



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELANOM HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİT
UYGULAMASININ TİROZİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şerife KILIÇ

KANSER BİYOLOJİSİ PROGRAMI

Ankara, 2022

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELANOM HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİT
UYGULAMASININ TİROZİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şerife KILIÇ

KANSER BİYOLJİSİ PROGRAMI

**Bu araştırma; Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından 2222 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2022

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Melanom Hücre Hatlarında Borik Asit Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine
Etkisinin İncelenmesi

Şerife KILIÇ

Yüksek Lisans Tezi

23.12.2022

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Özen ÖZENSOY GÜLER

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN

Doç.Dr. Ender ŞİMŞEK

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Fatma Elif KILINÇ

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasındaki planlama, yazım ve uygulamasının her adımında telif veya ihlal olmadığını, tez çalışmasının benim çalışmam olduğunu, çalışmadaki tüm aşamaların etik kuralları çerçevesinde gerçekleştirildiğini, kullanılan bilgilere kaynak göstererek kullandığımı beyan ederim.

23.12.2022

Şerife KILIÇ





Canım aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce geçirdiğim zor zamanlarda tezimi tamamlamamı sağlayan, bilimsel birikimini esirgemedi bana aktarmasının yanı sıra hayata dair de öğütlerinden faydalandığım sayın hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Özen Özensoy Güler' e gönülden teşekkür ediyorum. Yüksek lisans dersleri boyunca ve tez dönemi boyunca tavsiyelerini benden esirgemeyip her konuda destekleyen sayın hocalarım Doç. Dr. Ender Şimşek ve Prof. Dr. Ahmet Çarhan'a teşekkür ediyorum.

Labaratuvar çalışmaları sürecinde labaratuvar tekniklerinde bütün tecrübemi borçlu olduğum ve tezimi tamamlam için bütün desteğini hissettiğim Arş. Gör. Tugba Kevser Uysal'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Beyza Ecem Öz Bedir, Arş. Gör. Dr. Emine Terzi, Arş. Gör. Elif Ercan hocalarıma ve laboratuvar sürecinde destek çıkan Hacı Ahmet ve Betül arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans dönemi boyunca sevgisini, emeğini ve ilgisini esirgemedi daima en büyük destekçim olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Kanser İlişkili Genler.....	4
2.1.2. Kanserin Karakteristik Özellikleri.....	5
2.1.3. Melanom	8
2.1.3.1. Melanomun Risk Faktörleri	9
2.1.3.2. Melanomun klinik özellikleri	10
2.1.3.3. Melanomun Sınıflandırılması.....	10
2.1.3.4. Melanomun Tedavisi	11
2.1.3.5. Melanogenez	12
2.2. Tirozinaz Enzimi	15
2.2.1. Tirozinaz Enziminin Tarihçesi	16
2.3.Tirozinaz İnhibitörleri.....	17
2.4. Bor ve Borik Asit.....	19
2.4.1. Borik Asit ve Kanser Tedavisi	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	26
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	28
3.2. Yöntem.....	28

3.2.1. Hücre Kültürü.....	28
3.2.2. Besiyeri Değişimi	29
3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması.....	30
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması.....	30
3.2.5. Hücre Sayımı.....	30
3.2.6. Hücre Hatlarına Borik Asit Uygulanması ve Sitotoksitite Testi.....	31
3.2.6.1. Borik Asit Uygulanması.....	31
3.2.6.2. WST-1 Hücre Canlılık Testi.....	32
3.2.7. Tirozinaz Enzim Aktivite Tayini.....	33
3.2.8. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. SK-MELL-30 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	34
4.2. WM-115 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının	35
Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	35
4.3. SK-MELL-30 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi.....	36
4.4. WM-115 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi	38
5. TARTIŞMA.....	40
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKÇA.....	48
8. EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ÖZET

Melanom Hücre Hatlarında Borik Asit Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Malign melanom; cilt, göz ve saç rengini belirleyen nöral krest kökenli melanin üreten melanosit hücrelerinin malign tümörü olup görülme sıklığı hızla artış gösteren ve mortalitesi yüksek olan bir kanser türüdür. Tirozinaz enzimi (EC.1.14.18.1) melanositlerde melanin oluşumundan sorumlu enzim olup melanom kanserinde aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Tirozinaz enzimi yıllardır melanom teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Tirozinaz enziminin inhibitörlerinin melanom hücrelerindeki tirozinaz enzim aktivitesini inhibe etmesiyle hücrelerin apoptoz yolağına girdiğinin anlaşılması melanom tedavisinde son derece önemli bir yaklaşımı beraberinde getirmiştir.

Borik asidin (BA, H_3BO_3) kanser hücre hatlarında oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, SK-MELL-30 ve WM115 melanom hücre hatlarında BA'nın, tirozinaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılmasıdır.

Söz konusu çalışmamızda SK-MELL-30 ve WM115 hücre hatlarına 2,5-250 mM arasında 6 farklı konsantrasyonda borik asit uygulanmıştır. L-DOPA tirozinaz enziminin substratı olarak kullanılmıştır. Tirozinaz enzim aktivitesi 475 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. BA uygulaması tirozinaz enziminin bilinen en iyi inhibitörü Kojik asit (KA) ile karşılaştırma yapıldığında ise, WM115 hücre hattında anlamlı bir inhibisyon göstermiştir ($p=0,046$) SK-MELL-30 hücre hattında ise anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p=0,085$). BA kullanımının tirozinaz enzimi üzerindeki inhibisyon mekanizmalarını geniş çapta aydınlatmak için analitik yöntemlerin kullanılması ve mekanizmaların açıklığa kavuşturulması bir sonraki deneysel çalışmalarımızın hedefini oluşturmuştur.

Anahtar kelimeler: Borik Asit, Kanser, Melanom, Tirozinaz

ABSTRACT

The Effect of Boric Acid on Tyrosinase Activity in Melanoma Cell Lines

Malignant melanoma; It is a malignant tumor of melanin-producing melanocyte cells originating from the neural crest, which determines skin, eye and hair color, and is a cancer type with a rapidly increasing incidence and high mortality. The enzyme tyrosinase (EC.1.14.18.1) is the enzyme responsible for the formation of melanin in melanocytes, and its activity has been shown to be increased in melanoma cancer. The enzyme tyrosinase has been used for years as a biomarker in the diagnosis of melanoma. The finding that cells enter the apoptosis pathway by inhibiting the activity of the tyrosinase enzyme in melanoma cells by inhibitors of the tyrosinase enzyme brought an extremely important approach to the treatment of melanoma.

Boric acid (BA, H_3BO_3) is known to cause oxidative stress, inhibition of cell growth, apoptosis, and changes in cell morphology in cancer cell lines. The aim of this study is to investigate the effect of BA on tyrosinase enzyme activity in SK-MEL -30 and WM115 melanoma cell lines.

In our study, boric acid was applied to SK-MEL -30 and WM115 cell lines at 6 different concentrations between 2.5-250 mM. It was used as a substrate of the enzyme L- DOPA tyrosinase. Tyrosinase enzyme activity was determined spectrophotometrically at a wavelength of 475 nm. When comparing the use of BA with kojic acid (KA), the best known inhibitor of the tyrosinase enzyme, there was significant inhibition in cell line WM115 ($p=0.046$), but no significant result in cell line SK-MEL -30 ($p=0.085$). The use of analytical methods to comprehensively elucidate the inhibition mechanisms of the use of BA on the enzyme tyrosinase and the elucidation of the mechanisms were the goal of our next experimental studies.

Keywords: Boric Acid, Cancer, Melanoma, Tyrosinase

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

B	: Bor
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
BA	: Borik asit
P53	: Tümör protein 53
P21	: Tümör protein 21
RAS	: Ras geni tarafından üretilen protoonkogen protein
RB	: Retinoblastoma
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
TRP-1	: Tirozinazla ilişkili protein 1
TRP-2	: Tirozinazla ilişkili protein 2
MITF	: Mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü
DICEA	: Sodyum dietil-ditiyokarbamat
PVP	: Polivinilpirolidin
Cu ⁺²	: Bakır iyonu
KA	: Kojik asit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
L-DOPA	: 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PBS	: Fosfat tamponlu tuz
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
FBS	: Fetal sığır serumu
DMSO	: Dimetil Sulfoksit
HCl	: Hidrojen klorür
UV	: Ultraviyole ışık
WST-1	: Water-soluble tetrazolium salt
CDKN2A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
Ink4A	: Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 4A
BRAF	: hücre sinyal sistemi proteini

N-Ras	:NRAS geni tarafından kodlanan enzim
Raf	: Rapidly accelerated fibrosarcom
Ras	: Rat sarcoma
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
δ	: Delta
ζ	: Zeta
η	: Eta
θ	: Teta
ι	: İota
μM	: mikromolar
nM	: nanomolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre bölünmesi sonucu iyi huylu ve kötü huylu tümör oluşumu.....	3
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin özellikleri	6
Şekil 2.3. Derinin yapısı ve melanozom	9
Şekil.2.4. Melanogenez reaksiyonları.....	13
Şekil.2.5. İki tip melanin sentezi	14
Şekil 2.6. Tirozinaz enzim yapısı	15
Şekil.2.7. Tirozinaz reaksiyonları.....	16
Şekil.2.8. Kojik asit	18
Şekil 2.10. Borik asit	20
Şekil 2.11. Bazı bor bileşikleri	21
Şekil.2.12. Dünya bor madeni rezervleri dağılımı	22
Şekil.2.13. Borun en fazla bulunduğu gıdalar.....	23
Şekil 2.14. Bor metabolizması	24
Şekil 3.1. Sırasıyla SK-MELL-30 ve WM-115 melanom hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri	29
Şekil 3.2. T25 flaskta hücrelerin inkübasyonu.....	29
Şekil 3.3. Thoma lamı.....	31
Şekil 3.4. Tetrazolyum tuzu WST'nin formazona dönüşümü.....	32
Şekil 4.1. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan BA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği.....	34
Şekil.4.2. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği.....	35
Şekil.4.3. WM-115 hücrelerine uygulanan BA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği.....	35
Şekil.4.4. WM-115 hücrelerine uygulanan KA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği.....	36
Şekil.4.5. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan BA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği	36
Şekil.4.6. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği	37

Şekil.4.7. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA ve BA sonucu tirozinaz enziminin inhibisyonu.....	37
Şekil.4.7. WM-115 hücrelerine uygulanan BA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği.....	38
Şekil.4.8. WM-115 hücrelerine uygulanan KA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği	38
Şekil.4.9. WM-115 hücrelerine uygulanan KA ve BA sonucu tirozinaz enziminin inhibisyonu	39



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri	19
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.....	26
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.....	27
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerin listesi.	27



1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır (1). Melanositler, cilt, göz ve saçın rengini belirleyen koyu renkli bir pigment olan melanin üreten hücrelerdir. Melanom melanositlerden kaynaklanan malign (kötü huylu) bir kanser türü olup ilaç direnci geliştirme, metastatik hale gelme ve kötü prognoz taşıma eğilimi ile iyi bilinir (2). Deri kanserine bağlı ölümlerin % 75'i melanom nedeniyle gerçekleşir (3). Bütün bu zorlukları ortadan kaldırmak için hedefe yönelik terapiler oldukça önemlidir.

Tirozinaz enzimi (EC.1.14.18.1) katekoloksidaz, polifenol oksidaz ya da difenolaz isimleriyle de bilinen Cu^{+2} içeren, melanin sentezinde hız sınırlayıcı bir enzim olarak rol oynayan çok işlevli bir metaloenzimdir (4). Tirozinaz enzimi bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur. Melanom oluşumunda kritik bir role sahip olduğu düşünüldüğünde, aktivitesinin izlenmesi ve farmakolojik olarak düzenlenmesi hastalığın tanı ve tedavisine yardımcı olacaktır (3, 4). Deri kanserlerinde tirozinaz enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir olup yıllardır melanom teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (5,6). Tirozinazı inaktif hale getirecek inhibitörler geliştirilmiştir. Tirozinaz inhibitörlerini kaynağına göre doğal, sentetik ve yarı sentetik olarak üçe ayırabiliriz. Genellikle bitkiler ve mantarlar içerdikleri fenolik bileşenler, steroidler ve polifenollerle doğal tirozinaz inhibitörlerine temel kaynaklardır (4). Tirozinaz inhibitörleri endüstriyel ve gıda alanlarında oldukça yaygın kullanılırken melanom tedavisinde de kullanılmıştır (3, 4, 6). Tirozinaz enzim inhibitörlerinin yüksek toksite etki göstermeleri sebebiyle daha az zararlı ve etkili inhibitörlerin keşfi oldukça önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar, tirozinazın inhibe edilmesiyle melanom hücrelerinin apoptoza gittiğini göstermiştir (3, 5, 6).

Doğada elementel formda bulunmayan Bor (B), yaygın olarak borat formlarında (borik asit ve boraks gibi) bulunmaktadır (7). B elementinin bitkilerde esansiyel olarak keşfedilmesiyle hayvan hücreleri için de gerekli olduğu yapılan çalışmalar ile gözlenmiştir (8). Bu çalışmalar ile B elementinin etkilerinin kemik,

mineral, lipid, enerji metabolizması, immün sistem, endokrin fonksiyonu lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem ile DNA harabiyetinin önlenmesinde olumlu etkilerinin olabileceği belirtilmiştir (9-11). Borik asitin (BA) kanser hücre hatlarında oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (12). Ayrıca BA bileşiğinin, insan deri melanom hücre hatlarında hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (13).

Araştırmamızın en önemli hedefi; önemli bir molekül olan BA'nın melanom hücrelerinde tirozinaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenerek kanser tedavisinde tirozinaz enziminin yerinin ne olacağı ve bu söz konusu enzimin inhibisyon sonuçlarının melanom tedavisinde yeni aday moleküllerinin sentezinin mümkün olup olamayacağını belirlemektedir.

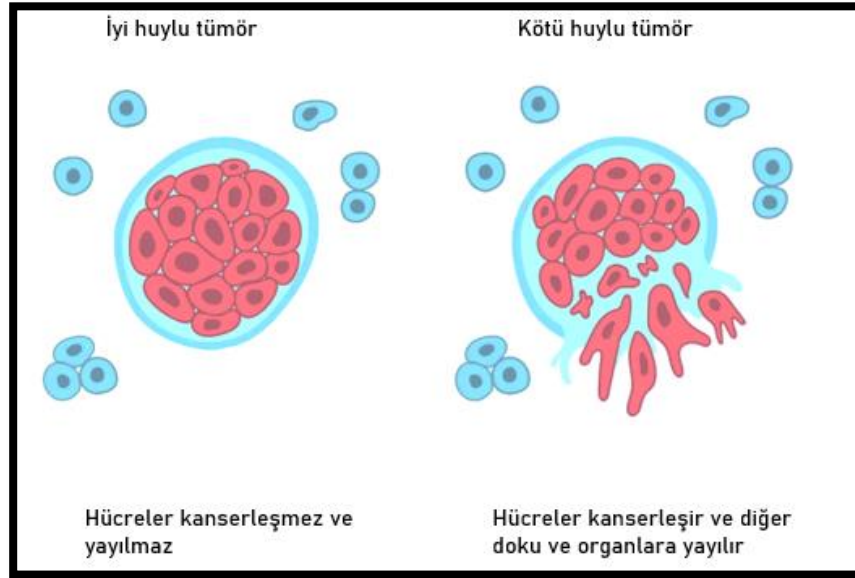
 alışmamamızda tirozinaz enzim üzerindeki borat formunun son derece önemli inhibisyon etkisi göstermesi bor kaynaklarının melanom üzerindeki tedaviye yönelik şansını arttırdığı söylenebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücudun belirli bir bölgesindeki hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve çoğaldığı bir durumdur. Kanserli hücreler, organlar da dahil olmak üzere çevredeki sağlıklı dokuyu istila edip yok edebilir (14). Uluslararası kanser araştırmaları ajansının 2020 yılı kanser istatistiklerine göre dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve yaklaşık 10 milyon ölüm olduğu bildirilmiştir (15).

Hücrelerin, hangi boyuta ulaşacağı, hangi sıklıkla bölüneceği ve ne zaman öleceği gibi fonksiyonlar genler tarafından kontrol edilir. Genlerde meydana gelen bir veya daha fazla mutasyon sonucu hücrelerin kontrolsüz bölünmeleriyle hücre yığınları meydana gelir. Bu oluşumlarla iyi huylu tümör (benign tümör) olabilir ya da kan dolaşımına girip, diğer dokuları istila ederek ikincil tümörleri oluşturup kötü huylu tümör olabilirler (Şekil 2.1) (14).



Şekil 2.1. Hücre bölünmesi sonucu iyi huylu ve kötü huylu tümör oluşumu (14)

Tümörler cildi, kemikleri, dokuları, organları ve bezleri etkileyebilir. Tümörlerin nerede oluştuğuna göre kanserin türü belirlenirken, tümör hücrelerinin büyümeye başladığı doku türüne göre de kanser türleri belirlenmektedir. Bu ayrıma göre 5 tip tümör vardır:

- *Karsinom*: Epitel dokusundaki bazal hücrelerin değişimi sonucu oluşurlar. Epitel dokusu deriyi, organları ve iç geçiş yollarını (yemek borusu gibi) örter. Cilt, göğüs, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas, baş ve boyun kanserlerinin çoğunu karsinomlar oluşturmaktadır.
- *Sarkom*: Yumuşak doku kanseri de denilen sarkomlar kas, kemik, yağ ve bağ doku hücrelerinin değişimi sonucu oluşurlar. Yetmişten fazla tipi olmasına rağmen sık görülmeyen bir kanser türüdür.
- *Lösemi*: Kan hücrelerinin özellikle de akyuvarların anormal şekilde çoğalması sonucu oluşurlar. Vücuttaki lenfatik sistem ve kemik iliğini etkileyen kanserlerdir. Lösemiler tümörün yayılım ve gelişim özelliklerine göre akut veya kronik olabilirler. Genellikle akut lösemiler çocuklarda ortaya çıkarken, kronik lösemiler yetişkinlerde görülür.
- *Lenfoma*: Kemik iliğinden üretilen vücudun savunma hücreleri olan lenfositlerin kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu oluşurlar. en çok vücudun en önemli savunma mekanizması olan lenf bezlerinde görülürler.
- *Miyeloma*: Antikor üreten plazma hücrelerinden kaynaklanan kanser türüdür. Miyelom hücreleri anormal antikorlar üretir. Bu anormal antikorlar özellikle kemik iliğinde birikirler. (14, 16).

2.1.1. Kanser İlişkili Genler

Tüm kanserler, bir hücredeki bir veya daha fazla gen mutasyona uğradığında başlar. Kansere sebep olan bu genler üç kategoriye ayrılırlar: Tümör baskılayıcı genler, protoonkogenler, DNA onarım genleri.

Tümör baskılayıcı genler, koruyucu genler olup, hücre döngüsü kontrol noktalarını düzenleyen ve apoptozis sürecini başlatan genlerdir (17). Tümör baskılayıcı genler mutasyona uğradıklarında, hücrenin apoptozise uğramasını engeller.

P53 proteini, hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. P53 mutasyonlarının büyük çoğunluğu DNA bağlama domaininin yer aldığı 4. ve 9. ekzonlarda meydana gelir. P53 proteini, ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek veya doğrudan DNA ile fiziksel olarak etkileşime girerek DNA tamiri, hücre döngüsü kontrolü, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve apoptozis işlevlerini gerçekleştirir. P53, DNA'ya bağlanarak P21 proteinin kodlayan bir genin transkripsiyonunu uyarır. P21 proteini, CDK4/siklin D1 kompleksini inhibe eder ve böylece hücrenin G1 aşamasından S aşamasına geçişini önler. Böylece DNA'da hasar var ise replikasyondan önce hücre döngüsü durdurulup DNA hasarının tamir edilmesi sağlanır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek ise P53 hücre ölümünü tetikler. İnsan kanserlerinin % 50'den fazlasında P53 mutasyonu görülmüştür (17, 18).

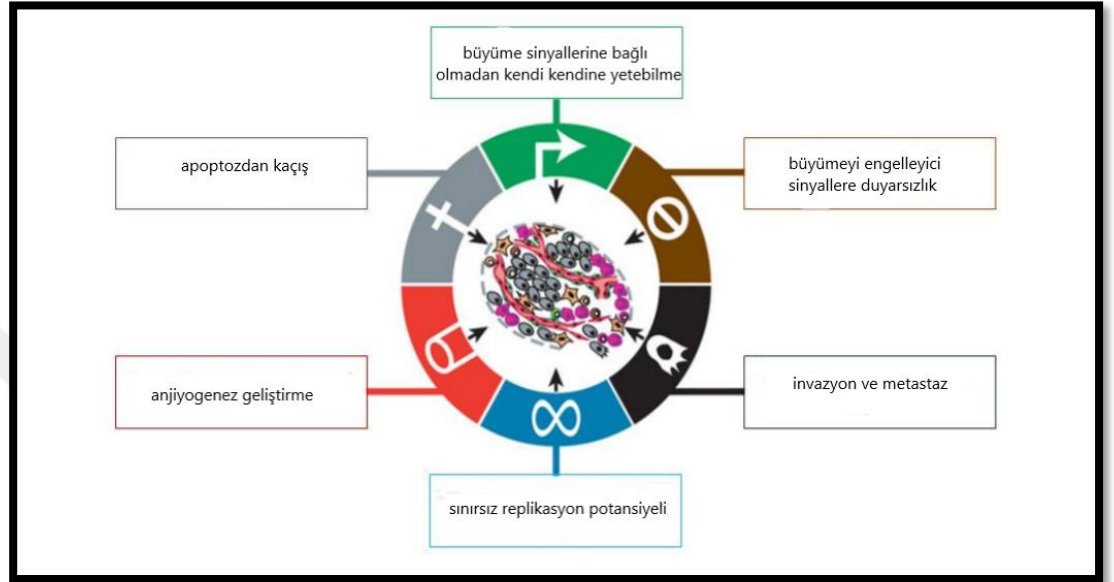
Protoonkogenler, hücre büyümesini ve bölünmesini sağlayan genlerdir. Mutasyona uğradıklarında hücre devamlı bölünür ve kanserleşme meydana geldiği için onkogen olarak isimlendirilirler (19). RAS genleri onkogen ailesinin bir üyesidir. Ras proteinlerinin hücre içinde protein kinaz MAP kaskadını aktive etmesiyle oluşan devamlı mitojenik sinyal sonucu ölümsüz hücreler oluşur. İnsan kanserlerinde RAS protoonkogeni mutasyonları en sık görülen genetik değişikliklerdendir (20).

DNA onarım genleri, DNA'nın tamir edilmesini ve genomik kararlılığın devamlılığını sağlar. DNA replikasyonu sırasında hatalar meydana gelebilir ve bunlar mutasyona sebep olabilir. DNA tamir genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu hatalı DNA'nın replikasyonu durdurulamaz ve kanserleşme süreci tetiklenir (16).

2.1.2. Kanser Karakteristik Özellikleri

İnsanlarda karsinogenez, çok aşamalı genetik değişiklikler sebebiyle normal hücrelerin yeni özellikler kazanması ve tümör hücrelerine dönüşmesi sürecidir. Bu özelliklerin sayısı artabildiği gibi her kanser hücresinde bulunan, kanserin

karakteristik özelliği olan altı temel özellik vardır (18) (şekil 2.2). Bu özellikler; apoptozdan kaçış, büyüme sinyallerine bağlı olmadan kendi kendine yetebilme, büyüme engelleyici sinyallere duyarsızlık, sınırsız replikasyon potansiyeli, anjiyogenez ile invazyon ve metastaz gelişmesi olarak sınıflandırılır.



Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin özellikleri (18)

Apoptozdan kaçış: Apoptozis hücrelerin programlanmış biçimde ölmelerini sağlayan normal fizyolojik bir süreçtir. Apoptoz, dokulardaki hücre sayısının sabit tutulmasını, organizma için tehlike arz eden hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptozis böylece dinamik dengenin sağlanmasının önemli bir mekanizmadır. Apoptozis mekanizmasının başlatılmasında görevli olan tümör baskılayıcı genlerde mutasyon meydana geldiğinde hücrenin apoptoza gitmesi engellenir. Böylece hasarlı hücreler apoptozdan kaçarak karsinogenezi başlatırlar (16,17).

Büyüme sinyallerine bağımlı olmadan kendi kendine yetebilme: Normal hücrelerin bölünmek için aktif hale geçebilmeleri öncelikle büyüme sinyalleri tarafından uyarılmalarını gerektirmektedir. Protoonkogenlerin ürünleri olan bu sinyal molekülleri büyüme faktörleri, ekstraselüler matriks bileşenleri ve hücreler arası adezyon molekülleri olup hücrenin membranındaki reseptörlere bağlanarak çekirdeğe kadar giden yolların uyarılmasını sağlarlar. Bu mekanizmanın ardından hücreye

bölünme emri verilir (18, 21). Kanser hücrelerindeki onkogenler, büyüme faktörlerinin sentezinin artması, büyüme faktörü reseptörlerindeki mutasyonlar veya hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin aktive/ inaktive edilmesiyle hücre membranından çekirdeğe kadar olan sinyal sistemini sürekli uyarırlar. Bunun sonucu olarak hücreler kontrolsüz şekilde çoğalırlar. (21).

Büyümeyi engelleyici sinyallere duyarsızlık: Normal dokularda büyümeyi engelleyici sinyaller, hücrelerin bölünmeden kalmalarını ve doku homeostazını sağlarlar. Hücre döngüsünde hücrenin sessizliğini koruması için görevli olan retinoblastoma (RB) geninde meydana gelen mutasyonla hücre denetlenemez ve devamlı olarak bölünür. Kanserlerin neredeyse tümünde RB geni ilişkili mutasyonlar nedeniyle hücre sessizliği bozulur ve devamlı olarak bölünür (22).

Sınırsız replikasyon potansiyeli: Hücreler zamanla kromozomlarının ucunda yer alan kodlanmayan özelleşmiş DNA tekrar dizileri olan telomer adı verilen bölgelerinin kısalmasıyla yaşlanırlar ve ölürlər. Kanser hücreleri ise telomer kısaltmalarını, telomeraz adı verilen enzimle, yeni tekrarlar ekleyerek ortadan kaldırır (23). Böylece kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünerek ölümsüzlük kazanırlar.

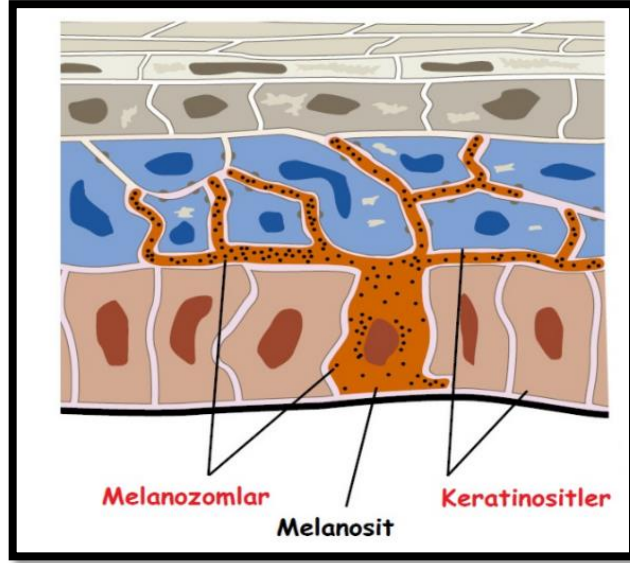
Anjiyogenez geliştirme: Kanser hücrelerin artan oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamaları için yeni damar oluşumları gerekmektedir. Bu yeni damarların oluşumu anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki dengenin denetimiyle gerçekleşir. Bu oluşumda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) önemli roller üstlenir (24). VEGF endotelial hücre yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanır. Endotelial hücre sitoplazmasında üretilen düzenleyici proteinler nükleusta ilgili genlerin transkripsiyonunu aktive eder. Böylece yeni endotelial hücre çoğalmasını uyarıcı proteinlerin üretilmesi sağlanır. Yeni damar oluşumuyla kanser hücreleri hem gerekli besini ve oksijeni alarak sürekli büyür hem de kan dolaşımına geçerek metastaz yapıp tümörün yayılmasını sağlarlar (25).

İnvazyon ve metastaz: Metastaz, bir tümör hücresinin bulunduğu yerden vücudun başka bir yerine yerleşip yeni oluşumlar yapmasıdır (26). Tümör hücresini çevresine fiziksel olarak bağlayan proteinler mutasyona uğradığında tümör hücresi adhezyonunu kaybeder. Örneğin, normal dokularda hücre-hücre tutunması için

gereken E-kadherin proteini epitel tümörlerinde normal seviyeden daha az bulunmaktadır. Ayrıca, proteolitik enzimler tümör hücrelerinde artarak hücredeki düzenleyici moleküllere duyarsızlığı sağlarlar böylece tümörün agresifliğini arttırırlar (18). Yanlış sentezlenen hücre adhezyon molekülleri ve artmış proteinaz enzimleri tümör hücrelerinin normal hücre sınırlamalarından kaçmasını ve bu sınırlarda delikler oluşturarak dolaşım sistemine girmesini sağlarlar (23- 26).

2.1.3. Melanom

Melanom, cilde, saça ve göze rengini veren nöral krest kökenli melanosit denilen hücrelerin kontrolden çıktığında meydana gelen kanserdir (5). Melanosit hücreleri deri, mukoza, göz ve santral sinir sistemlerinde bulunurlar. Melanosit hücreleri melanin pigmentinin yapımından sorumludur. Melanositlerden pigment yapımı “melanozom” adı verilen hücre içi organellerinde bir dizi reaksiyon zinciri ile sentezlenir (şekil 2.3) (27, 28). Melanozom, melanositin sitoplazması içindeki organelidir. Melanozom; tirozinaz enzimiyle melanin pigmenti oluşturan bir sitoplazmik organelidir. Melanozomlar melanin biyosentezini düzenleyen tirozinaz gibi enzimleri bulundurur (28).



Şekil 2.3. Derinin yapısı ve melanozom (28)

Derinin melanositik sisteminden kaynaklanan primer kutanöz melanom, dünyadaki kanser ölümlerinin % 1-2'sini oluşturmaktadır. Melanom diğer cilt kanserlerine göre daha az görülse de daha agresiftir. Deri kanserleri içinde ölümcül olarak ilk sırada (% 75) yer alır (27). Ayrıca, melanom beyin metastazı yapmada akciğer kanseri ve meme kanserinden sonra üçüncü sırada beyin metastazı yapan kanser türüdür. Melanom hastalarının yaklaşık % 75'inde beyine metastaz görülür. Beyin metastazı olan hastaların % 95'inde ise ölüm görülmektedir (29). Melanomun 5 yıllık sağ kalımı % 98 olmasına rağmen ileri seviye melanom veya metastatik melanom teşhisi olan hastalarda bu yüzde önemli ölçüde düşer (30).

2.1.3.1. Melanomun Risk Faktörleri

Melanomun yüksek metastatik potansiyeli nedeniyle, melanomla ilişkili risk faktörlerini belirlemek bu agresif cilt kanserini teşhis ve tedavi etmek için araştırmalar devam etmektedir. Melanom gelişimi için risk faktörleri başta UV maruziyeti olmak üzere genetik belirteçler (CDKN2A, Ink4A, BRAF ve N-Ras mutasyonu ile Raf/Ras/MAPK yolağındaki anomaliler), deri tipi, aile öyküsü, DNA onarım defektleri gösterilmiştir (31-39).

2.1.3.2. Melanomun Klinik Özellikleri

Melanomların % 25'i önceden olan bir deri lezyonu üzerinden gelişirken birçoğu normal görünen deri üzerinden gelişmektedir. Klinik olarak melanomun bulguları asimetri, sınır düzensizliği, renk değişikliği, çap ve elevasyondur (40). ABCDE tanımlamasına göre melanom için şüpheye sebep olabilecek özellikler şunlardır; A) Lezyonun iki taraf asimetrik ise bu durum melanom için bir uyarı olabilir. B) Melanomun sınırları düzensiz olma eğilimindedir. Düzensiz, bulanık veya çentikli kenarlar melanomu düşündürür. C) İyi huylu bir ben tek renktir. Eğer deri lezyonu içinde birden fazla renk mevcutsa melanomu işaret edebilir. D) Çapı 6 mm'den büyük olan lekeler melanomu düşündürür. E) Boyutu, şekli veya rengi değişen bir ben veya deri lezyonu melanomla ilgilidir (41).

Melanomda, tümör in situ dönemindeyken radyal (yanal) bir büyüme gösterir. invazif döneminde ise vertikal (dikey) büyümesi söz konusudur (42).

2.1.3.3. Melanomun Sınıflandırılması

Malign melanomlar olan kutanöz melanomlar histolojik olarak 4 alt tipe ayrılırlar:

Yüzeyel Yayılan Melanom (% 70): En yaygın melanom türüdür. Beyaz ırkta görülen melanomların % 60-70'ini oluşturur (5). Kadınlarda erkeklere oranla daha sık görülür. Önceden olan bir deri lezyonundan gelişen melanositik yapıların en çok görülenleri bu tiptedir (5, 42).

Nodüler Melanom (% 15): Genellikle mavi veya siyah olan ve hızla genişleyen kabarık veya polipoid lezyonlardan kaynaklanır. Yüksek metastaz oranı ile ilişkili bir büyüme fazına sahiptir. Erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanır (5,43).

Lentigo Maligna Melanom (% 5): Radyal büyüme fazı en uzun olup en iyi prognozlu ve ikinci en yaygın kutanöz melanom türüdür (5). Tipik olarak küçük çil

benzeri bir yapı olarak başlar. Zamanla büyür, koyulaşır, asimmetrik hale gelir ve dikey bir büyüme evresi gösterir. Yaşlı hastalarda daha sık görülür (44).

Akral Lentiginöz Melanom (% 10): Tırnak ve tırnak çevresindeki mukozalarda yerleşen melanom tipidir. En çok siyah ve sarı ırkları etkileyen melanom tipidir (5). Lezyonlar önceden var olan bir lezyondan gelişmez. Genellikle sağlam deride ortaya çıkar. Ayağın fazla basınca maruz kaldığı topuğu ve tabanında sık olarak görülürler (5). Klinik olarak düzensiz sınırlı bir pigmentasyon gösterir. Tipik olarak, kadın ağırlıklı yaşlı hastaları etkiler (45).

2.1.3.4. Melanomun Tedavisi

Melanom tedavisinde, cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri bulunmaktadır (46). Cerrahi işlemler tümörün klinik-patolojik özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Eksizyon, in situ melanomlarda 0,5 cm olarak yapılırken kalınlığı 2 mm'ye kadar olan tümörlerde 1 cm, kalınlığı 2 mm'den büyük olanlar için 2 cm olarak yapılır (47).

Melanom tedavisinde, eğer tümör ilk yerinden yayılım göstermediyse tedaviye cevap oluşturulabilir ve 5 yıllık sağ kalım oranı % 90'dır (48). Metastatik melanom hastalarının ortalama yaşam süresi genellikle 6-9 aydır (49). Metastatik melanom tedavisi oldukça toksik yan etkiler içeren kemoterapi, biyoterapi, biyokemoterapi ve tek ajan seçeneklerinin kombinasyonlarıyla yapılmaktadır (5). Melanom için kemoterapi tedavisinde kullanılan Dakarbazin ve Temozolomid son derece önemlidir (50-52). Dakarbazin, melanom tedavisi için 1975 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmış, alkilleyici bir ajandır. Diğer bir kemoterapötik ilaç olan Temozolomid ise Dakarbazin analogu olarak kabul edilir ve oral uygulama avantajına sahiptir. Bu ilaç, melanomun metastaz yaptığı en yaygın yerlerden biri olan merkezi sinir sistemine ulaşabildiği için melanom tedavisi için önem taşır (53). Metastatik melanomlu hastalar için prognozu büyük ölçüde iyileştirmeyi hedefleyen yeni ilaç keşifleri kemoterapiye olan ilgiyi azaltmıştır (54).

İmmünoterapi Melanom, immün sisteme en duyarlı tümörlerden biridir. Metastatik melanom tedavisinde sitotoksik T lenfosit (CTLA4) antijene karşı

antikorlar çalışılmıştır. Bu sayede melanom hücrelerindeki immün sistem düzenlenmesi hedeflenmiş olup sürekli yanıt sağlandığı görülmüştür (50).

Kutanöz melanomların % 60'ından fazlası BRAF geninde bir mutasyon barındırır ve bunların % 80'ninden fazlasında spesifik V600E mutasyonu bulunmaktadır (55). BRAFV600E'ı hedef alan tedaviler, büyümeyi inhibe etmesi, anjiyogenezi önlemesi, invazyon ve metastazı azaltması, tümör hücre ölümünü indüklemesi veya tümör farklılaşmasını teşvik ederek malign tümörlerin ilerlemesini durdurması gibi önemli potansiyele sahiptir. Klinik öncesi çalışmalardan elde edilen kanıtlar, BRAFV600E'in melanom tedavisinde önemli bir hedef olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (56). Vemurafenib (VMF) (PLX-4032), primer hedefi B-Raf proteini olan ve BRAFV600E mutasyonuna özgü kullanılan bir ilaçtır (57). VMF, mutasyona uğramış BRAF monomerinin ATP bağlayıcı bölgesini bloke ederek MAPK yolunu inhibe eder (58). Tafinlar olan Dabrafenib (DAB) ise primer hedefi B-Raf proteini olan ve BRAF mutasyonu pozitif hastalarda kullanılan bir ilaçtır (58). Melanomdaki yüksek dirençlilik melanom tedavisi için yeni ve etkili stratejilerin gelişimini hızlandırmıştır.

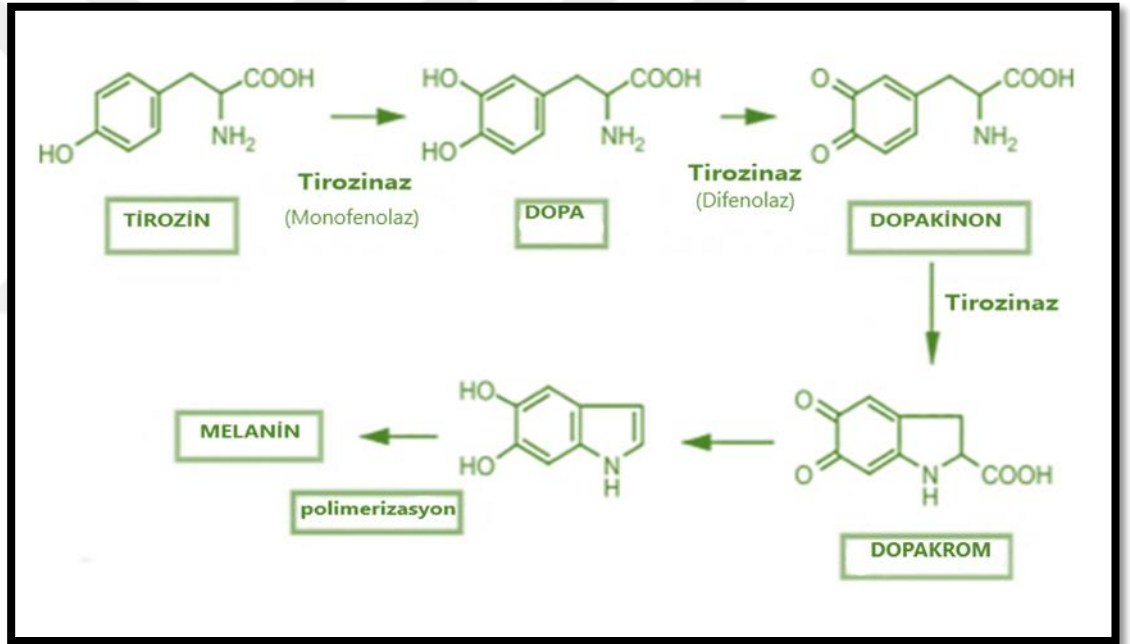
2.1.3.5. Melanogenez

Melanogenez, insan derisine, gözüne ve saçına renk veren pigment olan melaninlerin melanositlerden sentezlenmesi işlemidir (Şekil 2.4.) (59). Melanogenez ve cilt pigmentasyonu, güneşten gelen ultraviyole radyasyonun zararlı etkilerine ve cilt karsinogenezine yanıt olarak en önemli koruyucu faktördür (4).

Melanositlerin artmış melanin sentezi ve birikimi Acanthosis nigricans, Servikal Poikiloderma, melazma, Periorbital hiperpigmentasyon, Lentiginler, Parkinson hastalığı ile ilişkili nöro-dejenerasyon ve cilt kanseri riski dahil olmak üzere birçok cilt rahatsızlığı tipinde ortaya çıkar (4). Deri kanserlerinde de tirozinaz enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiştir ve yıllardır melanom teşhisinde biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (3, 4, 6). Tirozinazı inaktif hale getirecek inhibitörler geliştirilmiştir ve bunlar melanom tedavisinde kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar tirozinazın inhibe edilmesiyle melanoma hücrelerinin apoptoza gittiğini göstermiştir (3).

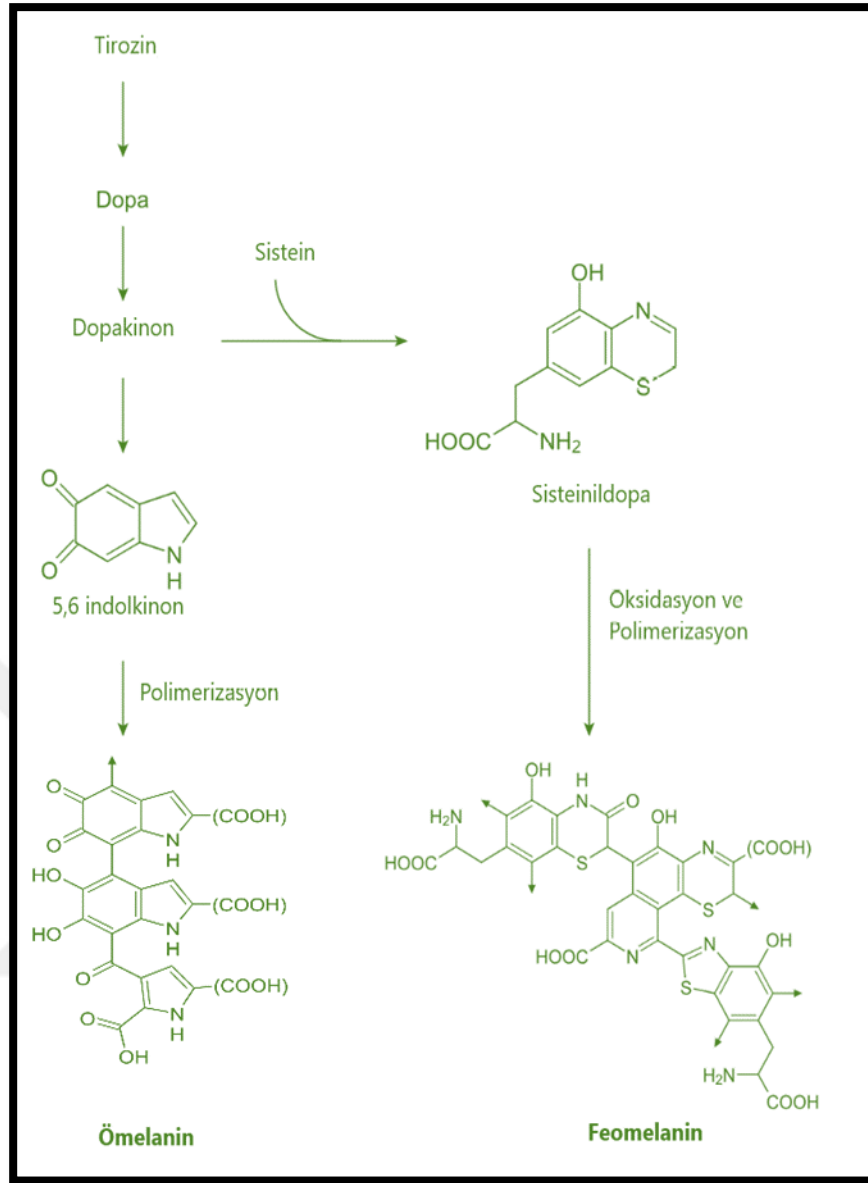
Melanogenez sürecinde melanozomların zarında tirozinaz, tirozinaza benzer (%40 homolog amino asitler) tirozinaz ilişkili protein-1 (TRP-1), protein-2 (TRP-2) ve mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (MITF) melanin sentezinde önemli rol oynarlar (60, 61). Rolü tam olarak netleşmemekle birlikte TRP-1'in tirozinazın aktivasyonu ve stabilizasyonunda, melanozom sentezinde, eumelanin/feomelanin oranının artmasında ve peroksidaz etkisinden dolayı oksidatif strese karşı rol oynadığı düşünülmektedir (62).

Tirozinaz enzimi, melanin sentezinde hız sınırlayıcı ve sentezin durdurulmasında kritik bir role sahiptir. Melanogenezi inhibe etmek için tirozinaz inhibitörlerini kullanmak yaygın bir yaklaşımdır (3, 4).



Şekil 2.4. Melanogenez reaksiyonları (27)

Melanogenez birçok enzimatik ve kimyasal reaksiyonun yer aldığı kompleks bir yolaktır (Şekil 2.5). Melanositlerde iki tip melanin sentezi gerçekleştirilir (Şekil2.5): eumelanin (kahverengi-siyah) ve feomelanin (kırmızı-sarı) formlarına sırasıyla glutatyon ve sistein rezidülerinin bağlanmasıyla farklılık oluşur (59).

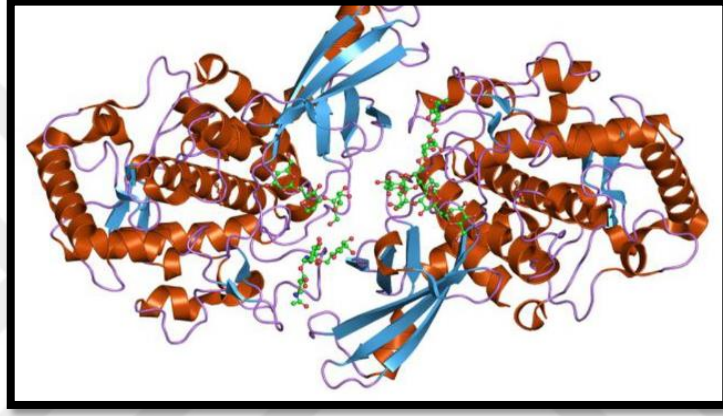


Şekil 2.5. İki tip melanin sentezi (63)

Melanogenez, tirozinaz aktivitesiyle L-tirozinin dopakinona oksidasyonu ile başlatılır. Dopakinon, eumelanin ve feomelanin sentezi için substrat görevi görür. Dopakinon oluşumu hız sınırlayıcı basamaktır ve melanin sentezinin diğer reaksiyonları uygun pH olan 7,4’de kendiliğinden gerçekleşmektedir (Şekil.2.4) (27, 59, 63).

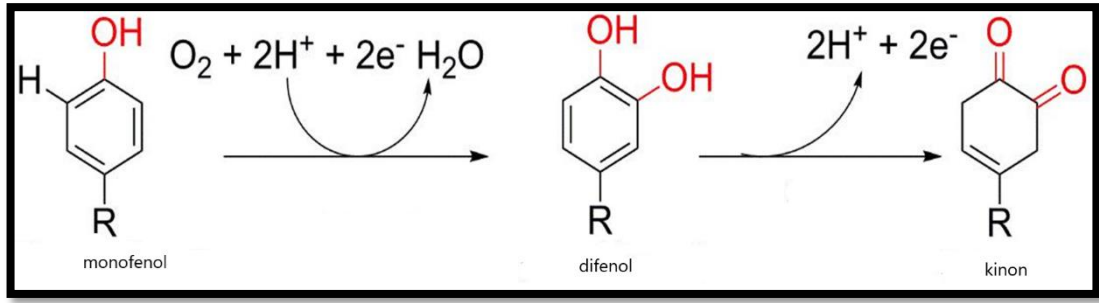
2.2. Tirozinaz Enzimi

Tirozinaz enzimi (monofenol monooksijenaz, EC.1.14.18.1) sadece melanozomların zarında bulunan zara bağlı bir glikoproteindir (30, 31). Tirozinaz aktif bölgesinde iki tane tip3 Cu atomu bulunduran bir metaloenzimdir (4). İki Cu^{+2} merkez, endojen bir koordinasyon köprüsü ile bağlanır. Merkezde bulunan Cu^{+2} altı tane histidin aminoasidiyle çevrelenmiştir (Şekil 2.6) (59, 64). Tirozin ve diğer maddeler, enzimin aktif merkezi ile hidroksil grubu arasındaki bağ yoluyla enzimle kompleks oluşturur.



Şekil 2.6. Tirozinaz enzim yapısı (64)

Tirozinaz enzimi hidroksilasyon ve oksidasyon tepkimeleriyle aktivasyon gösterir (30). Monofenolü o-difenole katalizleyen (monofenolaz aktivite) hidroksilasyon basamağının ardından o-difenolü o-kinona çeviren oksidasyon (difenolaz aktivite) basamağını katalizleyerek kimyasal tepkimelerini gerçekleştirir (Şekil 2.7). Tirozin aminoasitinden tirozinazın aktivitesiyle melanin öncüsü dopakinon oluşturulur (61).



Şekil 2.7. Tirozinaz reaksiyonları (61)

Tirozinaz, melanozomlarda melanin üretiminde kontrol noktalarında yer alan önemli bir enzimdir. Enzimde Cu^{+2} oksitlenirse enzim inaktive olur. L-DOPA, süperoksit anyonu ve muhtemelen nitrik oksit elektronları tarafından aktive edilebilir (65, 66). Tirozinaz enzimi, süperoksit anyonunu melanogenez için substrat olarak kullanabildiğinden, melanositleri reaktif oksijen türlerinden koruyabilir (67, 68).

Tirozinaz oksidasyon mekanizmasıyla dopamin oksidasyonunun dopakinonlar ürettiği nöromelanin üretim sürecini de katalizler. Bununla birlikte aşırı dopakinon üretimi nöronal hasara ve hücre ölümüne neden olur. Bu tirozinazın insan beynindeki nöromelanin oluşumunda önemli bir rol oynayabileceğini, Parkinson hastalığı ve Huntington hastalıkları ile ilişkili nörodejenerasyondan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (69).

2.2.1. Tirozinaz Enziminin Tarihçesi

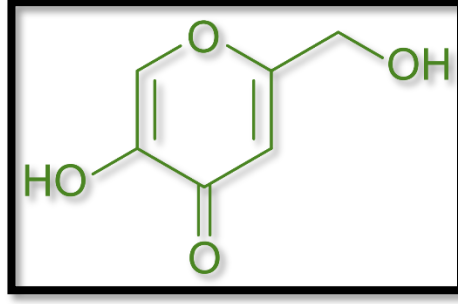
Oksidazlara karşı ilk ilgi 1856 yılında Schoenbein'in *Boletus luridus* mantarının oksijeni oksitleyici ajan olarak kullanarak, bitkilerde aerobik solunumla mavi pigment oluşumuna neden olduğunu fark etmesiyle başlamıştır. Yoshida yaptığı çalışmasıyla lak ağacının lateksinde lakkazın varlığını göstermiştir (70). Yoshida'nın çalışmasının ardından Bertrand, bazı mantar türlerinde lakkaz enziminin var olduğunu bulmuştur. Bourquelot ve Bertrand çalışmalarında *Russula nigricans* mantarının ekstraktından kristal halinde bir madde ayırıştırıp, çözeltisini mantar ekstraktı ile temas ettirdiklerinde kırmızı renkli çözeltinin siyaha döndüğünü gözlemlemişlerdir. Bu kristal maddeye Bertrand tarafından tirozinaz ismi verilerek yeni bir oksidazın keşfi

gerçekleştirilmiştir (71). Bertrand bilinen diğer oksidaz enzimlerinden farklı olarak tirozinaz enziminin tirozin aminoasitinin oksidasyonunu sağladığını bildirmiştir.

Bertrand'ın tirozinaz ile ilgili çalışmalarının ardından, polifenol oksidaz enzimlerine olan ilgi artmıştır. Tirozinaz enzimi oksijeni doğrudan fenolün yapısına katabilen enzimlerden ilk olarak keşfedilen enzimdir ve afinite kromatografisi ile saflaştırılan ilk enzimdir (71).

2.3. Tirozinaz İnhibitörleri

Tirozinaz enziminin katalizlediği reaksiyonlar sonucu meyve veya sebzelerde kararmalar meydana gelir. Tirozinaz enzim aktivitesi meyve sularında bulanıklık oluşması gibi istenmeyen durumlar meydana getirir (28). Kararma reaksiyonlarını engellemek amacı ile gıda endüstrisinde tirozinaz inhibitörleri kullanılmaktadır ve bu konu ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur (72-74). Siyanür (CN), karbon monoksit (CO), sodyum dietil-ditiyokarbamat (DICEA), askorbik asit ($C_6H_8O_6$), azit (HN_3) gibi moleküller tirozinaz enziminin merkez atomu olan Cu^{+2} ile şelat oluşturarak enzimi inhibe ederler (75). Polivinilpirolidin (PVP) gibi çözünebilir polimerler de tirozinazın inhibitörleri arasında yer almaktadır (76). Tirozinaz enziminin hidrojen peroksit, askorbik asit, fenil hidrazin, gallik asit, ferrosiyanür ve hidroksil amin gibi indirgeyici ajanlarla reaksiyonu sonucu tirozinazın prostetik grubunda bulunan Cu^{+2} 'nin indirgenerek tirozinazın inhibe edildiği bulunmuştur (77). Azelaik asit (1,7-heptandikarboksilik asit), *Pityrosporum ovale* mayasının ürettiği düz zincirli doymuş dikarboksilik asittir. Melanom hücreleriyle yapılan çalışmada azelaik asitin hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (75). Kojik asit (5-hidroksi-2-(hidroksimetil)-4-piron) ilk olarak buharda pişirilmiş pirinç üzerindeki *Aspergillus oryzae* mantarının doğal metabolitlerinden izole edilmiştir. *Aspergillus niger* ve *penicillium* mantar türlerinin aerobik fermantasyonuyla üretildiği gibi çeşitli substratların kimyasal dönüşümünden de sentezlenmektedir. Kojik asit, geçiş metal iyonları için iyi bir şelatlayıcıdır ve serbest radikal tutucudur (Şekil 2.8) (78). Kojik asitin, melanin sentezinin birinci ve ikinci basamağını etkili bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (77).



Şekil.2.8. Kojik asit(79)

Tirozinaz enzimi katalitik reaksiyonlarını esnasında ortamda inhibitör bulunmamasına rağmen inaktive olabilmektedir. Bu inaktivasyon tirozinaz enziminin 306. pozisyonundaki histidin amino asidinin kaybı ve buna bağlı olarak bir bakır atomunun salınmasıyla gerçekleştiği bildirilmiştir (75).

Deri kanserlerinde tirozinaz enzim aktivitesinin arttığı gösterilmiş ve bu enzimin yıllardır melanom teşhisinde biyobelirteç olarak kullanıldığı bilinmektedir (5, 6). Melanin sentezi tirozinazın inhibe edilmesiyle, UV' ye maruziyetin azaltılmasıyla, melanosit hücrelerinin proliferasyonu ile inhibe edilebilir (65). Tirozinazı inaktif hale getirecek inhibitörler geliştirilmiştir ve bunlar hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Tirozinaz enziminin monofenolaz, difenolaz ya da her iki reaksiyonunu da inhibe eden doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri klinik olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Fakat tirozinaz inhibitörlerinin toksite veya saklama koşullarının zorluğundan dolayı yeni inhibitörlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Tablo 2.1. Doğal kaynaklı çeşitli tirozinaz inhibitörleri (75)

İNHİBİTÖR	KAYNAK
Arbutin	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>
Aloesin	<i>Aloe barbadensis</i>
Anakardik asit	<i>Anacardium occidentale</i>
Anisik asit	<i>Pimpinella anisum</i>
Agaritin	<i>Agaricus bisporus</i>
Anisaldehit	<i>Pimpinella anisum</i>
Kumic asit	<i>Cuminum cyminum</i>
Kuminaldehit	<i>Cuminum cyminum</i>
<i>p</i> -Kumarik asit	<i>Panax ginseng</i>
ECG	<i>Thea ginseng</i>
EGCG	<i>Thea ginseng</i>
La	<i>Agaricus hortensis</i>
3,4-Dihidroksinamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
Oksiresveratrol	<i>Morus alba</i>
Kaempferol	<i>Crocus sativus</i>
<i>Trans</i> -Sinnamaldehit	<i>Cinnamomum cassia</i>
Lb	<i>Agaricus hortensis</i>
4-Hidroksi-3-metoksinnamik asit	<i>Pulsatilla cernua</i>
9-Hidroksi-4-metoksipisoralin	<i>Angelica dahurica</i>
5-Hidroksimetil-2-furfural	<i>Dictyophora indusiata</i>

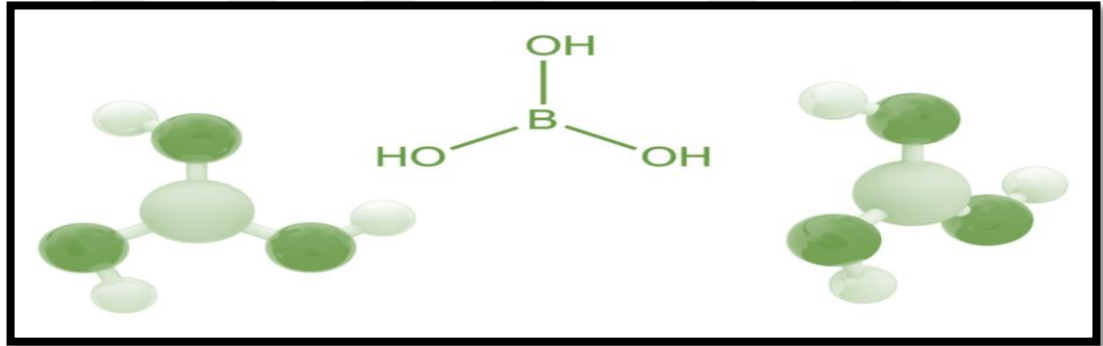
2.4. Bor ve Borik Asit

Bor elementi 1808 yılında Fransız kimyagerler J.L. Gay-Lussac ve Baron L. J. Thenard tarafından keşfedilmiştir (80). Adını Arapça Buraq ve Farsça Burah kelimelerinden almıştır. Atom numarası 5 ve simgesi "B"dir. Bor, yarı metaller grubunda yer alır ve metaloidlerden biridir. 10,81 g/mol molekül ağırlığında ve 2,34 g/cm³ özkütleyle sahiptir. Doğada katı halde bulunan B metali 2076 °C sıcaklıkta erir, 3927 °C sıcaklıkta ise kaynar (81-83).



Şekil 2.9. Bor madeni (84)

Bor, oksijene ilgisinin fazla olması nedeniyle doğada borat olarak adlandırılan çok çeşitli bor-oksijen bileşikleri şeklinde bulunur. Bor oksit (B_2O_3) ve borik asit (BA, H_3BO_3) bu bileşikler içinde en basit yapıları olanlardır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Borik asit (85)

Ayrıca bor kalsiyum, magnezyum ve sodyum elementleri ile de bileşikler oluştur ve bunlardan, boraks ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), kolemanit ($Ca_2B_6O_{11} \cdot 5H_2O$) ve üleksit ($NaCaB_5O_9 \cdot 8H_2O$) önemli olan bileşiklerdir. Bu bileşikler doğal boratlar olarak da bilinmektedir (Şekil 2.11) (86).

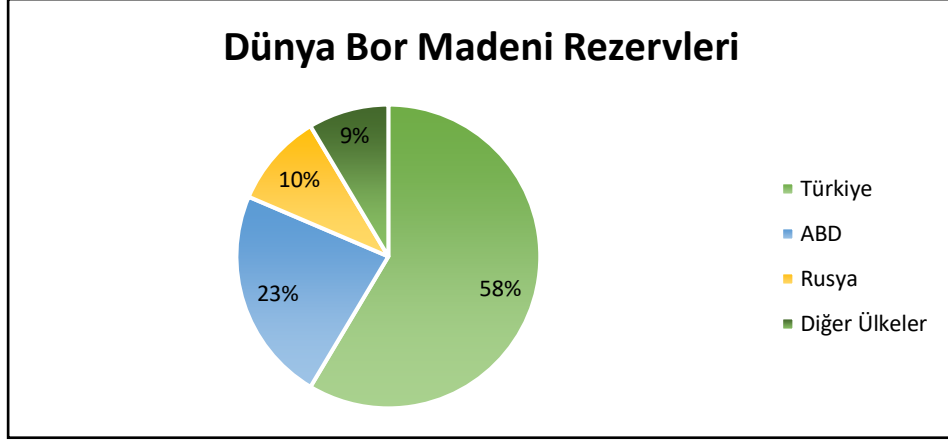


Şekil 2.11. Bazı bor bileşikleri(86)

Dünyanın en büyük B rezervi Türkiye, Amerika, Rusya, Arjantin, Şili, Çin ve Peru'da bulunmaktadır. Türkiye'de % 58'lik oranda bulunması, ülkemizi ilk sıraya taşımaktadır (Şekil 2.12) (87).

Türkiye'de bor rezervleri, Eskişehir-Kırka (Tinkal), Balıkesir-Bigadiç (Üleksit, Kolemanit), Bursa- Kestelek (Kolemanit) ve Kütahya-Emet (Kolemanit)'te yoğun olarak bulunmaktadır (88). Günümüzde bor madeni Türkiye'nin elinde bulundurduğu önemli, stratejik ve gelecek için çok önemli bir role sahip madendir. Bu açıdan özellikle ülke ekonomisi ve geleceği açısından önemi oldukça fazladır.

Mevcut dünya bor rezervlerine bakıldığında, Türkiye'deki mevcut bor rezervi, tüm dünya için tek başına 400 yıl yeterli olabilecektir. Bu sürenin ise, ikinci ve üçüncü büyük rezerve sahip ABD ve Rusya için 77 yıl civarında olacağı tahmin ediliyor (89).



Şekil.2.12. Dünya bor madeni rezervleri dağılımı (90)

Bor, çeşitli sektörde direkt olarak bor ya da rafine bor ürünleri olarak kullanılmaktadır. Bor minerallerinin en sıklıkla kullanıldığı alan cam ve ürünleridir. Ayrıca seramik, çimento sektöründe de sıklıkla kullanılan bor, tarım, deterjan, sağlık, sanayi gibi çoğu sektörde de farklı şekillerde kullanılmaktadır (91).

Bor, diyet ve içme suları ile alınan vücut için esansiyel bir elementtir. Bor ve formları, denizler, su kaynakları ve toprak yoluyla çevrede yayılır. Bu yayılım sonucunda, bitkiler doğrudan bor alımı yapar, ayrıca dolaylı yoldan hayvan ve insan vücuduna bor alımı gerçekleşir. Canlı vücuduna girişi, başta ağızdan olmak üzere, solunum ve deri yoluyla da olabilir (92). Diyet ile alınan B, vücutta borik asite dönüşür ve normal metabolik aktivitelerde önemli rol oynar. Kimyasal olarak zayıf bir asit olan BA, bazı organik bileşikler ile tepkimeye girmesi sonucu kuvvetli asit gibi davranabilir. Bu özelliği sayesinde, tepkime sırasında kolay proton verir, bu da BA'nın kolay bir şekilde tepkimeye girmesini sağlar (93). Son yıllarda yapılan çalışmalarda bor bileşiklerinin normal bir metabolik aktivitenin devamlılığı için önemi ve hastalıkların tedavisinde olası yararlı etkilerinden söz edilmektedir (11).

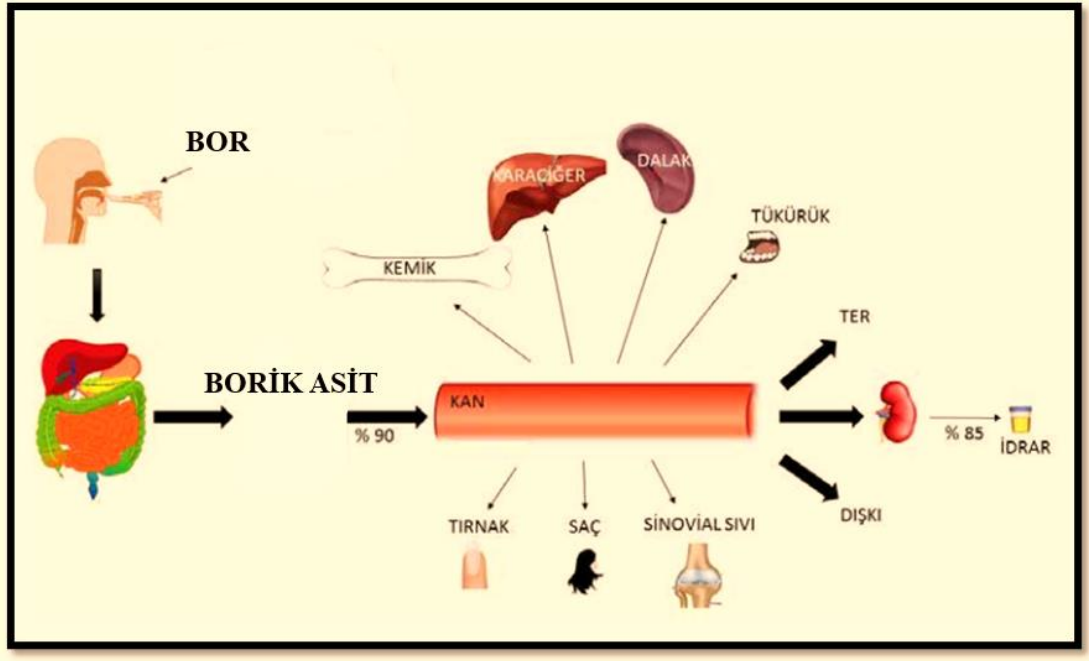
Bor, insan vücuduna çeşitli yiyecek türlerinden alınır. Literatürde yapılmış araştırmalara göre kabuklu yemişler, kuru baklagiller, meyve ve sebzelerin yüksek oranda bor ihtiva ettiği bildirilmiştir. Özellikle, pirinç, mısır ve buğdayda yüksek oranda bulunur (şekil.2.13) (86). Türkiye'de tüketimi fazla olan çayda ortalama 1,05 ppm, Türk kahvesinde 14,33 ppm fındıkta 18 ppm konsantrasyonlarda bor olduğu tespit edilmiştir (86, 94).



Şekil.2.13. Borun en fazla bulunduğu gıdalar (86)

Hatay’da yapılan bir çalışmada kekik, nane, kırmızı lahana, bakla, ayva, nar ve portakalın yüksek konsantrasyonda bor içerdiği tespit edilmiştir (95). Türkiye’de bor madeni üretimi yapılan bölgelerden toplanan gıda örneklerinde fıstık, üzüm yaprağı, vişne ve ayvanın yüksek konsantrasyonda bor içerdiği belirlenmiştir (96). Ayrıca, borik asit uçucu bir yapıya sahiptir. Bu nedenle, gıdaların hızla pişirilmesi, ürünlerdeki borik asit konsantrasyonunu azaltır (97).

Borik asit emilimi, gastrointestinal sistem tarafından gerçekleşir. Vücutta hemen hemen her dokuda borik asit bulunur. Borik asitin vücutta atılımı ise, çoğunlukla idrar yolu ile olur. Borik asit yaklaşık % 95 oranla vücuttan atılır, borik asitin birikimi yalnızca kemik, tırnak, kıl gibi yapılarda ve karaciğer, dalak gibi organlarda olur (şekil2.14) (86,92).



Şekil 2.14. Bor metabolizması (86)

Bor kemik gelişimi, yara iyileşmesi, enerji metabolizması ve immün sistemde önemli rol oynarken aynı zamanda oksidatif hasara karşı koruyucu bir ajan olarak antioksidan savunmada; süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin düzeylerini artırarak kullanılabileceği rapor edilmektedir (9, 10, 11). Diyetle alınan borun dışında bor içeren ilaçları fazlaca kullanmak ya da mesleki nedenle yüksek miktarda bora maruz kalmak toksiteye, gastrointestinal rahatsızlıklara, deri ve mukozanın dökülmesine, sperm sayısında azalmaya neden olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (98, 99).

2.4.1. Borik Asit ve Kanser Tedavisi

Yapılan çalışmalarda B'nin akciğer kanseri, meme kanseri ve prostat kanseri gibi pek çok kanser riskinin azaltılmasına katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (12, 13). B'nin tümör hücrelerine nasıl etki ettiğini açıklayan olası mekanizmalar literatürde mevcutken, normal hücrelere etkisi tam olarak açıklanmamıştır. Borun hangi formda olduğu, hangi dozda ve hangi sıklıkla kullanıldığına bağlı olarak B'nin kanser tedavisi için salternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (99, 100).

Doza bağı olarak BA'nın etkisi araştırıldığında düşük dozlarda BA varlığında hücrelerde nükleik asit/protein oranında bir artış görülmektedir ve bunun hücrelerin aktif olarak replike olduğu göstermektedir. Buna karşılık lipid/protein oranında herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Yüksek doz borik asit uygulamasında ise nükleik asit/protein oranı düşük olarak tespit edilmekte ve bu durum hücrelerde replikasyonun olmadığı yani hücrelerin bölünmediğini göstermektedir. Bununla birlikte yüksek dozlarda hücre canlılığında belirgin bir azalma olmaktadır ve borik asitin kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği görülmektedir (13).

Bor bazlı içerikler birçok tıbbi tedavi uygulamasında görülmektedir. Osteoartriti, osteoporozsa, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi hastalıkların yanı sıra kanser tedavisinde de Bortezamid adlı, bor içeren ve Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylı bir ilaç ve Bor-radyoterapi tedavi şekilleri uygulanmaktadır (101). Bor nötron yakalama terapisi (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) yöntemiyle, beyin tümörlerinin iyileştirilmesinde, yanık tedavilerinde, yara iyileşmesinde, antiseptik olarak lens solüsyonlarında, merhemlerde, gargaralarda ve göz damlalarında kullanıldığı görülmekle beraber, sağlıklı hücrelere en az zarar ile kanser hücreleri öldürülerek önemli bir yaklaşım elde edilmiştir (102-104).

Borik asit, B içeren kimyasallar içerisinde en çok çalışılan ve birçok kanser hücresinde proliferasyonu kontrol ettiği gösterilmiştir (12, 13). Borik asit peptidaz, proteaz, protozom, arjinaz, nitrik oksit sentaz ve dehidrogenaz aktivitesini inhibe eder. BA bu inhibisyon mekanizmasını NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotit) ve serin aminoasitindeki OH^- gruplarına bağlanarak gerçekleştirmektedir (102, 104).

BA proteazları inhibe etmesiyle kanser hücrelerinin göçünü ve yaşamalarını inhibe eder. Bor içeren kimyasallar ayrıca Ca^{2+} reseptörlerini etkileyerek hücre bölünmesini inhibe ederler (105). Borun atom kütlelerinin küçük olması (10,811 g/mol) ve kimyasının nötrofilik ve elektrofilik reaktivite içermesi nedeniyle B bazlı geniş bir dizi kimyasal kanser tedavisi için çalışılabilir (104).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan metastatik hücre hattı SK-MELL-30 (03010901) ve primer melanoma hücre hattı WM115 (WM115-01-0001) sırasıyla T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı ŞAP Enstitüsü Hücre Bankası'ndan ve Rockland firmalarından temin edilmiştir.

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

Adı	Üretici Firma
DMEM	Gibco, Life Tech, ABD
RPMI 1640	Biowest, ABD
FBS	Capricorn Scientific GmbH, Almanya
Trypsin/EDTA	Gibco, Life Tech, ABD
WST-1 Reaktifi	Celltechgen, LLC, ABD
PBS	Gibco, Life Tech, ABD
PMSF	BioVision, ABD
Triton X-100	MERCK, Almanya
L-DOPA	Cayman Chemical Company, ABD
Kojik Asit	BLDpharm, Çin
Borik Asit	Sigma, Almanya

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ve cihazlar Tablo 3.2 ve Tablo3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Adı	Üretici Firma
Falkon Tüpler	Greiner bio-one, Almanya
Serolojik Cam Pipetler	Greiner bio-one, Almanya
Otomatik Pipet Uçları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Lamel	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Tartım Kapları	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Spatüller	ISOLAB, Wertheim, Almanya
Flask	Greiner bio-one, Almanya
1.5 Mikrosantrifüj tüpleri	BIOLOGIX, ABD

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerin listesi.

Adı	Üretici Firma
Distile Su Cihazı	ELGA / LA621
Sıcak Su Banyosu	MemMert/WNB 14
Soğutmalı Santrifüj	Hettich / Universal 320 R
Otomatik Pipetler	Eppendorf, ABT
Şarjlı Otomatik Pipet Pompası	Eppendorf / Easypet 3
Işık Mikroskobu	Nikon / Eclipse E100
Hassas Terazî	MRC / ASB-220-C2
+4° C Buzdolabı	Klimasan / S 900 SC DD
Thoma Lamı	ISOLAB
İnkübatör	Panasonic/mco-170AICUV
Spektrofotometre	BioTek/Epoch2C

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Borik asit örneği çözeltileri: 0,309 g borik asit hassas terazi ile tartıldı. Üzerine 30°C'daki distile su eklenip son hacim 10 mL olacak şekilde tamamlanıp 0,5 M konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı.

Kojik asit örneği çözeltileri: 0,0014 g kojik asit hassas terazi ile tartıldı. Distile su ile son hacim 10mL olacak şekilde tamamlanıp 0.001 M konsantrasyonda stok çözelti hazırlandı.

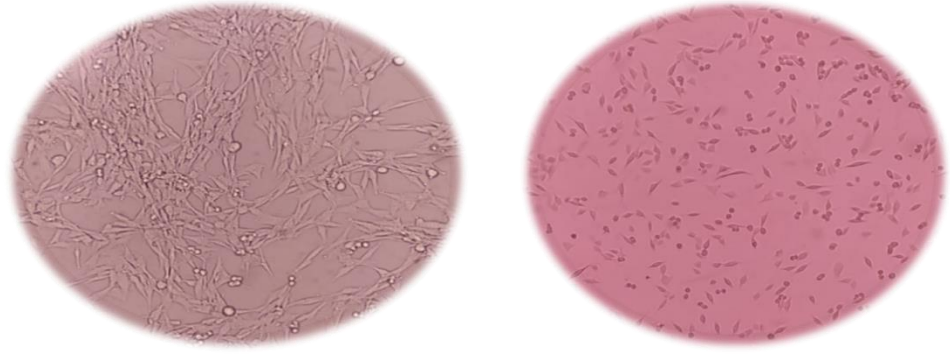
L-DOPA örneği çözeltisi: 0,207 g L-DOPA hassas terazi ile tartıldı. Son hacim 10 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanıp 0,1 M stok çözelti hazırlandı. Her bir örnek için 10 µL hacminde uygulama yapıldı.

Lizis tampon çözeltisi: 0,1742 g PMSF (fenilmetilsülfonil florid) hassas terazi ile tartılıp son hacim 10 mL olacak şekilde tamamlanıp 0,1 M stok çözelti hazırlandı. %1 lik Triton X-100 ve 0,5 mM PMSF soğuk 0,1 M PBS içerisinde süspanse edilip çözelti hazırlandı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

-80 C°'daki SK-MELL-30 ve WM-115 hücreleri oda sıcaklığına getirildi. T25 flask içerisine alınan SK-MELL-30 ve WM-115 hücreleri için sırasıyla RPMI 1640 besiyeri, DMEM besiyeri eklenerek son hacim 5mL olacak şekilde besiyeri ile tamamlanmıştır. Hücreler %10 FBS, %1 Penicillin-Streptomycin içeren RPMI 1640 ve DMEM besiyerleri kullanılarak 37C° sıcaklık ve %5 CO₂ içeren koşullarda muhafaza edilmiştir (106).



Şekil 3.1. Sırasıyla SK-MELL-30 ve WM-115 melanom hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri

3.2.2. Besiyeri Değişimi

Hücrelerin canlılıklarını koruyabilmeleri için besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler %80-90 doluluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi yapılmıştır.



Şekil 3.2. T25 flaskta hücrelerin inkübasyonu

3.2.3. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlama işlemi için hücrelerin bulunduğu besiyeri ortamı uzaklaştırılmıştır. 5 mL PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işleminden sonra PBS çekilerek 1mL Tripsin eklenmiş ve hücreler üç dk etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Etüvden çıkarılan flaskta hücrelerin olduğu duvara doğru pipet ile çek-bırak yapılarak hücrelerin tamamen ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında flaskın tabanına doğru beş defa çek-bırak yapılmıştır. 5 mL PBS eklenerek süspanse edilmiştir. 617 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelletin üzerine medium eklenmiştir. Flasklara bölünen hücreler 37 C° sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren koşullarında inkübasyona bırakılmıştır (107).

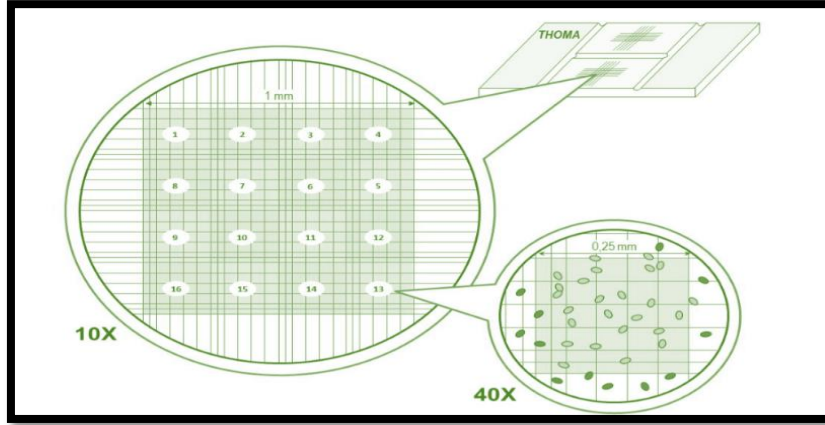
3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücrelerin bulunduğu ortam uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmıştır. 1 mL Tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. 5 mL besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir ve 50'lik steril falkona aktarılmıştır. Ardından 617 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış, pellet % 95 FBS, %5 DMSO dondurma solüsyonu ile homojenize edilmiş ve kryotüpler içine 1 mL hacimde olacak şekilde alınmıştır. Tüpler hazırlandıktan sonra -20 C°de 1 saat, -80 C°'de bir gece bekletilmiş ve ardından azot tankına kaldırılmıştır (108).

3.2.5. Hücre Sayımı

Hücre sayımı için hücre süspansiyonu ve tripan mavisinden 1:1 oranında 10'ar µL alınarak karıştırılmıştır. Bu karışımdan 10 µL alarak Thoma lamına alınarak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir.

Thoma lamında hücreler 16 adet büyük karede 40X objektifte sayılarak hücre sayımı gerçekleştirilir (Şekil 3.3). Hücreler sayılırken; $A \times SF \times 10000$ formülünden hesaplanır. Formülde, A: 16 büyük karede sayılan hücre adeti, SF: Seyreltme faktörü, 10000: 1 mL süspansiyondaki hücre sayısını bulabilmek için kullanılan sabittir (107).



Şekil 3.3. Thoma lamı (107)

Hücre sayımında canlı olan hücreler boyayı içine alamayacaklarından şeffaf renkte gözüktürler.

3.2.6. Hücre Hatlarına Borik Asit Uygulanması ve Sitotoksitite Testi

Melanom hücre hatlarına uygun konsantrasyondaki BA miktarını bulmak için BA uygulaması ve WST-1 sitotoksitite testi yapılmıştır.

3.2.6.1. Borik Asit Uygulaması

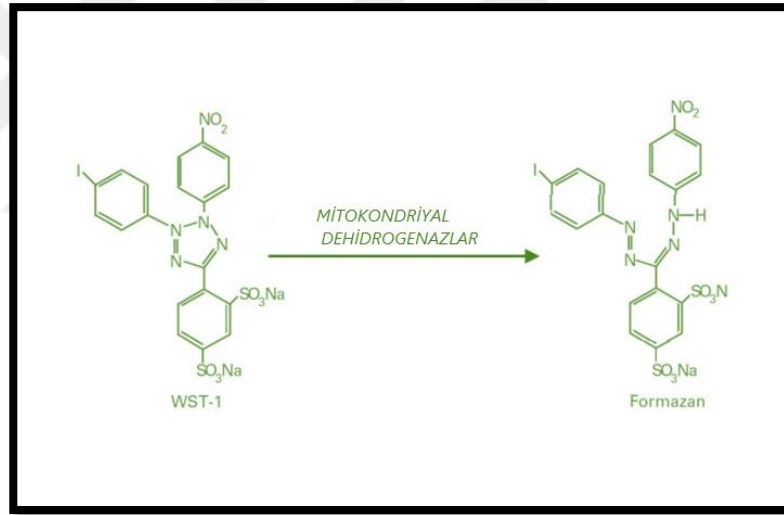
Hücrelerin bulunduğu ortam uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama yapılmıştır. 1 mL Tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. 5 mL besiyeri eklenerek süspanse edilmiştir ve steril falkona aktarılmıştır. Ardından 617g'de 10 dk santrifüj edilmiş. Süpernatant atılmıştır.

Santrifüjden çıkan SK-MELL-30 hücrelerin üzerine %10 FBS içeren RPMI 1640 eklenerek 10800 µL hücre karışımı hazırlanmıştır. WM-115 hücrelerin üzerine %10 FBS içeren DMEM eklenerek 10800 µL hücre karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışımlardan her kuyucuğa 300µL olacak şekilde 96'lı well-plate kuyucuklarına ekim yapılmıştır. 24 saatlik ve 48 saatlik ölçümler için her iki hücre hattı için ikişer tane 96'lık well-plate hazırlanmıştır. Sırasıyla negatif kontrol için DMSO, pozitif kontrol için sadece medium, tirozinazı inhibe ettiği bilinen KA 0, 5,

10, 25, 50, 100, 200, 300 μM konsantrasyonlarında, deney grubu için BA 0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mM konsantrasyonlarında hazırlanıp test edilmiştir (60).

3.2.6.2. WST-1 Hücre Canlılık Testi

WST-1 testi hücrelerin canlılığının spektrofotometrik olarak ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu testin prensibi, WST gibi tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleriyle formazan denilen yapıya dönüşmelerinin sonucu renk değişimi meydana gelmesine dayanır (Şekil 3.2). Tetrazolyum halkası yalnızca aktif mitokondri tarafından kırılabilir bu yüzden sadece renk değişim reaksiyonu canlı hücreler tarafından gerçekleştirilebilir. Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneğini kaybederler ve bu yüzden şeffaf renkte görünürler (107).



Şekil 3.4. Tetrazolyum tuzu WST'nin formazona dönüşümü (109)

WST-1 testi için SK-MELL-30 ve WM-115 hücreleri 96'lı platelere ekilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μM konsantrasyonlarında KA ve 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mM konsantrasyonlarında BA ile muamele edilmiştir. Kontrol kuyucuklarına sadece medium eklenmiştir. 24 ve 48 saat sonra canlılık testi yapılmıştır (13).

Her bir kuyucuğa 10µL WST-1 solüsyonu ilave edilip 37 °C’de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Hücreler için uygun BA ve KA konsantrasyonları belirlenmiştir.

Hücrelerin canlılık değerleri hesaplanırken;

$$\% \text{ CANLILIK} = \frac{\text{ort. absorbans örnek}}{\text{ort. absorbans kontrol}} \times 100$$

formülü kullanılmıştır.

3.2.7. Tirozinaz Enzim Aktivite Tayini

6’lı well plate içerisindeki hücrelerin üzerine belirlenen dozlarda BA ve KA uygulandıktan sonra 24 ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Hücrelerden lizat hazırlamak için hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı. PBS ile her kuyu iki kez yıkandı. Önceden hazırlanan lizis tampon solüsyonundan her kuyuya 100 µL eklendi. Her kuyu içinde kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırıldı. Her kuyu içindeki hücreler ayrı ayrı ependorf tüplerin içerisine aktarıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. +4°C’de 1600g’de 15 dk santrifüj edildi. 90 µL süpernatantdan alınarak 96’lı well plate aktarıldı. Her kuyuya 10 µL 0,1 M L-DOPA eklendi. 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Biotek Epoch Reader Spektrofotometre cihazında 475 nm’de absorbans değeri ölçüldü (110).

3.2.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler ve hesaplamalar için GraphPad Prism Version 8.4.2 (679) programı kullanılmıştır. İkili gruplar Student’s t testi, üçlü karşılaştırmalar ise tek yönlü ANOVA testi kullanılarak yapılmıştır. Testlere uygun grafikler çizilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda test istatistiği ve p değeri verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

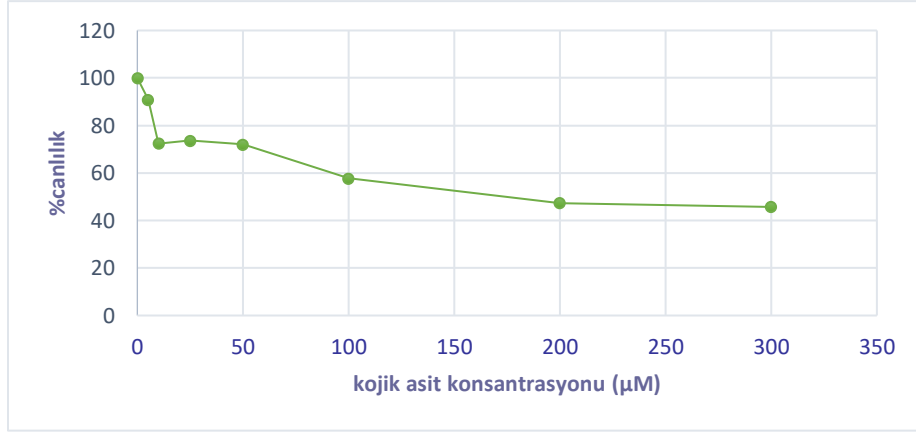
4.1. SK-MELL-30 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

SK-MELL-30 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mM konsantrasyonlarda BA uygulanmıştır. 48 saatin sonunda sırasıyla hücre canlılıkları % 100, % 71,4, % 94,5, % 112,7, % 95,1, % 113, % 119,5, % 70,7 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.1. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan BA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği

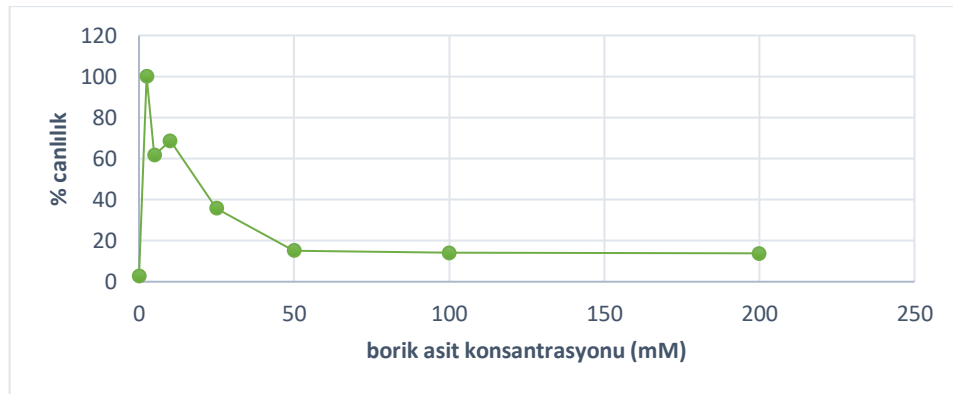
SK-MELL-30 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 5, 10, 25, 50, 100, 200,300 μ M konsantrasyonlarda KA uygulanmıştır. 48 saatin sonunda, % 100, % 90,9, % 72,4, % 73,7, % 72, % 57,7, % 47,4, % 45,7 canlılık olarak ölçülmüştür. KA için IC_{50} değeri 219,7 μ M olarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.2. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği

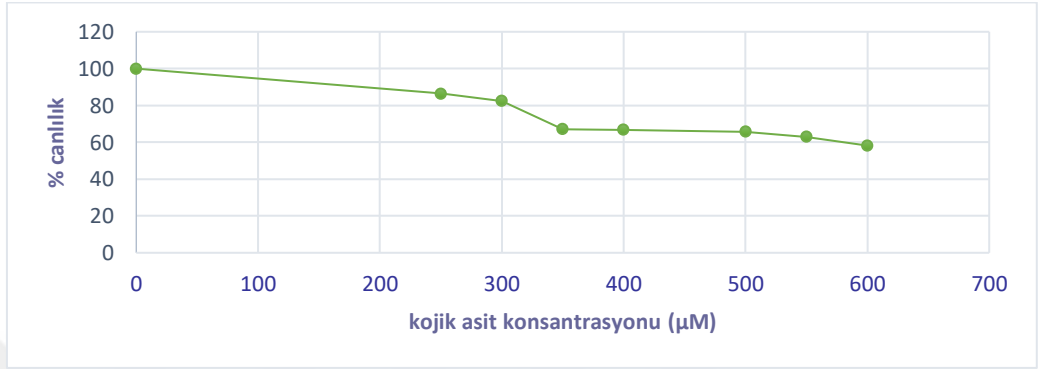
4.2. WM-115 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

WM-115 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mM konsantrasyonlarda BA uygulanmıştır. 48 saat sonunda sırasıyla hücre canlılıkları % 100, % 61,7, % 68,7, % 35,7, % 15,1, % 14,1, % 13,8, % 12,8 olarak ölçülmüştür. BA için IC₅₀ değeri 106.0 mM olarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.3. WM-115 hücrelerine uygulanan BA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği

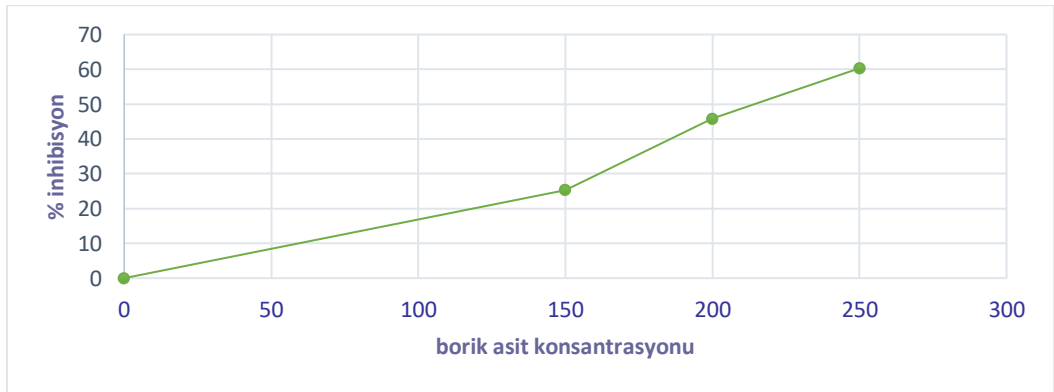
WM-115 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600 μM konsantrasyonlarda KA uygulanmıştır. 48 saatin sonunda sırasıyla hücre canlılıkları % 100, % 86,4, % 82,5, % 67,1, % 66,8, % 65,8, % 63,0, % 58,2 olarak ölçülmüştür. KA için IC_{50} değeri 754,2 μM olarak hesaplanmıştır. Literatürle uyumlu olarak IC_{50} 353,6 μM konsantrasyon deneyimizde kullanılmıştır (60).



Şekil.4.4. WM-115 hücrelerine uygulanan KA sonucu hücrelerin 48 saatteki % canlılık grafiği

4.3. SK-MELL-30 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi

SK-MELL-30 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 150, 200, 250 mM konsantrasyonlarında BA uygulanmıştır. 48 saat sonunda sırasıyla tirozinaz enzim inhibisyonları % 0, % 25,31, % 45,85, % 60,31 olarak hesaplanmıştır.



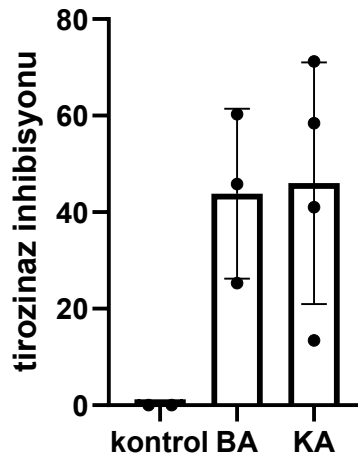
Şekil.4.5. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan BA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği

SK-MELL-30 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 200, 250, 300, 400 μM konsantrasyonlarda KA uygulanmıştır. 48 saat sonunda sırasıyla tirozinaz enzim inhibisyonları % 0, % 13,4, % 41,0, % 58,4, % 71,2 olarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.6. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği

BA ve KA uygulanan SK-MELL-30 melanom hücrelerindeki tirozinaz enzim aktivitesinde bir düşüş olmuştur ama istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P=0,085$).



Şekil.4.7. SK-MELL-30 hücrelerine uygulanan KA ve BA sonucu tirozinaz enziminin inhibisyonu ($p=0.085$)

4.4. WM-115 Melanom Hücrelerinde BA ve KA Uygulamasının Tirozinaz Enzim Aktivitesine Etkilerinin Belirlenmesi

WM-115 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 100, 150, 200, 250 mM konsantrasyonlarında BA uygulanmıştır. 48 saat sonunda sırasıyla tirozinaz enzim inhibisyonları % 0, % 26,5, % 52,4, % 62,2, % 64,3 olarak hesaplanmıştır.



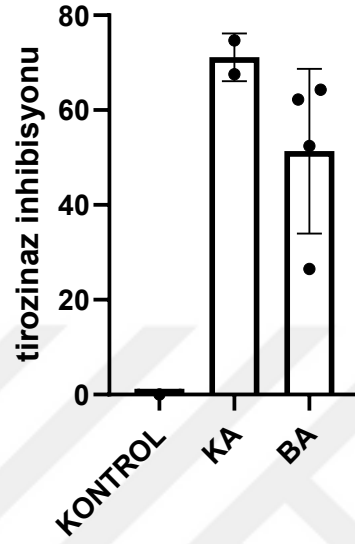
Şekil.4.7. WM-115 hücrelerine uygulanan BA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği

WM-115 melanom hücrelerinin üzerine sırasıyla 0, 200, 250, 300, 400 μ M konsantrasyonlarda KA uygulanmıştır. 48 saat sonunda sırasıyla tirozinaz enzim inhibisyonları % 0, % 67,6, % 72,2, % 73,4, % 74,7 olarak hesaplanmıştır.



Şekil.4.8. WM-115 hücrelerine uygulanan KA sonucu tirozinaz enziminin 48 saatteki % inhibisyon grafiği

WM-115 melanom hücrelerindeki tirozinaz enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P=0,046$).



Şekil.4.9. WM-115 hücrelerine uygulanan KA ve BA sonucu tirozinaz enziminin inhibisyonu ($p=0.046$)

5. TARTIŞMA

Melanom epidermisteki melanosit hücrelerinin düzensiz bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelen bir malign tümördür (5). Melanomun geç fark edilmesiyle ve tedaviye direnç göstermesiyle deri kanserleri içinde en tehlikeli tür olarak teşhis edildiği bilinmektedir.

Melanomun teşhisinde bir biyobelirteç olarak kullanılan tirozinaz enzimi bu hastalık için büyük önem taşımaktadır (6). Tirozinaz enzimi bitki, hayvan, mantar ve mikroorganizmalarda bulunan, cilt, saç ve hayvanlarda kürk rengini belirleyen melanin pigmentin biyosentezinden sorumlu bakır içeren, oksidaz enzim türlerinden olup hız sınırlayıcı bir rol oynayan çok işlevli bir metaloenzimdir (4). Tirozinaz, melanin biyosentez yolağında hidroksilasyon tepkimeleriyle monofenolaz aktivite ve oksidasyon tepkimeleriyle difenolaz aktivite göstererek anahtar bir role sahiptir (111). Metabolizmadaki kimyasal reaksiyonların büyük önemi nedeniyle melanin sentezinde meydana gelen herhangi bir değişiklik hastalık durumuyla sonuçlanabilmektedir. Melanin sentezini inhibe eden tirozinaz inhibitörlerinin hiperpigmentasyon, güneşe bağlı lentigo ve inflamatuvar hastalıkların güncel tedavilerinde kullanıldığı bilinmektedir (113). Dolayısıyla tirozinaz inhibitörlerinin, gıda alanında meyve ve sebze kararmalarının önlenmesinde, kozmetikte cilt aydınlatıcı kremlerin üretilmesinde ve tıp alanında hastalıkların tedavisinde önemleri giderek artmakta, çeşitli bileşiklerinin araştırılması için tirozinaz önemli bir hedef haline gelmektedir.

Deri kanserlerinde tirozinaz enzim aktivitesinin arttığı bilinmektedir (3, 4). Sitotoksik T hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, tirozinazın immün sistem tarafından HLA-restricted bir biçimde tanındığını ortaya koymuştur (6). Rekombinant üretilen, tirozinaz ile immünizasyon sonucu elde edilen T311 antikorunun melanomlarda yüksek bir duyarlılığa sahip olduğu bildirilmektedir (6). Yapılan bir diğer çalışmada histolojik boyamayla, primer veya metastatik melanomların tümünde tirozinaz antikorları ile pozitif bir artış olduğu bildirilmiştir. Tüm melanomlarda pozitiflik oranı %58 iken, metastaz yapmış melanomlarda %83 olduğu saptanmıştır (114).

Tirozinazı inhibe edecek moleküller sentezlenmiştir (4). Tirozinaz inhibitörlerini kaynağına göre doğal, sentetik ve yarı sentetik olarak üçe ayırabiliriz. Bitkiler ve mantarlar içerdikleri steroidler, polifenoller ve fenolik bileşikler doğal tirozinaz inhibitörlerine temel oluşturmaktadırlar. Dut bitkisinin yapraklarında bulunan betulinik asidin tirozinazı inhibe ettiği belirtilmektedir (115). A vitaminin melanositlerde tirozinaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (116). Kükürtlü bileşiklerin de iyi bir tirozinaz inhibitörü olduğu belirtilmekle beraber yüksek oranda kükürt içeren sarımsak ile yapılan çalışmada tirozinazı inhibe ettiği bildirilmiştir (75). Nar bitkisinin tirozinaz inhibitörü olan gallik asit, Kojik asit, kafeik asit, ellagik asit gibi çeşitli bileşikleri bulundurduğu literatürde belirtilmektedir (117). Narın deriyi yaşlanmaya karşı koruduğu ve nar tohum yağının farelerde deri kanserini önlediğine dair çalışmalar mevcuttur (75, 118). Deri hastalıklarında kullanılan kremlerin içeriğindeki bitkisel kaynaklı kuarsetin, kaemferol gibi antioksidan bileşiklerin tirozinaz inhibitörü olduğu bildirilmektedir (119). Bitkilerde bulunan antioksidan bileşiklerin tirozinazı inhibe etmesinin nedeni yapısında bulunan serbest -OH gruplarından olabilir (74, 75). Ayrıca polifenoller, flavonoidler, izoflavonlar, kurkuminoidler, kalkonlar, fenolik asitler ve terpenoid türevleri gibi bazı doğal kaynaklı bileşenler sentetik kaynaklı olarak da üretilebilmektedirler (4). Son yıllarda yeni tirozinaz enzim inhibitörlerinin sentezi sıklıkla araştırılan bir çalışma konusu haline gelmiştir. Bunun temelindeki en önemli sebep, tirozinaz enzim inhibitörlerinin çoğunda yüksek toksisite problemi. Dolayısıyla, bu tür sınırlandırmalar yan etkisi az ve güçlü tirozinaz inhibitörlerinin keşfini çok önemli kılmaktadır.

Kojik asit, tirozinaz enzimidaki iki önemli basamağı inhibe ederek tirozinaz için önemli bir inhibitör olup sıklıkla kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda pozitif kontrol olarak KA kullandık. Kojik asit cilt beyazlatıcı kremlerde kullanılan bileşikler içinde birinci sırada yer alır. Ayrıca, melazma tedavisi, gıdalarda kararmayı önleyici koruyucu ve antioksidan amaçlı, zararlı mikroorganizmalar üzerinde pestisit ve antimikrobiyal maddeler, antibiyotik, metal şelasyonu olarak da kullanımı mevcuttur. Bilinen bu özelliklerinden dolayı pek çok çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır (75). Ancak, deride alerjik reaksiyonlar geliştirdiği ve saklama süresindeki dayanıksızlığı nedeniyle kullanımı sınırlanmakta ve bu yüzden yeni tirozinaz inhibitörlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca hayvan deneyi çalışmalarında tümör oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (75). Bu çalışmada, dünya bor rezervlerinin

%73'üne sahip olan ülkemizde bulunan bor elementinin tirozinaz enzimi üzerine olan etkisinin incelenmesi planlanmıştır.

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, tirozinaz inhibitörlerinin melanomu önlediği bildirilmiştir (3). Melanogenez yolağının inhibe edilmesindeki hedef tirozinazın inhibe edilmesidir. Tirozinaz sadece melanosit hücrelerinde üretildiğinden, tirozinaz inhibitörleri avantajlı şekilde diğer hücrelere zarar vermeden spesifik olarak melanogenezi inhibe etmektedir. Tirozinazın katalitik bölgesini inhibe ederek veya bakır iyonlarını şelatlayarak, tirozinazın inhibe edilmesiyle melanogenezin inhibisyonu sağlandığında melanom hücrelerinin kemoterapiye olan direnci kaldırılıp siklofosfamidin ilacına duyarlı hale getirildiği bildirilmiştir (13). Tirozinazın inhibe edilmesiyle hücre içinde biriken L-DOPA, lenfosit proliferasyonunu inhibe edip, hücre döngüsünün G1/0 evresinde kalmasını sağlayarak hücre döngüsünü durdurmuştur. Ayrıca, IL-1 β , TNF- α , IL-6 VE IL-10 üretimi inhibe edilerek de hücre proliferasyonu durdurulmuştur. Bu nedenle, melanogenezin inhibe edilmesi, ilerlemiş melanomların tedavisi için seçenek olabilir (120). Bu çalışmada, tirozinazın inhibitörü olabileceğini düşündüğümüz bor ile melanogenezi inhibe ederek melanom tedavisi için seçenek oluşturmak hedeflenmiştir.

Doğada elementel formda bulunmayan Bor, yaygın olarak borat formlarında (borik asit ve boraks gibi) bulunmaktadır (7). Bor iz elementinin kemik, mineral, lipid, enerji metabolizması, immün sistem, endokrin fonksiyonu lipid peroksidasyonu ve antioksidan sistem ile DNA harabiyetini önleyebileceği düşünülmektedir (9-11). Borik asitin kanser hücre hatlarında oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (12).

Bor bileşikleri, yüksek maligniteye sahip bazı kanser türlerinin kemoterapisinde giderek daha sık kullanılmaya başlandı (99). Bor içerikli ilaçlar ile tedaviden en sık etkilenen kanser türleri prostat, meme, servikal ve akciğer kanserleridir (99-102). Bor bazlı tedavilerin kullanımı arttıkça farklı kanser türlerinin insidansı, borun hangi moleküler mekanizmaya nasıl etki ettiği ile ilgili çalışmalar yapmak gerekmektedir. İlaçların içerisindeki borun aktivitesiyle, kanser

hücrelerindeki serin proteaz, NAD dehidrogenaz, mRNA ekleme, hücre bölünmesi ve enzim aktivitesi mekanizmalarına müdahale edilir (121). Ayrıca B'nin andojen duyarlı kanser hücrelerinin çekirdeğindeki androjen reseptörlerine bağlanarak, hücre proliferasyonu için gereken PSA'yı (Prostatic Serum Antigen) inhibe etmesiyle apoptozu indüklediği bildirilmiştir (122).

Servikal kanser, dünya çapında kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türü olmasına karşın Türkiye'de % 7 oranıyla düşük insidansa sahiptir (123). Bunun sebebinin Türkiye topraklarının B ile zengin olduğunu savunan hipotezler mevcutken içme suyuyla alınan borun servikal kanser riskini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada kadınlara borla zengin diyet uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda kadınlarda servik ve akciğer kanseri riskinin önemli ölçüde azaltıldığı bildirilmiştir (94, 124, 125).

Borik asit ile muamele edilen melanom hücrelerinde tripan boyama yapıldığında BA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının azaldığı bildirilmiştir (13). FPA (Focal Plane Array) dedektörü ile yapılan FTIRI (Fourier Transform InfraRed Imaging) görüntülemesiyle, BA uygulamasının hücrelerdeki lipid/protein oranı önemli bir değişikliğe uğratmamasına karşılık nükleik asit/protein oranını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (13). Bu sonuçlar yüksek BA konsantrasyonunun, melanom hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir. Çalışmamızda tirozinaz enzim üzerindeki borat formunun son derece önemli inhibisyon etkisi göstermesi bor kaynaklarının melanom üzerindeki tedaviye yönelik şansını arttırdığı söylenebilir.

Mevcut çalışmamızda borik asitin SK-MELL-30 ve WM115 melanom hücre hatlarında tirozinaz enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tirozinazın sadece melanosit hücrelerinde bulunması nedeniyle SK-MELL-30 ve WM115 melanom hücre hatları literatürle uyumlu olarak inkübe edildi (106).

BA ve KA moleküllerinin SK-MELL-30 ve WM-115 melanom hücre hatlarında sitotoksikite aktivitesini belirlemek için WST-1 yöntemi kullanılmıştır (57). WST-1 yöntemi; kültür ortamındaki mitokondrial aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitasyonunu sağlar. IC₅₀ değeri; inhibe edici özelliği olduğu düşünülen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değerini vermektedir(107).

WST-1 yöntemi sırasında metastatik melanom hücre hattı olan SK-MEL-30 24. saat ve 48. saat olarak iki aralıkta ve sekiz farklı konsantrasyonda (0, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 Mm) BA uygulanmıştır. Ayrıca WST-1 yöntemi sırasında metastatik melanom hücre hattı olan SK-MEL-30 hücrelerine tirozinazın bilinen inhibitörü KA 24. saat ve 48. saat aralıklarında ve 8 farklı konsantrasyonda (0, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 μ M) uygulanmıştır. BA uygulaması sonrasında SK-MELL-30 hücre hattı için IC₅₀ değeri elde edilememiştir. KA uygulaması sonrasında SK-MELL-30 melanom hücre hattı için, GraphPad Prism Version 8.4.2(679) programıyla t testi ile IC₅₀ değeri 219,7 μ M değeri olarak tespit edilmiştir. Primer malign melanom hücre hattı olan WM-115 24. saat ve 48. saat olarak 2 aralıkta ve 8 farklı konsantrasyonda (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 mM) BA uygulanmıştır. Ayrıca WST-1 yöntemi sırasında primer malign melanom hücre hattı olan WM115 hücrelerine tirozinazın bilinen inhibitörü KA 24. saat ve 48. saat aralıklarında ve 8 farklı konsantrasyonda (0, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600 μ M) uygulanmıştır. BA uygulaması sonrasında WM-115 hücre hattı için, GraphPad Prism Version 8.4.2(679) programıyla t testi ile IC₅₀ değeri 106,0 mM değeri olarak tespit edilmiştir. KA uygulaması sonrasında, IC₅₀ değeri 754,2 μ M değeri tespit edilmiştir. Literatürle uyumlu olarak IC₅₀ değeri 353,6 μ M konsantrasyon deneyimizde kullanılmıştır.

Deneyisel verilere göre BA'nın WM115 primer melanom hücre hattı için yüksek konsantrasyonlarda hücreleri inhibe ettiği desteklenmiştir. SK-MELL-30 metastatik melanom hücre hattı için değişen BA konsantrasyonlarının ise farklı etki gösterdiği gözlenmiştir. Bilinen en iyi tirozinaz inhibitörü olan KA ise her iki hücre hattı üzerinde toksik etkiye sebep olmuştur.

Çalışmamızın ikinci kısmında ise tirozinaz enzim aktivitesindeki değişimi belirlemek için BA ve KA'yı SK-MELL-30 hücrelerine uygulanarak enzim aktivitesi ölçülmüştür. 48 saat sonunda 475 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Kontrol grubu için % 0 enzim inhibisyonu kabul edilerek BA için %43,82, KA için %46,00 tirozinaz enzim inhibisyonu belirlenmiştir. Tek yönlü ANOVA testi kullanılarak $p=0,084$ ($p>0,05$) bulunmuştur ve BA için anlamlı bir enzim inhibisyonu görülmediği saptanmıştır. WM115 hücrelerinin 48 saat uygulama sonrasındaki sonuçları Kontrol grubu için % 0 enzim inhibisyonu kabul edildiğinde BA için %51,35, KA için % 71,15 tirozinaz enzim inhibisyonu belirlenmiştir. Tek yönlü ANOVA testi kullanılarak $p=0,046$ bulunmuştur ($p<0,05$) ve BA için anlamlı bir

enzim inhibisyonu görülmüştür. Bu sonuçlar bize BA'nın tirozinazı inhibe etmesiyle melanom tedavisine katkı sağlayabileceğini göstermiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında BA'nın melanin pigmentinden sorumlu olan tirozinaz enziminin aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir.
- BA'nın sitotoksik etkisinin belirlenmesi için WST-1 testi uygulanmıştır. SK-MELL-30 hücre hattı için sitotoksik etki gözlenemezken WM-115 için IC_{50} 106,0 mM olarak bulunmuştur. KA uygulamasının WST-1 testi sonuçları SK-MELL-30 için IC_{50} 219,7 μ M WM115 için IC_{50} 754,2 μ M olarak bulunmuştur.
- BA uygulaması tirozinaz enziminin bilinen inhibitörü KA ile karşılaştırıldığında WM115 hücre hattında anlamlı bir inhibisyona sebep olurken ($p=0,046$) SK-MELL-30 hücre hattında anlamlı bir sonuç göstermemiştir ($p=0,085$).
- Melanomu önlemede melanogenezisin inhibe edilmesi önemliyken bunu sağlamak tirozinaz inhibitörleri büyük önem taşımaktadırlar. Literatürde yer alan tirozinaz inhibitörlerinin kanserojen yapıda olmaları yeni inhibitörlerin çalışılmasını gerektirmektedir.
- Çalışmamızda BA uygulamasının tirozinaz enziminin primer melanom hücrelerinde anlamlı bir inhibisyon sağlaması erken dönemdeki melanom tedavisi için umut vericidir.
- Bor madeni ülkemiz için büyük önem taşımaktadır. Bu değerli madenin klinik alandaki çalışma sahasının genişletilmesi ülkemize ulusal pazarda avantaj sağlayabilir.
- Bor bileşiklerinin prostat, meme, servik ve akciğer kanser vakalarında tedavi seçeneği olabildiği gösterilmiştir. Diğer kanser türleri için de çalışmaların yapılması gerekmektedir.
- Melanom hücrelerinde BA uygulamasının hücre proliferasyonunu engellediği bildirilmiştir. Mekanizmasının açıklığa kavuşturulması gerekmektedir.

- BA uygulamasının tirozinaz enzimindeki inhibisyonunu hangi mekanizma ile sağladığını açıklamak için ileri çalışmalar gerekmektedir.



7. KAYNAKÇA

1. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Homet B, Ribas A. New drug targets in metastatic melanoma. *Journal of Pathology*, 2014; 232(2),134–41.
3. Trovitch P, Gupte A, Ciftci K. Early detection and treatment of skin cancer. *Turkish Journal of Cancer*, 2002; 32(4),129–37.
4. Zolghadri S, Bahrami A, Khan MTH, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas FA. Comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Enzyme Inhib Med Chem*, 2019; 34(1):279.
5. Parlak A, Çayırılı M, Parlak N, Ekinci Ş. Melanoma genel bakış. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2014;6(1):22-27.
6. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wölfel C, Klehmann-Hieb E. A p16INK4a-Insensitive CDK4 Mutant Targeted by Cytolytic T Lymphocytes in a Human Melanoma. *Science* , 1995;(5228),1281–4.
7. Uluisik I, Karakaya HC, Koc A. The importance of boron in biological systems. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;45:156-162.
8. Kurtoğlu F, Kurtoğlu V, Celik I, Keçeci T, Nizamlioğlu M. Effects of dietary boron supplementation on some biochemical parameters, peripheral blood lymphocytes, splenic plasma cells and bone characteristics of broiler chicks given diets with adequate or inadequate cholecalciferol (vitamin D3) content. *British Poultry Science* 2005;46(1):87–96.
9. Hunt CD. Dietary Boron: An Overview of the Evidence for Its Role in Immune Function. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*;2003;16(4):291–306.
10. Naghii MR, Samman S. The effect of boron on plasma testosterone and plasma lipids in rats. *Nutrition Research* 1997;17(3):523–31.
11. Hazman Ö, Bozkurt MF, Fidan AF, Uysal FE, Çelik S. The Effect of Boric Acid and Borax on Oxidative Stress, Inflammation, ER Stress and Apoptosis in Cisplatin Toxication and Nephrotoxicity Developing as a Result of Toxication. *Inflammation* 2018;41(3):1032–1048
12. Hacıoglu C, Kar F, Kacar S, Sahinturk V, Kanbak, G. High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic

- Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line. *Biol Trace Elem Res.*, 2020;193(2):400–9.
13. Acerbo AS, Miller LM. Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*, 2003;134(8):1669–74.
 14. Cancer. <https://www.nhs.uk/conditions/cancer/>
 15. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Pineros M, Znaor A, Bray F. Cancer statistics for the year 2020: An overview, *International journal of cancer*, 2021;144, 1941-1953.
 16. The Genetics of Cancer. <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/genetics/genetics-cancer>
 17. Hinds PW, Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, 1994;4(1):135–41.
 18. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell* , 2000;100:57–70.
 19. Nanda MS, Sameer AS, Syeed N, Shah ZA, Murtaza I, Siddiqi MA, AliA. Genetic aberrations of the k-ras proto-oncogene in bladder cancer in kashmiri population *Urol J*. 2000;7:168-73
 20. Koşar P, Çapar E, Koşar A. Bladder cancer and RAS proto-oncogenes. *The New Journal of Urology* , 2012;7 (1): 55-58.
 21. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC(eds). Robbins Basic Pathology. *Elsevier*, 2013:161-214.
 22. Manning AL, Dyson NJ. RB: mitotic implications of a tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* ,2012;12(3):220–6.
 23. Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 2010;31(1):9–18.
 24. Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev*, 2011;37(1):63–74.
 25. Konukoğlu D. Anjiyogenezin temel moleküler mekanizmaları ve tümör anjiyogenezi. *Cerrahpaşa tıp dergisi*, 2005;36(1)-42.
 26. Fidler IJ, Gersten DM, Hart IR. The Biology of Cancer Invasion and Metastasis. *Adv Cancer Res* 1978;28(C)-149–250.

27. D'Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci.*, 2016;15;17(7).
28. Chung S, Lim G, Lee JY. Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. *Scientific Reports*, 2019; 9(1).
29. Nicholas S, Mathios D, Jackson C, Lim M. Metastatic melanoma to the brain: Surgery and radiation is still the standard of care. *Current Treatment Options in Oncology*, 2013;14(2):264-79.
30. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America*, 2020 ;100(1):1-12.
31. Özgün E, Seckin S, Ergocen S. İntradermal Melanositik Nevüs, Displastik Nevüs ve Malign Melanomanın Ayırıcı Tanısında Ki-67'nin Önemi ve Ki-67'nin Malign Melanomada Prognostik Faktörlerle Karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri J Dermatol* 2009;19(4):184-92. 3
32. Ko JM, Velez NF and Tsao H. Pathways to Melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2010;29(4):210-7.
33. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al: Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997;277(18):1439-44. 5.
34. Wang SQ, Setlow R, Berwick M, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(5):837-46.
35. Goldstein BG, Goldstein OA. Diagnosis and Management of Malignant Melanoma. *Am Fam Physician* 2001;63 (7):1359-68.
36. MacKie RM. Incidence, risk factors and prevention of melanoma. *Eur J Cancer* 1998;34(3):3-6.
37. Braun-Falco O, Burgdorf WHC, Plewing G, et al. Braun-Falco Dermatology. *Springer*, 2009:1416-32.
38. Savage LM, Boehmer L, McBride A. Melanoma: review of pathogenesis and treatment options. *US Pharm*, 2010;35(9)(Oncology suppl):8-16.
39. Wolf K, Goldsmith LA, Katz SI, et al. Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 7th ed. USA: Mc Graw Hill Companies; 2008:1134-57.
40. Kirkwood JM, Moschos S, Wang W. Strategies for the development of more effective adjuvant therapy of melanoma: current and future explorations of antibodies, cytokines, vaccines, and combinations. *Clin Cancer Res*, 2006;12(7):2331-6.

41. Chopra A, Sharma R, Rao UNM. Pathology of Melanoma. Surgical Clinics of North America, 2020, 100(1):43-59.
42. Baykal C, Ekinçi AP. Malign Melanom: Risk Faktörleri ve Temel Klinik Özellikler. *Türk Dermatoloji Dergisi*, 2015, 9(1):1-7.
43. Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. Surgical Clinics of North America, 2020 ;100(1):1-12
44. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification, *In Vivo*, 2014, 28(6):1005-11.
45. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Herlyn M, Marchetti MA, McArthur G, Ribas A, Roesch A, Hauschild A. Melanoma, *Nature Reviews Disease Primers*, 2015, 1:1-20.
46. Oz Bedir B.E. Melanom hücre hattında karbonik anhidraz-IX inhibisyonunun B-Raf proteini üzerine etkilerinin araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, Ankara, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, 2021.
47. Van Zeijl MCT, Van den Eertwegh AJ, Haanen JB, Wouters MWJM. (Neo)adjuvant systemic therapy for melanoma, *European Journal of Surgical Oncology*, 2017; 43(3):534-43.
48. Massi D, Franchi A, Borgognoni L, et al. Thin cutaneous malignant melanomas (< or =1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. *Cancer* 1999;85(5):1067-76
49. Gogas HJ, Kirkwood JM, Sondak VK. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*, 2007;109(3):455-64.
50. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 2019; 20(11):1366-79.
51. Eggermont AM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*, 2004;40(12):1825-36.
52. Agarwala SS, Kirkwood JM, Gore M, et al. Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol*, 2004;22(11):2101-7

53. Kuryk L, Bertinato L, Staniszevska M, Pancer K, Wieczorek M, Salmaso S, Caliceti P, Garofalo M. From conventional therapies to immunotherapy: Melanoma treatment in review, *Cancers (Basel)*, 2020; 12(10):3057
54. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, 2019; 20(11):1366-79.
55. Hawryluk EB, Tsao H. Melanoma: Clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2014; 4(9): a015388..
56. Inamdar GS, Madhunapantula SV, Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology*, 2010; 80(5):624-37.
57. Hertzman Johansson C, Egyhazi Brage S. BRAF inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 2014, 142(2):176-82
58. Zaman A, Wu W, Bivona TG. Targeting Oncogenic BRAF: Past, Present, and Future, *Cancers (Basel)*, 2019, 11(8):1197.
59. Schallreuter KU, Wood JM, Pittelkow MR, Buttner G, Swanson N, Korner C. Increased monoamine oxidase A activity in the epidermis of patients with vitiligo. *Arch Dermatol Res*, 1996; 288(1):14–8.
60. Sarkhail, Parisa S, Mona S, Pantea K, Hirsu M. Corrigendum: Anti-melanogenic activity and cytotoxicity of pistacia vera hull on human melanoma skmel-3 cells. *Acta Medica Iranica*, 2019;55, (7):422-428.
61. Lai X, Wichers HJ, Soler-Lopez M, Dijkstra BW. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry - A European Journal*, 2018; 24(1):47–55.
62. Videira, Santos, Moura, Lima, Magina, Sofia. Mechanisms regulate Melanogenesis, 2013.<https://doi.org/10.1590/S0365-05962013000100009>>. ISSN 1806-4841.
63. Ansinenea E, Ortiz A. Melanin: a photoprotection for Bacillus thuringiensis based biopesticides. *Biotechnol Lett*, 2015;37, 483–490.
64. <https://www.creative-enzymes.com/>
65. Schallreuter KU, Kothari S, Chuan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis controversies and new concepts. *ExpDermatol*, 2018;17:395-404.
66. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *PhysiolRev*, 2004;84:1155-228.
67. Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J HistochemCytochem*, 2002; 50:125-33.

68. Thody AJ, Graham A. Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans? *Pigment Cell Res.*, 1998; 11:265-74.
69. Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research*, 2003; 5(3):165–76.
70. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 2017;32(1):403.
71. Videira IF, Dos S, Lima Moura DF, Vasconcelos Magina SBLM. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol*, 2013; 88(1):76.
72. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2005;62, 1707–1723.
73. Kuba I, Kinst I. Flavonols from saffron flower: Tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47,4121-4125.
74. Chen O, Kubo I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002;50, 4108-4112.
75. Calay, Ö. Tirozinaz enziminin bazı tıbbi bitkiler tarafından inhibisyonu Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, İstanbul Üniversitesi, 2010.
76. Vámos-Vigyázó L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 1981; 15(1):49-127.
77. Polatoğlu İ. Tirozinaz Enzim Aktivitesi Üzerine Reaksiyon Parametre Etkilerinin UV Spektrofotometre ile Yerinde Analiz Edilmesi. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2016; 12(2):319–25.
78. Adak, T. (2019). Kojik Asit Türevi Bileşiklerin Tasarımı, Sentezi ve Melanoma Hücrelerine Karşı Sitotoksiteleri ile Tirozinaz İnhibisyonu Etkilerinin Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi, 2019.
79. Mahmoud A, Abdirahman S, Al-ruweidi M. Literature Review on Tyrosinase Enzyme. *Researchgate*, 2017.
80. Bentor, Yinon. Chemical Element.com – Boron, 2007.

81. Forrest H Nielsen, Curtiss D Eckhert, Boron, *Advances in Nutrition*, 2020; 11(2):461-462.
82. Dibek, E, Babayeva A, Sezer Kürkçü M, Akgüç, Çöl N, Çöl B. Bor içeren bazı biyoaktif bileşikler. *Journal of Boron*, 2020;5(1):29-39.
83. Tombal TD, Özkan ŞG, Ünver İK, Osmanlıoğlu AE. Bor bileşiklerinin özellikleri, üretimi, kullanımı ve nükleer reaktör teknolojisinde önemi. *Bor Dergisi*, 2016;1(2):86-95
84. Türkiye bor madeni haritası ile bor çıkartılan yerler-Bor madeni nerede çıkarılır, kullanım alanları nelerdir? *Sabah.com.tr*,2021.
85. Jessica C. What Is Boric Acid? *The Chemistry Blog*, 2020.
86. Kuru R, Yarat A. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. *Clin Exp Health Sci.*, 2017; 7: 107-14.
87. Yiğitbaşıoğlu H. Türkiye için ömenli bir maden:bor. *Coğrafi Bilimler Dergisi*, 2004;2 (2):13-25.
88. Bilgiç M, Dayık M. Borun Özellikleri ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımıyla Sağladığı Avantajlar. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 2018;30(1):133-138.
89. Güyagüler T. Türkiye Bor Potansiyeli. 4.Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, İzmir, 2001.
90. Akçıl A, Tuncuk A, Deveci H. An Overview of Leaching Systems of Ammonium Salts, Inorganic and Organic Acids in the Production of Boric Acid, *Scientific Mining Journal*, 2009;48(1):3-16.
91. ETİ MADEN. 2021 Yılı Bor Sektör Raporu.
92. Demirtaş A. Bor'un İnsan Beslenmesi ve Sağlığı Açısından Önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010 41(1):75-80.
93. Woods, WG. An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives*, 1994;102(7):5-11.
94. Simsek A, Velioglu S, Coskun AL, Saylı BS. Boron concentrations in selected foods from borate-producing regions in Turkey. *J Sci Food Agric* 2003;83:586-92.
95. Sungur S, Okur R. Using Azomethine-H method determination of boron contents of various foods consumed in Hatay region in Turkey. *Food Chem.*, 2009;115:711-4.

96. Simsek A, Korkmaz D, Velioglu A, Ataman YO. Determination of boron in hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and spectrophotometry. *Food Chem.*, 2003, 83: 293-6.
97. Hunt, CD. Boron. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2003, 566–574.
98. Barfh RF, Soloway AH, Fairchild RG, Brugger RM. Boron neutron capture therapy for cancer. *Realities and prospect Cancer* , 1992, 70(12):2995–3007.
99. I Scorei, R Popa, R. Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2010, 10(4):346–51.
100. Barth RF, Soloway AH. Boron neutron capture therapy of primary and metastatic brain tumors. *Mol Chem Neuropathol*. 1994, 21(2–3):139–54.
101. Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, <http://www.boren.gov.tr/tr>
102. Pisare MA, Dagrosa MA, Juvenal GJ. Boron neutron capture therapy in cancer: past, present and future. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2007, 51(5):852–6.
103. Yakıncı ZD, Kök M. Borun sağlık alanında kullanımı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 2016, 4(1):36-44.
104. Hiratsuka J, Kamitani N, Tanaka R, Tokiya R, Yoden E, Sakurai Y, Suzuki M. Long-term outcome of cutaneous melanoma patients treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *Journal of radiation research*, 2020, 61(6): 945–951.
105. Ukuda H. Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Cutaneous Malignant Melanoma Using ^{10}B -p-Boronophenylalanine (BPA) with Special Reference to the Radiobiological Basis and Clinical Results. *Cells*, 2021, 10(11): 2881.
106. Escobar SG, Chin MH, Sandberg ML, Xu H. Isolation and Characterization of a Distinct Subpopulation from the WM115 Cell Line That Resembles In Vitro Properties of Melanoma Cancer Stem Cells. *SLAS Discov.*, 2017, 22(5):484-493.
107. Terzi E. Renal kanser hücre hattında (CAKI-2) karbonik Anhidraz-IX enzim inhibisyonunun mTOR proteini üzerine etkilerinin araştırılması, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora tezi, Ankara, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi, 2021.
108. Öz Bedir B, Terzi E, Şimşek E, Karakuş İ, Uysal T, Ercan E, Özensoy Güler Ö. HIF-1 inhibitors: differential effects of Acriflavine and Echinomycin on tumor associated CA-IX enzyme and VEGF in melanoma. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2021, 46(6): 679-684.

- 109.Tokur O, Aksoy A. In vitro sitotoksosite testleri. *Harran üniversitesi veterinerlik fakültesi dergisi*, 2017, 6(1): 112-118.
110. Srisayam M, Weerapreeyakul N, Barusrux S, Tanthanuch W, Thumanu K. Application of FTIR microspectroscopy for characterization of biomolecular changes in human melanoma cells treated by sesamol and kojic acid. *Journal of dermatological science*, 2013, 73 (2014): 241-250
- 111.Chang T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009;10(6):2440-75.
- 112.Loizzo M, Tundis R, Menichini F. Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: an update. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11(4):378-98.
- 113.Germanas JP, Wang S, Miner A, Hao W, Ready JM. Discovery of smallmolecule inhibitors of tyrosinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007,17(24):6871-5. 147.
- 114.Büyükbani N. Melanositer lezyonlarda değişik diferansiyasyon antijenlerinin duyarlılık ve özgünlüğü: mart-1/melanin-a, tirozinaz ve hmb45'in s100 ve nk1/c3 ile karşılaştırılması. *Türk patoloji dergisi*, 2002, 18 (1-2):3-14.
- 115.Nattopong S, Omboon L. A new source of whitening agent from a Thai Mulberry plant and its betulinic acid quantitation, *Natural Product Research*, 2008, 22: 727- 734..
- 116.Deng J, Ye QY, Diao QC, et al. Effects of arotinnoid ethylester on UVB induced melanogenesis of cultured human normal melanocytes, *Chinese Journal of Dermatology*, 1997;30, 389-391.
- 117.Adhami M, V, Khan N, Mukhtar H. Cancer chemoprevention by pomegranate: Laboratory and clinical evidence. *Nutriton and Cancer*, 2009, 61: 811-815.
- 118.Seeram NP, Adams LS, Hennign SM, Niu Y, Zhang Y, Nair M. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005,16: 360-367.
- 119.Tiedthk, J, Morel J, Marks O. Depigmentation factor bioflavonoids. A safe and effective skin lightening based on encapsulated citrus bioflavonoids. *Cosmetic Science Technology*, 2004.

- 120.Slominski A, Zbytek B, Slominski R. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. *International journal of cancer*, 2009, 124(6); 1470–1477.
- 121.Bone R, Shenvi AB, Kettner CA, Agard DA. Serine protease mechanism: structure of an inhibitory complex of alpha-lytic protease and a tightly bound peptide boronic acid. *Biochemistry*, 1987, 26;7609-7614.
- 122.Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.*, 2004, 216; 21-29.
- 123.Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay JJ, Powell J. *Cancer Incidence in Five Continents*. Lyon, France International Agency for Research on Cancer, 1993.
- 124.Sayli BS, Tuccar E, Ellan AH. An assessment of fertility and infertility in boron-exposed Turkish subpopulations. *Biol. Trace Elem. Res*, 2001, 81:255-267
- 125.Korkmaz M, Uzgo E, Bakirdere S, Aydın F, Ataman Y. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ. Toxicol.*, 2007, 22, 17-25.