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E., 2015, Androgen Receptor: Structure, Role In Prostate Cancer And Drug Discovery, *Acta Pharmacologica Sinica*, 36, 3–23.
- Tomao, L., Sbardella, D., Gioia, M., Di Masi, A., Marini, S., vd., 2014, Characterization of the Prostate-Specific Antigen (PSA) Catalytic Mechanism: A Pre-Steady-State and Steady-State Study, *Plos One*, 9 (7).
- Tülüce, Y., Lak. P.T.A., Koyuncu, İ., Kılıç, A., Durgun, M., vd., 2017, The Apoptotic, Cytotoxic And Genotoxic Effect Of Novel Binuclear Boron-Fluoride Complex On Endometrial Cancer, *Biometals*, 30, 933–944

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Türkez, H., Arslan, M.E., Sönmez, E., Tatar, A., Açıkyıldız, M., vd., 2017, Toxicogenomic Responses Of Human Alveolar Epithelial Cells To Tungsten Boride Nanoparticles, Chemico-Biological Interactions, 273, 257–265.
- Uliasz, T.F., Hewett, S.J., 2000, Microtiter Trypan Blue Absorbance Assay For The Quantitative Determination Of Excitotoxic Neuronal Injury In Cell Culture, Journal of Neuroscience Methods, 100, 157–163.
- Uram, L., Nizioła, J., Majb, P., Sobichb, J., Rode, W., vd., 2017, N(4)-[B-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan)methyl]-2'-deoxycytidine As A Potential Boron Delivery Agent With Respect To Glioblastoma, Biomedicine & Pharmacotherapy, 95, 749-755
- Ünsal, A., Taşkın, F., Meteoğlu, I., UZ, B., Karaman, C.Z., 2006, Prostat Kanseri Tanısında Transrektal Ultrasonografi Bulgularının Gözden Geçirilmesi: Radyolojik Ve Patolojik Bulguların Karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 7 (2), 31–35.
- Wei, B., Zhou, Y., Xu, Z., Ruan, J., Cheng, H., vd., 2013, GSTP1 Ile105Val Polymorphism And Prostate Cancer Risk: Evidence from a Meta-Analysis, Plos One, 8 (8).
- Weyermann, J., Lochmanna, D., Zimmer, A., 2005, A Practical Note On The Use Of Cytotoxicity Assays, International Journal of Pharmaceutics 288, 369–376
- Wilson, K.M., Markt, S.C., Fang, F., Nordenvall, C., Rider, J.R., vd., Snus Use, Smoking And Survival Among Prostate Cancer Patients, International Journal of Cancer, 139, 2753–2759.
- Yakıncı, Z.D., Kök, M., 2016, Borun Sağlık Alanında Kullanımı, İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 4 (1), 36–44.
-
- Yang, S., Long, M., Tachado, S.D., Seng, S., 2015, Cigarette Smoke Modulates PC3 Prostate Cancer Cell Migration By Altering Adhesion Molecules And The Extracellular Matrix, Molecular Medicine Reports, 12, 6990-6996.
- Yıldız, Ö., Çolak, A.T., Yılmaz, M., İça, T., Oztopcu-Vatan, P., vd., 2017, The Syntheses, Characterization, Antimicrobial, DNA Cleavage And Cytotoxic Activities Of Novel Terephthalato Complexes, Journal of Molecular Structure, 1117, 668–674.
- Yılmaz, A., 2002, Her Derde Deva Hazinemiz Bor, TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi, 414, 38-48.
- Yokuş, B., Çakır, D.Ü., 2012, Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1 (2), 7–18.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Zeliadt, S.B., Buist, D.S.M., Reid, R.J., Grossman, D.C., Ma, J., vd., 2012, Biopsy Follow-Up of Prostate-Specific Antigen Tests, American Journal of Preventive Medicine 42 (1), 37-43.
- Uygan, D., Çetin, Ö., 2004, Bor'un Tarımsal ve Çevresel Etkileri: Seydisuyu Su Toplama Havzası, II. Uluslararası Bor Sempozyumu Bildiriler Kitabı, s.527.
- Wein, A.J., Kavoussi, L.R., Novick, A.C., Partin, A.W., Peters, C.A., 2014 Alt Üriner Sistem Ve Erkek Genital Sisteminin Anatomisi (Çev. M. Akand, M. Gül). Ankara Güneş Tıp Kitabevleri, s.33-73.
- Wenxiu, Z., Chuanhua, W., Shunfu, D., Yan, L., Duo, Z., vd., 2011, In vitro study on the antitumor activity of several new polyoxometalates, International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, China.
- Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2014, Bor Sektör Raporu 2013.
- Sağlık Bakanlığı, 2017, Türkiye Kanser İstatistikleri, Halk Sağlığı Kurumu.
- Anonim, 2016, Cell Death Detection ELISA Plus Version 15, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/celldethrobul.pdf>, erişim tarihi: 18.12.2018).
- Anonim, 2018, Prostat Büyümesi, <http://www.tahirkaradeniz.com/prostat-buyumesi.html> , erişim tarihi: 21.06.2018.