



**BOR BİLEŞİKLERİNİN DNA HASARI VE
ONARIMINDAKİ ROLÜNÜN BENİGN PROSTAT
HİPERPLAZİSİ (BPH-1) HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

YUSUF YAY



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOR BİLEŞİKLERİNİN DNA HASARI VE ONARIMINDAKİ ROLÜNÜN
BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ (BPH-1) HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Yusuf YAY
0000-0002-5617-7062

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA – 2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BOR BİLEŞİKLERİNİN DNA HASARI VE ONARIMINDAKİ ROLÜNÜN BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ (BPH-1) HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Yusuf YAY

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

Benign Prostat Hiperplazisi sık bir şekilde erkeklerde görülen benign bir adenomdur ve mesane çıkımında tıkanıklığa sebep olmaktadır. En yaygın görülen etkileri ise prostat büyümesi, prostat genişlemesi ve düşük üriner sistemi semptomlarıdır. Farklılaşmada, senesens, apoptoz ve proliferasyondaki değişiklikleri içeren kompleks hücresel değişimler sonucu meydana gelmekte ve özellikle kronik enflamasyon süreci ile ilişkili olarak gelişim göstermektedir.

Çift zincir kırıkları diğer lezyonlar kadar sık ortaya çıkmasalar da tamir mekanizması oldukça zor olduğundan son derece toksik lezyonlardır. Çift iplik kopmalarına endojen veya ekzojen DNA hasar ajanları aracılık edebilir. Hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin veya irinotekan, doksorubisin ve etoposid gibi topoizomeras I ve II'nin aracılık ettiği DNA'nın ligasyonunu engelleyen ajanların oluşumu çift zincir kırıklarına yol açar. Serin 139 amino asit üzerindeki histon H2AX fosforilasyonu, çift zincir kırıklarının mevcudiyeti için spesifik bir gösterge olarak kabul edilir.

Bor, çeşitli yapısal ve fonksiyonel rolleri ile biyokimyasal yolları destekleyen yararlı bir biyoaktif gıda bileşeni ve hayvanlar ve insanlar için gerekli olan bir iz elementtir. Hayvan çalışmaları ve sınırlı sayıda epidemiyolojik çalışmada, borun çeşitli metabolik aktiviteler üzerine etki ederek sağlığa yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bor ve türevlerinin anti-enflamatuvar ve immün yanıt düzenleyici özellikleri sebebiyle, BPH benzeri hastalıkların tedavisinde potansiyel olarak kullanılabilen öngörülmektedir.

Bütün bu bilgiler kapsamında çalışmada BPH-1 hücre hattında bor ve türevlerinin DNA hasarı üzerindeki etkisinin moleküler seviyede incelenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak BPH-1 hücrelerine BA (Borik Asit) ve BO (Bor Oksit) uygulanarak sitotoksikite denemeleri gerçekleştirildi. Uygun zaman ve konsantrasyon değerlerinin belirlenmesinin ardından BA ve BO'nin DNA hasarı ve onarımı üzerine etkisi pH2AX, pATM, pATR ve p53 protein seviyelerine bakılarak western-blot yöntemiyle analiz edildi. Bunun yanı sıra immünofloresan görüntüleme yapılarak pH2AX ve pATM odak sayımlarıyla DNA hasarı miktarı ölçüldü. Tez çalışması çerçevesinde azalan H2AX odak oluşumları nedeniyle BA ve BO'nin BPH-1 hücrelerinde doksorubisin ve H₂O₂ ile yaratılan DNA hasarını azaltabileceği ve koruyucu bir rol oynayabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bor Bileşikleri, BPH-1, DNA Hasarı, pH2AX, pATM

2021, xi + 78 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE ROLE OF BORON COMPOUNDS IN DNA DAMAGE AND REPAIR IN BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA (BPH-1) CELLS

Yusuf YAY

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) is one of the benign adenomas that causes obstruction in the bladder outflow in men. Prostate enlargement and lower urinary tract problems are the most prevalent side effects. Processes in differentiation, senescence, apoptosis, and proliferation occur as a result of complicated cellular changes.

Although double chain fractures are not as commonly seen as other lesions, they are particularly hazardous due to the difficulty in repairing them. Endogenous or exogenous DNA damaging agents can cause double-strand breaks. Double-strand breaks are caused by reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, as well as agents that impede topoisomerase I and II-mediated DNA ligation, such as irinotecan, doxorubicin, and etoposide. Phosphorylation of histone H2AX on serine 139 amino acids is thought to be a particular indication of double-strand breaks.

Boron is one of the bioactive food components that supports metabolic pathways through its many structural and functional activities, and it is a necessary trace element for both animals and humans. Tubing has been demonstrated to have favorable benefits on health in animal studies and a small number of epidemiological studies by acting on numerous metabolic functions. Thanks to its anti-inflammatory and immune response-regulating capabilities, boron and its compounds could potentially be employed in the treatment of disorders like BPH.

In light of this, the goal of our research was to look into the effect of boron and its derivatives on DNA damage at the molecular level in the BPH-1 cell line. First, BPH-1 cells were seeded, then BA (Boric Acid) and BO (Boron Oxide) cytotoxicity tests were performed. The effects of BA and BO on DNA damage were investigated using the Western-Blot method, looking at pH2AX and pATM protein levels, after finding the right duration and concentration. In addition, immunofluorescence imaging was used to determine the degree of DNA damage using pH2AX and pATM focal counts. In the framework of the thesis study, it was concluded that BA and BO could reduce DNA damage caused by doxorubicin and H₂O₂ in BPH-1 cells and play a protective role due to decreased H2AX foci formation.

Key words: Bor Compounds, BPH-1, DNA Damage, pH2AX, pATM

2021, xi + 78 pages.

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin süresince ve tez çalışmalarım sırasında yanımda olan çok değerli hocam ve tez danışmanım Doktor Öğretim Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN'e bütün desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimin süresince sonsuz sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) / Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (2210-C ÖNCELİKLİ ALANLAR BURS PROGRAMI) kurumuna desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun tez döneminde yanımda olan sevgili arkadaşlarım İrem ÇOKSEVER, Erdinç OKAN, Günay İBRAHİMOVA, Mehmet KARAÇAY, Engin HACIOğLU ve Gözde ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yusuf YAY
.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. Prostat Bezi.....	4
2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH-1).....	5
2.3. DNA Hasarı.....	9
2.3.1 DNA çift zincir kırıkları.....	9
2.3.2 DNA hasarı ajanları ve koşulları.....	11
2.3.3. DNA hasarı ve kronik enflamasyonda reaktif oksijen türü oluşumu.....	12
2.3.4. DNA hasarı meydana gelmesi durumunda hücresel yanıt mekanizmaları.....	15
2.4. Bor.....	25
2.4.1. Bor bazlı bileşiklerin genel özellikleri.....	25
2.4.2. Bor ve türevi maddelerin insan sağlığı üzerine etkileri.....	26
2.4.3. Borun hücresel işlevleri.....	27
2.4.4. Bor aktivitesinin biyokimyasal mekanizmaları.....	28
3. MATERYAL ve METOT.....	30
3.1. Kullanılan Materyaller.....	30
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	30
3.1.2. Hücre hattı.....	32
3.1.3. Kullanılan malzemeler.....	32
3.1.4. Kullanılan cihazlar.....	33
3.2. Yöntemler.....	34
3.2.1. Sterilizasyon.....	34
3.2.2. Kullanılan solüsyon ve tamponların hazırlanması.....	34
3.3. Hücre kültürü.....	41
3.3.4. MTT analizleri (sitotoksosite).....	42
3.3.5. İmmünofloresan işaretlemesi.....	44
3.3.6. Western blot uygulamaları.....	45
4. BULGULAR.....	50
4.1. Sitotoksosite Analizi Sonucu Bulgular.....	50
4.2. İmmünofloresan (IF) Bulguları ve Sonuçları.....	52
4.3. Western Blot Uygulaması Bulgu ve Sonuçlar.....	56
5. TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	78

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
%	Yüzde
~	Yaklaşık olarak

Kısaltmalar	Açıklama
ATM	Ataksiya Telangiektasia Mutant Protein
APS	Amonyum Persülfat
B	Bor
BA	Borik Asit
BO	Bor Oksit
BPH	Benign Prostat Hiperplazi
BPH-1	Benign Prostat Hiperplazi Hücre Hattı
CDC42	Hücre bölünmesi kontrol proteini homoloğu 42
ÇZK	Çift Zincir Kırığı
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimetilsülfoksid
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGTA	Etilen glikolik tetraasetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	Ekstraselüler Sinyal Regülasyon Kinazı
FBS	Fötal Sığır Serum
FGF2	Fibroblast Büyüme Faktörü 2
HR	Homolog Rekombinasyon
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
H2AX	H2A Histon Ailesinin X Üyesi
IC_{50}	Hücre Profilerasyonunu %50 Oranında İnhibe Eden Konsantrasyon Değeri
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
IL-8	İnterlökin-8
IR	İyonize Radyasyon
LH	Lütein Hormon
LHRH	Lütein Hormonu Salgılatıcı Hormon
LPS	Lipopolisakkarid

MDA	Malondialdehit
MDM2	Mouse Double Minute 2 homolog (E3 ubiquitin-protein ligase)
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
NF-kB	Nükleer Faktör kappa B (Transkripsiyon faktörü)
NHEJ	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
PBS	Fosfat Tamponu
PI3K	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PIKKs	Fosfotidilinositol-3 kinaz ilişkili kinazlar
PMSF	Fenilmetilsülfonil florür
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RPMI	Hücre kültürü besiyeri
RNT	Reaktif Nitrojen Türleri
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TBS	Trisle Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
TBS-T	Tween-20 içeren ve Trisle Tamponlanmış Tuz Solüsyonu
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethane-1,2-diamine
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
4-HNE	4-hidroksinonenal

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 2.1. İnsan prostatının zonal anatomisinin şeması5
- Şekil 2.2. İyonize radyasyona maruz kalmaktan kaynaklanan tek zincir kırılmaları, hemen veya hasarlı şekerlerin kimyasal reaksiyonlar veya hasarlı bazların enzimatik reaksiyonları ile ÇZK'lere dönüştürülebilir..... 10
- Şekil 2.3. Kronik enflamasyonda gerçekleşen ROT ile RNT oluşumunun şeması. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, kanserle bağlantılı genlerde DNA hasarlarına, DNA onarımına, apoptoz ile birlikte hücre siklusunda yer alan hayati derecedeki hüresel proteinlerde değişikliklere neden olmaktadır..... 15
- Şekil 2.4. Meydana gelen DNA hasarına karşı yanıt oluşturan proteinlerin şematik görüntüsü. 17
- Şekil 2.5. Meydana gelen DNA Hasarı ile replikasyon çatalına karşı oluşan hüresel yanıtların genel şematik görüntüsü. 18
- Şekil 2.6. Farklı Ajanların DNA kırıkları meydana getirmesiyle oluşan pH2AX^(Ser139) fosforilasyonu..... 22
- Şekil 2.7. Oluşan DNA çift zinciri kırığı sonucunda nükleer odak oluşumlarının şeması 24
- Şekil 4.1. BPH-1 hücre hattına bor oksit uygulamasıyla elde edilen konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığını gösteren grafik..... 51
- Şekil 4.2. BPH-1 hücre hattına borik asit uygulanmasıyla elde edilen konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığını gösteren grafik..... 51
- Şekil 4.3. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile BA ve BO uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D görüntüleri BA ve BO maddesi uygulanmamış kontrol BPH-1 hücreleri. E, F, G, H, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO uygulanmış BPH-1 hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594. (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir. 53
- Şekil 4.4. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile H₂O₂, BA+H₂O₂, BO+H₂O₂ uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D yalnızca H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. E, F, G, H, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA ve 250 μ M H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO ve 250 μ M H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir. 54
- Şekil 4.5. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile DOKSO, BA+DOKSO, BO+DOKSO uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D görüntüleri yalnızca 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1 hücreleri. E, F, G, H görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA ve 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO ve 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1

- hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir. 55
- Şekil 4.6. BPH-1 hücrelerinin immüno Floresan görüntüleme sonucu elde edilen görüntülerinden (A) γ H2AX^(Ser139) odak oluşumlarının ve (B) pATM^(Ser1981) fosforilasyon seviyesinin ImageJ programı ile analizi (Her grup için $n \geq 300$, * $p \leq 0,01$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0001$). 56
- Şekil 4.7. A) BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ile ilgili proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler. B) BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ile ilgili proteinlerin kat cinsinden elde edilen ekspresyon seviyesindeki değişimleri (ImageJ programı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir). 57
- Şekil 4.8. BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ve hücre proliferasyonu ile ilgili proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler. 59
- Şekil 4.9. BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ve hücre proliferasyonu ile ilgili proteinlerin kat cinsinden elde edilen ekspresyon seviyesindeki değişimleri (ImageJ programı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir). 61

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Bor Oksit ve Borik Asit Moleküler ağırlıkları.....	34
Çizelge 3.2. Ön Ayırma Jeli bileşenleri	40
Çizelge 3.3. Ayırma Jeli Bileşenleri.	40



1. GİRİŞ

Benign prostat hiperplazisi sık olarak erkek bireylerde görülen benign bir adenom olup kronik enflamasyonla birlikte prostat büyümesiyle ilişkili ciddi klinik semptomlara yol açan karmaşık ve kompleks bir oluşumdur (Sutton ve ark. 2006, Penna ve ark. 2009). BPH; hücre proliferasyonunda, apoptozda, farklılaşma ve senesens süreçlerinde gerçekleşen hücresel değişikliklerden meydana gelmektedir (Castro ve ark. 2004, Hallstrom ve ark. 2008, Penna ve ark. 2009, Schauer ve ark. 2011). Bunların yanı sıra son zamanda gerçekleştirilen çalışmalarla, meydana gelen birçok kompleks değişimin yara iyileşme süreci ve kronik enflamasyonla ilgili olduğu rapor edilmiştir (Schauer ve ark. 2011). Patofizyolojik olarak enflamatuvar yanıt ile ilişkili doku hasarı BPH nodüllerinin ve prostat kanseri öncül lezyonu olan proliferatif enflamatuvar atrofi alanlarının gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Enflamatuvar koşullar, epitel hücreleri tarafından reaktif oksijen (ROT) ve nitrojen (RNT) türlerinin salınmasına yol açarak DNA ve/veya doku hasarına neden olmaktadır. Sonuç olarak enflamatuvar koşullar altında DNA hasarı tamir mekanizmaları ve oksidatif stres regülasyonu normal hücrelerin transformasyonunda ya da kanser gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Kawanishi ve ark. 2017).

İnsan organizmasına alınan bor ve türevlerinin vücut sıvılarında %96 oranında borik asit ($B(OH)_2$) olarak temsil edildiği kabul edilmektedir (Korkmaz ve ark. 2007, Bakırdere ve ark. 2010, Nielsen ve ark. 2011). Bor ile ilgili yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, borik asidin (BA)'in hidroksil gruplarına gösterdiği ilgiden dolayı borun biyolojik etkisinin çok çeşitli olduğunu söylemektedir. Yapılan çalışmalar insan ve hayvanlarda borun embriyonik gelişmede, enerji substrat metabolizmasında, mineral metabolizmasında, kemik yapısı ve fonksiyonunda, enflamatuvar yanıtta ve diğer fizyolojik fonksiyonlarda önemli regülatör rollere sahip olduğunu göstermiştir (Hu ve ark. 2014, Khaliq ve ark. 2018). Bununla birlikte bor; peptidaz, proteaz, proteazom, arginaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidaz gibi enzimlerin etkili bir inhibitörü olarak fonksiyon göstermekte ve bu nedenle kemo-koruyucu olarak önem taşımaktadır (Gallardo-Williams ve ark. 2003, Bradke ve ark. 2008, McAuley ve ark. 2011). Ayrıca bor bileşikleri prostat kanseri başta olmak üzere diğer kanser türleri için de koruyucu ve/veya kemoterapötik ajanlar olarak tanımlanmaktadır (Li ve ark. 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bor alımının

artması ile birlikte kanser riskinin ve DNA hasarının azalması ve antioksidan seviyelerinin artmasının ilişkili olduğunu rapor etmektedir (Tepedelen ve ark. 2016, Yamada ve Eckhert 2019). Örneğin, borik asidin NADPH seviyesinin regülasyonunda etkin rolü olduğu ve antioksidan seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Chapin ve ark. 1998, Korkmaz ve ark. 2019). Ayrıca bordan yoksun erkek ve kadınlara (0,25mg/gün) yapılan bor takviyesi (3mg/gün) eritrosit süperoksit dismutaz konsantrasyonunu önemli derecede arttırmaktadır (Nielsen, 1996). Bununla birlikte kalsiyum fruktoboratin oksidatif strese maruz bırakılan kültür hücrelerinde hücre içi süperoksit iyonlarının miktarını azalttığı bulgulanmıştır (Nielsen ve Meacham 2011). 2018 yılında yapılan bir çalışmada borik asidin NAD'ın metabolik ürünü olan siklik ADP riboz (cyclic ADP ribose/cADPR) ile etkileştiği ve BA sinyal yolağının ARE (antioksidan yanıt elemanları/antioxidant response element)-regüle genler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yamada ve Eckhert 2019). Khaliq ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada düşük dozda (160mg'a kadar) borun enzim aktivitesini regüle ettiği, antioksidan sistemini geliştirdiği ve böbrek gelişimini artırdığı rapor edilmiştir (Khaliq ve ark. 2018). Sıçanlarda sisplatin toksisitesinin incelendiği bir çalışmada ise borik asidin ve boraksın farklı dozlarda sisplatin tarafından yaratılan enflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı bulgulanmıştır (Hazman ve ark. 2018). Ayrıca BA'in selenometiyonin ve genistein gibi kemopreventatif ajanların anti-proliferatif etkinliğini artırdığı ve kanser hücrelerini iyonize radyasyona (IR) karşı daha duyarlı hale getirdiği bulgulanmıştır (Barranco ve ark. 2007). Sonuç olarak yapılan çalışmalar borun anti-enflamatuvar, anti-karsinojen ve anti-oksidan ajan olarak rol oynayabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır. Bununla birlikte bor ile ilgili yapılmış olan çalışmalara bakıldığında gerek borik asit gerekse diğer farklı bor bileşiklerinin DNA hasarı onarımındaki rollerine dair herhangi bir araştırma yapılmadığı ve bu konuda ciddi bir eksiklik olduğu görülmektedir.

Çok sayıdaki etiyolojik hipotez, prostat enflamasyonunun BPH'ın başlamasına yol açtığını öne sürmektedir. Kronik prostat enflamasyonu olan hastaların, yüksek BPH geliştirme riskine sahip oldukları gösterilmiştir. (Chughtai ve ark. 2011, Schauer ve ark. 2011). Kronik enflamasyon süreci ise, uzun süre boyunca yüksek ROT seviyeleri ile DNA hasarını tetiklemektedir (Khandrika ve ark. 2009). Bu bilgiler ışığında enflamasyon kaynaklı olarak gelişim gösterdiği düşünülen BPH patogenezinde DNA hasarı onarım

mekanizmalarının önemli olması nedeniyle borik asit (BA) ve bor oksit (BO) gibi farklı bor bileşiklerinin DNA hasarı oluşumu ve tamirindeki rolleri araştırıldı. Bu amaçla Doksorubisin ve H₂O₂ gibi farklı DNA hasarı ve oksidatif stres ajanları bor bileşiklerinin varlığında ve yokluğunda BPH-1 hücrelerine uygulanarak DNA hasarı miktarı, DNA hasarı tamirinde rol oynayan proteinlerin seviyeleri ve gen ekspresyon değişiklikleri araştırıldı.

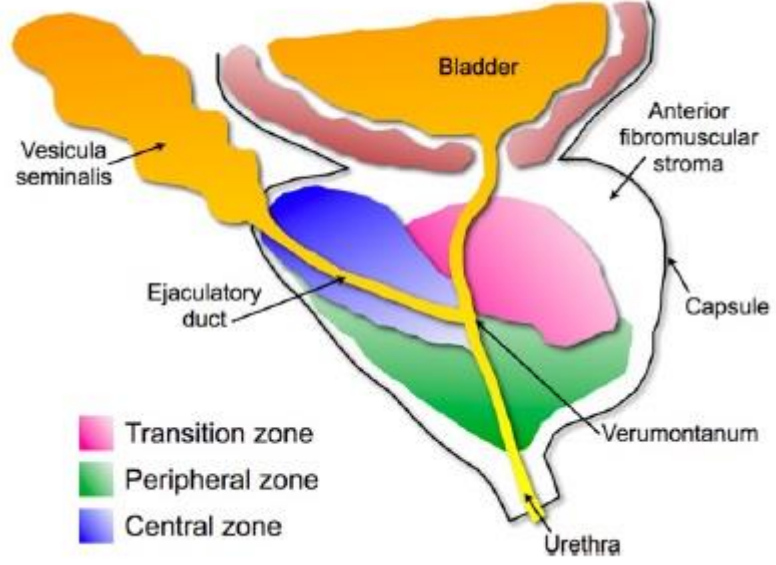


2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Prostat Bezi

İnsan prostat bezi, yetişkinlik süresince büyümeye devam eden tek iç organlardan birisidir. Bu büyümeye ve hastalığa yol açan patolojik değişiklikler esasen bilinmemektedir. İnsan prostat bezi, öncelikle düz kasta oluşan bir fibromüsküler stroma içinde glandüler asinde düzenlenmiş salgı epitelinden oluşur. Stromal bölge aynı zamanda fibroblastlar, bağışıklık ve sinir bileşenlerini içerirler. Stromal ve epitelyal hücrelerinin her biri etkileşimli bir şekilde benign prostat hiperplazisinin oluşumu ve evrimiyle alakalıdır (Schauer ve ark. 2011).

Gelişimsel olarak prostat dokusu, dallanma morfogenezi olarak adlandırılan yüksek oranda korunmuş bir süreçle meydana gelir. Burada ürogenital sinüsten epitel tomurcukları bitişik mezenkim içine doğru çıkıntı yapar, daha sonra uzar ve bifürkat terminal uçlu bir dal ağına dönüşür (Risbridger ve ark. 2005). Bu terminal uçları sonunda renal veya bronşiyolar ağlarda gözlenen benzer bir prosesle epitelyal kanal sistemine yol açar ve toplu olarak yetişkin prostatın nihai boyutunu ve şeklini sağlarlar (Risbridger ve ark. 2005). İnsanlarda yetişkin prostat bezi üretra tüpünün mesaneden inen ilk 3 cm'lik kısmını üretra ve ejakülatör kanalları verumontanum adı verilen bir divertikül kavşakta bağlar. Bu yapıda kadın rahmini oluşturan gelişimsel katmandan kalan bir kalıntıdır (Hunter ve Davies 1997). Bu gelişimsel süreç bir lobar yapının morfogenezinde 4 ayrı anatomik bölge oluşumuna yol açar; periferik, merkezi, geçişli ve anterior fibromüsküler ön bölge (Şekil 2.1). Merkezi bölge ejakülatör kanal bağlantılarını içerirken, fibromüsküler ön bölge herhangi bir glandüler yapıdan yoksundur. Periferik bölge total prostat hacminin yaklaşık %70'ini oluşturur ve prostat adenokarsinomunun çoğunluğunun olduğu yerdir. Geçiş bölgesi ise prostat hacminin sadece %5'ini temsil eder ve bununla beraber benign prostat hiperplazisinin meydana geldiği münhasır bölgedir (McNeal 1981).



Şekil 2.1. İnsan prostatının zonal anatomisinin şeması (Schauer ve ark. 2011).

Benign prostat hiperplazisi 60 yaş üzerindeki erkek bireylerin %70'inden fazlasında ortaya çıkan yaygın bir hastalık olup hasta popülasyonunda önemli morbidite ile sonuçlanmaktadır. Prostat epitel ve stromal hücrelerinin artan büyümesi ile karakterize olan benign prostat hiperplazisi yaşlı erkeklerde son derece yaygın olarak görülen bir hastalıktır (Castro ve ark. 2004).

2.2. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH-1)

Benign prostat hiperplazisi (BPH) son yıllarda erkeklerde sık bir şekilde gözlenen benign bir adenom olmakla birlikte mesane çıkımında tıkanıklık meydana getirerek prostat büyümesi ve kronik enflamasyonla ilişkili klinik düzeyde semptomlara neden olan karmaşık ve kompleks bir sendrom olarak nitelendirilmektedir (Sutton ve ark. 2006, Penna ve ark. 2009). Yaşla birlikte BPH gelişimi artış göstermekte ve erkeklerin yaklaşık olarak %40'ı bu rahatsızlığa yakalanma riski taşımaktadır (Fong ve ark. 2005, Schauer ve ark. 2011). BPH'nin etiyolojisinde bazı yönlerde belirsizlik sürmesiyle birlikte, çok sayıdaki mekanizmanın BPH'nin ilerlemesinde ve patogenezinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Briganti ve ark. 2009). Bunlardan birincisi yaşlanmadır ve BPH'nin gelişiminde ve alt üriner sistem semptomlarıyla (AÜSS) uyumlu olması durumu en önemli risk faktörünü temsil etmektedir. İleri yaştaki erkeklerde, büyüme yolağındaki

etkileşimlerin ve ciddi derecedeki doku yeniden biçimlendirme işleminin meydana gelmesinin prostat büyümesine yol açtığı ortaya koyulmuştur (Untergasser ve ark. 2005). İkinci olarak, BPH ilerlemesi ve patogenezi kapsamında hormonal değişikliklerin etkin olduğu önerilmektedir. Esasında, BPH'ın gelişiminde testiküler androjenlerin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır ve BPH dokusu normal prostat bezi dokusundan daha yüksek dihidrotestesteron aktivitesine sahiptir (Roberts ve ark. 2004, Siiteri ve Wilson 1970). Nihai olarak son yıllarda prostatik enflamasyonun BPH ilerlemesi ve patogenezinin önemli bir parçası olarak rol oynadığı ortaya çıkmıştır. İlginç olarak enflamatuvar infiltratın doku hasarına ve daha sonra prostat büyümesini belirleyebilen kronik bir yara iyileşmesi sürecine yol açtığı hipotezi ortaya atılmıştır (De Nunzio ve ark. 2012, De Nunzio ve ark. 2011, Alcaraz ve ark. 2009). Yalnızca ABD' de yılda yaklaşık olarak 4 milyar gibi bir harcama ile 300.000'den fazla olan BPH operasyonunun gerçekleştirilmesinden dolayı yeni tedavi yöntemleri için hedef olabilecek terapötik ilaçlar ve mekanizmaları anlamaya yönelik olan ihtiyacı sert bir biçimde ortaya koymaktadır (Schauer ve ark. 2011).

BPH hücrelerine histolojik olarak bakıldığında prostatik epitel ve stromal hücrelerinin yüksek miktarda proliferasyonu ile tanımlanmakta ve ayrıca proliferasyon, yaşlanma, apoptoz gibi ciddi hücresel mekanizmalarda meydana gelen kompleks hücresel düzeydeki değişiklikler sebebiyle gerçekleşmektedir (Castro ve ark. 2004, Hallstrom ve ark. 2008, Penna ve ark. 2009, Schauer ve ark. 2011). BPH gelişiminde en önemli risk faktörleri yaşlanma, östrojenler, androjenlerin varlığı, enflamasyon süreci ve adrenerjik reseptörler olduğu rapor edilmiştir (Siejka ve ark. 2010). Bunların yanı sıra son zamanlarda gerçekleştirilen birçok çalışma ile, meydana gelen birçok kompleks değişikliklerin yara iyileşme süreci ve kronik enflamasyon süreçleri ile yakından alakalı olduğu daha anlaşılabilir hale gelmiştir. BPH hastalığının oluşum ve gelişim sürecinde kronik yara tamiri yanıtının gerçekleşme olasılığı oldukça yüksektir (Schauer ve ark. 2011). BPH'ı tedavi etmek amacıyla uygulanan medikal yöntemler finasterid gibi 5- α redüktaz inhibitörlerini ve terasozin gibi adrenerjik bloke edici ajanları içermektedir. Farmakolojik tedavi yöntemlerinin cerrahi müdahalede düşüşe sebep olmasına rağmen kullanılan bu ilaçlar uzun süreli bir etki sağlamamakla birlikte bazı hastalar için bu tedavi yöntemi uygun olmamaktadır. Ayrıca, lutein salgılatıcı hormon (LHRH) antagonistleri

ve anti-androjenler benzeri diđer hormonal tedavilerin kabul edilebilirliđi ve etkinliđi dūşüktür. Bu nedenle, BPH'nin tıbbi tedavi modalitelerinin daha da geliřtirilmesine ihtiyaç vardır (Siejka ve ark. 2010).

Çok sayıdaki etiyolojik hipotez, prostat enflamasyonunun BPH'ın başlamasına yol açtığını öne sürmektedir. Kronik prostat enflamasyonu olan hastaların, yüksek BPH geliştirme riskine sahip oldukları gösterilmiştir. BPH, yaşa bağlı olarak hormon seviyeleri ve kronik enflamasyon ile ilişkili doku homeostazındaki değişimlere yanıt veren reaktif bir fenotip olarak karakterize edilebilir. Çok sayıda yapılan çalışmada değişen sitokin/kemokin ekspresyon seviyesi ve pro-enflamatuvar sitokinlerin BPH gelişimiyle alakalı olduğu raporlanmıştır (Chughtai ve ark. 2011, Schauer ve ark. 2011). Prostat mikroçevresi tarafından üretilen pro-enflamatuvar sitokin IL-8'in, kronik enflamasyon ile hücre proliferasyonu arasında önemli bir bağlantı oluşturduğu ve aynı zamanda güvenilir bir BPH belirtecini temsil ettiği düşünölmektedir (Penna ve ark. 2009, Chughtai ve ark. 2011, Schauer ve ark. 2011). Harici bir uyarı durumunda, prostat epitel hücreleri tarafından üretilen IL-8, epitel hücrelerinde FGF2'nin indüklenmesiyle bitişik stromal hücrelerin çoğalmasını doğrudan uyarır. FGF2 molekülü esas olarak bir otokrin stromal büyüme faktörü ve küçük ölçüde bir parakrin epitelyal büyüme faktörü olarak görev almaktadır. Bu yolla, IL-8, BPH patogenezi için önemli olan geçiş bölgesinde anormal proliferasyonu indükler (Giri ve ark. 2001, Castro ve ark. 2004).

Enflamasyonda önemli bir rol oynayan bir pro-enflamatuvar sitokin olarak karakterize edilen ilk insan kemokini IL-8 molekülüdür (Kim ve ark. 2005). Reseptörleri, sinyal mekanizmaları, üç boyutlu yapısı ile tümör gelişimi, anjiyogenez, mitoz ve doku modellemesindeki fonksiyonları gibi çok sayıdaki özelliği oldukça iyi bir şekilde bilinmektedir (Hoffman ve ark. 2002, Zhang ve ark. 2012). IL-8 molekülü dış bir etken ve uyarıcı olmadığı sürece ve sağlıklı dokularda oldukça düşük seviyelerde tutulmaktadır. TNF- α ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinler, hücresel stres, viral ve bakteriyel ürünler gibi uyarıcıların varlığında ise sinyal yollarını transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede IL-8 ekspresyonunu hızlı bir şekilde aktive etmektedir (Hoffman ve ark. 2002, Kim ve ark. 2005). Bakteri ve EGF gibi uyarıcılar 5-10 kat arası IL-8 salınımına yol açarken TNF- α ve IL-1 gibi uyarıcılar 100 kattan daha fazla IL-8 artışına yol

açmaktadırlar. Bu uyarıcıların haricinde hücre içerisinde artan Ca^{+2} seviyesinin NF-kB nükleer translokasyonunu artırarak IL-8 ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur (Kim ve ark. 2005). IL-8 miktarının maksimum seviyeye ulaşması üç farklı mekanizmanın kombinasyonu ile gerçekleşir; ilk olarak gen promotorunun derepresyonu (reseptör genin inaktivasyonu), ikinci olarak NF-kB ve JNK yolağı vasıtasıyla genin transkripsiyonel aktivasyonu ve üçüncüsü ise p38 MAPK yolağı aracılığı ile mRNA stabilizasyonudur. Bu mekanizmaların gerçekleşmesinden sonra hücreler salgılanan IL-8 molekülünün miktarını hızlı bir şekilde arttırabilmekte ve doku hasarının meydana geldiği bölgelerdeki lökosit saldırısının boyutunu da kontrol altına alabilmektedir (Hoffman ve ark. 2002).

IL-8 gen promotoru bir NF-kB bağlanma bölgesi içermektedir ve bu bölge tüm hücre tiplerinde IL-8 aktivasyonu için gerekli olmaktadır. IL-1 uyarısından yaklaşık olarak 60 dakika sonra NF-kB p65 biriminin IL-8 promotoruna bağlandığı ve hemen sonrasında RNA Polimeraz-II'nin hızlı bir biçimde bölgeye yerleştiği bulunmuştur. Bu olayın meydana gelmesi de NF-kB'nin IL-8 transkripsiyonundaki önemi ve rolünü göstermektedir. Buna ek olarak IL-8 promotoru aynı zamanda C/EBP (CAAT/enhancer-bağlanma proteini) ve AP-1 (aktive edici protein-1) proteinlerinin bağlanması için de bağlanma bölgeleri içermektedir. Bu bölgeler maksimum gen ekspresyonu için gerekmele birlikte NF-kB bağlanma bölgesinden ayrı olarak indüksiyon için zorunlu değildir. AP-1 proteini ise JNK, ERK ve p38 MAPK yolakları olmak üzere üç farklı MAPK yolağı ile aktive olmaktadır ve bu yolaklar IL-8 ekspresyonuna katkı sağlamaktadır (Hoffman ve ark. 2002). Buna ilaveten bazal ve epitel tabakadaki düzensizlik de enflamatuvar aracı maddelerin salınımı ile sonuçlanmaktadır. MMP-12 aracılığıyla yıkımı gerçekleşen ECM de epitel hücrelerinin ERK1/2 yolağı aracılığıyla IL-8 üretimini yüksek seviyede uyarılmaktadır (Quement ve ark. 2008). Öte yandan bir serin proteazı olan "hepsin" molekülünün prostat epiteli tarafından yüksek miktarda eksprese edilmesi sebebiyle bazal tabakanın yüksek oranda parçalanarak prostatik enflamasyona ve kontrol edilemeyen epitel hücre büyümesine ve hiperplazisine sebep olduğu bir fare modellemesinde açıkça ortaya konmuştur (Schauer ve ark. 2011). Nihai olarak prostatik bir enflamasyonun varlığı BPH gelişiminin klinik açıdan öngörülmesine imkan vermektedir. Ancak BPH için kullanılan anti-proliferatif ve anti-enflamatuvar

terapilerin klinik yanıtlarını değerlendiren veriler oldukça kısıtlı ve düşük düzeydedir (Penna ve ark. 2009).

2.3. DNA Hasarı

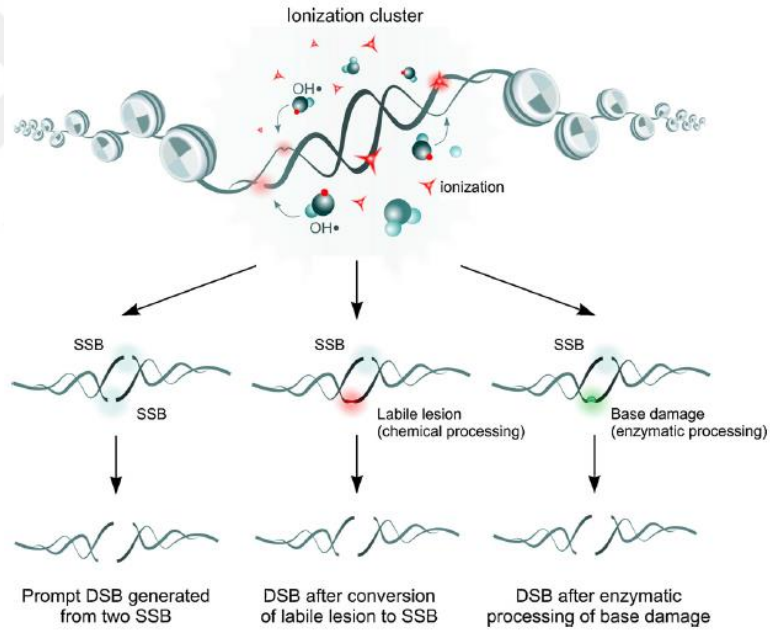
Organizmaların tüm genetik bilgilerini taşıyan DNA molekülleri, çevresel faktörler nedeniyle ya da doğal olarak zarar görür. Metabolik faaliyetler ve çevresel faktörler nedeniyle, her gün insan hücrelerinde 1 milyon hücre zarar görebilmektedir. Bu faktörler DNA'nın yapısını değiştirebilir ve dolayısıyla genetik bilginin diğer nesillere aktarımını değiştirebilir. Ekzojen veya endojen faktörlerin etkisi altında, genetik materyalin moleküler bütünlüğündeki tüm bu değişikliklere "DNA hasarı" denir (Dinant ve ark. 2008).

Bütün organizmalar (bakteri, maya, balıklar ve insanlar dahil), hücreleri DNA hasarından korumak ve genetik materyalin evrim süresi boyunca değişmeden kalmasını sağlamak için DNA onarım mekanizmaları geliştirmiştir (Valerie ve Povirk 2003). DNA onarımı; hücre ölümü, replikasyon hataları, mutasyon, genom dengesizliği, DNA hasarının sürekliliği gibi tüm süreçleri azaltmak için kullanılır. Tek zincir kırıklarından baz alkilasyonuna kadar farklı DNA hasarı türlerine göre DNA onarım mekanizmaları seçilmektedir (Lord ve Ashworth 2012, Rossetto ve ark. 2010). Birçok deneysel ve epidemiyolojik veri, DNA hasarı ile onarım mekanizmalarındaki kusurlar ile yaşlanma, kanser ve çok çeşitli genetik hastalık arasında nedensel bir ilişki olduğunu göstermektedir. DNA onarım mekanizması, genom stabilitesini ve hücrelerin hayatta kalmasını sağlamak için gerekli moleküler biyolojik mekanizmalardan biridir (Dinant ve ark. 2008, Huen ve Chen 2008).

2.3.1 DNA çift zincir kırıkları

Dış etkenler veya normal hücre içi metabolik aktiviteler sonucunda DNA omurgasında yer alan fosfodiester bağlarının kırılmasıyla çift zincir kırıkları meydana gelmektedir (Hallstrom 2007). Topoizomeraz-I ve topoizomeraz-II enzim aktivitelerinin başarısızlığından ve DNA replikasyonu sırasında meydana gelen yanlış eşleşmelere bağlı

olarak fizyolojik süreçte çift zincir kırıkları meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda oksidatif solunum ile redoks tepkimeleri sonucunda meydana gelen ROT'lerden dolayı da DNA hasarı meydana gelebilmektedir. Ek olarak enflamasyon ile enfeksiyon meydana gelen bölgelerdeki makrofaj ve nötrofiller ROT ve RNT bileşikleri oluşmasına sebep olmaktadır (Jackson ve Bartek 2009). Böylelikle meydana gelen serbest radikallerin şeker moleküllerine oksidatif saldırısı nedeniyle tek zincir kırıkları meydana gelmektedir (Jackson ve Bartek 2009, Polo ve Jackson 2011). Lezyonların oluşmasıyla birlikte bu bölgedeki hasar enzimatik ve kimyasal bir değişime uğradığında, DNA-replikasyon birimleri bu hasarla karşılaştığında ve komplementer DNA zincirlerinde birbirine yakın lokasyonlarda bir tek zincir kırığı meydana geldiği zaman DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir (Jackson ve Bartek 2009, Lieber ve ark. 2003, Mladenov ve Iliakis 2011).



Şekil 2.2. İyonize radyasyona maruz kalmaktan kaynaklanan tek zincir kırılmaları, hemen veya hasarlı şekerlerin kimyasal reaksiyonlar veya hasarlı bazların enzimatik reaksiyonları ile ÇZK'lere dönüştürülebilir (Mladenov ve Iliakis 2011).

ÇZK'lar, hücre ölümüne veya çeşitli genetik değişikliklere (heterozigotluk kaybı, delesyon, kromozom kaybı, translokasyon gibi) neden olan kritik lezyonlardır (Khanna ve Jackson 2001, Shrivastav ve ark. 2008). Çift zincir kırıkları diğer lezyonlardan daha az sıklıkta olmasına rağmen oldukça toksik lezyonlardır ve onarımı zordur (Jackson ve

Bartek 2009). Tam bir kalıp zincirinin olmaması nedeniyle onarımları zor olduğundan ve DNA molekülünün sürekliliğini bozduğundan, çift zincir kırıkları genomik bütünlüğü ve hücre yaşamını tehdit eder (Mladenov ve Iliakis 2011). Çift zincir kırıkları, DNA replikasyonu veya mitozdan önce onarılamazsa hücre ölümüne, uygun şekilde onarılmazsa genom kararsızlığına ve tümörleşmeye yol açmaktadır (Lees-Miller ve Meek 2003, Shrivastav ve ark. 2008).

2.3.2 DNA hasarı ajanları ve koşulları

Ekzojen veya endojen olarak DNA hasarı ajanları ile birlikte çift zincir kırıkları meydana gelmektedir (Czornak ve ark. 2008, O'Driscoll ve Jeggo 2006). Histon H2AX'in karboksi (C)-terminal kuyruğundaki serin 139 amino asidinin fosforilasyonu (γ H2AX^(Ser139)) çift zincir kırıklarının varlığının spesifik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Ohnishi ve ark. 2009). İyonize radyasyon, enerji yoğunlaşması vasıtasıyla doğrudan veya dolaylı olarak ROT oluşumu yoluyla çift zincir kırıklarının meydana gelmesine neden olmaktadır (Lieber ve ark. 2003, O'Driscoll ve Jeggo 2006, Shrivastav ve ark. 2008). γ H2AX^(Ser139) odakları sadece iyonize radyasyona maruz kalınması nedeniyle değil hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin veya irinotekan, doksorubisin ve etoposid gibi topoizomeraz I ve II'nin aracılık ettiği DNA'nın ligasyonunu engelleyen ajanlara maruz kalınca da meydana gelmektedir. Tek işlevli alkilleyici maddelerle (N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidin ve adoksiloksin gibi) üretilen DNA hasarı da çift zincir kırıklarına ve γ H2AX^(Ser139) odak oluşumuna yol açmaktadırlar (Ohnishi ve ark. 2009).

Tek zincir kırıkları genel olarak baz-eksizyonu tamir enzimleri veya DNA replikasyon çatalıyla etkileşime girerek potansiyel bir şekilde çift zincir kırığına dönüşme yönelimi gösterirler (Thompson ve Limoli 2000). Tek zincir kırıkları serbest radikallerle birlikte doğrudan veya daha yaygın bir şekilde apürinik bölgelerin veya sitozin deaminasyonunun ya da diğer hasarlı bazların tamiri sonucunda meydana gelmektedir. Örnek olarak öncelikli işlevi tek zincir kırığı oluşturmak olan 4-nitroquinoline-N-oxide ve hidrojen peroksit (H₂O₂) de çift zincir kırığı meydana getirmektedir (Lieber ve ark. 2003, Ohnishi ve ark. 2009). Tek zincir kırıkları, çift zincir kırıklarından farklı bir şekilde insan hücrelerinde yaygın olarak bulunan endojen DNA lezyonlarıdır ve normal bir hücrede

%1 oranında oluşan DNA tek zincir kırığının yaklaşık olarak 50 endojen çift zincir kırığına dönüştürüldüğü rapor edilmiştir (Ohnishi ve ark. 2009).

Mayoz bölünme sürecinde homolog kromozomlar arasında rekombinasyon meydana gelebilmesi için senesens, apoptotik DNA fragmentasyonu, hematopoiteik V(D)J rekombinasyonu gibi süreçlerde programlı olarak DNA çift zincir kırıkları meydana getirilir (Thompson ve Limoli 2000, Ohnishi ve ark. 2009). Buna ek olarak telomer uzunluğunun önemli derecede kısalmış da çift zincir kırıklarına sebep olmaktadır. Ayrıca S/ G2 fazı hücrelerinde DNA replikasyonu sırasında ÇZK'larına ya da duran replikasyon çatalına cevap olarak γ H2AX^(Ser139) fosforilasyonu meydana gelebilir. Bundan dolayı normal metabolik koşullar altında oluşan spontan DNA hasarı, fizyolojik koşullar sırasında endojen çift zincir kırıklarının oluşum mekanizmasına yüksek bir şekilde katkı sağlamaktadır. Hipoksi, ısı şoku ve hiperozmotik stres gibi stresler de γ H2AX^(Ser139) fosforilasyonunu artırmaktadır ancak bu şekilde meydana gelen streslerin nasıl bir mekanizmayla ÇZK oluşturduğu net olarak bilinmemektedir. (Ohnishi ve ark. 2009). Endojen veya ekzojen çift zincirli kırıklar arasındaki fark, kırıkları birleştirmeden önce hangi faktör veya faktörlerin gerekli olduğunu etkiler; yani çift zincir kırılmasının nasıl ve hangi durumda meydana geldiği tamir için kullanılacak mekanizmayı belirler (O'Driscoll ve Jeggo 2006).

2.3.3. DNA hasarı ve kronik enflamasyonda reaktif oksijen türü oluşumu

Oksidatif stresin sebep olduğu hasar genellikle kronik enflamasyondan kaynaklanır ve genetik olarak veya sonradan edinilmiş bakteriyel, parazitik, viral enfeksiyonlar veya kimyasal indüksiyonlar nedeni ile oluşabilirler (Hussain ve ark. 2003, Loft ve Poulsen 1996). Kronik enflamasyon süresince, uzun süre boyunca yüksek ROT seviyeleri DNA hasarını tetiklemektedir. Meydana gelen bu hasar, kanserle ilgili genlerde bulunan nokta mutasyonları, apoptoz, DNA onarımı ve hücre siklusunda görev alan temel hücresel proteinlerin modifikasyonları biçiminde meydana gelebilmektedir. Aynı zamanda bu mutasyonların ve hasarların proto-onkogenler ya da tümör baskılayıcı genlerde oluşmasında kanseri tetikleyebilmektedir (Khandrika ve ark. 2009).

Kanserleşme; başlama, gelişim, ilerleme şeklinde tanımlanmış üç ana basamaktan oluşan bir süreçtir. Oksidatif stres de bu üç ana basamakla etkileşmektedir. ROT, kanserleşmenin başlangıç aşamasında, DNA üzerinde birtakım değişiklikler yaratarak, örnek olarak gen mutasyonları ve yapısal değişikliklerle DNA hasarı meydana getirebilmektedir. Gelişim basamağındaysa, hücre-hücre iletişiminin engellenmesi, anormal olan gen ekspresyonları ve ikincil mesajcı sistemlerin modifikasyonuna katkıda bulunmaktadır. Meydana gelen bu değişimlerin sonucu olarak, başlangıçta hücre proliferasyonunda yükselme ya da apoptoz seviyesinde azalmaya neden olmaktadır. Nihai olarak oksidatif stres, kanserin ilerleme aşamasında meydana getirdiği yüksek DNA hasarı oluşumu ile genomik kararsızlığı arttırarak kanserleşme sürecine katkı sağlar (Guyton ve Kensler 1993).

Son zamanlarda, ROT'ların kronik enflamasyon ile kanser arasındaki temel bağlantıyı oluşturduğunu gösteren çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Tümör promötörlerinin önemli özelliği, enflamatuvar hücrelerinin toplanması ile ROT üretimini uyarma kabiliyetleridir. Yapılan birtakım ön denemelerde, ROT'ların tümörün başlamasındaki rolü hakkındaki varsayım, ROT'ların birer DNA hasarı indükleyicisi oldukları ve mutasyon miktarını arttırarak onkojenik birer dönüşüme sebep olduğu düşüncesi yönündeydi. Fakat yeni yapılan çalışmalarda, genomik kararsızlığın indüklenmesinin yanı sıra, ROT'ların belirli spesifik sinyal yollarını da aktive edebildiği, böylelikle hücre proliferasyonunu, anjiyogenezisi ve metastazı regüle ederek tümör gelişimine yol açtığı raporlanmıştır (Finkel 2003, Reuter ve ark. 2010).

ROT'un kanserojen özelliği, hücre proliferasyonu ile hücre migrasyonunu artırma yeteneğinden kaynaklandığı yapılan birçok çalışmayla raporlanmıştır. ROT, DNA hasarı meydana getirerek tümör gelişimini başlatan ve aynı zamanda ilerleten genetik hasarlara neden olmaktadır. Aynı zamanda ROT'lar apoptoz ve senesens olaylarına sebep olduğu için antitümörijenik özelliği de göstermektedir. Ancak ROT'ların hangi tarafta rol oynayacağını belirlemek hücre tipi ile hücre dokusuna aynı zamanda ROT'ların oluştuğu yere ve miktarına bağlıdır (Reuter ve ark. 2010).

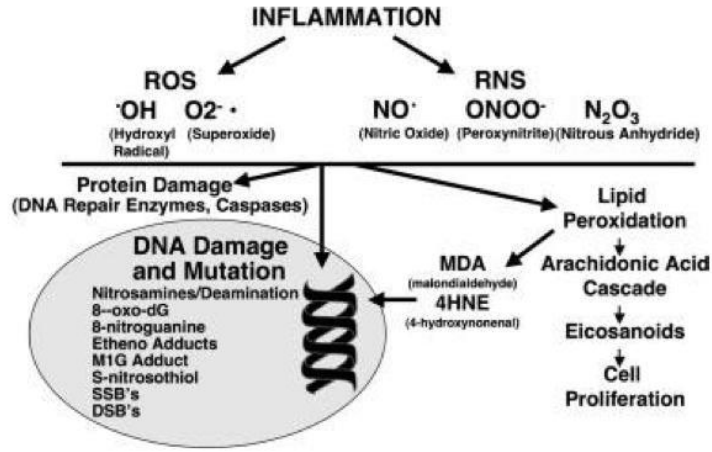
ROT'ların oluşması durumunda doğru biçimde verilecek hücresel yanıt, daha çok oksidatif hasar oluşumunun bloklanması ve hücre canlılığının devam edebilmesi

bakımından ciddi bir önem taşımaktadır. Ancak, aşırı şekilde oluşan hücrel hasar karşısında etraftaki hücrelerin canlılığını devam ettirmesi açısından bu hücrenin ortadan kaldırılması çok hücreli bir organizma için avantaj sağlamaktadır. Bu sebeple, ROT oksidatif stresin şiddetine bağımlı olarak bir hücrenin apoptotik veya nekrotik şekilde ölümünü tetikleyebilmektedir (Finkel 2003).

Büyüme faktörleri ile sitokinler, kendi sinyal yolağının aktivasyonu ile birlikte ikincil mesajcılar olarak ROT'ları meydana getirirler ve bunu o alanda bulunan NADPH oksidazları aktifleştirerek yaparlar (Ushio-Fukai 2009). Aynı zamanda, ROT'lar başta TNF α sinyali yolağı olmak üzere çok sayıda sinyal iletim yolağında rol oynarlar (Liu ve ark. 2008).

ROT'lar aynı zamanda apoptoz ve nekroz ile gerçekleşen hücre ölümünde de görev almaktadır. Genellikle, düşük düzeylerdeki oksidatif stres apoptozu indüklerken, yüksek miktarlardaki ROT mitokondrinin depolarizasyonuna bağımlı olarak ATP üretimini düşürerek ATP-bağımlı kaspaz aktivasyonunun bloklanması yoluyla nekrotik hücre ölümüne sebep olurlar (Takeda ve ark. 1999, Teramoto ve ark. 1999, Saito ve ark. 2006). TNF α tarafından indüklenmiş ROT'ların birtakım moleküler hedefleri tanımlanmıştır. Tanımlanan bu moleküller, oksidatif stres olması durumunda artan p53 aktivasyonu yolağı, PI3K yolağıyla p85'tir (Liu ve ark. 2008). Fakat tanımlanmış olan yolların TNF α - ROT hücre ölümü yolları üzerinde önemli bir etken olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Morgan ve ark. 2008).

ROT ve RNT moleküllerinin anti-tümörijenik olarak etki gösterdiği durumlar birçok çalışmayla ortaya koyulmuştur. ROT ve RNT belli başlı hücrel koşullar altında anti-tümörijenik bir sonuç olarak meydana gelen epitel hücre yaşlanmasına sebep olur. p38 yolağı üzerinden tümörleşme ve hücre proliferasyonunu düşürür, apoptoz sinyalini regüle eden kinazı (ASK-1) ise aktive ederek apoptozu artırır (Schetter ve ark. 2010).



Şekil 2.3. Kronik enflamasyonda gerçekleşen ROT ile RNT oluşumunun şeması. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri, kanserle bağlantılı genlerde DNA hasarlarına, DNA onarımına, apoptoz ile birlikte hücre siklusunda yer alan hayati derecedeki hücresel proteinlerde değişikliklere neden olmaktadır (Hussain ve Harris 2007).

2.3.4. DNA hasarı meydana gelmesi durumunda hücresel yanıt mekanizmaları

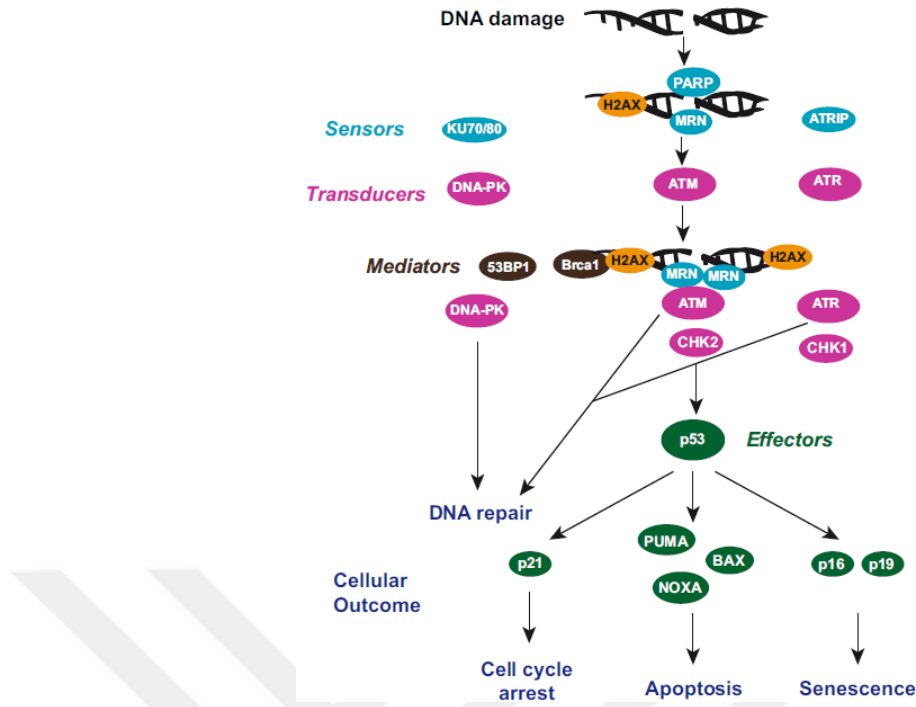
DNA hasarı meydana gelmesi durumunda oluşan hücresel yanıt, kanser biyolojisi alanındaki en önemli alanlardan bir tanesidir (Kastan ve Bartek 2004). Hücreler ÇZK'larını genomun stabilitesi üzerinde en az etki ile onarılmasını sağlamak için kompleks bir DNA hasar yanıtı oluşturur (Ohnishi ve ark. 2009). DNA hasarına karşı yanıt yolları, DNA hasarı olması durumunda hücreleri uyarıp, uygun yanıtlarla organize eden sinyal iletimi ile DNA hasarı onarım mekanizmalarını içermektedir. ÇZK'lar tarafından aktif hale getirilen sinyal iletimi prosesi ATM, ATR gibi fosfotidilizoinitol-3 kinazla alakalı olan kinazlara (PIKKs) dayanır (O'Driscoll ve Jeggo 2006). ÇZK tamir yolları esas olarak homolog olmayan uç birleştirmeyi (NHEJ) ve homolog rekombinasyonu (HR) içermektedir (Jackson ve Bartek 2009, O'Driscoll ve Jeggo 2006). Bu iki yolak ise ATM ve ATR bağımlı şekilde gerçekleşmektedir (O'Driscoll ve Jeggo 2006).

DNA çift zinciri kırığı tamirinde yer alan HR yolağının temel işlevi replikasyon çatallında meydana gelen kırıkları onarmak, NHEJ yolağının ise DNA'da rastgele şekilde oluşmuş çift zincir kırıklarını tamir etmektedir. HR tamir mekanizması asıl işlevi kardeş kromatidlerin meydana geldiği geç S ve G2 fazında gerçekleşmektedir (Valerie ve Povirk

2003, Jeggo ve Lobrich 2006). Yüksek sayıda replikasyon döngüsü sırasında replikasyon çatalının salınımı gerçekleştiğinden HR ile ilişkili birçok protein gereklidir. Diğer taraftan, NHEJ mekanizması ise hücre döngüsü süresince bir rol oynamakta ve G1 fazı ve erken S fazında meydana kırıkları onarmada etkindir (Langerak ve Russel 2011, Shrivastav ve ark. 2008, Valerie ve Povirk 2003). DNA hasarı meydana gelmiş hücrenin hangi tamir mekanizmasını seçeceği hücre siklusunun olduğu faz, proliferasyon hızı, tamir kalıplarının uygunluğu gibi etkenler tarafından belirlenmektedir (Shrivastav ve ark. 2008).

Sinyal iletiminin mekanizması

Sinyal iletimi yolağı; hasarı algılama ile sinyali ileten proteinler, hücre siklusunun durdurulması ve apoptoz gibi belirli cevap oluşturan efektör proteinlerini kapsamaktadır. Hasar algılama proteinleri doğrudan veya dolaylı bir şekilde DNA hasarını algılar ve genetik bir kararsızlığın oluştuğunu işaret ederek biyokimyasal kontrol noktası kaskadını başlatırlar. Sinyal iletimini yapan proteinler genel olarak hedef proteinlerini fosforilleyerek sensörlerden iletilen hasar sinyalini çoğaltmakla görevlidirler. Efektör proteinlerse esas olarak sinyal iletimini gerçekleştiren kinazların hedef proteinleri olarak işlev görmektedir. DNA hasarı oluşması durumunda efektör proteinlerdeki değişiklikler ile hücre siklusunun durdurulması, DNA tamiri, senesens, apoptoz gibi hücresel yanıtlara sebep olarak genomik bütünlük ve kararlılığını korumaktadır (Hallstrom 2007, O'Driscoll ve Jeggo 2006). Bahsedilen bu üç gruba ek olarak DNA hasarı aracılığı diye bilinen diğer bir protein grubu yer almaktadır. Aracı olarak görev alan bu proteinler transdüser ve sensörlerin arasında yer almakta ve meydana gelen hasarın sinyalini arttırmanın yanında hasarın tanınmasında modülatör proteinler olarak görev almaktadırlar (Blanpain ve ark. 2011, Hallstrom, 2007).



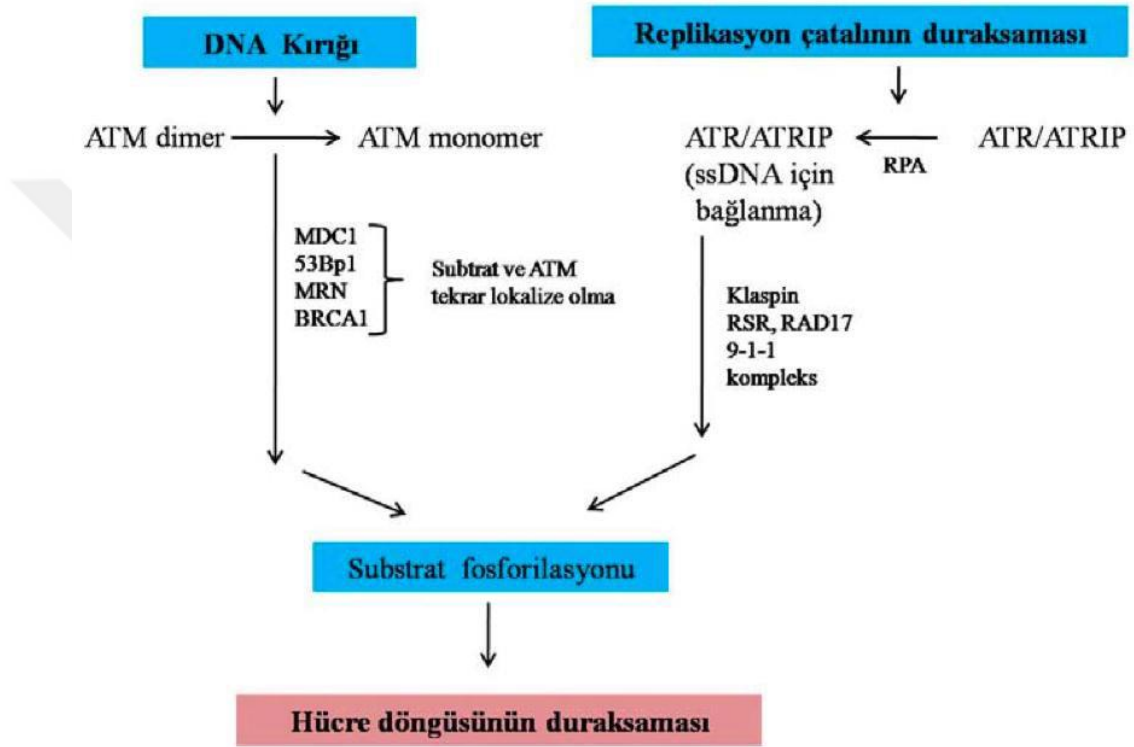
Şekil 2.4. Meydana gelen DNA hasarına karşı yanıt oluşturan proteinlerin şematik görüntüsü (Blanpain ve ark. 2011)

DNA Hasarı Sonucu ATM Aktivasyonu ve Yanıt Mekanizması

DNA hasarının sinyalinde görev alan memeli PIKK kinazları ATR, ATX/SMG-1, ATM ve DNA-PKcs'dir (Ohnishi ve ark. 2009, Valerie ve Povirk 2003). Oldukça büyük (350-450kDa) ve benzer işlevlere sahip olan bu proteinler glutamin amino asidinden sonra serin ve treonin artıklarından birçok substratı fosforilleyerek işlev göstermektedir. Geniş çaplı yapılan proteomik çalışmalarla DNA hasarına karşı oluşan yanıt mekanizması için 700'den fazla proteinin fosforillendiği raporlanmıştır (Czornak ve ark. 2008, Huen ve Chen 2008).

DNA çift zincir kırıklarına karşı verilen yanıtta ATM ve DNA PKcs baskın bir role sahipken, ATR sinyali ise iyonize radyasyon sebebiyle oluşmuş lezyonların replikasyonu bloke etmesiyle veya çift zincir kırığında meydana gelen yüksek derecede geri dönüşü olmayan bir hasar oluştuğunda nükleaz kesimi yapılmasıyla oluşan tek zincir kırıklarında aktif olarak rol oynamaktadır (Hallstrom 2007, Huen ve Chen 2008, Jeggo ve Lobrich 2006). Nükleaz kesimiyle oluşan tek zincir bölgelerini RPA sarmakta ve ATR ile ortağı

olan ATRIP'lerin bir araya gelmesini sağlamaktadır (O'Driscoll ve Jeggo 2006). ATM hücre siklusunun durdurulması, DNA tamiri ve apoptoza sebep olan sinyal kaskadlarını başlatarak çift zincir kırıklarına yanıt vermektedir (Hallstrom 2007). Aynı zamanda ATM; CHK1, CHK2, NBS1, p53, FANCD2 gibi hücre siklusunun kontrol noktalarında görevli çok sayıda proteini fosforile ederek işlev gösterir (Hallstrom 2007, Kim ve ark. 2005, Tanaka ve ark. 2006).



Şekil 2.5. Meydana gelen DNA Hasarı ile replikasyon çatalına karşı oluşan hücresel yanıtların genel şematik görüntüsü (Kastan ve Bartek 2004).

Hasar meydana gelmemiş olan hücrelerde ATM proteini ATM dimeri olarak inaktif şekilde hücre içerisinde yer almaktadır (Czornak ve ark. 2008, Hallstrom 2007). İnaktif durumda bulunan ATM proteinin kinaz bölgesi bir diğer ATM molekülünün FAT (FRAP/ ATM/ TRRAP) bölgesi tarafından bloke edilmektedir. Hücrenin iyonize radyasyona maruz kalmasıyla FAT bölgesinin içinde lokalize olmuş ser1981'den otoposforilasyonu uyarır ve inaktif formda bulunan ATM dimerlerini birbirinden ayırarak enzimatik olarak aktif bir monomere dönüştürür ve böylece ATM aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Hallstrom 2007). ATM'nin aktivasyonu ise iyonize radyasyondan sonra çok hızlı bir

şekilde olmaktadır. ATM'nin aktive edilmesi mekanizması net olarak bilinmemekle beraber fonksiyonel MRN kompleksinin ATM'nin aktivasyonunda rol oynadığı savunulmaktadır (Hallstrom 2007).

Oluşan DNA hasarına karşı etkin bir yanıt ATM aktivasyonu ile birlikte ATM proteininin ihtiyaç duyduğu substratlarının bulunduğu bölgeye yönelmesidir. Lee ve Paul saflaştırılmış ATM dimeri için MRN kompleksinin çift zincir kırıkları için sensör görevi gördüğünü ve ATM'yi kırık olan bölgelere yerleştirdiğini in vitro yöntemlerle ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda Falck ve arkadaşları aktif ATM'nin çift zincir kırığı bölgelerine yerleşebilmesi için NBS1 proteininin C-terminal ucundan ATM'ye bağlanması gerektiğini raporlamışlardır (Hallstrom 2007). ATM'nin kırık bölgelerinde kalma süresini arttıran MRN kompleksi bu şekilde ATM'nin substratlarını fosforillemesini daha kolay hale getirmektedir (Jeggo ve Lobrich 2006).

Aktif hale gelen ATM proteini hücre siklusunda, apoptozda ve tamirde görev alan çok sayıdaki substratı fosforilleyerek DNA hasarına karşı yanıt oluşturmaktadır. MRN kompleksi bileşenlerinden histon H2AX ile RAD17 gibi çift zincir kırıklarının tanınmasıyla alakalı proteinler ATM ile fosforilasyona uğrayan hedef proteinlerdir. CHK1 ile CHK2 kinazlarının ATM proteini tarafından fosforilasyona uğraması bu kinazların DNA tamiri ve hücre siklusu yollarında yer almalarına sebep olmaktadır (Tanaka ve ark. 2006). Aktif hale gelen ATM hücre siklusunun durmasını üç önemli noktada gerçekleştirmektedir. G1-S fazında meydana gelen duraklama replikasyonun gerçekleşmesinden önce DNA hasarının tamir edilmesi için geniş bir zaman tanımaktadır. ATM bağımlı G1-S kontrol noktası inhibisyonu TP53 ve CHK2'ye bağlı olup aynı zamanda siklin bağımlı bir kinaz inhibitörü olan p21'in aktif hale gelmesine ihtiyaç duymaktadır. Bunun yanı sıra S ile G2-M kontrol noktaları da ATM ile denetlenmektedir (O'Driscoll ve Jeggo 2006). H2AX fosforilasyonunu gerçekleştiren DNA bağımlı protein kinazlar veya ATM proteinleri ATR ve ATM bağımlı sinyal yollarında önem arz etmektedir. γ -H2AX odaklarının oluşumu MRN kompleksi, BRCA1 gibi aracı olarak görev alan proteinlerin kırık bölgesinde kalması için önemlidir (Tanaka ve ark. 2006).

H2AX Fosforilasyonu

Oluşan DNA hasarının tamir edilmesi, kromatin yapısı içinde meydana gelmelidir. Kromatin yapısının en temel yapısı ise DNA'yı etrafından sarmalayan çekirdek histonlarından iki kopya bulunduran nükleozom yapısıdır. Nükleozom yapısı ise H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere 4 çekirdek histonundan meydana gelmektedir. Bu proteinlerin her biri, nükleozom çekirdek yapısının merkezinde bir histon katlama alanı içerir. (Foster ve Downs 2005).

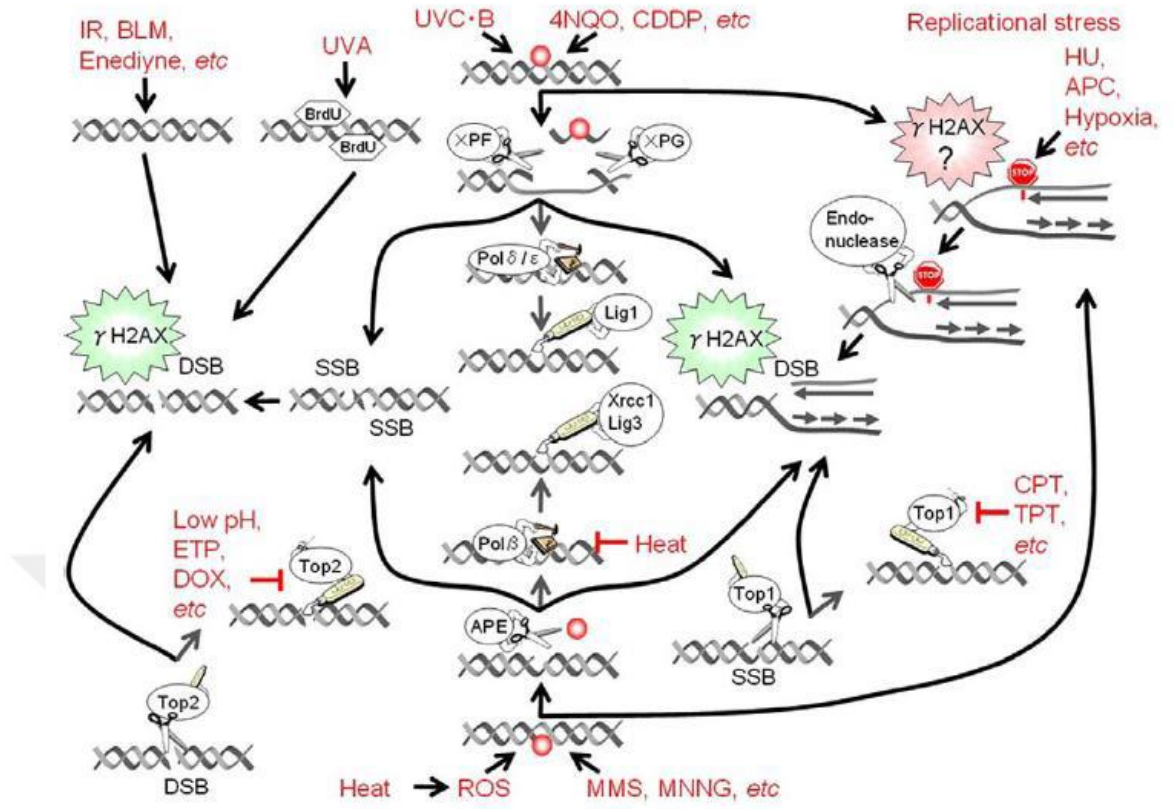
DNA replikasyonu ve onarımı gibi olayları daha kolay hale getirebilmek için kromatin yapısı ve kompozisyonunun değişime uğradığı birçok mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalar histon proteinlerinin ATP'ye bağımlı kromatinin baştan düzenlenmesi, histon varyantlarının kromatin iç ve dış tarafına karşılıklı olarak değişimi ve kovalent modifikasyonunu içerir. Histonlar translasyon sonrası değişikliklerle güçlü bir şekilde değiştirilir ve bilinen modifikasyonlar lizin ve arjinin amino asitlerinin metilasyonu, lizin amino asitlerinin asetilasyonu ve ubikitinasyonu ve serin ile treoninin amino asit alanlarının fosforilasyonunu kapsamaktadır. Meydana gelen bu modifikasyonlar sayesinde histonların yükleri değişerek DNA ile yoğunlaşmasını etkiler veya kromatin bağlantılı proteinler için bağlanma yüzeyi oluştururlar (Foster ve Downs 2005).

Histon H2A'nın bir varyantı H2AX, kromatin yapısının temel bileşenlerindedir ve yüksek yapılı canlılarda total hücresel H2A'nın yaklaşık %2 si ile %25'i arasında görülmektedir (Hallstrom 2007). Tüm histon çekirdekleri NH₂- ile COOH- terminal motifleri içermekle birlikte bu bölgelerinden transkripsiyon sonrası modifikasyonlara uğrarlar. Histon H2AX'in C-terminal kuyruğunda yer alan serin 139 amino asidinden fosforilasyonu memeli organizması hücrelerinde çift zincir kırıklarına karşın meydana getirilen en erken yanıtlar arasında yer almaktadır (Mukherjee ve ark. 2006). İyonize radyasyon dolaylı bir şekilde reaktif oksijen türleriyle ya da doğrudan enerji yoğunlaşmasından ötürü çift zincir kırıkları oluştururlar (Lieber ve ark. 2003, O'Driscoll ve Jeggo 2006, Shrivastav ve ark. 2008). γ radyasyonu ile meydana gelen DNA hasarından sonra hızlı bir şekilde fosforilasyon gerçekleşmekte ve fosforilasyona uğrayan bu H2AX moleküllerine pH2AX^(Ser139) denmektedir (Bristow ve ark. 2007, Foster ve

Downs 2005, Huang ve ark. 2005). Meydana gelen her bir çift zincir kırığından dolayı yaklaşık olarak 2000 civarında pH2AX^(Ser139) fosforillenmekte ve bu fosforilasyonla kromatin yapısının yaklaşık %0.03'lük bir kısmının modifikasyonu meydana gelerek tamir edilme sinyallerinin artmasını sağlamaktadır (Rossetto ve ark. 2010).

pH2AX^(Ser139) odakları yalnızca iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra değil serbest radikal üretimiyle etki eden bleomisin ve tirapazamin, topoizomeraz-II aracılı DNA ligasyonunu bloke eden doksorubisin ve etoposid gibi klasik çift zincir kırıklarını indükleyen ajanlara maruz kalındığında da ortaya çıkmaktadır. Düşük düzeydeki pH'da topoizomeraz-II aracılı DNA ligasyonunu bloke ederek pH2AX^(Ser139) odakları meydana getirmektedir. N-metil-N-nitro-N-nitrozoguanidin, adozelesin benzeri mono-fonksiyonel alkilleyici ajanlar ile üretilen DNA hasarları da çift zincir kırıklarına ve pH2AX^(Ser139) odak oluşumuna sebep olmaktadır. Bunlar haricinde yüksek düzeyde çift zincir kırığı meydana getiren kalikeamisin- γ 1 antibiyotiği etkili bir şekilde pH2AX^(Ser139) odak oluşumuna sebep olmaktadır (Ohnishi ve ark. 2009).

Hidroksiüre, adozelesin, UVC, UVB, afidikolin vasıtasıyla uyarılan replikasyon stresine H2AX fosforilasyonu ile yanıt verilmektedir. Bu şartlar altında pH2AX^(Ser139) odaklarının oluşumu yalnızca S fazı hücrelerinde meydana gelmektedir. DNA polimeraz pirimidin dimerleri, alkil eklentileri ve çapraz bağlar benzeri replikasyonu engelleyen bir durumla karşılaştığı zaman ilgili bölgede durur (Ohnishi ve ark. 2009, Shrivastav ve ark. 2008). Bu durumda spesifik bir endonükleaz tarafından tanınan Y şeklindeki DNA yapısının oluşumuyla sonuçlanır ve daha sonra endonükleaz şablon zincirde bir çentik oluşturmak suretiyle çift zincir kırığı oluşumuna yol açar (Ohnishi ve ark. 2009).



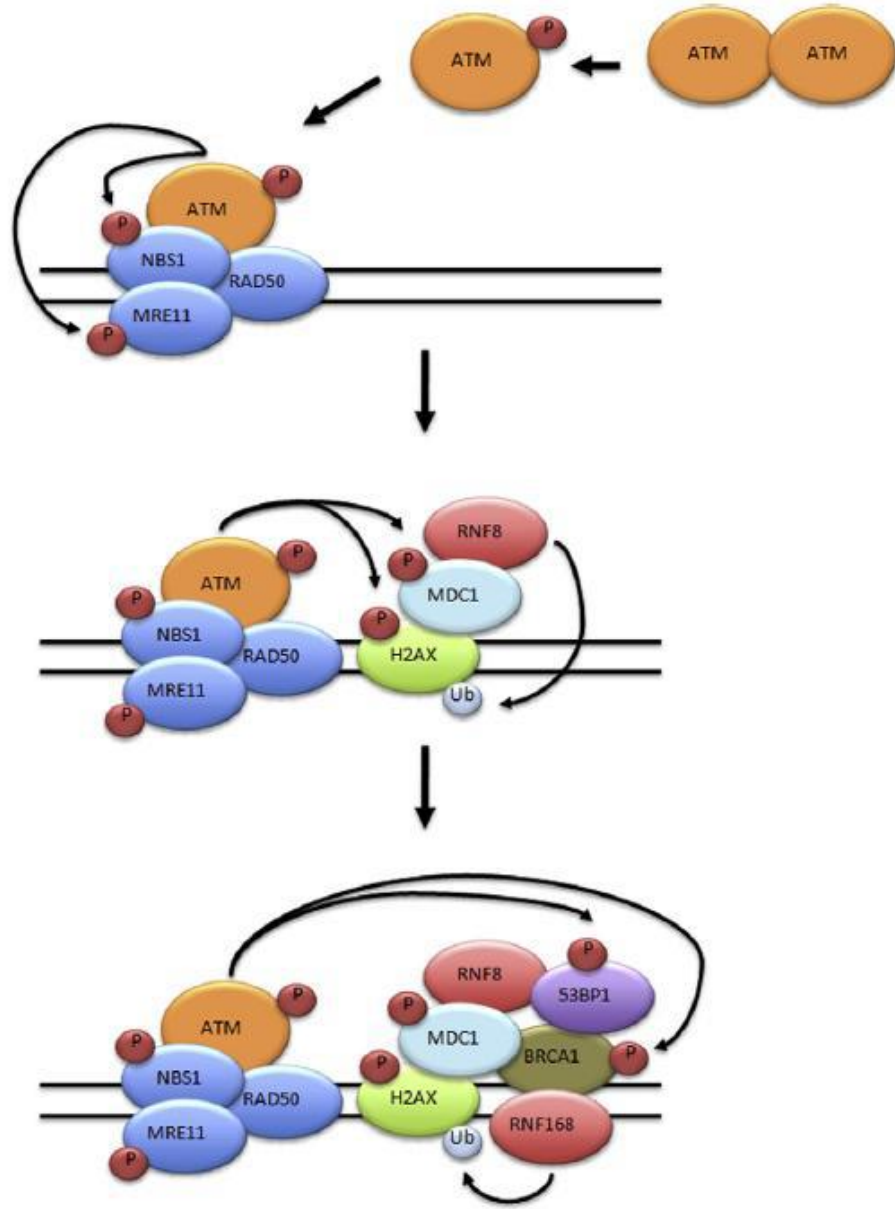
Şekil 2.6. Farklı Ajanların DNA kırıkları meydana getirmesiyle oluşan $\gamma\text{H2AX}^{\text{(Ser139)}}$ fosforilasyonu (Takahashi ve Ohnishi 2005).

İyonize radyasyon veya genotoksik ajanlarla DNA çift zincir kırıklarının indüklenmesiyle kromatinde meydana gelen $\gamma\text{H2AX}^{\text{(Ser139)}}$ varlığı özgül antikorlar vasıtasıyla ayrı ayrı nükleer odaklar şeklinde gözlemlenebilmektedir (Huang ve ark. 2005, Jeggo ve Lobrich 2006). Gözlenen her bir odak ise tek bir DNA çift zincir kırığını temsil ettiğinden dolayı odakların sıklığı çift zincir kırığının miktarı ya da başka bir deyişle oluşan DNA hasarı miktarıyla doğru orantılıdır (Huang ve ark. 2005). Öte yandan $\gamma\text{H2AX}^{\text{(Ser139)}}$ odaklarının kaybolma hızı DNA hasarının onarım hızı ile ilişkilidir (Jeggo ve Lobrich 2006).

H2AX'in fosforilasyonu, DNA hasarının kontrol noktası aktivasyonu için anahtar bir rol oynamakta ve defosforilasyonuysa hücre döngüsünün devam etmesini sağlamak için kontrol noktası sinyalini azaltması bakımından önem arz etmektedir (Shrivastav ve ark. 2008). DNA hasarına yanıt olarak bu motifin fosforilasyonundan sorumlu PIKK ailesi üyelerinin ATM, ATR ve DNA-PK'ın oldukları raporlanmıştır (Foster and Downs 2005, Lobrich ve ark. 2010). Genom kararlılığının sağlanmasında H2AX'in kesin işlevi net bir

şekilde ortaya koyulamamıştır. Fakat γ H2AX^(Ser139)'in kırılmış DNA uçlarını tanıyıp bağlanarak ve DNA tamirini uyarıcı hasar yanıtı proteinleri için bir yerleşme alanı sağladığı öngörülmektedir (Hallstrom 2007).

Bütün bu bilgiler dahilinde DNA hasarı sonucu nükleer odak oluşumu için bir model meydana getirildiğinde, öncelikle DNA çift zincir kırıkları MRN kompleksi ile tanınır ve bu proteinlerin kırık bölgelerine yerleşmesi ATM, H2AX ve MDC1'den bağımsız şekilde gerçekleşmektedir. NBS1 molekülüne aktif halde olan ATM'nin kırık bölgelerine yerleşmesini sağlar. Kırık bölgesinde histon H2AX, NBS1'le aralarında köprü olarak rol oynayan MDC1'e bağlandıktan sonra saniyeler içinde ATM tarafından fosforile edilir. MDC1 proteini ise meydana gelen DNA hasarına yanıt oluşturacak diğer proteinlerin birikimini sağlamak amacıyla mediyatör protein olarak işlev göstermektedir. MRN/MDC1 ve ATM arasındaki etkileşime ilaveten ATM moleküllerinin kırık meydana gelen bölgeye yerleşimini artırır ve böylelikle daha yüksek bir H2AX fosforilasyonunu indükleyerek ilk oluşan çift zincir kırığının yayılmasını önleyip aynı zamanda γ H2AX^(Ser139) odak oluşumlarını daha görünür hale getirmektedir (Derheimer ve Kastan 2010, Hallstrom 2007).



Şekil 2.7. Oluşan DNA çift zinciri kırığı sonucunda nükleer odak oluşumlarının şeması (Derheimer ve Kastan 2010).

2.4. Bor

2.4.1. Bor bazlı bileşiklerin genel özellikleri

Bor atomu, periyodik cetvelde “B” simgesiyle gösterilmekte olup, 5 atom numarasına, 10,81 atom ağırlığına sahip olan ve yarı iletken ve yarı metal bir özellik ihtiva eden elementtir. Borun doğada serbest halde bulunmamasıyla birlikte yaklaşık olarak 230 türevi olduğu bilinmektedir (Helvacı 2010). Bor okyanuslarda, madenlerde, kayalarda ve belli başlı topraklarda borat formunda bulunup aynı zamanda doğada daha düşük konsantrasyonlarda bulunan doğal bir elementtir. Borun çevreye yayılması temel olarak kayalardan aşınma, deniz sularından ve volkanik aktivitelerin sonucu buharlaşması şeklindedir (Butterwick ve ark. 1989). Bor bileşik ve mineralleri çeşitli endüstri alanlarında farklı ürünler ve malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (Helvacı 2010).

Borik Asit

Boratin önemli bir formu, insanlarda ve hayvanlarda en yaygın formu olan borik asittir. Borik asitin başlıca özellikleri renksiz, kokusuz ve ayrıca suda rahatlıkla çözünebilmesidir. Kristal bir yapıya sahiptir ve beyaz granüler toz formunda bir Lewis asididir. Borik asit özellikle diğer oksijenli bileşiklerin öncüsü olduğundan oldukça dikkat çekmektedir (Soriano-Ursua ve ark. 2014). BA'nın, özellikle enzim inhibisyonu yoluyla belirli kanser hücre tiplerinin proliferasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Scorei ve Radu 2010, Petasis 2007). Bununla birlikte BA, apoptoz, reseptör bağlanması ve mRNA birleştirme (splicing) gibi farklı hücresel hedeflere sahip olduğu da söz konusudur. Ek olarak borik asidin NAD ve serindeki hidroksil gruplarına bağlanma kapasitesi, dehidrogenaz ve serin proteaz aktivitelerinin inhibisyon etkinliğini belirlemektedir (Scorei 2013, Scorei ve Popa 2013).

2.4.2. Bor ve türevi maddelerin insan sağlığı üzerine etkileri

Bor yoğunluğunun yüksek olduğu yerlerde yaşayan kişiler bor ve bileşiklerine çevre yoluyla (deri yolu veya solunum gibi), yiyecek ve içecekler ile maruz kalmaktadır (Devirian ve ark. 2003, Nielsen 2008). Epidemiyolojik verilerin eksik olmasına rağmen DSO (Dünya Sağlık Örgütü) borun insan sağlığı için fizyolojik olarak yarar sağlayabileceğini raporlamıştır. İnsan üzerindeki deneysel çalışmalar sonucunda, borun yaşamsal hayatta metabolizmaya ve yarar sağlayıcı bakır, magnezyum, kalsiyum, glukoz, azot, trigliserid, östrojen ve reaktif oksijen süreçleri gibi önemli ölçüde yaşamsal faaliyetlere katkıda bulunduğunu görülmüştür. Çok sayıda metabolik aktiviteyi etkilediği bilinen bor 1980 yılında ise iz elementi olarak tanımlanmıştır (WHO 1998).

Deney hayvanlarında ve az sayıda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise bor biyoaktif bir mineral olarak insan ve hayvanlara birçok yararlı etkisi bulunduğu deneylerle gösterilmiştir (Nielsen ve Meacham 2011). Özellikle son zamanlarda bazı kanser tiplerinde koruyucu ve tedavi edici etkisinden dolayı epidemiyolojik olarak olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar hayvansal deneyler ve laboratuvar çalışmalarında da görülmüştür (Gallardo-Williams ve ark. 2003, Barranco ve Eckhert 2006, Barranco ve ark. 2007, Carper ve ark. 2007, Korkmaz ve ark. 2007, Henderson ve ark. 2009).

Bor ve türevleri solunum ve sindirim sistemi tarafından yüzde yüz oranında emilmektedir. Borik asit $B(OH)_3$ ve küçük oranda borat ($B(OH)_4^-$) anyonlarına dönüşen bor ve borun türevleri kanda çok stabildir ve dokularda homeostatik mekanizma ile belirli bir seviyede kalır ve bu homeostaz öncelikle böbrekler vasıtasıyla düzenlenmektedir (Korkmaz ve ark. 2007, Bakırdere ve ark. 2010, Nielsen ve ark. 2011). Absorbe edilen bor bileşiklerinin 24 saat ya da daha kısa sürede yarıya inmektedir ve %90'dan fazlasının birkaç gün içinde hızla atıldığı görülmüştür. Aynı şekilde günlük bor miktarının %85'inin idrarda bulunduğu görülmüştür (Sutherland ve ark. 1999, Murray 1998).

İnsanlarda ve hayvanlarda fazla miktarlarda alınan borun vücuttan idrar vasıtasıyla atıldığı için borik asit yalnızca yüksek dozlarda alındığı durumlarda toksik bir etki gösterir (Bakırdere ve ark. 2010). Günümüzde toplam günlük bor alınımı dünya ülkeleri

arasında birtakım farklılıklar göstermesine rağmen Dünya Sağlık Örgütü tarafından günde güvenli bor alım miktarının 1-13 mg arasında olabileceğini ve günlük alımın 28 mg'ı geçmemesi gerektiğini tavsiye etmektedir (WHO 2003-2009) (Meacham ve ark. 2009, Nielsen ve ark. 2011).

2.4.3. Borun hücresel işlevleri

Bor elementinin insanlar için organizmada birçok önemli göreve sahip olabileceği düşünülmektedir (Nielsen ve Meacham 2011, Korkmaz 2011). Hunt, borun hayvanlarda, bitkilerde, kültür ortamlarında ve kimyasal reaksiyon sistemlerinde en az 26 enzimin aktivitesine etki ettiğini bildirmekle birlikte borun immün sistem, insülin salınımı, enerji substrat yollarını içeren enzimatik reaksiyonların düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. NADPH seviyelerinin düzenlenmesinde de etkin bir role sahiptir. NADH molekülü, hücrelerde glutatyon (GSH) oranını tırmandırarak oksidatif stresi ve bundan ötürü oksidatif kaynaklı hasarları azaltabilmektedir (Hunt 1998). Vitamin D, magnezyum ve kalsiyum ile bağlantısı olan bor elementinin, kemik metabolizmasının düzenlenmesinde de büyük bir işlevi bulunmaktadır (Korkmaz 2008, Duydu ve ark. 2011).

In vitro ile yapılan çalışmalarda, borun, enflamatuvar yanıtta rol oynayan kan hücrelerinin popülasyonunu veya akut veya kronik enflamasyon sonucu oluşan ROT'ların metabolizmasına etki ederek immün yanıtı etkilediği gösterilmiştir. Fazla reaktif oksijen tipleri glutatyon, katalaz ve süperoksit dismutaz reaksiyonlarında bozunur ve borun reaktif oksijen tiplerinin bozunmasını etkilediğine dair kanıtlar vardır. Bor eksikliği bulunan erkek ve kadınlara bor takviyesi yapılması ile eritrosit süperoksit dismutaz konsantrasyonunun önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Nielsen ve Meacham 2011). Öte yandan, kalsiyum fruktoboratin ise oksidatif stres uygulanan kültüre edilmiş hücrelerde, hücre içindeki süperoksit iyonlarının miktarlarını azalttığı gösterilmiştir (Nielsen ve ark. 2011). Kalsiyum fruktoboratin LPS ile uyarımı yapılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde nitrik oksit, interlökin 6 ve interlökin 1b salgılarını azalttığı da rapor edilmiştir. Bu sebepten ötürü kalsiyum fruktoboratin hem anti-oksidan hemde anti-enflamatuvar bir ajan olarak görev aldığı kanısına ulaşılmıştır (Scorei ve Rotaru 2011).

Durrick ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, borunun pro-inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu ve dolayısıyla NF-kB transkripsiyon faktörü yoluyla enflamasyon sürecini engelleyebildiğine dair kanıtlar da vardır (Durrick ve ark. 2005).

2.4.4. Bor aktivitesinin biyokimyasal mekanizmaları

Borun, hücre sinyal sistemini etkileyerek veya vücutta muhtelif biyokimyasal süreçlerde rol alan bir olayın oluşumunu ve/veya aktivitesini etkilemesi sonucu çeşitli etkiler ortaya çıkardığı yargısına ulaşılmıştır. (Nielsen ve ark. 2011). Borun biyokimyasal esası, borik asitten kaynaklanmaktadır. Borik asit, bir Lewis asidi gibi davranır ve bazlardan bir elektron çifti alarak tetrakovalent bileşik yapısı oluşturmaktadır. Borik asit, hidroksil grupları birbirine yakın konumlarda olduğu zaman organik bileşiklerin hidroksil gruplarıyla ester kompleksleri oluşturmaktadır (Barranco ve ark. 2006, Scorei ve ark. 2011). Bu özelliğinden ötürü borun, transpeptidaz, proteaz, nitrik oksit sentaz, arginaz, proteazom ve peptidaz benzeri enzimler için etkin bir inhibitör olarak işlev göstermesini sağlamaktadır (Gallardo ve ark. 2003, Bradke ve ark. 2008, McAuley ve ark. 2011). Böylelikle bor, bağ dokusu yapıları ile membran bileşenlerinin bozulmasını düşürerek iltihaplanma sürecini düzenler. Serin proteazlar (kimotripsin, katepsin, elastaz, allin vb.) hidrolazların bir alt sınıfıdır ve aktif lökositler vasıtasıyla salınan en önemli proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler salınan reaktif oksijen türlerine ek olarak proteoliz yoluyla bağ dokusu yapıları, membran bileşenleri ile çözünür proteinleri parçalayarak enflamatuvar yanıtını artırır. Bu nedenle bor, enflamatuvar süreçte artan enzimatik aktiviteleri azaltacak ve enflamatuvar hastalık geliştirme riskini azaltacak bir baskı sinyali olarak işlev görür (Hunt ve ark. 1999).

Boru aktive etmek için önerilen mekanizmalardan biri, borun hücre yüzeyi ve membranındaki moleküller ile cis-diol oluşturması ve hücre membranı fonksiyonunun bütünlüğü ve sinyalleşmesini etkilemesidir. Borun alımı ve prostat kanseriyle arasındaki biyolojik olarak ters ilişkinin, steroid hormonları, metabolik düzenleme, anti-tümör metabolitleri ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesine bağlı olduğu düşünülmektedir, çünkü bunlar cis-diol bağlantıları yoluyla testosteron ve PSA fonksiyonunu etkiler (Meacham ve ark. 2009). Yapılan bir çalışma sonucunda 3-nitrofenil borik asit ve borik

asidin PSA'nın proteolitik aktivitesini bloke ettiğini bulunmuş ve bu durumun hücre proliferasyonu ile adenokarsinom gelişimini azaltabileceğini öne sürmüşlerdir (Gallardo ve ark. 2003).

Bor aynı zamanda hücre membranında fosfoinositidler, glikoproteinler, glikolipidler gibi cis-hidroksil grupları ile diester borat kompleksleri meydana getirerek de biyoaktivitesini açığa çıkarmaktadır. Diester borat kompleksleri, kalsiyum şelatörleri ya/ya da redoks metabolizmasının düzenleyicileri şeklinde hareket ederek membran bütünlüğünü ve işlevini etkiler. Bitkilerle yapılan çalışmalar sonucunda, transkripsiyon faktörleriyle etkileşime giren ve bazı genlerin ekspresyonuna etki eden borun hücrel bir sinyal olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Böylelikle borun hücre farklılaşmasını, organogenezini ve embriyogenezini etkileyebileceği görüşüne katkı sağlamaktadır (Nielsen ve ark. 2011).

Birçok metastatik tümörün belirteçlerinden birisi hücre göçündeki anormalliklerdir. Metastaz için en önemli hücrel hedefler, GTP bağlayıcı proteinlerin Rho ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyeleri olan RhoA, Rac1 ve CDC42 molekülleridir. Bu moleküller birçok kötü huylu kanser türünde aşırı eksprese edilir ve fokal adezyon regülasyonu, aktin hücre iskeletinin organizasyonu, epitelyal yara iyileşmesi ve hücre göçünün yanı sıra enflamatuvar yanıtta önemli roller oynar. Borik asit ve fenil boronik asidin bu göç karşıtı tepkisi nedeniyle, yeni kanser önleyici tedaviler için uygun adaylar olabileceği yargısına varılmıştır (Penna ve ark. 2009, McAuley ve ark. 2011).

Fokal adezyon kinazındaki (FAK) değişikliklerin, borik asidin meme ve prostat kanseri hücre kültüründe apoptozu indüklediği olası mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir. FAK, birçok insan kanser hücre hattında yüksek oranda eksprese edilir ve integrin aracılı sinyal yolunda önemli bir rol oynar; hücre göçü, anjiyogenez ve iltihaplanma/yara iyileşmesinde önemli rolleri vardır (Meacham ve ark. 2009, Nielsen ve ark. 2011). Fosforilasyon reaksiyonları yoluyla FAK'daki konformasyonel değişiklikler, apoptozu baskılayan ve hücre göçünü uyarıcı hücre içi ve hücre dışı tepkilere yol açar. Borik asit uygulaması sonucunda FAK fosforilasyonundaki 4 kat azalma ve kaspaz 3 aktivitesindeki artış, kanser hücrelerinde apoptotik aktivitede bir artışa işaret etmektedir (Meacham ve ark. 2009, Nielsen ve ark. 2011).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

Bu çalışmada kullanılan materyaller aşağıdaki başlıklarda listeler halinde sıralanmıştır.

3.1.1. Kimyasal maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları aşağıda verilmiştir.

- Bor oksit, BO, (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü)
- Borik asit, BA, (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü)
- TEMED (SIGMA)
- EGTA (SIGMA)
- EDTA (SIGMA)
- Amonyum Persülfat (APS)
- İzopropanol (Merck)
- Akrilamid (SIGMA)
- Beta-merkaptotanol (SIGMA)
- N,N-metilenbisakrilamid (SIGMA)
- Yağsız Süt Tozu (PINAR)
- Metanol (Merck)
- Brom Fenol Mavisi (Merck)
- Glisin (Biochemika/FLUKA)
- Trizma baz (SIGMA)
- PMSF 100X (100 mM) (FLUKA)
- Proteaz ve Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche, Almanya)
- Triton X-100 (SIGMA)
- NaVO₃ 100X (200 mM) (FLUKA)
- NaF 100X (100 mM) (Merck)
- Bovine Serum Albumin-BSA (USB-10857, Almanya)
- Sodyum Deoksikolat (SIGMA)

- SDS (SIGMA)
- NaCl (SIGMA)
- HCL (SIGMA)
- Na₂HPO₄ · 2H₂O (Merck)
- KCL (Merck)
- Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline (PBS))
- Penisilin/Streptomisin (Biochrom AG)
- L-glutamin (Biochrom) Fötal Dana Serum (PAA)
- Dimetil Sülfoksit (SIGMA)
- Clarity Western ECL Substrate kiti (Biorad, 1705061)
- Tripsin-EDTA (GIBCO)
- RPMI-1640 (GIBCO)
- Coomassie Brilliant Blue (BIORAD)
- Thiazolyl blue tetrazolium bromide / MTT (SIGMA-ALDRICH)
- Tripan mavisi solüsyonu (SIGMA)
- Protein ölçüm kiti (BIORAD DC protein assay)
- p53 antikoru (Cell signaling 9282)
- ATM antikoru (Milipore)
- GAPDH antikoru (Cell signaling 82530)
- p53 antikoru (Cell signaling 9282)
- Phospho-p53^(Ser15) antikoru (Cell signaling 82530)
- ATM antikoru (Cell signaling 2873)
- Phospho-ATM^(Ser1981) antikoru (Cell signaling 13050)
- Phospho-H2AX^(Ser139) antikoru (Cell signaling 9718)
- Phospho-ATR^(Ser428) antikoru (Cell signaling 2853)
- Phospho-Akt^(Ser473) antikoru (Cell signaling 4060)
- Akt antikoru (Cell signaling 9272)
- Phospho-p38^(Thr180/Tyr182) antikoru (Cell signaling 4511)
- p38 antikoru (Cell signaling 9212)
- Phospho-SAPK/JNK^(Thr183/Tyr185) antikoru (Cell signaling 9255)
- SAPK/JNK antikoru (Cell signaling 9252)

- 4,6-diamidino-2-phenylindole / DAPI (SIGMA)
- Anti-rabbit IgG ve Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen)
- Anti-rabbit IgG ve Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 594) (Invitrogen)
- pATM^(Ser1981) antikoru (SIGMA)
- Anti-rabbit ve Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham NA934/ Amersham NA931)

3.1.2. Hücre hattı

BPH-1 Hücre Hattı Leibniz Institute, DSMZ, Almanya'dan (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures ACC 143) satın alınmıştır.

3.1.3. Kullanılan malzemeler

Kullanılan kimyasal maddeler ve markaları aşağıda verilmiştir.

- 0,5-10, 10-100, 20-200, 100-1000 µL otomatik pipetler (SCILOGEX)
- 0,5-10, 10-100, 20-200 ve 100-1000 µL mikropipet ucu (VERTEX)
- Steril cam pipetler (ISOLAB)
- Whatman kağıdı (Cytiva)
- 1,5-2 mL eppendorf tüpleri (SSIbio)
- 22x22 mm No:1 lamel (Marienfeld)
- Yürütme aparatı (BIO-RAD 1658006FC)
- Transfer aparatı (BIO-RAD 1703989)
- Steril santrifüj tüpü 15 mL (SSIbio)
- Steril santrifüj tüpü 50 mL (SSIbio)
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Hybond NE1706)
- Hücre kültürü plate, 6 ve 96 kuyucuklu (Sarstedt, Almanya)
- 100x20 mm'lik kültür kabı (Greiner Bio-One Cellstar, Almanya)
- 60x15 mm'lik kültür kabı (Greiner Bio-One Cellstar, Almanya)
- 35x10 mm'lik kültür kabı (Greiner Bio-One Cellstar, Almanya)

- 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik doku kültürü flaskı (Sarstedt, Almanya)
- Hücre kazıyıcı (TPP 9903 Cell Scraper)
- Filtreli steril pipet ucu, 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL ve 50 mL (Costar)
- Steril pastör pipeti (FL Medica)
- Steril Kryo tüp, 1 mL (Clearline, Biosigma)

3.1.4. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar ve markaları aşağıda verilmiştir.

- +4 ve -20 derece buzdolabı (Arçelik)
- -86 derece derin dondurucu (New Brunswick)
- Blok ısıtıcı (Wealtec HB-2)
- Class II biyogüvenlik kabini (Esco)
- CO₂'li inkübatör (Esco)
- Çalkalayıcı (Biosan Shaker-Rocker MR-12)
- ETÜV (Nüve)
- Floresan ekli inverted ışık mikroskobu (Leica DMIL)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Hemositometre (Neubauer)
- Manyetik karıştırıcı (M TOPS)
- Microplate reader (Biotek FLx800)
- Nitrojen tankı ve aktarma ünitesi (Chart, MVE, Cleveland)
- pH metre (Hanna- HI221)
- Santrifüj (Eppendorf, centrifüğe, 5415 D)
- Soğutmalı santrifüj (SIGMA, B6916)
- Sonikatör (Bandelin Sonopuls UW 2070)
- Su banyosu (Nüve Bath)
- Ultrasaf su cihazı (Elga Purelab Q)
- Vakum pompası (Vacuum Pump)
- Vortex (Dragonlab MX-S)

3.2. Yöntemler

Kullanılan yöntemler aşağıda başlıklar halinde anlatılmıştır.

3.2.1. Sterilizasyon

Ticari firmalar tarafından sağlanan her türlü plastik bazlı malzemeler steril bir şekilde alınmıştır. Cam bazlı malzemeler ve bazı sıvı malzemeler (PBS ve dH₂O gibi) 121 °C’de 45 dakika sterilizasyonu yapıldı. Otoklavlanamayan bir takım sıvı maddeler ise 0,22 µm por çapındaki mikrobiyolojik filtrelerden süzülme yapılarak steril hale getirildi. Steril hücre kültürü kabininin sterilizasyonu UV ışık kullanarak yapıldı. Hücre kültürü kabine konulacak malzemeler ise %70’lik alkolle silinerek kabin içerisine yerleştirildi. Aylık periyotlarla, hücre kültürü laboratuvarındaki yüzeyler %70 alkolle silinerek steril ortam oluşturuldu.

3.2.2. Kullanılan solüsyon ve tamponların hazırlanması

▪ Borik Asit ve Bor Oksitin Hazırlanması

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

Çizelge 3.1. Bor Oksit ve Borik Asit Moleküler ağırlıkları

Bor Maddesi	Moleküler Ağırlık
BO	69,68
BA	61,832

- 100 mM 1 mL bor oksit için 0,0069 g, 100 mM 1 mL borik asit için 0,0062 g,
- 6,9 mg bor oksit ve 6,2 mg borik asit tartılarak 1 mL dH₂O’da çözdürüldü (Maksimum bir ay olacak şekilde oda sıcaklığında tutuldu).

▪ **Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 0,2 g KCl
- 1 L dH₂O
- 1,41 g Na₂HPO₄.H₂O
- 8,0 g NaCl

Bunlar tartılarak 900 mL damıtılmış su ile çözdürüldükten sonra 1M HCl ile pH 7,4 yakalanmaya çalışıldı ve sonrasına 1 L'ye tamamlandı. 45 dakika 121 °C'de steril edildi ve oda sıcaklığında tutuldu.

▪ **0,5 M EDTA**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 16,81 g EDTA
- 100 mL dH₂O

EDTA 90 mL dH₂O içerisinde çözdürüldükten sonra pH 7'ye ayarlandı. Daha sonra 100 mL'ye tamamlanıp oda koşullarında muhafaza edildi.

▪ **0,5 M EGTA**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 19,02 g EGTA
- 100 mL dH₂O

EGTA 90 mL dH₂O içerisinde çözdürülmesine müteakip pH 7 olarak ayarlandı. Sonrasında 100 mL'ye tamamlanıp oda koşullarında muhafaza edildi.

▪ **10 M NaOH**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 40 g NaOH
- 100 mL dH₂O

NaOH, 100 mL dH₂O içerisinde çözdürüldü ve daha sonra oda koşullarında muhafaza edildi.

▪ **5 M NaCl**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 292,2 g NaCl
- 1 L dH₂O

NaCl, 1 L dH₂O içerisinde çözdürüldü ve daha sonra oda sıcaklığında saklandı.

▪ **1 M KCl**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 74,55 g KCl
- 1 L dH₂O

KCl, 1 L su içerisinde çözdürüldü ve daha sonra oda sıcaklığında saklandı.

▪ **30 x NaF**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 378 mg NaF (0,9 M NaF)
- 10 mL dH₂O

NaF, 10 mL dH₂O içerisinde çözdürüldü ve daha sonra -20°C'de muhafaza edildi.

▪ **Jel Boyama Solüsyonu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır. Bunlar, oda sıcaklığında saklanmıştır.

- 0,25 g Coomassie Brilliant Blue
- 10 mL Asetik Asit
- 45 mL dH₂O

- 45 mL MeOH

▪ **Ponceau-S Membran Boyama Solüsyonu (Membrane Staining)**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır. Bunlar, oda sıcaklığında saklanmıştır.

- 0,05 g Ponceau-S (%0,1)
- 2,5 mL Glacial asetik asit (%5)
- 47,5 mL dH₂O

▪ **Boya Akıtma Solüsyonu (Destaining)**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır. Bunlar, oda sıcaklığında saklanmıştır.

- 400 mL dH₂O
- 50 mL Glacial asetik asit (%10)
- 50 mL MeOH (%10)

▪ **DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır. Bunlar, -20 °C'de saklanmıştır.

- %30 Glycerol
- %70 PBS
- 1 µg/mL p-phenylenediamin (antifade)
- 1 µg/mL DAPI

▪ **10X SDS-PAGE Jel Transfer Tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 30 g Trizma base
- 144 g Glisin

Bunlar, 1 L dH₂O içerisinde çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

▪ **1X SDS-PAGE Jel Transfer Tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır. Bunlar, oda sıcaklığında saklanmıştır.

- 100 mL 10X Transfer Buffer
- 200 mL %100 MeOH
- 700 mL dH₂O

▪ **10X TBS (10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl)**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 12,1 g Trizma base
- 80 g NaCl
- 1 L dH₂O

Bunlar, 900 mL dH₂O içerisinde çözdürüldükten sonra 1M HCl ile pH 8'e ayarlanarak 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

▪ **TBS-T (10 mM Tris.HCl, 150 mM NaCl, Tween 20)**

- 1X TBS içerisine %0,1 Tween-20 ilave edildi.

▪ **%30 Akrilamid karışımı**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- %29 (w/v) akrilamid (500 mL için 145 g)
- %1 (w/v) N,N-metilen-bisakrilamid (500 mL için 5 g)

Karışım hazırlandı ve 0,22 µm por çapındaki filtreden geçirildi. Daha sonra 20 dakika boyunca filtreden hava geçirildi. 4 °C'de karanlıkta saklandı.

▪ **10X SDS-PAGE Jel Yürütme Tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 10 g SDS

- 144 g Glisin
- 30 g Trizma Base

Hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

▪ **4X Ön ayırma jeli tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 0.5 M Tris-Cl (pH: 6,8)
- %0,4 SDS

▪ **4X Ayırma jeli tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 1,5 M Tris-Cl (pH: 8,8)
- %0,4 SDS

▪ **4X SDS-PAGE Jel Laemli Buffer/ Yürütme Tamponu**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- %20 Gliserol
- %4 SDS
- 200 µl Brom fenol mavisi (10 mL için)
- 4 mM EDTA
- 40 mM Tris-HCl (pH: 6,8)

Kullanımdan öncesinde ise %10 β-merkaptolanol eklendi.

▪ **RIPA Buffer**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- %0,1 SDS
- %0,1 Sodyum Deoksikolat

- %1 Triton X-100
- 1 mM EDTA
- 1 mM EGTA
- 10 mM Tris-Cl, pH: 8
- 140 mM NaCl

Kullanımından önce ise yeterli miktarlarda proteaz inhibitörleri (Na_3VO_4 , NaF, PMSF) eklendi.

Çizelge 3.2. Ön Ayırma Jeli bileşenleri

Ön Ayırma (Stacking) Jeli		10 ml	5 ml	2.5 ml
	1) 4X ön ayırma jeli tamponu	2,5 mL	1,25 mL	0,625 mL
	2) %31 akrilamid karışımı	1,7 mL	0,85 mL	0,42 mL
	3) dH₂O	5,7 mL	2,85 mL	1,425 mL
	4) %10 APS	0,15 mL	0,075 mL	0,038 mL
	5) TEMED	0,010 mL	0,005 mL	0,005 mL

Çizelge 3.3. Ayırma Jeli Bileşenleri

Separating Jeli (Ayırma) (10 ml)	6%	8%	10%	12%	15%
1) 4x ayırma jeli tamponu	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
2) %30 akrilamid karışımı	2,0 mL	2,7 mL	3,3 mL	4,0 mL	5,0 mL
3) dH₂O	5,4 mL	4,7 mL	4,1 mL	3,4 mL	2,4 mL
4) %10 APS	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL	0,15 mL
5) TEMED	0,008 mL	0,006 mL	0,005 mL	0,005 mL	0,005 mL

3.3.3. Hücre kültürü

Tez çalışması kapsamında BPH-1 hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması için besiyerlerine ilaveten;

- %1 Penisilin/ Streptomisin (P/S)
- İnaktif hale getirilmiş %10 Fötal Sığır Serumu
- %1 L-glutamin (L-glu) de eklenerek ortam kullanıma hazır hale getirildi.

Hücrelerin Üretilmesi

Hücre üretim aşamaları aşağıda listelenmiştir.

- Steril cam pastör pipetleri kullanılarak vakum pompasıyla ortam ayrıştırıldı.
- Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca^{2+} ve Mg^{2+} bulundurmeyen steril PBS kullanarak bir kez yıkandı.
- PBS uzaklaştırılmasını takiben 1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatörde 1-2 dakika hücreler yüzeyden ayrışana duruldu.
- Hücre yoğunluğuna göre taze ortam hücreler üzerine eklendi ve hücreler pipet yardımıyla homojenizasyon sağlandı.
- Homojenizesi sağlanan hücreler, dikkatli bir şekilde yeni kültür kabına eklendi ve büyümeleri için 37 °C sıcaklıkta %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi.

Hücrelerin Dondurulma ve Çözdürülme İşlemi

Hücre dondurulma ve çözdürülme aşamaları aşağıda listelenmiştir.

- In vitro kültürler, değerli hücre dizilerini korumak, pasaj sayısı ilerlemesi nedeniyle fenotipik ve genotipik değişiklikleri engellemek ve aynı zamanda bu çalışmalar esnasında güvenli bir şekilde geriye dönebilmek için hücre hatlarının kısa veya uzun süreli saklanması önem arz etmektedir. Hücreleri bu bağlamda korumak için en uygun ve yaygın yöntem -86 °C veya -130 °C 'de dondurmaktır. Donmuş hücreler, özelliklerini değiştirmeden daha uzun süre saklanabilir. Dimetilsülfoksit (DMSO) veya gliserol gibi kriyoprotektan ajanlar, dondurma işlemi sırasında hücrenin organellerini korumak için kullanılır. Araştırma veya

üretim için donmuş hücrelerden yeni kültürler hazırlanabilir, ancak çözündürme işlemi mümkün olduğunca çabuk yapılmalıdır.

- Hücrelerin pasajlanmasının akibine ve hücrelere kültür kabına yerleştirilmeden önce, %30 FBS içeren taze hücre ortamında %5 DMSO eklenmiş ve 1 mL hacimde kriyotüplere aktararak -86 °C sıcaklığa sahip derin dondurucuya yerleştirilmiştir.
- Buzu çözülecek hücreler -86 °C dondurucudan çıkarıldığı andan itibaren 37 °C 'lik su banyosunda çözülene kadar bekletilmiştir. Sonrasında ise hücre kültürü kaplarında 37 °C'ye ısıtılmış 8 mL ortam üzerine dikkatli bir şekilde pipetlendikten sonra ilave edildi.

Hücre Sayımı

Hücre sayımı aşamaları aşağıda listelenmiştir.

- Hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücrelere pasajlanma yapılrırken doğru miktarlarda ekim yapılabilmesi için hemositemetri yardımıyla sayım yapıldı.
- Sayımı yapmak amacıyla hücre süspansiyonundan 10 µL alınır ve tripan mavisi ile 100 µL'ye tamamlanır Karışımın homojen hale gelmesi için pipetleme yapıldı. Hemositometre üstüne bir lamel koyulup sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına 45 derecelik açıyla yayıldı.
- Hemositometre üstünde bulunan 9 büyük kare içinde hücre sayısı belirlendi. Mililitre başına düşen hücre sayısını bulmak amacıyla aşağıda yer alan formül kullanıldı.

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \frac{\text{Hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oran} (10) \times 10^4}{9}$$

3.3.4. MTT analizleri (sitotoksiste)

Sitotoksiste analizinde kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür) oluşumları değerlendirilmiştir. Hücre üremesi; PBS

tamponunda steril bir şekilde hazırlanan 5 mg/mL bulunan MTT stok solüsyonu, kullanmadan hemen önce üretim ortamıyla 1:10 oranında seyreltilmiş ve 0,5 mg/mL'de hazırlanmıştır. Ulusal Boron Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen BA ve BO maddelerinin anti-proliferatif etkileri BPH-1 hücre hattında test edildi. Doz aralıkları 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM ve 7,5 mM olarak kullanıldı.

Madde uygulaması, 24, 48 ve 72 saat boyunca, 96 oyuklu kültür tabaklarına oyuk başına 8×10^3 hücre ekilerek gerçekleştirildi. Süre dolduktan sonra maddeli ortam vakum pompası ile uzaklaştırıldı ve 5 mg/mL MTT stok solüsyonu, son konsantrasyonu 0,5 mg/mL olacak şekilde ortam ile seyreltildi ve kuyu başına 200 µL eklendi. 96 kuyucuklu kültür kabındaki MTT alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan etkilenmemesi için %5 CO₂'li inkubatörde 37 °C sıcaklıkta 4 saat kadar bekletildi. Sürenin dolmasının ardından, MTT içeren ortam uzaklaştırılıp oluşan mavi formazan kristalleri 200 µL hacimde %100 DMSO içerisinde çözdürüldü. Meydana gelen mavi formazanın miktarı, bir mikropilaka okuyucu kullanılarak 570-690 nm referans aralıklarında ölçüldü. Hücre canlılığı, madde uygulanmış hücrelerin absorbansı/kontrol hücrelerin absorbans değeri şeklinde hesaplandı. Sonuçlar, Microsoft Excel (XP) yazılımıyla grafiksel formatta değerlendirilerek, her bir maddenin IC₅₀ değeri (hücre proliferasyonunu %50 oranında inhibe eden konsantrasyon değeri) bulundu.

3.3.5. İmmünofloresan İşaretleme

İmmünofloresan yöntemi kullanarak incelenen protein, özgül antikorlarla işaretlenip floresan ışık yardımıyla mikroskopik inceleme yapıldı.

Hücrelerin Hazır Hale Getirilmesi

%70 etanolün içinde tutulan lameller steril bir dolapta kağıt mendil üzerine yerleştirilip kurumaya bırakıldı ve sonrasında lameller 6 gözlü kültür kaplarına uygun şekilde yerleştirildi. Hücreler; 2 mL ortam içinde %50-60 konsantrasyonda lamelli kültür kaplarına geçirilip %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de 24 saat şeklinde inkübasyon yapıldı. Ardından BPH-1 hücreleri öncelikle 2 saat ve 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO ile ön işleme tabi tutuldu ve sonrasında 22 saat süreyle 5 µM Doxo ile 250 µM H₂O₂ DNA hasarı ajanları uygulandı. Uygulanan maddelerin süresinin dolmasının ardından lamellerin üzerindeki hücreler fikse edildi.

Fiksasyon

- Ortam, birkez 1 mL PBS ile yıkandı.
- Hücrelere 1 mL %4'lük paraformaldehit ekleyerek oda sıcaklığında 1 saat kadar fikse edildi.
- 1 mL PBS ile bir kerelik yıkandı.
- Hücreler oda sıcaklığında %0,2'lik Triton X-100 içeren 1 mL PBS ile bir çalkalayıcı üzerinde 5 dakika süreyle inkübasyon yoluyla geçirgenleştirildi.
- Yıkama, 1 mL PBS ile bir kez yapıldı.

Antikor İşaretleme

- Bloklama, oda sıcaklığında 5 dakika süreyle %1 BSA içeren PBS ile yapıldı ve bloklama solüsyonu çıkarıldı.
- Optimize edilmiş ve kullanım konsantrasyonlarına sahip olan birincil antikorlar, %1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltildi ve her bir lamel üzerine 50 µL olacak

hacimde damlatılarak 37 °C sıcaklıkta 1 saat süreyle inkübe edildi, parafilm ile kaplandı.

- Parafilmeler çıkarılarak 4 kez PBS ile yıkama yapıldı.
- %1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilen ikincil antikolar, her bir lamel üzerine 50 µL damlatıldı ve ardından lameller parafilm ile kaplandı ve 37 °C sıcaklıkta 30 dakika inkübe edildi.
- Parafilmeler çıkarılarak 4 defa PBS ile yıkama yapıldı.
- Lameller üstünde 1 mL %70 etanol ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.

DAPI Boyaması

- Lameller üstüne 1 mL %100 etanol ilave edilerek 1-2 dakika inkübe edildi.
- %100 etil alkol içerisindeki hücreler 6 kuyucuklu hücre plakalarından çıkartılarak kağıt mendiler üstüne yerleştirildi ve kuruması için beklendi.
- 10 µL DAPI (0,25 µg/mL) hücrelerin lamel üzerine yapıştırıldığı yüzeye damlatılıp ters çevrilerek lamaların üstünde doğru kapatılmıştır.
- İnceleme floresan ışık mikroskopunda 100X objektif kullanılarak yapılmıştır.

3.3.6. Western blot uygulamaları

Western blot yönteminde amaç, uygulanan madde dozlarına ve zamana bağlı olan etkileri optimize etmek ve proteinlerin poliakrilamid jellerde uygulanması, ayrılması ve özgül antikolarla işaretleme sonucunda ilgili proteinlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri belirlemektir.

Protein İzolasyonu

- Deney setleri için uygulanan inkübasyon sürelerinin bitiminde hücreler inkübatörden çıkarılarak bir kez soğuk PBS ile yıkandı.

- Hücreler üzerine RIPA Modifiye lizis tamponu eklenip hücreler kazıyıcı yardımıyla kazınmış ve eppendorflara eklenmiştir. (Buz üzerinde yapılan tüm prosedürler gerçekleştirilmiştir).
- Kullanmadan öncesinde RIPA lizis tamponunun içine gerekli miktarda proteaz inhibitörleri eklenmiştir.
- Örneklerimiz her 15 dakikada karıştırılarak 45 dakika buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır.
- Hücre lizis işleminin tam olarak gerçekleşmesi için ayrıca sonikasyon gerçekleştirilmiştir.
- Numuneler 12.000 rcf'de +4 °C sıcaklıkta 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı toplam hücre proteini olarak yeni eppendorf tüplerine aktararak elde edilen lizat -86 °C'ye kaldırıldı.

Protein Miktarını Belirleme

İzole edilen proteinlerin miktarının belirlenmesi amacıyla Lowry Protein Miktarı Ölçüm Kiti aşağıdaki protokole uygun şekilde kullanılmıştır.

- 2,5 µL protein lizat numunesi, 96 gözlü hücre kültürü kaplarına ilave edilip kör numunede protein lizatının yerine 2,5 µL RIPA Modifiye Tampon kullanılmıştır.
- Protein örnekleri üzerine 12,5 µL A ve S reaktifi eklendi. Kullanımdan önce A ve S reaktif toplam örnek miktarına göre A/S oranı 50 olmak kaydıyla hazırlanmış ve numunelere uygulanmıştır.
- Son olarak örneklere karanlıkta 100 µL B reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon bittikten sonra mikropilaya okuyucusunda 690 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır.
- Elde edilen absorbans değerleri vasıtasıyla albümin proteini standart grafiği oluşturulmuştur ve bu grafikten elde edilen denklemlerle protein miktarları belirlenmiştir.

Proteinlerin SDS-PAGE'le Ayrılması

- SDS-PAGE cihazı camları sıralı bir şekilde dH₂O, etanol ve izopropanolle silinerek jelin dökülebilmesi için kompresyon cihazına yerleştirildi ve camlar hazır hale getirildi.
- Jel konsantrasyonu, proteinin moleküler ağırlığı baz alarak seçilmesinden sonra, ayırma jeli hazırlanıp aparata döküldü ve üst yüzey izopropanol ile düzeltilerek 30-40 dakika donması beklendi.
- Donmuş ayırma jeli üzerindeki izopropanol uzaklaştırılıp saklama jeli hazır hale getirildi.
- Depolama jeli kendi aparatına dökülüp tarak yerleştirildi ve donması için yarım saat kadar beklenmiştir.

Örneklerin Hazır Hale Getirilmesi

- İgili hacimde 4X yükleme tamponu üzerine %10 beta-merkaptoetanol eklenerek kısa bir santrifüj yapıldı.
- 100 µg protein lizatlarına karşılık gelen hacim için suyla 4X yükleme tamponu ilave edilerek toplam hacim 30 µL'ye tamamlanır.
- Hazır hale getirilen protein örneklerine 95 °C sıcaklıkta ve 5 dakika denatürasyon uygulandı.
- Örnekler denatürasyonun ardından buz üzerine alınarak jele yüklenmesinden önce kısa bir santrifüj gerçekleştirilmiştir.
- Kuyulara yüklenen örnekler jelin sonuna gelene kadar uygun elektriksel akımda çalıştırılmıştır.

Membrana Transfer

- İmmüno blot sandviç aparatına sırasıyla bir sünger, iki Whatman kağıdı, üzerine proteinlerin yapıldığı bir jel, bir PVDF membran, iki Whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirildi ve aparat kullanıma hazır hale getirildi.

- PVDF membranı aparata yerleştirilmeden öncesinde sünger ve Whatman kağıdı +4 °C sıcaklıkta soğutulmuş ve transfer tamponu ile metanol içinde ıslatılmıştır.
- Jeldeki proteinleri membrana aktarmak için transfer aparatına sandviç aparatı yerleştirilmiştir.
- Transfer aparatına 1X transfer tamponu dökülerek aparatın kenarlarına bir soğutma bloğu yerleştiril ve bir gece boyunca +4 °C sıcaklıkta 90 mA'da manyetik karıştırıcıda aktarılmıştır.

Primer Antikor ile İşaretleme

- Alınan membran, bir kere TBS-T ile 5 dakika boyunca yıkama yapıldı.
- Oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile (TBS-T %5 süt tozu) bir saat inkübasyon yapıldı.
- Bloke edildikten sonra membran 2 kere TBS-T'le yıkanmıştır.
- Membran, uygun şekilde kullanılan primer antikor solüsyonuyla oda sıcaklığında 1 saat ya da +4 °C sıcaklığındaki çalkalayıcıyla gece boyunca inkübasyon yapıldı.

Sekonder Antikor Vasıtasıyla İşaretleme

- Primer antikor çözeltisinden alınan membran, TBS-T ile 1x15 ve 3x5 dakika yıkandı.
- 1 saat, sekonder antikor inkübe edildi (%0,5 süt tozu içeren TBS-T'de).
- TBS-T ile 1x15 ve 3x5 dakika yıkama yapıldı.

Bantların Görüntülenmesi

- HRP enzimi ile işaretli ikincil antikor uygulanmış membranların kemilüminesans görüntülenmesi için Clarity Western ECL Substrat (Bio-Rad) kiti kullanıldı. Substrat olarak kullanılan lüminol, HRP ve H₂O₂ varlığında okside olarak uyarılmış ürün 3-aminofthalatı oluşturur. Bu ürün, 425 nm'de ışığa verir. Bu ışığa, yalnızca enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlemlenebilir. Substratın aşırı yoğun sinyal çıkışı pikogram

düzeyindeki antijenin tespitini mümkün kılar. Sinyalin hassasiyeti, yoğunluğu ve süresi fotoğraflanarak kolaylıkla belirlenmektedir.

- Clarity Western ECL Substrate çalışma solüsyonları membran başına 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında karıştırılarak görüntülemeye hemen önce taze hazırlanır. Görüntüleme işlemi için membran hazırlanan substrat solüsyonuyla direkt ışıktan kaçınılacak şekilde 1 dakika süre ile inkübe edilir.
- Kemilüminesans görüntüleme için Vilber Lourmat FX-7 cihazı (Thermo) kullanıldı.
- Cihaz ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar çalıştırılarak FX-7 yazılımı açıldı.
- Kamera sisteminin soğutma işlemini tamamlaması beklendikten sonra cihazın odak noktası ayarlanarak kemilüminesans görüntülemeye geçildi.
- Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra membran cihazın tablasına yerleştirilerek görüntüleme süreleri saniye ve dakika cinsinden seçilerek fotoğraflama işlemi yapıldı.

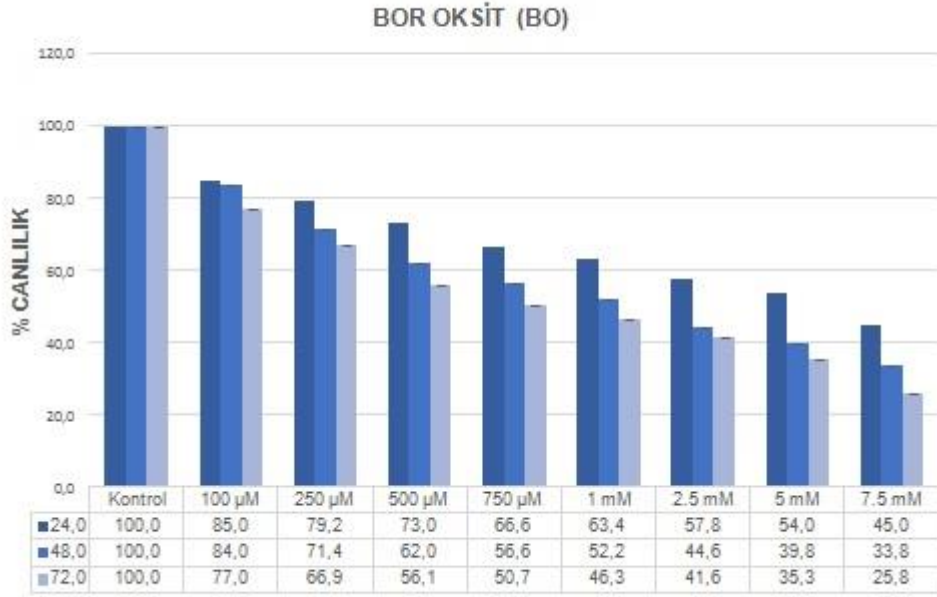
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite Analizi Sonucu Bulgular

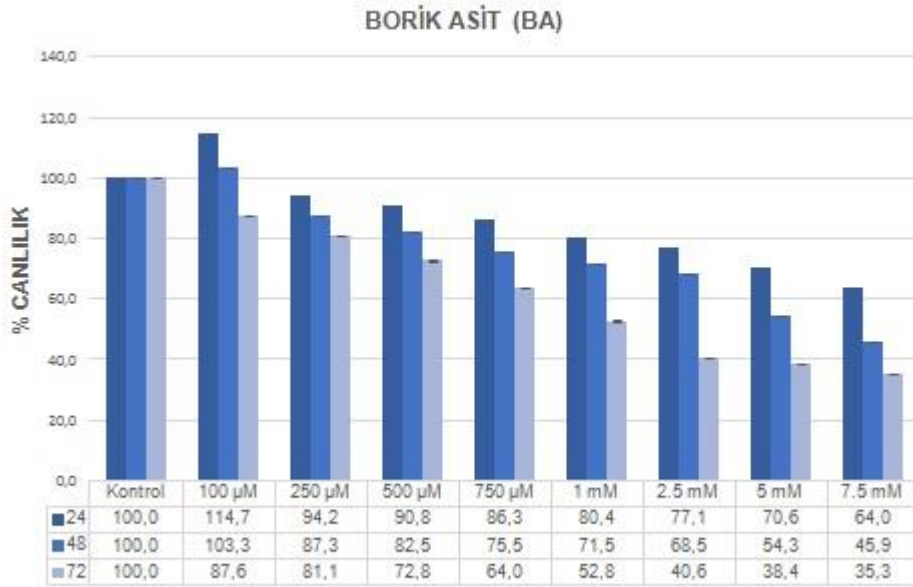
Tez çalışması kapsamında MTT yöntemi ile sitotoksosite denemeleri, hücrelere uygulanan borik asit (BA) ve bor oksit (BO) bileşenlerinin uygulama süresi ve dozlarına bağlı olacak şekilde gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkilerin ve bu etkilerin gözlemlendiği optimum konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

İlk olarak BPH-1 hücre hattında BA ve BO'in anti-proliferatif etkileri karşılaştırmalı olarak denendi. BPH-1 hücrelerinin belirlenen optimum sayıda 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilmesinin ardından hücrelere 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM konsantrasyon değerleri şeklinde 24, 48 ve 72 saat süreyle madde uygulaması yapıldı ve uygulamaların ardından 570-690 nanometre dalga boylarında spektrofotometreyle ölçüm yapılarak sonuçlar elde edildi. Denemeler en az 3 defa tekrar edildi. Ölçümlerden elde edilen absorbans değerlerinden, kontrol hücreleri %100 olacak şekilde kabul edilip madde uygulamalarıyla gözlenen % canlılık değerleri hesaplandı ve BPH-1 hücre hattı için % canlılık eğimleri oluşturuldu.

Şekil 4.1 ve 4.2'de görüldüğü gibi MTT denemesi sonucunda oluşturulan % canlılık grafikleri incelendiğinde, BO ve BA'in BPH-1 hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılıklarını azalttığı belirlendi. Her ne kadar yüksek konsantrasyon değerlerinde canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiş olsa da, BO'in BA'e kıyasla daha etkili bir ajan olduğu sonucuna varıldı. Belirlenen konsantrasyon aralıklarında BA için 24 saatte %50 canlılık oranı elde edilemezken, 48 saatte %50 canlılık oranı 5 mM'da ve 72 saatte ise 1 mM konsantrasyon değerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.) BO uygulaması yapılan hücrelerde ise %50 canlılık oranları 24 saatte 5 mM, 48 saatte 1 mM ve 72 saatte ise 750 µM konsantrasyon değerlerinde gözlemlendi (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. BPH-1 hücre hattına bor oksit uygulamasıyla elde edilen konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığını gösteren grafik.



Şekil 4.2. BPH-1 hücre hattına borik asit uygulanmasıyla elde edilen konsantrasyon ve zamana bağlı hücre canlılığını gösteren grafik.

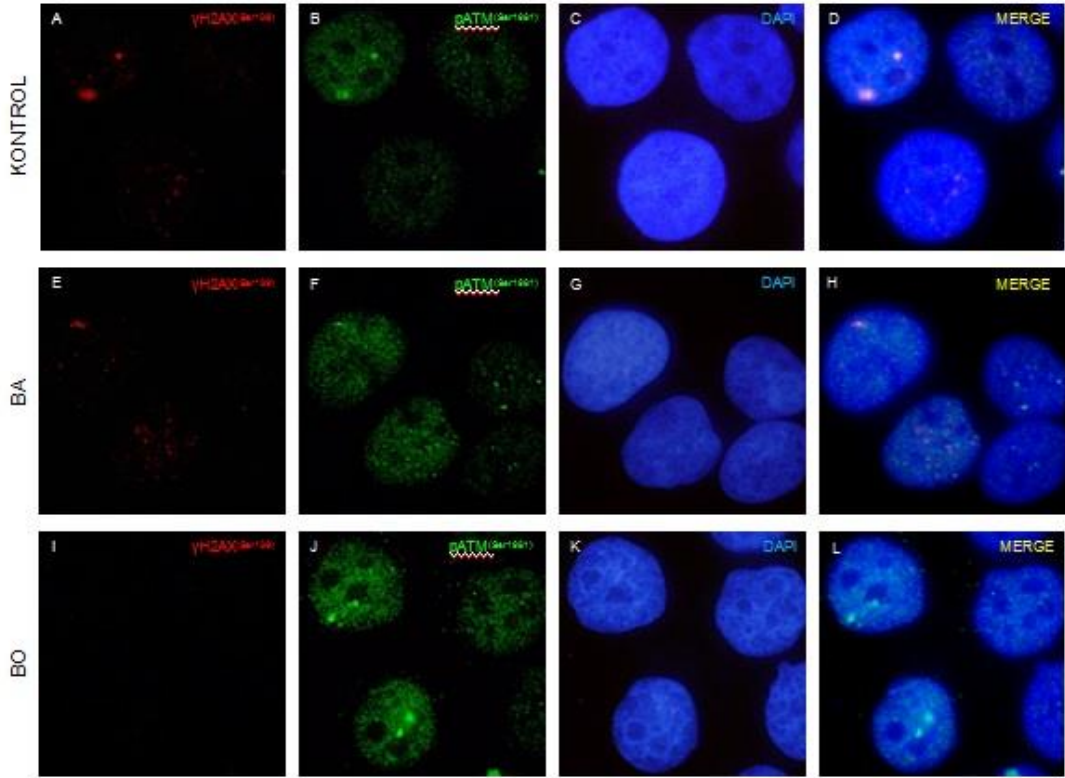
MTT analizi sonuçlarına göre BA ve BO için uygun olan konsantrasyon değerleri 24 saat süreyle 2,5 mM olarak seçildi. Bu doğrultuda western-blot ve immunofloresan analizleri için, BPH-1 hücreleri öncelikle 2 saat ve 2,5 mM şeklinde BA ve BO ile ön işleme tabi tutuldu ve ardından 22 saat süreyle 5 µM Dokso ile 250 µM H₂O₂ DNA hasarı ajanları uygulandı.

4.2. İmmünofloresan (IF) Bulguları ve Sonuçları

BO ve BA'in DNA hasarına olan etkisini incelemek amacıyla BPH-1 hücrelerine belirli süre ve dozlarda maddeler uygulanarak immünofloresan mikroskopisi denemesi yapıldı. İmmünofloresan mikroskopisinde BPH-1 hücreleri kültür kaplarına yerleştirilerek etil alkolle sterilizasyonu yapılmış lameller üzerinde üretilerek immünofloresan görüntüleme için hazırlandı. BA ve BO maddelerinin varlığı ve yokluğunda oluşan değişimler ve süreleri optimize edilerek hücreler lameller üzerinde fikse edildi. İmmünofloresan görüntüleme denemeleri aracılığıyla, BA ve BO'in varlığında doksorubisin ve H₂O₂ ile yaratılacak olan DNA hasarına (özellikle DNA çift zincir kırıklarına) bağlı olarak gerçekleşecek H2AX ve ATM fosforilasyonlarına olan etkisi sorgulanmaya çalışıldı.

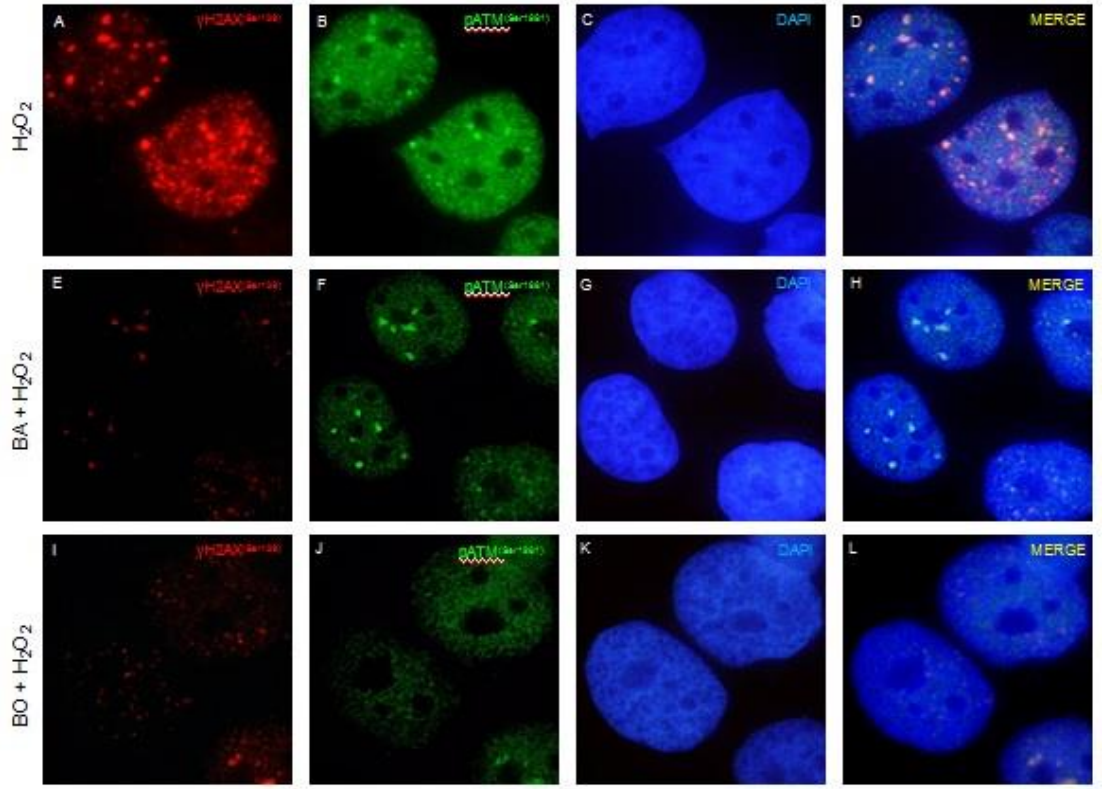
Şekil 4.3.'de çekilen immünofloresan görüntüler incelendiğinde herhangi bir bor bileşiği uygulanmamış kontrol hücrelerinde bazal miktarda H2AX ve ATM fosforilasyonu olduğu belirlendi. Bununla birlikte 2,5 mM BA uygulanmış BPH-1 hücrelerinde H2AX fosforilasyonunda azalma, ATM fosforilasyonunda ise artış olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde 2,5 mM BO uygulanmış BPH-1 hücrelerinde de H2AX fosforilasyonunda net bir şekilde azalma meydana geldiği ve ATM fosforilasyonunda ise belli bir miktarda artış olduğu saptandı.

Kontrol hücrelerinde endojen strese kaynaklı olduğu düşünülen düşük seviyede H2AX fosforilasyonu gözlemlenmesine rağmen bu odakların BA ve BO uygulanmasıyla birlikte azaldığı belirlendi. Kontroldeki ATM seviyesini görsel olarak BA ve BO ile kıyaslandığında ise BA ve BO uygulanan hücrelerde ATM seviyesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile BA ve BO uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D görüntüleri BA ve BO maddesi uygulanmamış kontrol BPH-1 hücreleri. E, F, G, H, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO uygulanmış BPH-1 hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir.

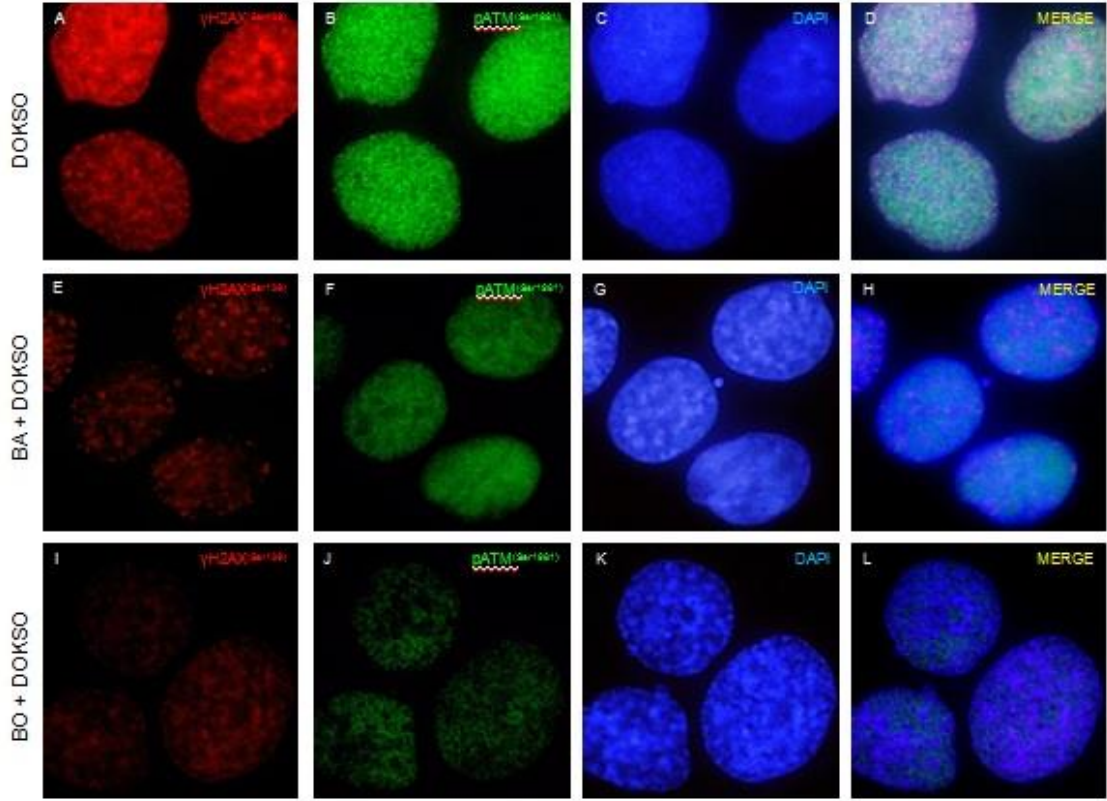
Şekil 4.4'deki immünofloresan görüntüler incelendiğinde tek başına H₂O₂ uygulanan BPH-1 hücrelerinde, özellikle Şekil 4.3'teki hiçbir madde uygulanmayan kontrol hücrelerine kıyasla net ve düzgün bir şekilde H2AX odaklarının ve ATM fosforilasyonunun gerçekleştiği belirlendi. BA ve BO varlığında H₂O₂ uygulanan BPH-1 hücreleri incelendiğinde ise sadece H₂O₂ uygulanmış hücelere kıyasla ATM fosforilasyonunun ve buna bağlı olarak H2AX odak oluşumlarının net ve belirgin bir biçimde azaldığı gözlemlendi.



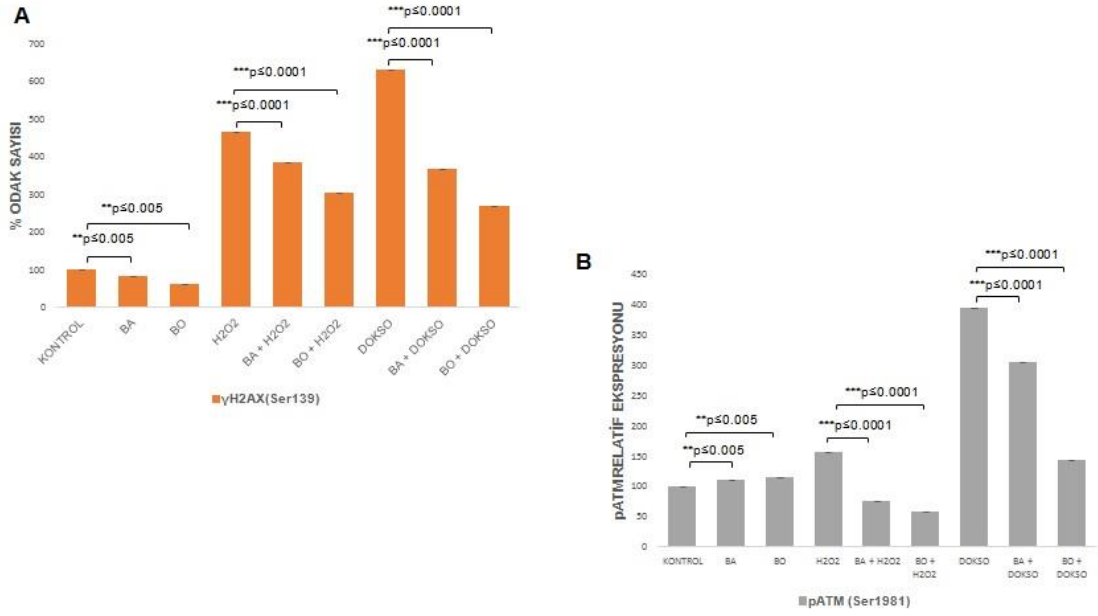
Şekil 4.4. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile H₂O₂, BA+H₂O₂, BO+H₂O₂ uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D yalnızca H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. E, F, G, H, görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA ve 250 μ M H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO ve 250 μ M H₂O₂ uygulanmış BPH-1 hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir.

Şekil 4.5.'deki immünofloresan görüntüler analiz edildiğinde 24 saat yalnızca DOKSO uygulanan BPH-1 hücrelerindeki H2AX ve ATM fosforilasyonlarında net ve düzgün bir şekilde artış meydana geldiği gözlemlendi. 24 saat süreyle BPH-1 hücrelerine uygulanan BA+DOKSO görüntüleri incelendiğinde ise H2AX ve ATM fosforilasyonu yalnızca Dokso uygulanmış BPH-1 hücreleriyle kıyaslandığında net ve düzgün bir biçimde azalma meydana geldiği gözlemlendi. 24 saat süreyle BPH-1 hücrelerine uygulanan BO+DOKSO görüntüleri incelendiğinde ise yine yalnızca DOKSO uygulanmış BPH-1 hücrelerinin görüntüleriyle kıyaslandığı zaman H2AX ve ATM fosforilasyonlarında belirgin bir şekilde azalma olduğu saptandı.

Sonuç olarak hem H₂O₂ (Şekil 4.4.) hem de DOKSO (Şekil 4.5.) uygulanan BPH-1 hücrelerinde net ve düzgün bir şekilde H2AX odak oluşumları ve ATM fosforilasyonu gözlenirken bu odakların BA ve BO uygulamasıyla birlikte yüksek seviyede azaldığı belirlendi



Şekil 4.5. BPH-1 hücrelerinde 24 saat süre ile DOKSO, BA+DOKSO, BO+DOKSO uygulamasının DNA hasarı belirteçleri olan γ H2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna etkisi. A, B, C, D görüntüleri yalnızca 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1 hücreleri. E, F, G, H görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BA ve 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1 hücreleri. I, J, K, L görüntüleri 24 saat süreyle 2,5 mM BO ve 5 μ M DOKSO uygulanmış BPH-1 hücreleri. γ H2AX^(Ser139) ALEXA 594 (Kırmızı), pATM^(Ser1981) ALEXA 488 (Yeşil) ve hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Görüntülemelerin hepsi 100X objektifte ve aynı uygulama koşulları altında çekilmiştir.



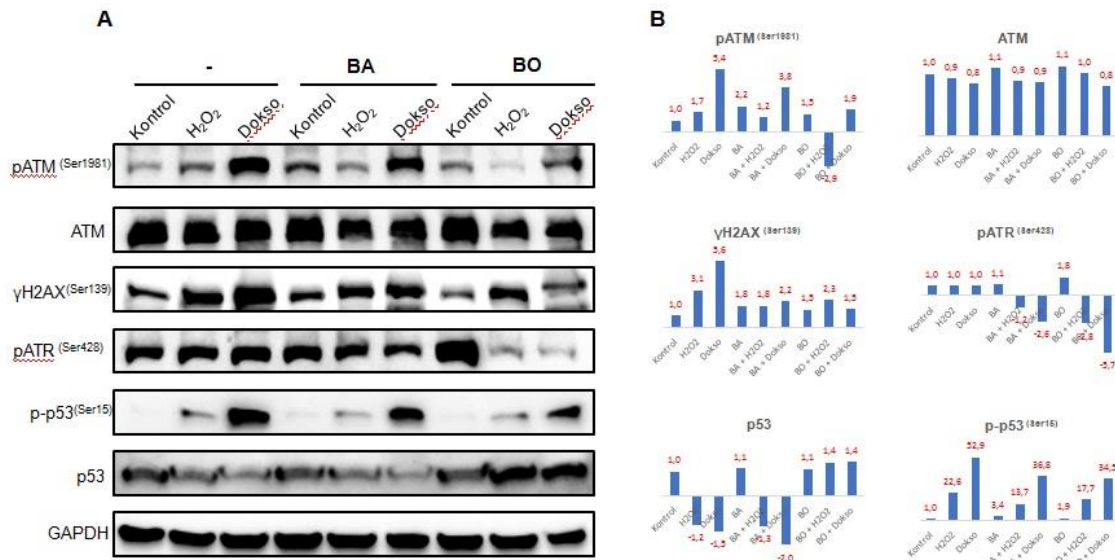
Şekil 4.6. BPH-1 hücrelerinin immüno Floresan görüntüleme sonucu elde edilen görüntülerinden (A) γ H2AX^(Ser139) odak oluşumlarının ve (B) pATM^(Ser1981) fosforilasyon seviyesinin ImageJ programı ile analizi (Her grup için n \geq 300, *p \leq 0,01; **p \leq 0,005; ***p \leq 0,0001)

İmmüno Floresan mikroskopisi ile elde edilen görüntüler ImageJ yazılım programı ile analiz edilerek H2AX odakları ve pATM seviyeleri sayıldı ve ölçüldü. Her örnek grubu için en az 300 hücrenin analizi gerçekleştirildi. Veriler “ortalama değer \pm standart sapma” olarak sunuldu. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi SPSS programı kullanılarak yapıldı. Sayısal verilerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile varyansların homojenliği ise Levene testi ile araştırıldı. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farklılıklar, Tek Yönlü Varyans Analiz (One Way ANOVA) JMP paket programı kullanılarak değerlendirildi. Anlamlılık sınırı 0,01 olarak alındı ve anlamlı çıkan örneklerde p değerleri sunuldu. Bu ölçümler sonucunda elde edilen ve Şekil 4.6’da verilen grafiklere bakıldığında, hiçbir madde uygulanmamış kontrol hücrelerinde 100 olarak belirlenen H2AX odak sayısının, BA uygulanan hücrelerde 84’e ve BO uygulanan hücrelerde ise 61’e düştüğü belirlendi. H₂O₂ uygulanan hücrelerde beklenildiği üzere DNA hasarının artmasıyla birlikte H2AX odak sayısının 466 değerine yükseldiği, BA uygulanması sonucu bu odak sayısının 385’e ve BO uygulanması sonucu ise 303’e gerilediği gözlemlendi. Tek başına DOKSO uygulanan hücrelerde H2AX odak sayısı 629 olarak hesaplanırken, BA uygulanan hücrelerde bu odak sayısının 367’ye ve BO

uygulanan hücrelerde 269'a düştüğü belirlendi. Şekil 4.6.B’de pATM relatif ekspresyon grafiği incelendiğinde, kontrol hücrelerinde pATM fosforilasyon seviyesinin 100 olduğu ve bu değerin sırasıyla BA ve BO uygulanması sonucu 111 ve 114’ yükseldiği gözlemlendi. H₂O₂ uygulanan hücrelere bakıldığında pATM seviyesi 157’iken BA uygulanması sonucu fosforilasyon seviyesinin 75’e düştüğü, BO uygulanması sonucunda ise 59’a kadar gerilediği belirlendi. DOKSO uygulanması sonucunda pATM seviyesi 395 olarak ölçülürken BA uygulanması sonucu 305’e, BO uygulanması sonucunda ise 144’e kadar düştüğü saptandı. Sonuç olarak hem immüno Floresans görüntüleri hem de Image J analizi ile elde edilen veriler göz önüne alındığında BA ve BO varlığında hücrelerde gerçekleşen DNA hasarı oranının azaldığı belirlendi.

4.3. Western Blot Uygulanması Bulgu ve Sonuçlar

Bu tez kapsamında western-blot ile BA ve BO’in BPH-1 hücre hattındaki DNA hasarı yanıt yolağı üzerine bir etkisi olup olmadığı sorgulandı. Bu amaç doğrultusunda BPH-1 hücrelerine önce 2 saat süreyle 2,5 mM BA ve BO ön uygulaması ve ardından 22 saat süreyle 5 µM Dokso ile 250 µM H₂O₂ uygulanarak protein izolasyonları yapıldı ve SDS-PAGE jellerinde yürütüldü. Bu deneme ile bor bileşiklerinin DNA hasarı yanıt yolağında temel rol oynayan proteinlerin seviyesine olan etkisi araştırıldı.



Şekil 4.7. A) BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ile ilgili proteinlerin ekspresyon

seviyesindeki değişimler. **B)** BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolağı ile ilgili proteinlerin kat cinsinden elde edilen ekspresyon seviyesindeki değişimleri (Image J programı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir).

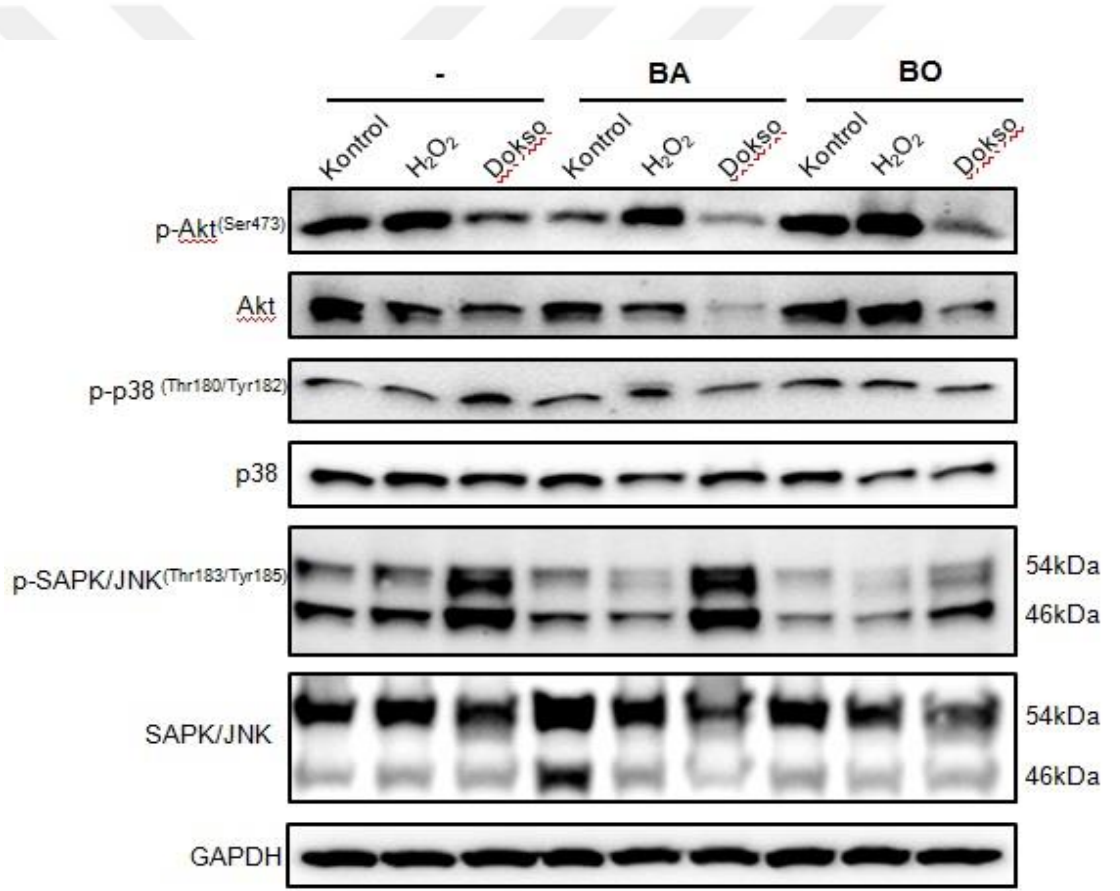
Şekil 4.7.'de elde edilen verilere göre protein seviyesindeki değişimler incelendiğinde, ATM proteininde yapılan bütün uygulamalarda total ATM proteininde çok anlamlı değişiklikler gözlenmedi. pATM^(Ser1981) fosforilasyon seviyesindeki değişimlere bakıldığında immünofloresan sonuçları ile uyumlu olacak şekilde tek başına BA ve BO uygulamalarının pATM^(Ser1981) seviyesini sırasıyla 2,2 ve 1,5 kat artırdığı belirlendi. Kontrol hücrelerine kıyasla DOKSO uygulamasının 5,4 kat pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna yol açtığı daha sonra BA uygulanmasıyla bu seviyenin 3,8 kata düştüğü, BO uygulamasıyla ise 1,9 kata kadar gerilediği gözlendi. Kontrol hücrelerine kıyasla H₂O₂ uygulanmasının ise 1,7 kat pATM^(Ser1981) fosforilasyonuna yol açtığı, BA uygulanmasıyla birlikte bu seviyenin 1,2 kat düzeyine gerilediği ve BO uygulanmasıyla birlikte pATM^(Ser1981) fosforilasyonunun 2,9 kat azaldığı saptandı.

γ H2AX^(Ser139) seviyeleri incelendiğinde kontrol hücrelerine kıyasla DOKSO uygulanması sonucu 5,6 katlık ve H₂O₂ uygulanması sonucu 3,1 katlık bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.7.). BA varlığında DOKSO ve H₂O₂ uygulandığında elde edilen bu artışların sırasıyla 2,2 ve 1,8 kata düştüğü gözlendi. Benzer şekilde BO varlığında DOKSO ve H₂O₂ uygulandığında γ H2AX^(Ser139) fosforilasyon seviyesi kat değişikliklerinin sırasıyla 1,5 ve 2,3 olduğu belirlendi.

p-p53^(Ser15) kat seviyeleri incelendiğinde ise kontrol BPH-1 hücrelerine kıyasla H₂O₂ uygulanması sonucu p-p53^(Ser15) fosforilasyonunda 22,6 katlık bir artış meydana geldiği, BA uygulanmasıyla bu seviyenin 13,7 düzeyine gerilediği, BO uygulanmasıyla 17,7 seviyelerine düştüğü gözlemlendi. DOKSO uygulanması sonucunda ise 52,9 katlık bir artış meydana gelmiş olup BA uygulanmasıyla bu kat artışı 36,8'e, BO uygulanmasıyla 34,5 seviyelerine düştüğü belirlendi (Şekil 4.7.).

Total p53 protein seviyesinde çok anlamlı değişiklikler gözlenmemesi ile birlikte H₂O₂ ve DOKSO uygulaması ile bir miktar azalan p53 proteininin, özellikle BO varlığında daha yüksek seviyelerde olduğu gözlemlendi.

pATR^(Ser428) seviyeleri incelendiğinde kontrol BPH-1 hücrelerine kıyasla H₂O₂ ve DOKSO uygulamaları sonucunda ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Bununla birlikte BA varlığında H₂O₂ ve DOKSO uygulandığında sırasıyla 1,2 ve 2,6 katlık; BO varlığında H₂O₂ ve DOKSO uygulandığında ise sırasıyla 2,8 ve 5,7 katlık bir azalma olduğu gözlemlendi. Ek olarak tek başına BO uygulamasının pATM^(Ser1981)'ye benzer şekilde pATR^(Ser428) seviyesini 1,8 kat arttırdığı saptandı.

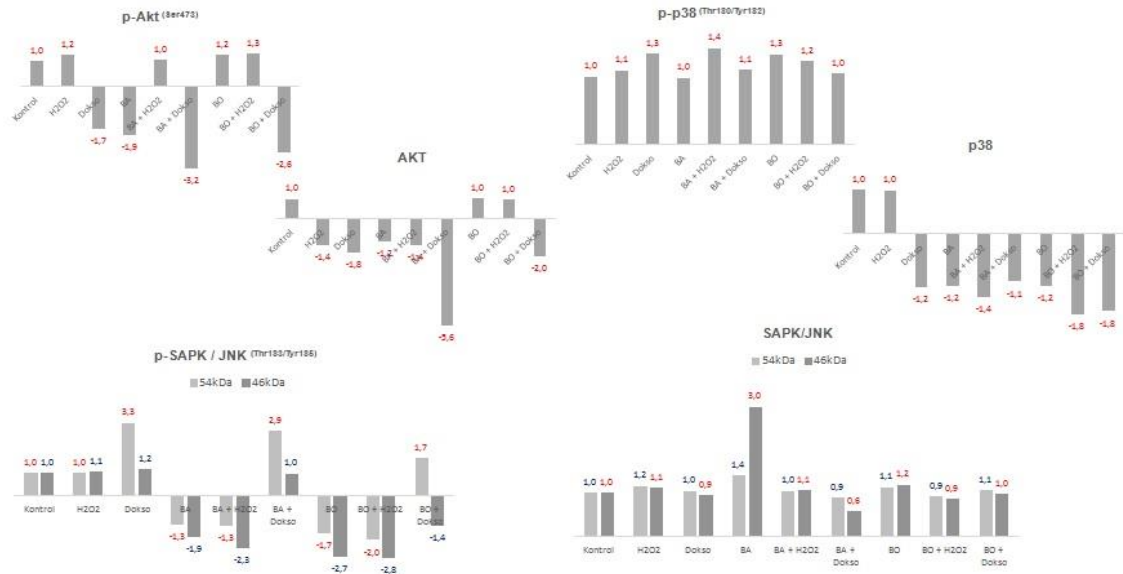


Şekil 4.8. BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolu ve hücre proliferasyonu ile ilgili proteinlerin ekspresyon seviyesindeki değişimler.

Şekil 4.8.'de p-Akt^(Ser473) seviyelerine bakıldığında tek başına BA uygulaması belirli bir oranda azalmaya yol açarken, tek başına BO uygulamasının anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. Kontrol BPH-1 hücrelerine kıyasla hem tek başına hem de BA ve/veya BO varlığında yapılan H₂O₂ uygulamasının anlamlı bir şekilde p-Akt^(Ser473) seviyesini değiştirmediği gözlemlendi. Tek başına DOKSO uygulamasında ise belirgin bir şekilde azalan p-Akt^(Ser473) seviyesinin, BA ve/veya BO varlığında ise çok daha yüksek oranda azaldığı belirlendi. Total AKT seviyeleri incelendiğinde genel olarak DNA hasarı ajanları varlığında Akt seviyesinin azaldığı, özellikle BA ve BO varlığında DOKSO uygulandığında bu azalmanın daha yüksek oranlarda gerçekleştiği gözlemlendi.

p-p38^(Thr180/Thr182) ekspresyon seviyelerinde yapılan uygulamalara bağlı olarak çok belirgin değişiklikler elde edilmedi. Bununla birlikte tek başına DOKSO uygulaması ile bir miktar artan p38 fosforilasyonunun, BA ve BO varlığında tekrar bazal seviyeye düştüğü gözlemlendi. p38 ekspresyon seviyesinde de benzer şekilde kontrol hücrelerine kıyasla yüksek oranlarda bir değişim gözlenmemesine rağmen, özellikle BO varlığında H₂O₂ ve DOKSO uygulandığında ekspresyon seviyesinde bir miktar azalma olduğu belirlendi.

p-SAPK/JNK^(Thr183/Tyr185) ekspresyon seviyeleri incelendiğinde sadece doksorubisin ile yaratılan DNA hasarı koşullarında belirgin değişiklikler olduğu gözlemlendi. Tek başına DOKSO uygulandığında artan p-SAPK/JNK^(Thr183/Tyr185) seviyelerinin, özellikle BO varlığında belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi. Benzer şekilde tek başına DOKSO uygulandığında değişiklik göstermeyen SAPK/JNK ekspresyon seviyesinin BA ve özellikle BO varlığında azaldığı gözlemlendi. İlginç olarak tek başına BA uygulandığında ise SAPK/JNK protein seviyesinde bir miktar artış olduğu belirlendi.



Şekil 4.9. BPH-1 hücrelerine 24 saat süreyle 2,5 mM konsantrasyonda BA ve BO uygulanması sonucu gözlenen DNA hasarı yolu ve hücre proliferasyonu ile ilgili proteinlerin kat cinsinden elde edilen ekspresyon seviyesindeki değişimleri (İmageJ programı ile kantitatif olarak analiz edilmiştir).

Şekil 4.9.'da elde edilen Image J analiz verilerine göre protein seviyesindeki değişimler incelendiğinde, p-Akt^(Ser473) seviyelerinde hem tek başına hem de BA ve BO varlığında yapılan H₂O₂ uygulamalarında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte tek başına DOKSO uygulamasında 1,7 katlık bir azalma olduğu, BA ve BO varlığında ise bu azalmanın sırasıyla 3,2 ve 2,6 kata yükseldiği belirlendi. Tek başına BA uygulamasının da p-Akt^(Ser473) seviyesinde 1,9 katlık bir azalmaya yol açtığı saptandı. Total Akt protein seviyesinin H₂O₂ ve DOKSO uygulaması ile birlikte 1,4 ve 1,8 kat azaldığı gözlemlendi. Özellikle BA veya BO varlığında DOKSO uygulandığında Akt seviyesinin belirgin bir biçimde azaldığı ve sırasıyla 5,6 ve 2 katlık bir azalış olduğu belirlendi.

p-p38^(Thr180/Tyr182) ekspresyon seviyelerinde yapılan tüm uygulamalar için anlamlı kat değişiklikleri gözlenmedi. Bununla birlikte tersi olarak total p38 ekspresyon seviyesinin BA ve BO varlığında yapılan tüm uygulamalarda azaldığı belirlendi. BA ve BO'in DOKSO ile sinerjik olarak etki gösterdiği, tek başına DOKSO uygulamasının 1,2 kat azalttığı p38 seviyesini BA ve BO'in sırasıyla 1,4 ve 1,8 kata yükselttiği gözlemlendi.

p-SAPK/JNK^(Thr183/Tyr185) ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, tek başına H₂O₂ uygulanan hücrelerde ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir değişim meydana gelmezken, BA uygulanan hücrelerde sırasıyla 1,3 ve 2,3 katlık bir azalma, BO uygulanan hücrelerde sırasıyla 2,0 ve 2,8 katlık bir azalma meydana geldiği gözlemlendi. Tek başına DOKSO uygulanan hücrelerde 3,3 ve 1,2 katlık bir artış meydana gelirken, BA uygulanan hücrelerde bu artışların 2,9 ve 1 kata, BO uygulanan hücrelerde ise 1,7 ve -1,4 kata düştüğü belirlendi. SAPK/JNK ekspresyon seviyelerine bakıldığında ise tek başına BA uygulamasında gözlenen 3 katlık artış dışında anlamlı bir değişim gözlenmedi.



5. TARTIŞMA

Benign prostat hiperplazisi, genel olarak kötü huylu olmayan epitel ve stromal bir hücre çoğalmasdır. En yaygın görülen etkileri ise prostat büyümesi, prostat genişlemesi ve düşük üriner sistemi semptomları'dır (Sutton ve ark. 2006, Pena ve ark. 2009, Norström ve ark. 2016). BPH'ın ortaya çıkması genellikle çevresel, genetik ve hormonal etkenler gibi faktörlere dayandırılmasına rağmen BPH patogenezindeki anormal seviyede meydana gelen bu büyümeyi regüle eden moleküler yolak hakkında bilinenlerin seviyesi düşüktür (Siejka ve ark. 2010, Xie ve ark. 2015). BPH gelişiminin tedavisi cerrahi veya bilinmeyen yan etkilerden oluşan farmokolojik ajanlardan oluşmasından dolayı BPH geliştiren kişilerin tedavisinde kullanılabilir yeni ajan ve maddelerin bulunmasına ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2015, Nörström ve ark. 2016, Sarbishegi ve ark. 2016, Nielsen ve ark. 2011).

Borun insanlar ve hayvanlar için çok sayıda yararlı etkisi olabilecek biyoaktif bir mineral olduğu kısıtlı epidemiyolojik ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Nielsen ve ark. 2011). Bor ve türevlerinin anti-profleratif, anti-enflamatuvar ve anti-kanserojen etkisi olabileceği son zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya koyulmaya çalışılmıştır (Barranco ve ark. 2007, Korkmaz 2008). Bu sebeple, bor ve türevlerinin benign prostat hiperplazisi hücrelerinde umut vaat eden ajanlar olarak uygulanabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda, bor ve türevlerinin BPH üzerine etkilerini gösteren çalışmalar literatürde çok azdır. Az sayıda literatür çalışmasına bakıldığında yüksek miktarda bor alan erkek bireylerde prostat büyümesi olasılığının azaldığı, su içerisindeki bor miktarındaki artışla prostat büyümesi, prostat kanseri riski ile ölüm oranlarının azaldığı rapor edilmiştir (Korkmaz 2011, Müezzinoğlu ve ark. 2011).

Bu tez çalışmasında ise prostat dokusunun farklılaşması özelliğinden yola çıkılarak BPH'ın gelişiminde rol oynadığı düşünülen DNA hasarında fonksiyon gösteren proteinlerin bor ve türevlerinin varlığında nasıl bir değişime uğradığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ise BPH-1 hücre hattı uygun koşullarda büyütülmüş daha sonrasında ise MTT deneyleri ile bu hücrelere uygulanacak borik asit (BA) ve bor oksit (BO) bileşiklerinin sitotoksosite analizleri gerçekleştirilmiştir. MTT

demeleri sonucunda ise IC₅₀ değerleri değerlendirilerek hücre için en uygun konsantrasyon ve süre için karar verilmiştir. Belirlenen doz ve süre açısından karar verildikten sonra ise immüno Floresan görüntüleme yöntemiyle uygulanan maddelerin DNA hasarına etkisinin ölçülmesi için gerekli antikorlarla hücreler fikse edilerek pH2AX^(Ser139) ve pATM^(Ser1981) proteinlerinin fosforilasyon seviyelerine bakılmış ve odak sayımları yapılmıştır. Yine belirlenen doz ve süre dikkate alınarak hücrelerden Western-blot analizi yapılması amacıyla protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve uygun antikorlar kullanılarak DNA hasarında ve hücre proliferasyonunda görev alan pH2AX^(Ser139), pATM^(Ser1981), ATM, pATR^(Ser428), p-p53^(Ser15), p53, p-Akt^(Ser473), Akt, p-p38^(Thr180/Tyr182), p38, p-SAPK/JNK^(Thr183/Tyr185), SAPK/JNK proteinlerinin seviyelerindeki değişimler incelenmiştir.

Borun bitkiler ve bazı yüksek hayvanlar için esansiyel olduğu ve bağımsızlık sistemi, tiroid hormonu, insülin metabolizması ve ayrıca kemik metabolizması üzerinde faydalı etkileri olduğu gösterilmiştir. Başka bir deyişle, insanlarda bor eksikliği veya takviyesi ile farklı biyolojik etkiler gözlenmiştir (Bradke ve ark. 2008, Duydu ve ark. 2011, Hunt ve Idso 1999). Ayrıca BA 'nın yara iyileşmesi üzerinde olumlu etkilerinin yanı sıra DNA hasarına ve oksidatif strese karşı koruyucu bir element olabileceği öne sürülmüştür (Yılmaz ve ark. 2016, Ince ve ark. 2010). BA'nın biyokimyasal mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen, çoğu çalışma hücre membran fonksiyonları ve özellikle oksidatif metabolizmada enzim aktivitelerinin düzenlenmesi olmak üzere iki mekanizmaya odaklanmıştır (Nielsen ve ark. 2011, Bradke ve ark. 2008, Ince ve ark. 2010).

Literatürde farklı hücre grupları üzerinde farklı bor bileşikleri kullanılarak yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Tez çalışmasında kullanılan bor türevlerinin miktarları literatürde yer alan bilgilere bakıldığında hücreler için toksik bir etki yaratabileceği görüşündeydi fakat sonraki yapılan araştırmalara bakılarak kullandığımız bor ve türevlerinin suda çözünüyor olduğundan ve hücre membranının lipid yapısından dolayı hücre içerisine emilmesini azaltabileceği için kullanılan bor ve türevleri bu miktarlarda kullanılmıştır. Kullanacağımız bor ve türevi maddeler eğer yağda çözünen bir yapıda olsaydı hücre içerisine emilimi daha yüksek olacağından dolayı daha düşük

konsantrasyonlarda kullanılması gerekirdi. Ayrıca kullanılan bor ve türevi maddelerin hangi materyal içerisinde çözündüğü de önem arz etmektedir. Örneğin kullanılan bor ve türevi maddelerimiz DMSO gibi bir kimyasalın içerisinde çözünseydi hücelere ayrıca DMSO uygulaması yapıp bu maddenin DNA hasarında etkin rol oynayan proteinlerin üzerine etkisi olup olmadığının araştırılması gerekirdi. Bizim çalışmamızda ise BA ve BO suda çözündüğü için suyun tek başına bir etkisi olabileceği düşünülmediğinden dolayı sadece suyla bir deneme yapılmamıştır. Sonuç olarak kullandığımız BA ve BO maddeleri suda çözünürlükleri yüksek oldukları için bu durum hücre membranından geçişi zorlaştırdığı için yüksek konsantrasyonlarda etki gösterdiği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında BA ve BO'in pH2AX odak oluşumu ve pATM fosforilasyonu ile DNA çift zincirindeki kırılmalara karşı koruyuculuğunu araştırdık. BPH-1 hücre hattına Dokso ve H₂O₂ gibi DNA hasarına neden olan ajanlar kullanılarak DNA çift zincir kırıkları meydana getirilmiş ve bu ajanların normal hücrelerde yüksek seviyede DNA hasarına neden olduğu immünofloresan görüntüleme ve western analizleriyle gözlemlenmiştir. Immünofloresan görüntüler incelendiğinde hiçbir uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinde çok az miktarda da olsa pH2AX odağı ve pATM fosforilasyonu gözlemlenmektedir. Bunun sebebidir hali hazırda olan hücrelerin pasajlama stresi, ortam değişimi gibi sebeplerden dolayı endojen stres kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Daha sonra BA ve BO uygulanmış hücreler incelendiğinde ise kontrol hücreleriyle kıyaslandığında pH2AX odak sayısı azalırken, pATM fosforilasyon seviyesinin bir miktar arttığı saptanmıştır. H₂O₂ ve Dokso uygulanan hücrelerde ise net bir şekilde H2AX odakları gözlenirken bu odakların BA ve BO uygulanması ile birlikte yüksek seviyede azaldığı gözlenmiştir. ATM proteini DNA çift zincir kırıklarına karşı oluşturulan yanıtta önemli bir role sahiptir çünkü pH2AX proteinini fosforilleyerek DNA hasarı onarımını aktif hale getirmektedir (Hallstrom 2007). Dolayısıyla uygulanan BA ve BO maddelerinin pATM seviyesini arttırarak DNA tamirini hızlandırıp H2AX seviyelerinin düşmesine yol açtığı düşünülmektedir.

Tez çalışmasında western sonuçlarına bakıldığında ise, kontrol hücrelerindeki pATM seviyelerinin düşük olduğu, Dokso ve H₂O₂ uygulanan hücrelerde pATM seviyelerinin yüksek bir miktarda arttığı, BA ve BO uygulamasıyla da pATM seviyelerinin belirgin bir

biçimde düştüğü bulunmuştur. pH2AX seviyelerine bakıldığında kontrol hücrelerinde az seviyede gözlemlenirken, Dokso ve H₂O₂ uygulanmasıyla birlikte pH2AX seviyelerinin arttığı daha sonrasında ise BA ve BO uygulanmasıyla birlikte bu seviyelerin düştüğü bulunmuştur. Diğer bir DNA hasarı belirteci olan p-p53^(Ser15) seviyelerine bakıldığında ise kontrol hücrelerinde H₂O₂ ve Dokso uygulanmasıyla birlikte fosforilasyonunda artış gözlenmiş, daha sonra BA ve BO uygulanmasıyla birlikte bu fosforilasyon seviyelerinin düştüğü bulunmuştur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar bor alımının artması ile birlikte kanser riskinin ve DNA hasarının azalması ve antioksidan seviyelerinin artmasının ilişkili olduğunu rapor etmektedir (Tepedelen ve ark. 2016, Yamada ve Eckhert 2019). Örneğin, borik asidin NADPH seviyesinin regülasyonunda etkin rolü olduğu ve antioksidan seviyelerini artırdığı gösterilmiştir (Chapin ve ark. 1998, Korkmaz ve ark. 2019). Ayrıca bordan yoksun erkek ve kadınlara (0,25mg/gün) yapılan bor takviyesi (3mg/gün) eritrosit süperoksit dismutaz konsantrasyonunu önemli derecede arttırmaktadır (Nielsen, 1996). Bununla birlikte kalsiyum fruktoboratin oksidatif strese maruz bırakılan kültür hücrelerinde hücre içi süperoksit iyonlarının miktarını azalttığı bulgulanmıştır (Nielsen ve Meacham 2011). 2018 yılında yapılan bir çalışmada borik asidin NAD'ın metabolik ürünü olan siklik ADP riboz (cyclic ADP ribose/cADPR) ile etkileştiği ve BA sinyal yolağının ARE (antioksidan yanıt elemanları/antioxidant response element)-regüle genler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yamada ve Eckhert 2019). Khaliq ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada düşük dozda (160mg'a kadar) borun enzim aktivitesini regüle ettiği, antioksidan sistemini geliştirdiği ve böbrek gelişimini artırdığı rapor edilmiştir (Khaliq ve ark. 2018). Sıçanlarda sisplatin toksisitesinin incelendiği bir çalışmada ise borik asidin ve boraksın farklı dozlarda sisplatin tarafından yaratılan enflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı bulgulanmıştır (Hazman ve ark. 2018). Ayrıca BA'in selenometiyonin ve genistein gibi kemopreventatif ajanların anti-proliferatif etkinliğini artırdığı ve kanser hücrelerini iyonize radyasyona (IR) karşı daha duyarlı hale getirdiği bulgulanmıştır (Barranco ve ark. 2007). Bu doğrultuda tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlara bakıldığında H₂O₂ ve Dokso uygulanan BPH hücrelerinde artan pH2AX ve pATM fosforilasyonlarının BA ve BO uygulamasıyla birlikte azaldığı ve DNA hasarı meydana gelmiş hücrelerde bu hasarın düşmesinde rol oynadıkları bulunmuştur. Bu bağlamda BA

ve/veya BO'in ATM gibi anahtar faktörleri regüle ederek DNA tamir kapasitesini artırabileceği ya da anti-oksidan enzim seviyelerini regüle ederek oksidatif metabolizmayı modifiye edebileceği sonucuna varıldı. Ek olarak ekstraselüler kalsiyum seviyelerinin oksidatif DNA hasarı aracılığıyla arttığı ve artan kalsiyum seviyelerine bağlı olarak nükleus içerisine giren aktif nükleazların DNA zincir kırıklarına yol açtığı bilinmektedir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise kandaki yüksek BA seviyesinin hücre içi Ca^{+2} sinyalini ve depolanmasını azalttığı belirlenmiştir (Henderson ve ark. 2009). Dolayısıyla BA ve diğer bor bileşiklerinin kalsiyum seviyelerini azaltarak DNA hasarı oluşumunu engelleyebileceği de düşünülmektedir.

Birçok etiyolojik varsayım BPH'nin başlangıcı olarak prostat enflamasyonunu işaret etmektedir. Değişen sitokin/kemokin ekspresyonunun BPH odakları ile ilişkili olduğu ve pro-enflamatuvar sitokinlerin BPH gelişimine yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir (Chughtai ve ark. 2011, Schauer ve ark. 2011). Prostat mikroçevresi tarafından üretilen bu pro-enflamatuvar sitokinler arasında yer alan IL-8 ise kronik enflamasyon ve hücre proliferasyonu arasındaki anahtar bağlantı olarak kabul edilmekte ve IL-8'in BPH'nin güvenilir bir belirteci olabileceği düşünülmektedir (Penna ve ark. 2009, Chughtai ve ark. 2011, Schauer ve ark. 2011). IL-8 miktarı ise gen promotörünün derepresyonu (represör genin inaktivasyonu), NF-kB ve JNK yolağı aracılığıyla genin transkripsiyonel aktivasyonu ve p38 MAPK yolağı aracılığıyla mRNA stabilizasyonu mekanizmaları aracılığıyla kontrol edilmektedir (Hoffmann ve ark. 2002). Bu tez çalışması kronik enflamasyon sürecinde oluşan DNA hasarında bor bileşiklerinin koruyucu bir etkisi olup olmadığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında DNA hasarında rol oynayan H2AX ve ATM gibi proteinlerin yanı sıra hücre proliferasyonu, hücre sağ kalımı ve özellikle IL-8 salınımı ile ilişkili olan Akt, SAPK/JNK ve p38 MAPK yollarındaki protein seviyeleri de incelenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen sonuçlar incelendiğinde özellikle BA ve BO varlığında Akt, SAPK/JNK ve p38 seviyelerinde belirli oranlarda azalmalar olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda bor bileşikleri varlığında JNK ve p38 seviyelerinin azalması ile ilişkili olarak IL-8 seviyesinin ve dolayısıyla enflamasyonun azaltılması yoluyla Akt seviyesindeki azalış ile birlikte hücre proliferasyonunun ve sağ kalımın azalabileceği ve özellikle BPH-1 hücrelerinde DNA hasarının minimum seviyede tutulmaya çalışıldığı kanısına varıldı.

Sonuç olarak azalan H2AX odak oluşumları nedeniyle BA ve BO gibi bor bileşiklerinin DNA hasarını azaltıcı veya koruyucu bir etki gösterdiği kanısına varılabilir. Bununla birlikte bu hipotezin doğrulanabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu tez çalışması kapsamında tek doz ve tek süre şeklinde denemeler gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla doz ve süre uygulamaları genişletilerek daha farklı deney setlerinin kurulmasıyla, DNA onarımında rol oynayan MRN kompleksi gibi diğer önemli faktörlerin, IL-8 gibi enflamatuvar belirteçlerin ve ROS türlerinin seviyelerinin incelenmesi ve apoptoz regülasyonunun araştırılması ile daha ayrıntılı sonuçlar elde edileceği ve bu şekilde çalışmanın daha ileri seviyelere taşınabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Alcaraz, A., Hammerer, P., Tubaro, A., Schroder, F.H., Castro, R. (2009).** Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur. Urol.*, 55, 864–73.
- Bakırdere, S., Örenay, S., Korkmaz, M. (2010).** Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3, 54-59.
- Barranco, W.T., Eckhert, C.D. (2006).** Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 94, 884-890.
- Barranco, W.T., Hudak, P.F., Eckhert, C.D. (2007).** Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*, 18, 71–77.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., Passegue, E. (2011).** DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 16-29.
- Bradke, T.M., Hall, C., Carper, S.W., Plopper, G.E. (2008).** Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhes. Migr.*, 2(3), 153–160.
- Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N., Gallina, A., Salonia, A., Bianchi, M., Tutolo, M., Girolamo, V.D., Guazzoni, G., Rigatti, P., Montorsi, F. (2009).** Benign prostatic hyperplasia and its aetiologies. *Eur. Urol. Suppl.*, 8, 865–71.
- Bristow, R.G., Ozcelik, H., Jalali, F., Chan, N., Vesprini, D. (2007).** Homologous recombination and prostate cancer: a model for novel DNA repair targets and therapies. *Radiother. Oncol.*, 83, 220-230.
- Butterwick, L. de Oude, N., Raymond, K. (1989).** Safety assessment of boron in aquatic and terrestrial environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 17(3), 339–371.
- Castro, P., Xia, C., Gomez, L., Lamb, D.J., Ittmann, M. (2004).** Interleukin- 8 Expression Is Increased in Senescent Prostatic Epithelial Cells and Promotes the Development of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Prostate*, 60, 153-159.
- Chapin, R. E., Ku, W. W., Kenney, M. A., McCoy, H. (1998).** The effects of dietary boric acid on bone strength in rats. *Biological Trace Element Research*, 66, 395-399.
- Chughtai, B., Lee, R., Te, A., Kaplan, S. (2011).** Role of Inflammation in Benign Prostatic Hyperplasia, *Reviews in Urology*, 13, 147-150.
- Cui, Y., Zong, H., Zhang, Y. (2012).** The efficacy and safety of silodosin in treating BPH: a systematic review and meta-analysis. *International urology and nephrology*, 44(6), 1601–1609.

Czornak, K., Chughtai, S., Chrzanowska, K.H. (2008). Mystery of DNA repair: the role of the MRN complex and ATM kinase in DNA damage repair. *J. Appl. Genet.*, 49, 383–396.

De Nunzio, C., Aronson, W., Freedland, S.J., Giovannucci, E., Parsons, J.K. (2012). The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *Eur. Urol.*, 61, 560–70.

De Nunzio, C., Kramer, G., Marberger, M., Montironi, R., Nelson, W., Schröder, F., Sciarra, A., Tubaro, A. (2011). The controversial relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: the role of inflammation. *European urology*, 60(1), 106–117.

Derheimer, F.A., Kastan, M.B. (2010). Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity. *FEBS Lett.*, 584, 3675–3681.

Devirian, T.A., Volpe, S.L. (2003). The physiological effects of dietary Boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219–231.

Dinant, C., Houtsmuller, A.B., Vermeulen, W. (2008). Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics & Chromatin*, 1(1), 9.

Durick, K., Tomita, M., Santoro, T., Hunt, C., Bradley, D. (2005). Evidence that boron down-regulates inflammation through the Nf-(Kappa) b pathway. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(5), 1705.

Duydu, Y., Başaran, N., Ustundag, A., Aydın, S., Undeger, U., Ataman, O.Y., Aydos, K., Duker, Y., Ickstadt, K., Waltrup, B.S., Golka, K., Bolt, H.M. (2011). Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Arch. Toxicol.*, 85, 589–600.

Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 15, 247–254.

Fong, Y.K., Milani, S., Djavan, B. (2005). Natural history and clinical predictors of clinical progression in benign prostatic hyperplasia. *Curr. Opin. Urol.*, 15, 35–38.

Foster, E.R., Downs, J.A. (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *Febs J.*, 272, 3231–3240.

Gallardo-Williams, M.T, Maronpot, R.R, Wine, R.N, Brunssen, S.H, Chapin, R.E. (2003). Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *Prostate*, 54, 44–49.

Giri, D., Ittmann, M. (2001). Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *Am. J. Pathol.*, 159, 139–47.

Guyton, K.Z, Kensler, T.W. (1993). Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br. Med. Bull.*, 49, 523-544.

Hallstrom, T.A. (2007). p53 and DNA damage checkpoint response in the human prostate. Molecular and Cancer Biology Program, Biomedicum Helsinki, Department of Virology, Haartman Institute. University of Helsinki, Finland.

Hallstrom, T.M., Laiho, M. (2008). Genetic changes and DNA damage responses in the prostate. *Prostate*, 68, 902-918.

Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., Çelik, S. (2018). 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*, 41, 1032-1048.

Helvacı, C. (2010). Bor Madenlerinin Oluşum Ortamları, Türkiye'nin Potansiyeli ve Ekonomimizdeki Yeri (1. Baskı). Ankara: TÜBA- Bilim ve Düşün Dizisi- 21, s, 43.

Henderson, K., Stella, S., Kobylewski, S., Eckhert, C.D. (2009). Receptor activated Ca^{2+} release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One*, 4(6), e6009.

Hoffmann, E., Breiholz, O.D., Holtmann, H., Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression, *Journal of Leukocyte Biology*, 72, 847-855.

Hu, Q., Li, S., Qiao, E., Tang, Z., Jin, E., Jin, G., Gu, Y. (2014). Effects of boron on structure and antioxidative activities of spleen in rats. *Biological Trace Element Research*, 158, 73-80.

Huang, X., Halicka, H.D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A., Darzynkiewicz, Z. (2005). Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif.*, 38, 223–243.

Huen, M.S., Chen, J. (2008). The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res.*, 18, 8-16.

Hunt, C.D. (1998). Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in animals and humans. *Biological Trace Element Research*, 66, 205-225.

Hunt, C.D, Idso, J.P. (1999). Dietary Boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 12, 221-233.

Hunter, D., Davies, J. (1997). An overview of prostate gland development, The Glandular Organ Development Database, Medical Research Council.

Hussain, S.P., Harris, C.C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials, *Int. J. Cancer.*, 121(11), 2373-2380.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., Haris, C.C. (2003). Radical Causes of Cancer. *Nature*, 3, 276–285.

Jackson, S.P., Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071–1078.

Jeggo, P., Lobrich, M. (2006). Radiation-induced DNA damage responses. *Radiat. Prot. Dosimetry*, 122, 124-127.

Kastan, M.B., Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432, 316-323.

Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y., Murata, M. (2017). Crosstalk between DNA Damage and Inflammation in Multiple Steps of Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1808.

Khaliq, H., Jing, W., Ke, X., Ke-Li, Y., Peng-Peng, S., Cui, L., Wei-Wei, Q., Zhixin, L., Hua-Zhen, L., Hui, S., Ju-Ming, Z., Ke-Mei, P. (2018). Boron Affects the Development of the Kidney Through Modulation of Apoptosis, Antioxidant Capacity, and Nrf2 Pathway in the African Ostrich Chicks. *Biological Trace Element Research*, 186, 226-237.

Khanna, K.K., Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.*, 27, 247–254.

Kim, M.S., Lim, W.K., Park, R.K., Shin, T., Yoo, Y.H., Hong, S.H., An, N.H., Kim, H.M. (2005). Involvement of mitogen-activated protein kinase and NF- κ B activation in Ca²⁺-induced IL-8 production in human mast cells, *Cytokine*, 32, 226-233.

Korkmaz, M. (2007). Bor Mineralinin İnsanda Erkek Fertilitesi ve Prostat Kanserine Etkisinin Belirlenmesi. PROJE NO: BOREN AR-GE/6, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Korkmaz, M. (2008). Farklı Bor Konsantrasyonlarının Meme Kanseri Hücrelerinin Büyümesine Olası Etkilerinin Araştırılması, PROJE NO: BOREN–2007-G0150, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Korkmaz, M. (2011). Boron: Environmental Exposure and Human Health. *Encyclopedia of Environmental Health*. ed: Nriagu, JO. Burlington: Elsevier, 442–445.

Korkmaz, M., Sayli, U., Sayli, B.S., Bakirdere, S., Titretir, S., Ataman, O.Y., Keskin, S. (2007). Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *British Journal of Nutrition*, 98, 571-575.

Korkmaz, M., Turkmen, R., Demirel, H. H., Saritas, Z. K. (2019). Effect of Boron on the Repair of Osteochondral Defect and Oxidative Stress in Rats: an Experimental Study. *Biological Trace Element Research*, 187, 425-433.

Korkmaz, M., Uzgoren, E., Bakirdere, S., Aydin, F., Ataman, O.Y. (2007). Effects of Dietary Boron on Cervical Cytopathology and on Micronucleus Frequency in Exfoliated Buccal Cells. *Environmental Toxicology*, 22, 17-25.

Langerak, P., Russell, P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 366(1584), 3562–3571.

Lees-Miller, S.P., Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, 85, 1161–1173.

Li, X., Wang, X., Zhang, J., Hanagata, N., Wang, X., Weng, Q., Ito, A., Bando, Y., Golberg, D. (2017). Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment. *Nature Communications*, 8, 13936.

Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*; 4, 712–720.

Liu, B., Chen, Y., St Clair, D.K. (2008). ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.*, 44(8), 1529-1535.

Lobrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A. (2010). GammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9, 662-669.

Loft, S., Poulsen, H.E. (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74, 297–312.

Lord, C.J., Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481, 287-294.

Mcauley, E.M., Bradke, T.A., Plopper, G.E. (2011). Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration. *Cell Adhesion and Migration*, 5, 382-386.

McNeal, J.E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2(1), 35–49.

Meacham, S. (2009). What Do We Know about Boron in Relation to Human Health? IV. Uluslararası Bor Sempozyumu, Eskişehir-TURKEY, pp:533-46.

Meacham, S.L., Hall, C., Shen, S., Carper, S.W. (2007). Boric acid and phenyl boric acids induce apoptosis in prostate cancer and breast cancer cell lines. *The FASEB Journal*, 21(5), A124-A124.

Mladenov, E., Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat. Res.*, 711, 61-72.

Morgan, M.J., Kim, Y.S., Liu, Z.G. (2008). TNF alpha and reactive oxygen species in necrotic cell death, *Cell Res.*, 18(3), 343-349.

Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B.P., Chen, D.J., Chatterjee, A., Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*, 5, 575-590.

Murray, F.J. (1998). Comparative Review of the Pharmacokinetics of Boric Acid in Rodents and Humans. *Biological Trace Element Research*, 66, 331-341.

Müezzinoğlu, T., Korkmaz, M., Neşe, N., Bakırdere, S., Arslan, Y., Ataman, O.Y., Lekili, M. (2011). Prevalence of prostate cancer in High Boron-Exposed Population: A Community-Based Study. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 144(1), 49-57.

Nielsen, F. H. (1996). Evidence for the nutritional essentiality of boron. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 9, 215-229.

Nielsen, F.H. (2008). Is Boron Nutritionally Relevant. *Nutrition Reviews*, 66(4), 183-191.

Nielsen, F.H, Meacham, S.L. (2011). Growing evidence for human health benefits of boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16, 169-180.

O'Driscoll, M., Jeggo, P.A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat. Rev. Genet.*, 7, 45-54.

Ohnishi, T., Mori, E., Takahashi, A. (2009). DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. *Mutat. Res.*, 669, 8-12.

Penna, G., Fibbi, B., Amuchastegui, S., Corsiero, E., Laverny, G., Silvestrini, E., Chavalmane, A., Morelli, A., Sarchielli, E., Vannelli, G.B., Gacci, M., Colli, E., Maggi, M., Adorini, L. (2009). The Vitamin D Receptor Agonist Elocalcitol Inhibits IL-8-Dependent Benign Prostatic Hyperplasia Stromal Cell Proliferation and Inflammatory Response by Targeting the RhoA/RhoKinase and NF- κ B Pathways. *The Prostate*, 69, 480-493.

Petasis, N.A. (2007). Expanding roles for organoboron compounds-versatile and valuable molecules for synthetic, biological, and medicinal chemistry. *Australian Journal of Chemistry*, 60, 795-798.

Polo, S.E., Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.*, 25, 409-433.

Quement, C.L., Guenon, I., Gillon, J.Y., Lagente, V., Boichot, E. (2008). MMP-12 Induces IL-8/CXCL8 Secretion Through EGFR and ERK1/2 Activation in Epithelial Cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 294(6), 1076-84.

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.*, 49, 1603-1616.

Risbridger, G.P., Almahbobi, G.A., Taylor, R.A. (2005). Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell Tissue Res.*, 322(1), 173-181.

Roberts, R.O., Jacobson, D.J., Rhodes, T., Klee, G.G., Leiber, M.M., Jacobsen, S.J. (2004). Serum sex hormones and measures of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, 61, 124–135.

Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., Cote, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clin. Cancer. Res.*, 16, 4543-4552.

Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kimata, J., Kinumi, T., Yoshida, Y., Noguchi, N., Niki, E. (2006). Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.*, 40, 619-630.

Schauer, I.G., Rowley, D.R. (2011). The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*, 82, 200-210.

Schetter, A.J., Heegaard, N.H., Harris, C.C. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*, 31(1), 37-49.

Scorei, R.I. (2013). Boron-containing Compounds, Regulation of Therapeutic Potential. In: Kretsinger R.H, Uversky V.N, Permyakov E.A. (eds.) *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York: Springer.

Scorei, R.I, Popa R. (2010). Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 346-351.

Scorei, R.I., Popa, R. (2013). Sugar-borate esters – potential chemical agents in prostate cancer chemoprevention. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 901-909.

Scorei, R.I, Rotaru P. (2011). Calcium fructoborate-potential anti-inflammatory agent. *Biological Trace Element Research*, 143, 1223-1238.

Shrivastav, M., De Haro, L.P., Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, 18, 134–147.

Siejka, A., Schally, A.V., Block, N.L., Barabutis, N. (2010). Mechanisms of inhibition of human benign prostatic hyperplasia in vitro by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist cetrorelix, *BJU International*, 106, 1382-1388.

Siiteri, P.K., Wilson, J.D. (1970). Dihydrotestosterone in prostatic hypertrophy. I. The formation and content of dihydrotestosterone in the hypertrophic prostate of man. *J. Clin. Invest.*, 49, 1737–45.

Soriano-Ursua, M.A., Das, B.C., Trujillo-Ferrara, J.G. (2014). Boron-containing compounds: chemico-biological properties and expanding medicinal potential in prevention, diagnosis and therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24(5), 485-500.

Sutherland, B., Leslie, R., Woodhouse, P.S., Janet, C.K. (1999). Boron balance in humans. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 12, 271-284.

Sutton, M.T., Yingling, M., Vyas, A., Atiemo, H., Borkowski, A., Jacobs, S.C., Kyprianou, N. (2006). Finasteride Targets Prostate Vascularity by Inducing Apoptosis and Inhibiting Cell Adhesion of Benign and Malignant Prostate Cells. *The Prostate*, 66, 1194-1202.

Takahashi, A., Ohnishi, T. (2005). Does gamma H2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.*, 229, 171-179.

Takeda, M., Shirato, I., Kobayashi, M., Endou, H. (1999). Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron*, 81(2), 234-238.

Tanaka, T., Kurose, A., Huang, X., Dai, W., Darzynkiewicz, Z. (2006). ATM activation and histone H2AX phosphorylation as indicators of DNA damage by DNA topoisomerase I inhibitor topotecan and during apoptosis. *Cell Prolif.*, 39, 49-60.

Tepedelen, B. E., Soya, E., Korkmaz, M. (2016). Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process. *Biological Trace Element Research*, 174, 309-318.

Teramoto, S., Tomita, T., Matsui, H., Ohga, E., Matsuse, T., Ouchi, Y. (1999). Hydrogen peroxide-induced apoptosis and necrosis in human lung fibroblasts: protective roles of glutathione. *Jpn. J. Pharmacol.*, 79(1), 33- 40.

Thompson, L.H., Limoli, C.L. (2000). Origin, Recognition, Signaling and Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells. Madame Curie Bioscience Database; Landes Bioscience.

Untergasser, G., Madersbacher, S., Berger, P. (2005). Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp. Gerontol.*, 40, 121–8.

Ushio-Fukai, M. (2009). Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid. Redox Signal.*, (6), 1289-1299.

Valerie, K., Povirk, L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, 22, 5792-5812.

Yamada, K. E., Eckhert, C. D. (2019). Boric Acid Activation of eIF2 α and Nrf2 Is PERK Dependent: a Mechanism that Explains How Boron Prevents DNA Damage and Enhances Antioxidant Status. *Biological Trace Element Research*, 188, 2-10.

WHO. (1998). Boron, World Health Organization, IPCS (Environmental Health Monograph) 204. Geneva.

World Health Organization. (2003). “Boron in drinking-water, Background document for preparation of WHO guidelines for drinking-water quality”, Tech. Report, Geneva.

World Health Organization. (2009). Boron in Drinking Water, Tech.Report, WHO/HSE/WSH/09.01/2; 2009.

