

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN
ANTI-ENFLAMATUAR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Erdinç İlkay OKAN



T.C
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN ANTI-
ENFLAMATUAR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Erdinç İlkay OKAN
0000-0003-0469-7581

Dr. Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BURSA-2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE BOR BİLEŞİKLERİNİN ANTI-ENFLAMATUAR ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Erdinç İlkay OKAN

Bursa Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Erbaykent TEPEDELEN

Meme kanseri, süt bezi veya süt kanalındaki hücrelerde meydana gelen çeşitli etkenler sonucu kontrolsüz şekilde çoğalan ve başka organlara yayılma potansiyeli gösteren tümoral oluşumdur. Enflamatuvar meme kanseri ise nadir görülen ve hızla ilerleyen meme kanserinin en agresif formudur. Enflamatuvar meme kanserinin tümörögenezinde etkili olan sinyal yolları ise NFκB, JAK-STAT3, COX2, IL-6, IL-8 ve IL-10'dur. Özellikle TNF-α ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinler, bakteriyel ve viral ürünler ve hücrel stres gibi uyaranlar varlığında sinyal yolları transkripsiyonel (NFκB aracılığıyla transkripsiyonel aktivasyon) ve posttranskripsiyonel (p38 MAPK aracılığıyla mRNA stabilizasyonu) seviyede IL-8 ekspresyonunu hızlı bir şekilde aktive etmektedir. İnsan organizmasına alınan bor ve türevlerinin vücut sıvılarında %96 oranında borik asit (B(OH)₂) olarak temsil edildiği kabul edilmektedir. Bor, enflamasyon sürecinde artan enzimatik aktiviteleri azaltacak bir represyon sinyali olarak fonksiyon göstermekte ve enflamatuvar hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalar, borun anti-enflamatuvar ajan olarak rol oynayabileceğine dair kanıtlar sunmasına rağmen moleküler mekanizması henüz aydınlatılmış değildir. Bu tez çalışmasında, borik asit (BA) ve etidot 67 (ETD67) bor bileşiklerinin meme kanseri hücrelerinde anti-enflamatuvar etkileri araştırıldı. MTT hücre canlılığı testleri ile IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinin ardından TNF-α uygulanarak enflamatuvar ortam yaratılan MCF-7 hücrelerinde IL-8, IL-6, NFκB, IκBα gibi enflamasyon prosesinde rol oynayan moleküllerin qRT-PCR ve western blot metodolojileri ile transkripsiyonel ve translasyonel regülasyonları incelendi. Elde edilen sonuçlar ile bor bileşikleri varlığında sitokin salınımlarının azalabileceğine, NFκB sinyal yolağının aktivasyonunun engellenebileceğine ve PARP aracılığıyla apoptozun tetiklenebileceğine dair kanıtlar elde edildi. Özellikle ETD 67 olmak üzere bor bileşiklerinin meme kanseri gibi diğer kanser türlerinde anti-enflamatuvar ajanlar olarak rol oynayabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Bor Bileşikleri, IL-8, Kronik Enflamasyon, Meme Kanseri, NFκB

2021, x + 103 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

INVESTIGATING THE ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF BORON COMPOUNDS IN BREAST CANCER CELL LINE

Erdinç İlkay OKAN

Bursa Uludag University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assistant Prof. Burcu Erbaykent TEPEDELEN

Breast cancer is a tumoral formation that multiplies uncontrollably as a result of various factors occurring in the cells of the mammary gland or milk duct and has the potential to spread to other organs. Inflammatory breast cancer is the rarest and most aggressive form of rapidly progressive breast cancer. Signaling pathways that are effective in the tumorigenesis of inflammatory breast cancer are NF κ B, JAK-STAT3, COX2, IL-6, IL-8 and IL-10. Especially in the presence of stimuli such as pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1, bacterial and viral products, and cellular stress, signaling pathways accelerate IL-8 expression at transcriptional (transcriptional activation via NF κ B) and posttranscriptional (mRNA stabilization via p38 MAPK) levels. somehow activates it. It is accepted that boron and its derivatives taken into the human organism are represented as 96% boric acid (B(OH)₂) in body fluids. Boron functions as a repression signal that will reduce the increased enzymatic activities in the inflammatory process and reduce the risk of developing inflammatory diseases. Although studies provide evidence that boron may play a role as an anti-inflammatory agent, its molecular mechanism has not yet been clarified. In this thesis, the anti-inflammatory effects of boric acid (BA) and etidote 67 (ETD67) boron compounds in breast cancer cells were investigated. After the determination of IC₅₀ values with MTT cell viability tests, the transcriptional and translational regulation of molecules that play a role in the inflammation process, such as IL-8, IL-6, NF κ B, I κ B α , in MCF-7 cells, in which an inflammatory environment was created by applying TNF- α , were examined by qRT PCR and western blot methodologies. With the results obtained, evidence was obtained that cytokine releases can be reduced in the presence of boron compounds, activation of NF κ B signaling pathway can be prevented and apoptosis can be triggered through PARP. It was concluded that boron compounds, especially ETD 67, may play a role as anti-inflammatory agents in other cancer types such as breast cancer.

Keywords: Boron Compounds, IL-8, Chronic Inflammation, Breast cancer, NF κ B

2021, x + 103 pages

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi'ndeki akademik yaşantım boyunca tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Doktor Öğretim Üyesi Burcu Erbaykent TEPEDELEN'e en içten ve derin teşekkürlerimi sunarım. Akademik açıdan deneyimlerini benimle paylaşarak yüksek lisans öğrenimim boyunca bana yol gösterip başarılı bir akademik çalışma elde etmemi sağlamıştır. Akıl hocam ve danışmanım olarak ona sonsuza dek minnettar kalacağım.

Ayrıca tez çalışmalarımda bana yardımcı olan laboratuvar arkadaşlarım yüksek lisans öğrencisi Yusuf YAY ve İrem ÇOKSEVER'e teşekkür ediyorum.

Son olarak, aileme, özellikle annem Gülçin DEMİR ve eşim Gizem Nur OKAN'a bana sonsuz sevgi ve destek sağladıkları için büyük bir teşekkürü borç biliyorum. Ailem sayesinde, akademik hayatım boyunca gerekli olan motivasyona sahip oldum. Ayrıca yıllar boyunca gösterdikleri destek için Kapsam Health Products'a teşekkür ederim.

Erdoğan İlker OKAN
.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.1.1. Normal histoloji ve anatomi.....	3
2.1.2. Meme kanseri risk faktörleri.....	4
2.1.3. Meme kanserinde moleküler değişiklikler.....	6
2.1.4. Meme kanserinin histolojik sınıflandırması.....	10
2.2. Kanser ve Enflamasyon.....	13
2.2.1. Lökositler ve karsinom gelişimi.....	15
2.2.2. Adaptif bağışıklık ve karsinom gelişimi.....	16
2.2.3. Meme kanserlerinde STAT-3 yolağı.....	19
2.2.4. Meme kanserinde NFκB yolağı.....	20
2.2.5. Meme kanserinde enflamatuvar araçlar.....	25
2.3. Kanser ve Eser Elementler.....	31
2.3.1. Bor elementinin genel özellikleri.....	31
2.3.2. Bor elementinin insan sağlığına etkisi.....	32
2.3.3. Bor ve kanser araştırmaları.....	36
2.3.4. Bor ve kanser tedavisi.....	42
3. MATERYAL VE METOT.....	44
3.1. Kullanılan Materyaller.....	44
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	44
3.1.2. Hücre hattı.....	46
3.1.3. Kullanılan malzemeler.....	46
3.1.4. Kullanılan cihazlar.....	47
3.2. Yöntemler.....	48
3.2.1. Sterilizasyon.....	48
3.2.2. Kullanılan solüsyon ve tamponların hazırlanması.....	48
3.3. Hücre kültürü.....	55
3.3.4. MTT analizleri (sitotoksosite).....	56
3.3.5. İmmünoblotlama analizleri (Western-blot).....	57
3.3.6. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR.....	61
4. BULGULAR.....	64
4.1. Sitotoksosite Sonuçları.....	64
4.2. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları.....	67
4.2.1. BA ve ETD 67'nin sitokin salınımına etkisi.....	67
4.2.2. BA ve ETD 67'nin NFκB sinyal yolağına etkisi.....	70
4.2.3. BA ve ETD 67'nin MAPK yolağına etkisi.....	73
4.2.4. BA ve ETD 67'nin JAK/STAT3 yolağına etkisi.....	76
4.3. Western Blot Sonuçları.....	78
4.3.1. NFκB ve IκBα yolağı sonuçları.....	78

4.3.2. IKK- α ve IKK- β yolağı sonuçları	81
5. TARTIŞMA	84
KAYNAKLAR	944
ÖZGEÇMİŞ	1033



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
mL	Mililitre
μ l	Mikrolitre
mM	Milimolar
M	Molar
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
AP	Aktivatör Protein
B	Bor
BA	Borik Asit
BAFF	B-hücre Aktive Edici Faktör
BRCA	Meme Kanseri
CAM	Hücre adhezyon molekülleri
CD	Katepsin D
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
CRP	C-reaktif protein
DCIS	Duktal Karsinom
DMEM	Hücre kültürü besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksid
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Ekstra Selüler Matriks
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER	Östrojen Reseptörü
ETD-67	Etidot 67
FcR	Fc Reseptörü
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IC ₅₀	Yarı Maksimum İnhibitör
I κ B	İnhibitör kappa B
IDO	İdolamin 2,3 Deoksijenaz
IL	İnterlokin
INF	İnterferon
JAK	Janus Kinaz
MCF-7	Meme Kanseri Hücre Hattı

M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MCM	Minikromozom idame proteini
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMP	Matris Metalloproteinazlar
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-4,5 dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NFκB	Nükleer Faktör kappa B (Transkripsiyon faktörü)
P38 MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PGR	Progesteron
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfat
PR	Progesteron reseptörü
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SC	Baskılayıcı Hücreler
SP	Spesifik Protein
TAM	Tümör ilişkili Makrofa
TAN	Tümör ilişkili Nötrofil
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör- α
TP53	Tümör Protein 53
Treg	T Düzenleyici Hücre
UPS	Ubikitin-proteozom sistemi
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. İnsan meme bezi A) Kanallar, alveoller ve yağ dokusu B) Normal bir kanalın (üst) ve duktal karsinomun (alt) kesiti.....	3
Şekil 2.2. Meme kanserinin anatomik ve histolojik kökenleri.....	4
Şekil 2.3. Meme kanserinde invazyon ve migrasyon ile ilişkili yollar	9
Şekil 2.4. Tümörle ilişkili iltihaplanmanın anahtar düzenleyicileri TAM ve TAN'lar. (IDO, idolamine2,3 deoksijenaz; M-CSF makrofaj koloni uyarıcı faktör; EGF, epidermal büyüme faktörü; Treg, düzenleyici T hücresi; IFN, interferon)	14
Şekil 2.5. Kanser gelişimi esnasında adaptif lökositlerin zıt yönleri (CTL, sitotoksik T lenfosit; FcR, Fc reseptörü; INF, interferon; SC, baskılayıcı hücreler; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü)	17
Şekil 2.6. Akut enflamasyon ve kronik enflamasyon karşı sonuçlarını gösteren model	18
Şekil 2.7. NFκB alt birimleri ve oluşturdıkları dimerler RHD, Rel domain bölgesi; GGG, Glisince zengin bölge; Ank, Ankrin tekrarları; TAD, Transaktivasyon bölgesi.....	21
Şekil 2.8. Kanonik ve kanonik olmayan NFκB Yolu. Kanonik yol, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık reseptörlerinin aracılık ettiği sinyaller de dahil olmak üzere çok sayıda sinyal tarafından tetiklenir. Tak1, IKK aracılı IκBα fosforilasyonu ve ardından bozunma ile IKK kompleksinin aktivasyonunu içerir, bu da prototipik NFκB heterodimer RelA/p50'nin hızlı ve geçici nükleer translokasyonu ile sonuçlanır. Kanonik olmayan NFκB yolu, bir TNFR üyeleri alt kümesinden sinyal göndererek tetiklenen fosforilasyon kaynaklı p100'ün işlenmesine dayanır. Bu yol, NIK ve IKKα'ya bağlıdır, ancak trimerik IKK kompleksine bağlı değildir ve RelB/p52 kompleksinin kalıcı aktivasyonuna aracılık eder.	23
Şekil 2.9. Genotoksik stres ile uyarılan NFκB Yolu.....	24
Şekil 2.10. Bor elementi.....	32
Şekil 2.11. Doğal (inorganik ve organik) bor içeren bileşiklerin onaylanmış biyolojik aktiviteleri.....	35
Şekil 2.12. Çeşitli anti-kanser etkiye sahip doğal ve sentetik bor bileşiklerinin genel kimyasal yapıları	43
Şekil 4.1. BA'in hücre canlılığına etkisi	65
Şekil 4.2. ETD 67'nin hücre canlılığına etkisi.....	66
Şekil 4.3. IL6 gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi	68
Şekil 4.4. IL-8 gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi.....	68
Şekil 4.5. IL1- α gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi.....	69
Şekil 4.6. IL1β gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi.....	70
Şekil 4.7. BA ve ETD 67'nin NFκB p50 gen ekspresyonu üzerine etkisi	71
Şekil 4.8. BA ve ETD 67'nin NFκB p65 gen ekspresyonu üzerine etkisi	72
Şekil 4.9. Borik asit ve ETD 67'nin IκB-α gen ekspresyonu üzerine etkisi	73
Şekil 4.10. BA ve ETD 67'nin MAPK14 gen ekspresyonu üzerine etkisi	74
Şekil 4.11. BA ve ETD 67'nin MAPK3 gen ekspresyonu üzerine etkisi	75
Şekil 4.12. BA ve ETD 67'nin MAPK8 gen ekspresyonu üzerine etkisi	75
Şekil 4.13. BA ve ETD 67'nin JUN gen ekspresyonu üzerine etkisi	76
Şekil 4.14. BA ve ETD 67'nin JAK gen ekspresyonu üzerine etkisi	77

Şekil 4.15. BA ve ETD 67'nin TP53 gen ekspresyonu üzerine etkisi	77
Şekil 4.16. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen NF κ B sinyal yolağı ile ilgili proteinlerin seviyesi	78
Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen NF κ B ve pNF κ B ^(Ser536) (p65) proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri.....	79
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKK- α ve pIKK- α ^(Ser32) proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri	80
Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKK- α , IKK- β ve PARP proteinlerinin seviyesi	81
Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKK- α ve IKK- β proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri.....	81
Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen PARP proteininin kat cinsinden elde edilen değişimleri	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Meme kanserinde yaş ve insidans arasındaki ilişki	5
Çizelge 2.2. İyi huylu meme hastalıklarının meme kanseri riskine etkisi	6
Çizelge 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri	11
Çizelge 2.4. Meme kanseri sınıflandırması	12
Çizelge 2.5. Meme kanserinde rol oynayan interlökinlerin ana fonksiyonları ve kaynak hücreleri	27
Çizelge 3.1. Borik Asit (BA) ve Etidot-67 (ETD 67) Moleküler ağırlıkları	48
Çizelge 3.2. Ön Ayırma Jeli bileşenleri	54
Çizelge 3.3. Ayırma Jeli Bileşenleri	54



1. GİRİŞ

Kanser; yaşam ortamında karşılaşılan ve/veya hücrelerde meydana gelen fiziksel veya biyolojik faktörlere bağlı olarak hücre ölüm programının kesintiye uğraması ve kontrolsüz bölünen hücrelerin aşırı çoğalması sonucu ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Gelişmiş ülkelerde görülen en sık üç kanser türü erkeklerde akciğer, kolon ve prostat, kadınlarda ise meme, kolon ve akciğer kanseridir (Rashid ve ark. 2017). Kanser apoptoz, kontrolsüz hücre proliferasyonu, metastaz ve anjiyogenezle sonuçlanan ardışık genetik ve epigenetik değişikliklerin bir sonucudur (Batra ve ark. 2018). Kanser; başlangıcında ve gelişmesinde çeşitli faktörlerin rol oynadığı, günümüz dünya çağının başlıca halk sorunlarından biridir ve kanser hücreleri diğer hücrelerde kolonileştikçe tedavisi giderek zorlaşır ve yaygın organ yetmezliğine neden olabilir. Genetik ve iç/dış faktörler meme kanseri gibi birçok kanserin ortaya çıkması ve gelişmesi üzerinde etkili olan önemli ajanlar olabilir. Bu hastalık için farklı boyutların ve sebeplerin değerlendirilmesi, kanser patogenezinde rol oynayan çeşitli faktörlerin daha iyi anlaşılmasına yol açmıştır. Bu faktörler meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin önlenmesine ve daha iyi tedavisine yardımcı olabilir (Banikazemi ve ark. 2018). Meme kanseri 161 ülkede kadınlar arasında en yaygın kanserdir ve kemik metastazı hastalığın nüksetmesinin en yaygın bölgesi olarak sunulur (Brook ve ark. 2018). Son teknoloji yeni tedavi yöntemleri sayesinde her ne kadar meme kanseri ölüm oranları azalmış olsa da metastatik meme kanseri halen daha 98 ülkede kadınlar arasında en yaygın ölüm nedeni olarak devam etmektedir. Meme kanseri moleküler ve patolojik özelliklere dayalı birkaç alt tipe bölünmüş heterojen bir hastalıktır (Baker ve ark. 2018). Tedavisi ve teşhisi östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) ve HER2 ekspresyonuna dayalı olarak alt sınıflara ayrılmaktadır. En agresif alt tipi, sınırlı tedavi seçenekleri ve kötü prognozu olan üçlü negatif meme kanseridir. Üçlü negatif meme kanserlerinin yaklaşık %70'inde yüksek saldırganlık görülür ve hedefe yönelik tam bir tedavinin olmamasından dolayı tam bir patolojik yanıt elde edilemez. Son yıllarda kanserden kaçınma ile mücadele için ameliyat, hormon tedavisi, kemoterapi ve radyasyon tedavisi dahil olmak üzere çeşitli stratejiler uygulanmaktadır. Meme kanserinin tercih edilen tedavisi cerrahi ve ardından da radyasyon terapisi (Cabre ve ark. 2018). Ek olarak çoğu hasta adjuvan kemoterapi veya hormon tedavisi alır.

Enflamasyon birçok kanserin gelişmesinde ana faktörlerden biri olarak bilinir (Banikazemi ve ark. 2018). Kanser gelişiminin altında yatan moleküler ve hücrel mekanizmalara ilişkin son bilgiler, bağışıklık hücrelerinin kanser gelişimini ve ilerlemesini işlevsel olarak düzenlediğini ortaya çıkarmıştır. Dahası, biriken klinik ve deneysel veriler, gelişen bir göğüs neoplazmasına karşı bir bağışıklık tepkisinin sonucunun, büyük ölçüde ortaya çıkan bağışıklık tepkisi tipi tarafından belirlendiğini göstermektedir. Aslında, tümörlerin içinde ve çevresinde bir bağışıklık sisteminin varlığı uzun süredir bilinse bile; bu büyük ölçüde bağışıklık sisteminin tümörle savaşmasına atfedilmiştir. Aksine, deneysel kanıtlar kanserle ilişkili iltihaplanmanın tümörjenez ve ilerlemeyi teşvik ettiğini göstermiştir (Dvorak 1986).

Yapılan çalışmalar borun enflamatuvar yanıtın regülasyonunda önemli bir rolü olabileceğini söylemektedir (Soriano-Ursua ve ark. 2014). Borun enflamasyon sürecinde, artan enzimatik aktiviteleri azaltacak bir represyon sinyali olarak fonksiyon gösterdiği ve başta kanser dahil olmak suretiyle enflamatuvar hastalıklara yakalanma riskini azalttığı düşünülmektedir (Scorei ve ark 2011). Enflamatuvar süreçleri inhibe etmek veya enflamasyonu ortadan kaldırmak, kanserin baskılanmasında ve tedavi stratejisinde mantıklı bir rolü temsil etmektedir.

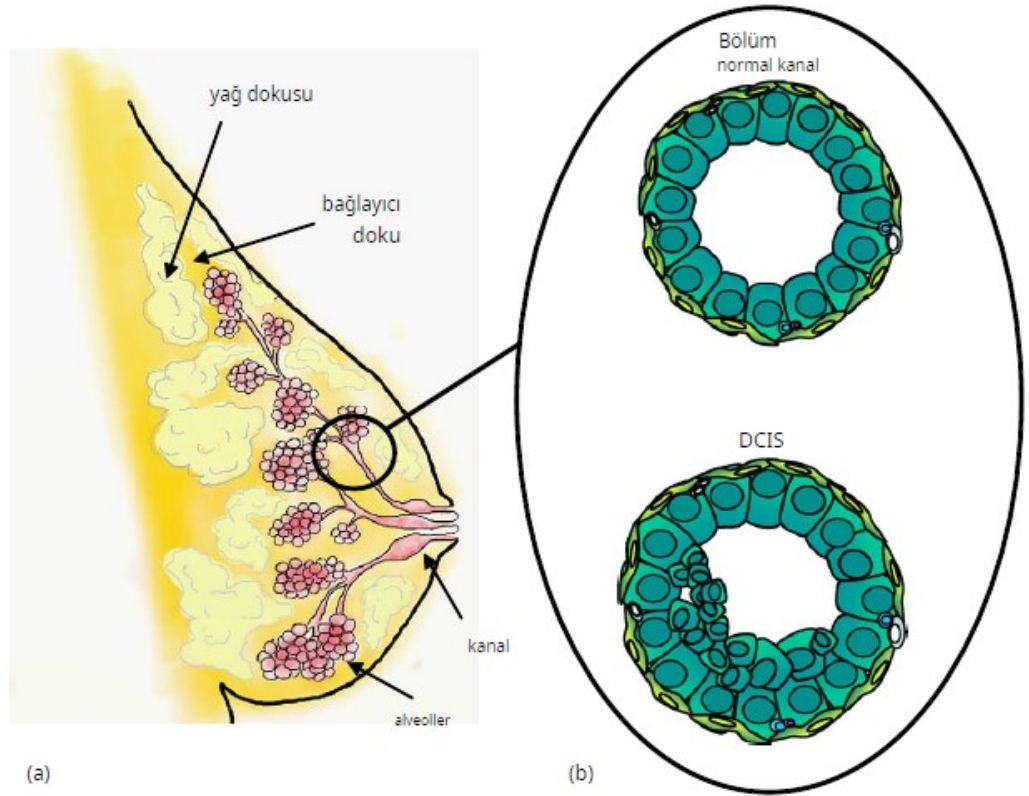
Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında bor bileşiklerinin anti-enflamatuvar özelliklerinden yola çıkarak meme kanseri gelişiminde rol oynadığı düşünülen enflamasyon da fonksiyon gösteren gen ve proteinlerin bor bileşikleri varlığında nasıl bir değişime uğradığını araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda MCF-7 hücre hattı uygun koşullarda büyütülmüş daha sonrasında ise MTT deneyleri ile bu hücrelere uygulanacak borik asit (BA) ve Etidot 67 (ETD 67) bileşiklerinin sitotoksikite 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 qRT-PCR ve western blot analizleri ile NFκB sinyal yolağı başta olmak üzere enflamasyon ile ilişkili olan hedef gen ve proteinlerin seviyelerindeki değişimler incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

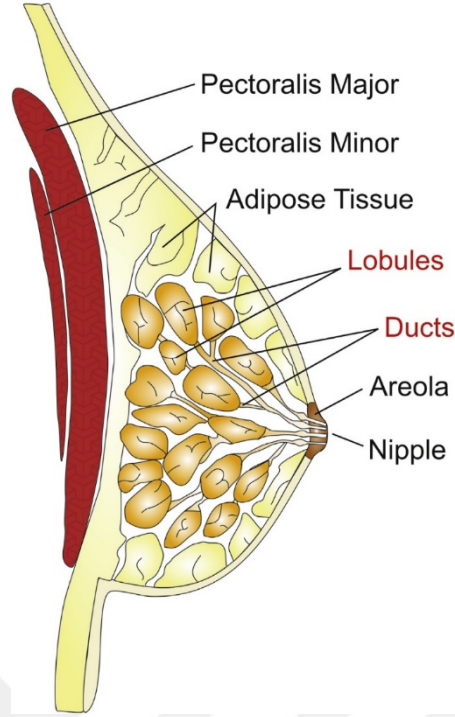
2.1. Meme Kanseri

2.1.1. Normal histoloji ve anatomi

Meme veya meme bezi, memelilerin tanımlayıcı özelliğidir. İlkel meme bezleri embriyoda gelişir ve doğumdan sonra vücut büyümesiyle orantılı olarak gelişim gösterir. Pubertede, steroid hormonlarına yanıt olarak bez, duktal ağacın büyümesi ve yağ yastığının sınırlarına kadar dallanması ile hızlı bir genişlemeye uğrar (Şekil 2.1.) (Caffarel ve ark. 2011).



Şekil 2.1. İnsan meme bezi A) Kanallar, alveoller ve yağ dokusu B) Normal bir kanalın (üst) ve duktal karsinomun (alt) kesiti (Caffarel ve ark. 2011)



Şekil 2.2. Meme kanserinin anatomik ve histolojik kökenleri (Caffarel ve ark. 2011).

Çoğu meme kanseri, memenin lobüllerinden veya kanallarından kaynaklanır (Şekil 2.2.). Bazı durumlarda, tümör, pectoralis kasları gibi göğüs duvarının deri veya bileşenlerini infiltrate eder. Tümör hücreleri ayrıca büyümelerini ve genişlemelerini desteklemek için mikro-ortamı tümör dostu bir duruma dönüştürebilir (Caffarel ve ark. 2011).

2.1.2. Meme kanseri risk faktörleri

Sağlıklı meme hücrelerinin kanser hücrelerine dönüşümünü etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Yaş ve cinsiyet, genetik yatkınlık, beslenme tarzı, çevresel etmenler, hormonlar, varlığı bilinen iyi huylu meme hastalıkları bu faktörler arasında sayılabilir (Haallaa ve ark. 2017).

Yaş ve Cinsiyet

Meme kanserinin kadınlarda erkeklere göre 100 kat daha fazla görülmesi cinsiyetin meme kanseri için ana risk faktörü olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca 55 yaş ve üzeri

kadınlarda teşhisi daha sık olduğundan yaşlanmanın da meme kanseri insidansını artırdığı belirlenmiştir (Feng ve ark. 2018).

Çizelge 2.1. Meme kanserinde yaş ve insidans arasındaki ilişki (Eroles ve ark. 2012)

Yaş	100000'de insidans
0-39	1
40-44	126
50-54	228
60-64	348
70-74	450
80-84	477

Genetik Yatkınlık

Ailesinde meme kanseri öyküsü olan kadınlarda kansere yakalanma riskinin 2 kat arttığı belirlenmiş ve çoğu meme kanseri hastasında edinilmiş mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Meme kanserlerinin % 10'u aileden gelen mutasyonların varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Kamel ve ark. 2016).

Beslenme Tarzı

Fazla kilolu olan kişilerde kandaki insülin seviyelerinin artışına bağlı olarak meme kanseri de dahil olmak üzere belirli kanser türlerinde artış söz konusudur. Ayrıca kadınlarda menopoz sonrası artan yağ dokusu östrojen seviyelerini arttırarak meme kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. Bununla birlikte alkol tüketim miktarının meme kanserini doğru orantılı bir şekilde arttırdığı da tespit edilmiştir (Feng ve ark. 2018).

Hormonal Faktörler

Meme kanseri görülme riski, ergenlik ve erişkinlik dönemlerinde vücutta salgılanan östrojen, prolaktin, progesteron ve insülin hormonlarının ekspresyonundaki artışa bağlı olarak artmaktadır. Bu durum, subklinik tümör hücrelerinde büyüme ve genişlemeyi

etkileyen risk altındaki hücre popülasyonunun artmasıyla açıklanabilir (Haallaa ve ark. 2017).

İyi Huylu Meme Hastalıkları

İyi huylu meme neoplazisinde tümör baskılayıcı genler inaktive olabilir, heterozigotluk kaybı meydana gelebilir ve bu nedenle kanser gelişme riski artabilmektedir. Ayrıca hücre proliferasyonunda meydana gelen anormal artış meme kanseri riskini de arttırmaktadır (Haallaa ve ark. 2017).

Çizelge 2.2. İyi huylu meme hastalıklarının meme kanseri riskine etkisi (Yixiao ve ark. 2018)

Benign meme hastalığı	Risk Artışı
Non-proliferatif meme hastalığı (<i>fibrokistik değişiklik, duktal ektazi, benign filloid tümör, papillom, yağ nekrozu, mastit, lipom, hamartom, nörofibrom, basit fibroadenom</i>)	Risk artışı yok ya da çok hafif artış
Atipisiz proliferatif meme hastalığı (<i>duktal hiperplazi, kompleks fibroadenom, sklerozan adenozis, papillamatozis, radial skar</i>)	1,5-2 kat artış
Atipili proliferatif meme hastalığı (<i>atipik duktal hiperplazi, atipi lobüler hiperplazi</i>)	4-6 kat artış
Karsinoma in-situ (<i>LKİS, DKİS</i>)	8-10 artış

2.1.3. Meme kanserinde moleküler değişiklikler

BRCA-1 ve BRCA-2 Genleri

Meme kanseri gelişiminde rol oynayan BRCA-1 ve BRCA-2 genleri DNA hasarının onarımında ve genomik kararlılığın korunmasında aktif rol oynayan tümör baskılayıcı genlerdir. Bu genler, mutasyon sonucunda işlevsel özelliklerini kaybederek olması gereken fonksiyonlarının aksine hareket ederek kanser oluşumuna sebep olan birer faktör haline gelmektedir. Bu şekilde mutasyonlu genlere sahip bireylerde kanser oluşma riski 15-20 kat daha fazladır (Caffarel ve ark. 2011).

TP53 Geni

TP53 geni, hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde hücreyi apoptoza sürükleyen veya hücre siklusunun durmasına etki eden bir tümör supresör genidir. Çoğu kanser tipinde en sık mutasyona uğrayan gen olmakla birlikte bu genin invaziv erken evre meme kanserlerinde % 30-35, tüm meme kanseri olgularında % 30 ve üçlü negatif meme kanserlerinde % 80 mutasyona uğradığı tespit edilmiştir (Çapanoğlu ve Bakar 2018).

HER2 (c-erB2) Geni

Meme karsinomlarının % 20'sinde yüksek seviyelerde eksprese olan HER2 genine rastlanmaktadır. HER2/neu olarak bilinen c-erB2 onkogeni 17'nci kromozomda bulunur ve HER2 glikoproteininin sentezlenmesinden sorumludur. Sağlıklı meme epitelinde normal seviyelerde bulunan HER2 geninin ekspresyonu bazı onkojenik transformasyonlar sonucu artmakta ve meme kanseri olgularında artmış HER2 ekspresyonuyla sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu durum kötü prognoz ve sağ kalım oranlarının azalmasıyla ilişkilendirilmektedir (Çapanoğlu ve Bakar 2018).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

EGFR, tümör hücrelerinde büyümeyi uyaran, apoptoz inhibisyonu, proliferasyon, anjiyogenez ve hücre sağ kalımı gibi süreçlerde önemli rollere sahip bir hücresel membran reseptörüdür. Meme kanseri olgularının yarısında EGFR'nin aşırı üretimine rastlanmaktadır ve bu durum sağ kalım üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır (Çapanoğlu ve Bakar 2018).

PI3K/AKT Yolağı

Hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, sağ kalım, hücre büyümesi ve proliferasyondan sorumlu olan PI3K/AKT yolunun meme kanserlerinin % 70'inde mutasyona uğradığı belirlenmiştir. PI3K, hücre dışı sinyallere yanıt oluşturarak PIP3 oluşumunu katalize eder. PIP3 hücresel işlevlere sahip ikincil habercidir (Caffarel ve ark. 2011).

Ki67 Proteini

Ki67, hücre döngüsünün G0 fazı dışındaki tüm fazlarında eksprese olan nükleer bir proteindir. Aynı zamanda meme kanserinde tümör büyüme oranını belirlemek için kullanılan bir belirteçtir. Ki67 açısından pozitif olan hücrelerde çoğunlukla kötü prognozdan söz edilmektedir. HER2 ve hormon reseptörleriyle birlikte değerlendirildiğinde, erken evrede tedavi için biyobelirteç görevi görürlerken meme kanserinin alt sınıflara ayrılmasına da olanak sağlarlar (Kamaruzman ve ark. 2019).

Katepsin-D

Meme kanseri ve birçok kanser türünde yüksek düzeylerde eksprese edilen lizozomal aspartik proteaz olan katepsin-D (CD) apoptoz için anahtar bir mediyatördür. CD, meme dokusunun gelişimi ve yeniden biçimlenmesinde önemli rollere sahiptir. CD düzeyi yüksek kanser hücrelerinde kötü prognoz riski artmaktadır. Kanser hücrelerindeki invazyon, hücre göçü ve proliferasyonun CD ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Duncan ve ark. 2013).

PCNA Proteini

Hücre proliferasyonu için önemli bir protein olan PCNA, DNA'nın bir bileşenidir ve genom bütünlüğünün korunması, hücre döngüsünün kontrolü, DNA eksizyon onarımı, kromatin birleşmesi ve RNA transkripsiyonu gibi birçok önemli göreve sahiptir. PCNA, hücre döngüsünün S ve G2 fazlarında yüksek oranda eksprese olurken, durgun hücrelerde seviyesi düşmektedir. Bu nedenle meme kanseri hücrelerinde immunohistokimyasal olarak belirlenen PCNA, meme kanserinin teşhisinde ve prognozunda kullanılmaktadır (Jurikova ve ark. 2016).

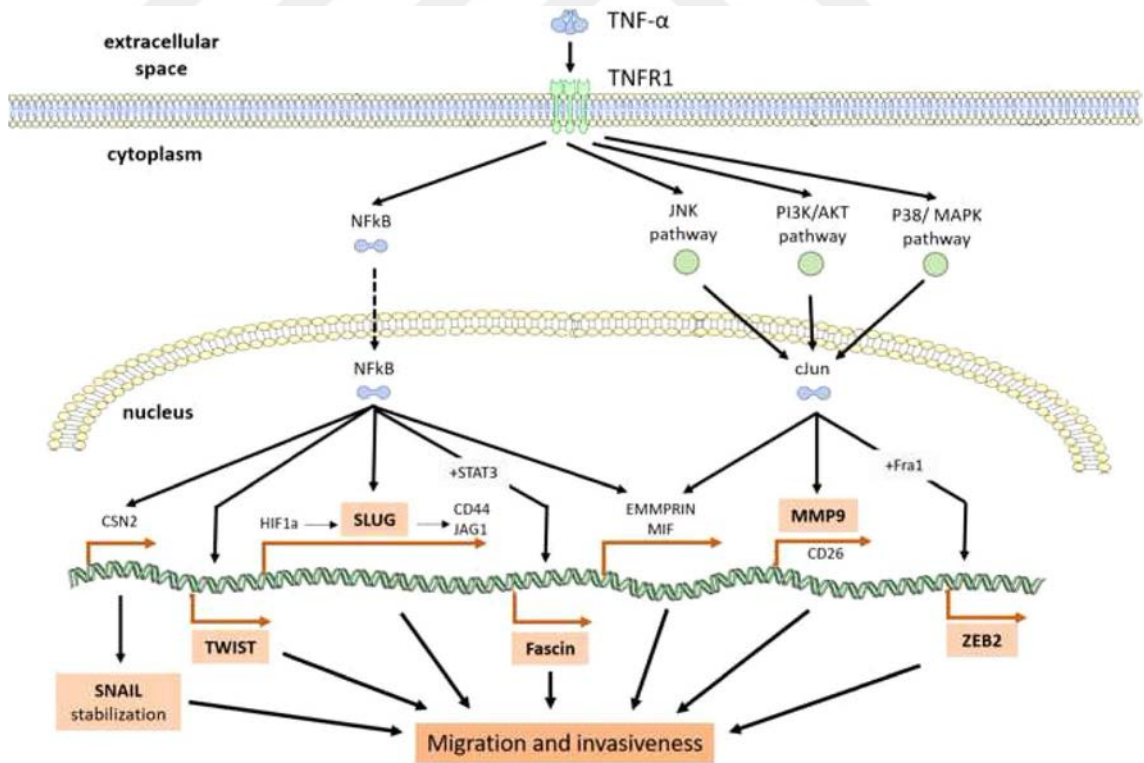
MCM Proteinleri

MCM2-7'yi kapsayan minikromozom idame proteinlerinin DNA replikasyonu ve genom stabilitesi dışında kanser başlangıcı ve ilerlemesinde rol oynadığı belirlenmiştir. MCM2 meme kanseri tanısında önemli bir prognostik belirteçtir. Yapılan bir çalışmada

MCM4'ün yüksek seviyelerde eksprese edilmesinin meme kanseri hastalarında kanser ilerlemesi ve daha kısa sağ kalım ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Çapanoğlu ve Bakar 2018).

NFκB Yolağı

Enflamasyon; kanser, diyabet ve nörolojik hastalıklar dahil olmak üzere kronik birçok hastalığa sebep olan oksidatif stres tarafından indüklenebilir. NFκB gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri bu durumla aktive olabilir (İnce ve ark. 2017). NFκB; TNF-α tarafından aktive edilen hücre göçünü ve istilasını teşvik etmede en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir. Hücrenin TNF-α ile stimülasyonu üzerine, NFκB kompleksi çekirdekte aktive olur ve burada TWIST ve SNAIL ailesi üyeleri dahil olmak üzere bu süreçlerde yer alan çeşitli proteinlerle etkileşime girer. TNF-α ile aktifleşen NFκB TWIST1 ifadesini artırır. NFκB-TWIST1 yolağının, meme kanseri hücre hatlarında hem göçü hem de istilayı indüklediği bulunmuştur (Şekil 2.3.) (Cruceriu ve ark. 2019).



Şekil 2.3. Meme kanserinde invazyon ve migrasyon ile ilişkili yollar (Cruceriu ve ark. 2019)

TNF- α JNK, PI3K/AKT ve p38/ MAPK yolaklarının aktivasyonunu ve dolayısıyla cJun ve NF κ B transkripsiyon faktörlerini tetikler. NF κ B'nin çekirdeğe translokasyonu, TWIST'in transkripsiyonunu aktive eder, SLUG, Fascin ve diğer proteinlerin yanı sıra SNAIL stabilizasyonunu sağlar, böylece meme kanseri hücrelerinde istilacı bir fenotip indüklenir (Şekil 2.3.) (Liu ve ark. 2018).

2.1.4. Meme kanserinin histolojik sınıflandırması

Meme kanserleri oluşum yerlerine göre lobüler (göğüs lobüllerinde yerleşik) ve duktal (göğüs kanallarında) olarak sınıflandırılmaktadır (Velloso ve ark. 2017). Patolojik özellikler ve invaziv kriterler dikkate alındığında non-invaziv (in situ), invaziv ve metastatik meme kanserleri olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır (Feng ve ark. 2018).

In Situ Meme Kanseri

Henüz kanal dışına çıkmamış bu evre meme kanserinin en erken evresidir ve tümör hücreleri kanal dışında bulunmadığı için başka bir hücre ya da organa yayılma söz konusu değildir. Yerinde duktal karsinom (DCIS) olarak da bilinmektedir (Kamel ve ark. 2017).

İnvaziv Meme Kanseri

Bu tür kanserlerde tümör hücreleri normal göğüs lobül ve kanallarının etrafına yayılarak göğüs stromal dokusuna doğru büyüme gerçekleştirirler. Bu kanserlere kadınlarda genellikle 55 yaş ve üzerinde rastlanmaktadır. Lenf düğümleri ve vücudun diğer bölgelerine yayılarak metastaz oluşturma eğilimindedirler (Kamel ve ark. 2017).

Metastatik Meme Kanseri

Dördüncü evre olarak da bilinen metastatik meme kanserleri vücudun diğer bölgelerine yayılmış geç evre kanserlerdir. Metastazlar koltuk altı lenf düğümleri, karaciğer, akciğer, kemik ve beyin gibi bölgelere olabilmektedir. Tümör çıkartıldıktan sonra dahi mikro tümör veya metastazlar vücutta kalarak kanserin tekrarlamasına ve yayılmasına neden

olmaktadır. Metastatik kanser teşhisi başlangıçta konulabildiği gibi sonraki aşamalarda da metastaz gelişebilir (Feng ve ark. 2018).

Çizelge 2.3. Meme kanserinin moleküler alt tipleri (Haallaa ve ark. 2017)

1. İN SİTU KARSİNOM	
İn situ lobüler karsinom	İn situ duktal karsinom
2. İNVAZİV KARSİNOM	
İnvaziv duktal karsinom	İnvaziv mikropapiller karsinom
İnvaziv lobüler karsinom	Apokrin karsinom
Tübüler karsinom	Sekretuar (juvenil) karsinom
İnvaziv kribriform karsinom	Adenoid kistik karsinom
Medüller karsinom	Metaplastik karsinom
Müsinöz karsinom	Nöroendokrin karsinom
İnvaziv papiller karsinom	İnflamatuvar karsinom

2.1.5. Meme kanserinin moleküler alt tipleri

Luminal A

Meme kanserlerinin % 50-60'lık kısmını oluşturan en yaygın alt tipidir. Memede lümen epitelinde bulunan östrojen reseptörü (ER) transkripsiyon faktörü aracılığıyla aktif olan genlerin ekspresyonuyla karakterizedir. Bu alt tipe sahip kanser hastalarının prognozu iyidir, relaps oranı % 27,8 olup hayatta kalma oranı daha yüksektir (Eroles ve ark. 2012, Feng ve ark. 2018).

Luminal B

Kadınlarda görülen meme kanserlerinin % 10-20'si gibi bir kısmını oluşturur. Luminal A'ya göre daha yüksek histolojik derece ve proliferatif indekse, daha kötü prognoza ve agresif fenotipe sahiptir. Hayatta kalma süresi daha düşüktür. Bu alt tipte tanı alan hastaların tedavileri Luminal A'ya göre daha zordur (Eroles ve ark. 2012, Feng ve ark. 2018).

HER2 Pozitif

Tüm meme kanserlerinin % 15-20'lik kısmını HER2 pozitif oluşturmaktadır. Bu kanserler hücre proliferasyonu ile ilişkili genlerin aşırı eksprese edilmesiyle karakterizedir. Bu alt tipteki kanserlerin % 75'i yüksek histolojik dereceye sahiptir, % 40'ından fazlasında p53 mutasyonu görülmektedir. Luminal A ve B ile kıyaslandığında daha yüksek yanıt oluşturarak diğer alt tiplere göre daha yüksek kemoterapötikiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Caffarel ve ark. 2011, Eroles ve ark. 2012).

Bazal Benzeri

Meme kanserlerinin % 10-20'si bu grupta yer almaktadır. Klinik olarak erken yaşlarda ortaya çıkmaları, büyük tümör boyutuna sahip olmaları, yüksek lenf düğümü etkilenmeleri ve yüksek histolojik derece ile karakterizedirler. Bu tip kanserlerin en önemli özelliklerinden biri anahtar reseptörler olan östrojen (ER), progesteron (PGR) ve HER2 ekspresyonunun olmamasıdır. Bu sebeple bazal benzeri ve üçlü negatif terimleri birbirini yerine kullanılmaktadır. Diğer tümör alt sınıflarına göre daha kötü prognoza, daha yüksek nüks oranına ve yüksek oranda p53 mutasyonuna sahiptirler. Ayrıca kalıtsal BRCA-1 mutasyonlarının bazal benzeri tümörlerin oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir (Caffarel ve ark. 2011, Eroles ve ark. 2012).

Çizelge 2.4. Meme kanseri sınıflandırması (Eroles ve ark. 2012)

İntrinsik Alt Tipler (GEP)	IHC Sınıflandırması (St.Gallen)	IHC/GEP'in Uyumu
Luminal A	'Luminal A' ER ve/veya PR pozitif HER2 negatif Ki67<14%	73%-100%
Luminal B	'Luminal B (HER2 negatif)' ER ve/veya PR pozitif HER2 negatif Ki67≥14% 'Luminal B (HER2 pozitif)' ER ve/veya PR pozitif Ki67 yok HER2 over-eksprese veya amplifiye	73%-100%
HER2	'HER2 pozitif (non-luminal)' HER2 over-eksprese veya amplifiye ER ve PR yok	41%-69%
Bazal	'Üçlü negatif' ER ve PR yok HER2 negatif	80%

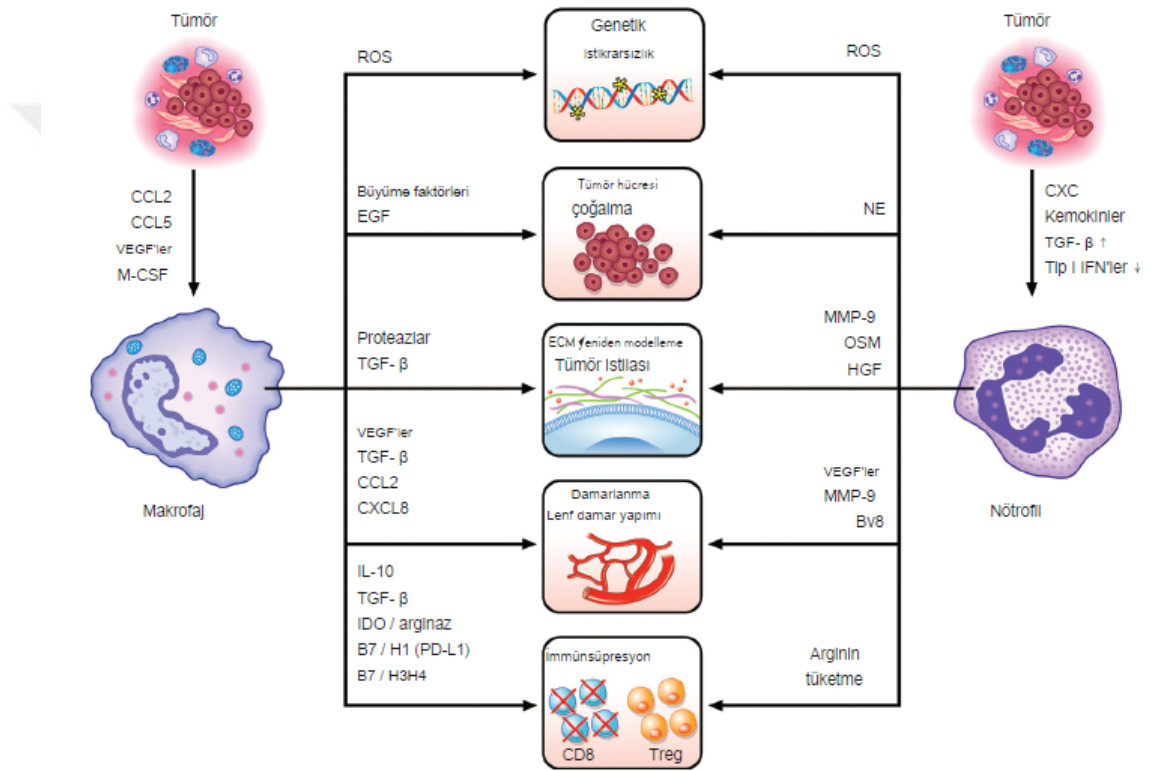
2.2. Kanser ve Enflamasyon

Enflamasyon birçok kanserin gelişmesinde ana faktörlerden biri olarak bilinir (Banikazemi ve ark. 2018). Kanser gelişiminin altında yatan moleküler ve hücresel mekanizmalara ilişkin son bilgiler, bağışıklık hücrelerinin kanser gelişimini ve ilerlemesini işlevsel olarak düzenlediğini ortaya çıkarmıştır. Dahası, biriken klinik ve deneysel veriler, gelişen bir göğüs neoplazmasına karşı bir bağışıklık tepkisinin sonucunun, büyük ölçüde ortaya çıkan bağışıklık tepkisi tipi tarafından belirlendiğini göstermektedir. Aslında, tümörlerin içinde ve çevresinde bir bağışıklık sisteminin varlığı uzun süredir bilinse bile; bu büyük ölçüde bağışıklık sisteminin tümörle savaşmasına atfedilmiştir. Aksine, deneysel kanıtlar kanserle ilişkili iltihaplanmanın tümörjenez ve ilerlemeyi teşvik ettiğini göstermiştir (Dvorak 1986).

Enflamasyon, enfeksiyöz ajanlar, çevresel uyarılar ve endojen irritanların neden olduğu doku hasarını onarmak için bir immün tepkidir. Akut enflamasyonu çözememe, iltihaplı doku mikro ortamında makrofajların ve lenfositlerin sürekli aktivasyonu ve proinflatuar sitokinler olan IL-1 β , IL-6, IL-17 ve TNF- α 'nın yükselmiş seviyeleri ile karakterize edilen kronik enflamasyona yol açar. Kronik kalıcı enflamasyon doku-mikro ortamdaki epitel hücreleri, stromal hücreler ve bağışıklık hücreleri arasındaki homeostatik etkileşimlerin çökmesine yol açar ve hücre dışı matris (ECM) bileşenlerinin birikimine neden olur (Kato 2018).

Kronik enflamasyon, yeni başlayan tümörlerin immün gözetimden kaçmasına izin veren iyi bilinen bir tümör etkinleştirme kabiliyetidir. Tümör ilişkili makrofajlar (TAM) ve tümör ilişkili nötrofiller (TAN) tümör mikro ortamının önemli bileşenleri olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.4.). Meme kanseri hastalarında yüksek TAM yoğunluğu, ileri hastalık evresi ve kötü hayatta kalma ile ilişkilendirilmektedir (Hanada ve ark. 2000). TAM'lar, meme kanseri hücre çoğalmasını indükleyen epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerinin üretimi yoluyla tümör hücre büyümesini teşvik eder (Pollard 2010). Ayrıca kanser hücrelerinin DNA hasarına ve genetik kararsızlığına katkıda bulunan yüksek reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretir (Bonavita ve ark. 2015) ve tümöre invaziv davranış kazandırıp ilerlemesini teşvik eder (Allavena ve Montovani 2012).

Ek olarak da immünosupresif moleküller (örn TGF-Beta, IL-10) üreterek tümörün bağışıklıktan kaçmasını sağlar (Granata ve ark. 2010). TAN'lar enflamatuvar meme karsinomu başlamasında önemli rol oynar. Nötrofilden türetilen reaktif oksijen ve nitrojen türevleri ile DNA nokta mutasyonlarına sebep olur ve genetik kararsızlığı teşvik eder (Güngör ve ark. 2010), VEGF üretimini artırır ve tümör invazivliğini teşvik eden onkostatin M'yi salgılar (Queen ve ark. 2005).



Şekil 2.4. Tümörle ilişkili iltihaplanmanın anahtar düzenleyicileri TAM ve TAN'lar. (IDO, idolamine2,3 deoksijenaz; M-CSF makrofa koloni uyarıcı faktör; EGF, epidermal büyüme faktörü; Treg, düzenleyici T hücresi; IFN, interferon) (Galdiero ve ark. 2018)

Enflamasyon, patojenlerle savaşmak, hasarı kontrol altına almak ve doku onarımını teşvik etmek için bir savunma mekanizması olarak çalışan atadan kalma bir fizyolojik tepkidir. Akut enflamasyonda bu reaksiyon kendi kendini sınırlar ve homestaziye yeniden oluşturmak için yeterlidir (Serhan 2010). Enflamatuvar yanıt kapatıldığında, doku yeniden şekillenmesi, yerel fizyolojik koşulları eski haline getirmek için optimize edilir. Bazı

durumlarda bu mekanizma bozulur ve kronik enflamasyon oluşur (Grivennikove ve ark. 2010).

Enflamatuvar moleküllerin üretimi ve toplanması göz önüne alındığında çözölmeyi engelleyen yeni oluşın tñmör vakasıdır. Kanserlerin yaklaşık %20'si kronik enflamasyonla indüklenir. Tñmörler çeşitli mekanizmalar yoluyla iltihaplanma reaksiyonlarına neden olabilir. Birincisi tñmör ve stromal hücrelerin; makrofajları ve nñtrofilleri tutan kemotaktik faktörleri serbest bırakmasıdır (Bonavita ve ark. 2015). Ek olarak tñmör normal dokuya fiziksel zarar verebilir ve granülositleri aktive eden hasara bağılı molekülleri serbest bırakabilir. Bu hücreler iltihaplı molekülleri salgılayarak enflamatuvar yanıtı güçlendirebilir. Ek olarak tñmör mikro ortamının asidikasyonu; istila, bağışıklıkta kaçma, artmış anjiyogenez ve tedaviye direnç gibi kanser saldırganlığı ile ilişkilendirilen temel özellikleri artırabilir (Granja ve ark. 2017). Sitolitik T lenfositleri içeren akut tñmöre yönelik immün yanıtlar tñmör gelişimine karşı koruma sağlarken, hümmoral immünitenin kronik aktivasyonu, Th2 hücrelerinin infiltrasyonunu ve promotör polarize doğuştan enflamatuvar hücrelerin dahil olduğı immün yanıtlar, tñmör gelişimi ve hastalığın artmasına neden olur (Denardo ve ark. 2007).

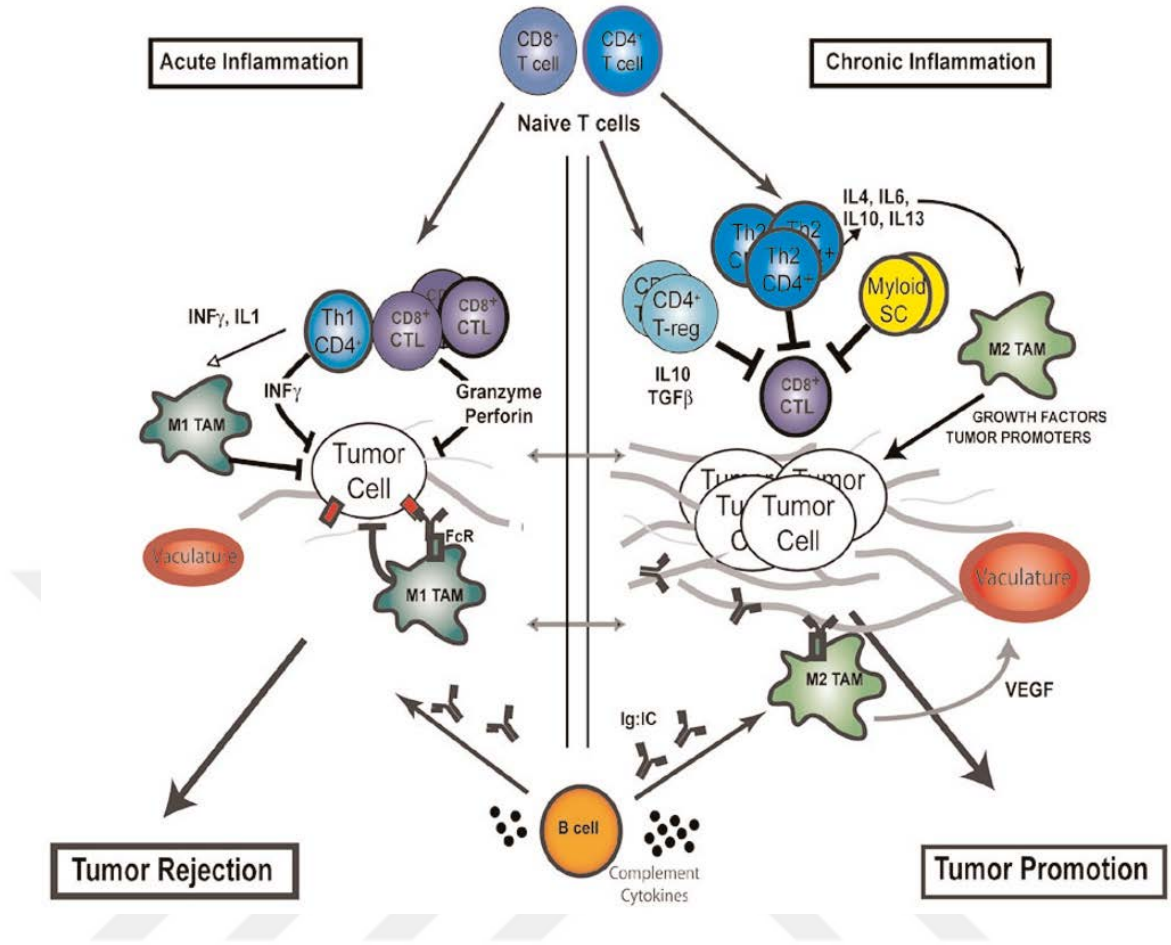
2.2.1. Lökositler ve karsinom gelişimi

Lökositler hem doğuştan gelen (myeloid) hem de adaptif (lenfoid) soylardan oluşın çok çeşitli immün hücreleri temsil eder. Makrofajlar, granülositler, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık hücreleri; patojenlere ve yabancı maddelere karşı ilk savunma hattını temsil eder. Doku homeostazı bozulduğunda, dokuda yerleşik makrofajlar ve mast hücreleri, dolaşımdan enflamasyonlu dokuya ek lñkositler toplayan sitokinler (IL-6 gibi), kemokinler, biyoaktif araçılar ve matriks yeniden modelleme proteinleri gibi çözünür faktörleri yerel olarak salgırlar. Efektör doğal bağışıklık hücreleri patojenik maddeleri doğrudan yerinde ortadan kaldırabilir. Aynı zamanda dendritik hücreler, tñmör antijenleri dahil yabancı antijenleri alır ve lenfoid organlara göç ederler. Antijenler tanındıktan sonra T ve B lenfosit gibi hücreler tñmör hücreleri dahil yabancı ajanlara adaptif bir yanıt oluşturmak için klonal genişlemeye uğrlarlar. Yabancı ajanlar ortadan kaldırıldıktan sonra iltihap düzelir ve doku homeostazı sağlanır (Denardo ve ark. 2007).

Bununla birlikte, bir immün reaksiyonu mümkün kılmak için gerekli olan enflamatuvar yanıtlar, tümör neoplazisini de teşvik edebilir. 1863 gibi erken bir tarihte Virchow, kanserin kronik enflamasyon bölgelerinde ortaya çıktığını ve enflamasyon bölgesinde bazı sitokin ve kemokinlerin de tümör proliferasyonu artırdığını keşfetti. Hücre proliferasyonu ve enflamasyon, ancak hareketli ajanlar çıkarıldıktan ve doku onarımı tamamlandıktan sonra biter. Aksi durumda hareketli ajanlar (tümör gibi) zamanla devam ederse, enflamatuvar hücreler ve bunların biyoreaktif olarak zengin ürünlerinin bulunduğu ortamda hücre proliferasyonunun ve ölümün sonsuz döngüsü tümör neoplazmasını ve progresyonunu artırır (Demardo ve ark. 2007).

2.2.2 Adaptif bağışıklık ve karsinom gelişimi

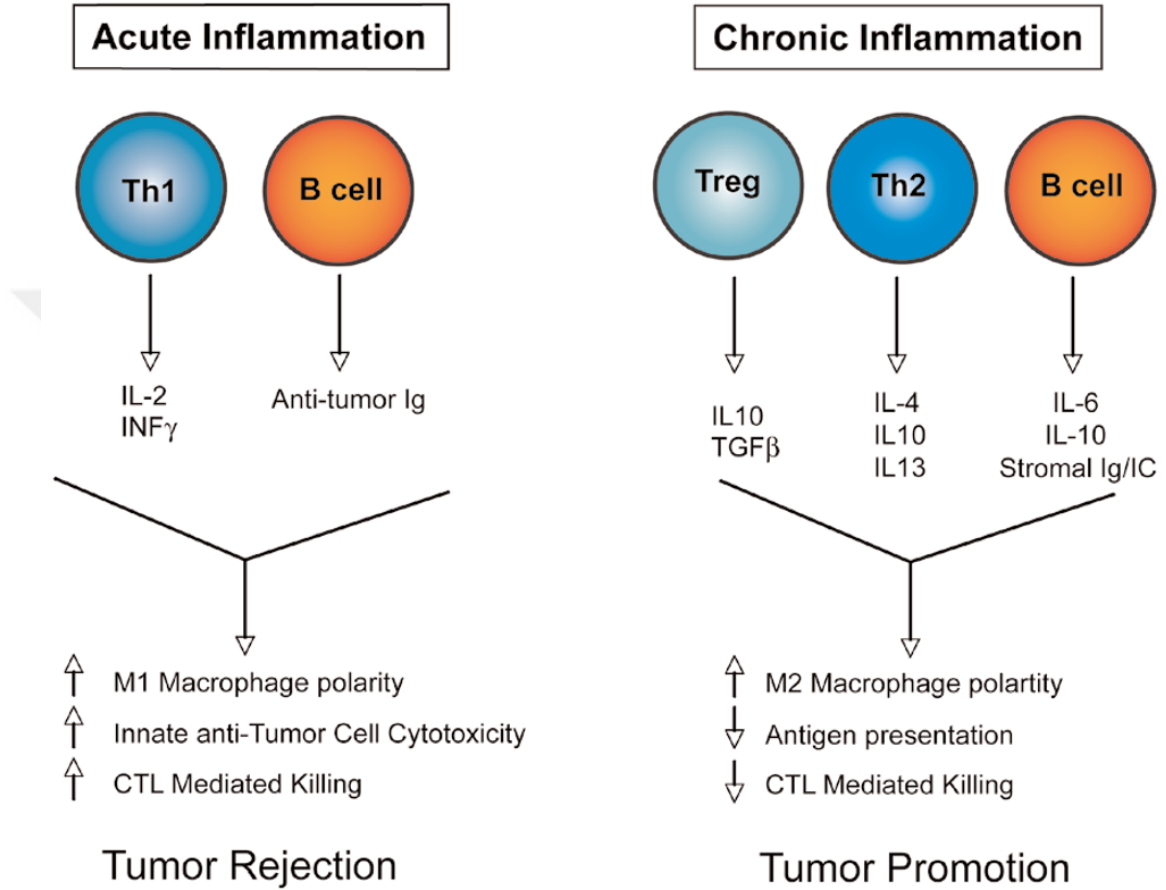
Lökositlerin, insan katı tümörlerinin çoğunun gelişimine katkı bulunduğunu gösteren büyüyen bir literatür ortaya çıkmıştır. Neoplastik stroma içindeki lökosit infiltrasyonları, meme tümör oluşumuna paralel olarak artar. B lenfositlerinin, antijene özgü immünoglobülin salgılaması yoluyla antikanser immün yanıtlarına katkıda bulunduğu kabul edilmektedir. B hücrelerinin akut aktivasyonunun erken neoplastik hücreleri yok etmede rol oynayacağı ve tümörün spontan gerilemesine yardım edeceği açıkken, son veriler ayrıca B hücrelerinin kronik aktivasyonun paradoksal olarak karsinom gelişimini güçlendirmede rol oynadığını göstermiştir. Kanser kanıtı olmayan sağlıklı hastalarla karşılaştırıldığında, meme kanseri hastalarının lenf düğümleri, çoğalan ve afinitesi artırılmış B lenfositlerinin zenginleştirilmiş popülasyonlarını içerir. İnvaziv meme kanserlerinin yaklaşık %20'si yüksek sayıda B hücresi içerir. Bu gözlemler meme kanserine özgü değildir, katı tümörlerin %70'i yüksek B hücresi popülasyonu içerir (Denardo ve ark. 2007).



Şekil 2.5. Kanser gelişimi esnasında adaptif lökositlerin zıt yönleri (CTL, sitotoksik T lenfosit; FcR, Fc reseptörü; INF, interferon; SC, baskılayıcı hücreler; VEGF, vasküler endotelial büyüme faktörü) (Deonardo ve ark. 2007)

Akut enflamatuvar yanıtlar sırasında (Şekil 2.5 sol panel), Th1 CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri doğrudan doğruya tümör hücresi sitotoksitesini düzenlerken, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerini tümör baskılamasına doğru polarize eder (Örneğin tümörle ilişkili makrofajların [TAM'lar] M1 polarizasyonu). B hücresi tarafından üretilen faktörler (immünoglobülinler ve tamamlayıcı), doğuştan gelen lökositlerin toplanmasını ve neoplastik hücrelerin hedeflenen yıkımını kolaylaştırır. Bununla birlikte kronik enflamasyon sırasında (Şekil 2.5 sağ panel), myeloid baskılayıcı hücreler, Th2 CD4⁺ T hücreleri ve düzenleyici T (T-reg) hücreleri hem CD8⁺ sitotoksiteyi bastırmak hem de doğuştan gelen bağışıklık yanıtının protümoral polarizasyonunu indüklemek için kombinasyon halinde işlev görür (Örneğin TAM'lar, sitokin salgısı [IL-4, IL-13, IL-10, IL-6] ve dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-B)) (Deonardo ve ark. 2007).

Kronik olarak aktive olan B hücreleri, immünoglobülin ve sitokin üretimi ile neoplastik stromada doğal hücrelerin birikmesini teşvik eder. Kronik iltihaplanma sırasında olduğu gibi polarize edildiğinde, bu doğal bağışıklık hücreleri zengin bir proanjiyojenik ve protümoral mikroçevre sağlar (Coussens ve ark. 2002).



Şekil 2.6. Akut enflamasyon ve kronik enflamasyon karşı sonuçlarını gösteren model (Deonardo ve ark. 2007)

Akut antitümör enflamatuar yanıtlar sırasında (Şekil 2.6 sol panel), Th-1 polarize T hücreleri, antitümör sitokinleri (örneğin IL-2 ve $INF\gamma$), antitümöre yönelik B hücresinden türetilmiş faktörlerle (immünoglobülinler gibi) kombinasyon halinde, toplanmış doğal immün hücrelerde ve tümör reddini destekleyen sitotoksik T lenfositlerde (CTL'ler) tümör inhibe edici tepkileri aktive eder. Bunun tersine bağışıklık tepkisinin çözülmeden kronik aktivasyonu (Şekil 2.6 sağ panel), genellikle düzenleyici T hücrelerinin (Treg), Th2 hücrelerinin ve aktif B hücrelerinin birikmesine neden olur ve bu da büyüme faktörlerini (IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 ve $TGF\beta$), immünoglobülinlerini

salgılatır. Bu olaylar promotör tepkilerini artırır ve CTL sitotoksitesini inaktive eder, böylece tümör gelişimini destekler (Coussens ve ark. 2002).

2.2.3. Meme kanserlerinde STAT-3 yolağı

Stat-3 transkripsiyon faktörü, meme kanserlerinin %70'inde uygunsuz bir şekilde aktive edilir ve hastalığın patogenezeine doğrudan katkıda bulunur. Bazal koşullarda STAT-3, sitoplazmada inaktif bir konformasyonda bulunur. Kritik bir tirozin kalıntısı olan tirozin 705 üzerinde, sitokin reseptörü ile ilişkili fosforilasyon ile aktive olur. Janus kinazlar (JAK) gibi tirozin kinazlar STAT-3 aktivasyonunu sağladıktan sonra STAT-3'ler çekirdeğe yer değiştiren aktif dimerler oluşturur ve hedef genlerin düzenleyici bölgesindeki aynı kökenli bağlanma bölgelerinde DNA'ya bağlanır. STAT-3 daha sonra proliferasyon, farklılaşma, göç, hayatta kalma ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan anahtar hedef genlerin (BCL-2, m-cyc gibi) ekspresyonunu düzenler. STAT-3 meme kanseri hücrelerin hayatta kalması için gerekli olduğundan STAT-3 inhibisyonunun yüksek bir terapötik etkisi olabilir. STAT-3'ü terapötik olarak inhibe etmek için kinaz inhibitörleri ve dimerizasyon antagonistleri dahil olmak üzere bir dizi yaklaşım benimsenmiştir ancak bunlar hedef dışı veya spesifik olmayan etkiler gösterir (Egusquiaguirre ve ark. 2018).

Hem intrinsik hem de ekstrinsik yollar tarafından uyarılan aktive tirozin kinazlar (JAK gibi), STAT3 fosforilasyonunu sağlar, bu da nükleusa translokasyon yapan fosforile STAT3 dimerleri oluşturur. STAT3, çoğalma, hayatta kalma, istila ve metastazı içeren çok sayıda genin düzenlenmesine ek olarak, kanseri teşvik eden iltihaplanma ile ilişkili IL-6 ve COX2 gibi birçok sitokin, kemokin ve diğer aracılardan ekspresyonunu indükler. Bu sitokinlerin, kemokinlerin ve aracılardan birçoğunun reseptörleri de STAT3'ü daha da aktive eder, böylece genetik programda ve kanser iltihabının teşvikinde kararlı bir değişikliklerle sonuçlanan otokrin ve parakrin ileri besleme döngüleri oluşturur (Yu ve ark. 2009).

2.2.4. Meme kanserinde NFκB yolağı

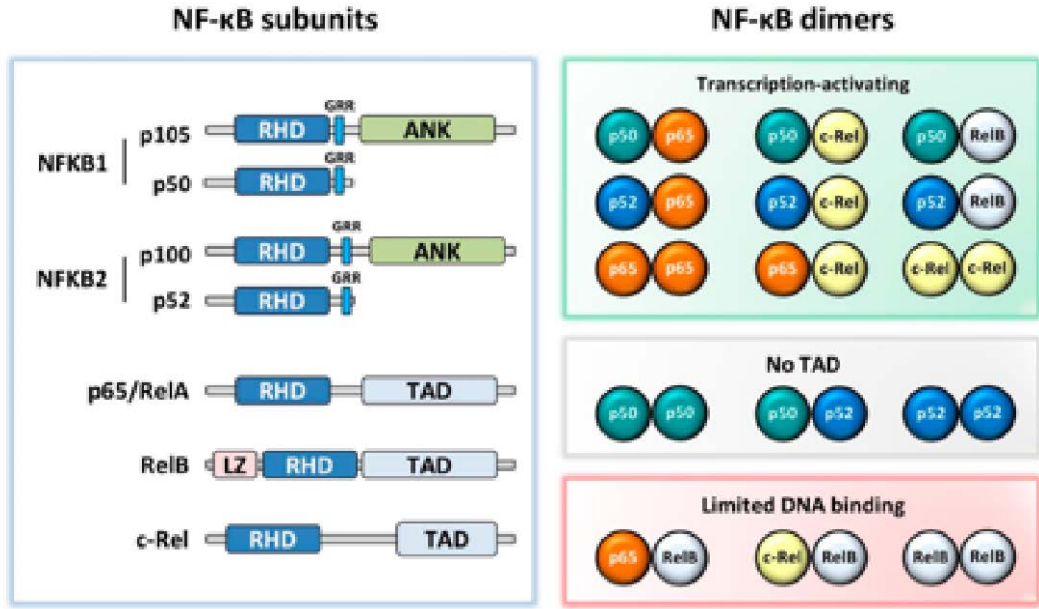
NFκB transkripsiyon faktörü, bir dizi önemli fizyolojik süreçte temel bir rol oynamaktadır. Çoğunlukla, bağışıklık sisteminin gelişimi, homeostazı ve aktivasyonundaki merkezi rolü için çalışılmasına rağmen, NFκB kas ve iskelet sistemlerinde de önemlidir ve epitel homeostazının önemli bir düzenleyicisidir. Hücresel düzeyde NFκB; hücre döngüsü, proliferasyon, hücre göçü ve hücre ölümünü düzenlemede önemli roller oynar ve yaşlanmada anahtar faktör olarak tanımlanmıştır (Christian ve ark. 2011, Hayden ve ark. 2012). NFκB 'nin bu fizyolojik işlevlerine, NFκB aktivitesinin genellikle düzensiz olduğu görülen hastalıkta eşit derecede önemli roller eşlik eder. Bu nedenle NFκB, oto bağışıklık ve ateroskleroz dahil enflamatuvar hastalıkta ve ayrıca kanser ve nörodejenerasyonda kritik bir patolojik rol oynar (Christian ve ark. 2011, Hamid ve ark. 2011).

NFκB, DNA'ya doğrudan bağlanarak birçok genin ekspresyonu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. TNF-α ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinler ve hormonlar gibi çeşitli uyarıcı moleküller tarafından aktive olan NFκB çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolağı olarak görev yapar (Concetti ve Wilson 2018, Şen ve ark. 2017). NFκB; B ve T lenfositleri, monositler, makrofajlar, keratinosit ve fibroblastlar tarafından eksprese edilip; sitokinler kemokinler, sitokin reseptörleri, stres proteinleri, büyüme faktörleri, adezyon molekülleri, immün düzenleyiciler gibi bağışıklıkta ve ayrıca hücre proliferasyonu ve apoptozda etkin olan çok sayıda genin uyarılabilir ekspresyonu için önemli bir düzenleyici proteindir. Bu nedenle NFκB sinyal yolağı enflamasyon ve kanser arasında anahtar bir bağlantı oluşturmaktadır (Christian ve ark. 2011, Concetti ve Wilson 2018).

NFκB alt birimleri

NFκB ailesi, memeli genomunda NFκB1 / p105, NFκB2 / p100, RelA / p65, RelB ve c-Rel olmak üzere beş alt birimden oluşan bir protein ailesidir. Bu alt birimler, hedef genin promotor bölgesine bağlanmak için homo veya heterodimerleri oluşturur. NFκB ailesinin tüm üyeleri, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içeren bir Rel homoloji alanı (RHD)

bulundurur. Homo veya heterodimerleri, diziye özgü DNA'ya bağlanır ve NFκB ailesi inhibitörlerinin (IκB ailesi) üyelerinde bulunan ankirin tekrar motifleriyle etkileşime girer (Khandia ve Munjal 2019).



Şekil 2.7. NFκB alt birimleri ve oluşturdukları dimerler RHD, Rel domain bölgesi; GGG, Glisince zengin bölge; Ank, Ankirin tekrarları; TAD, Transaktivasyon bölgesi) (Concetti ve Wilson 2018)

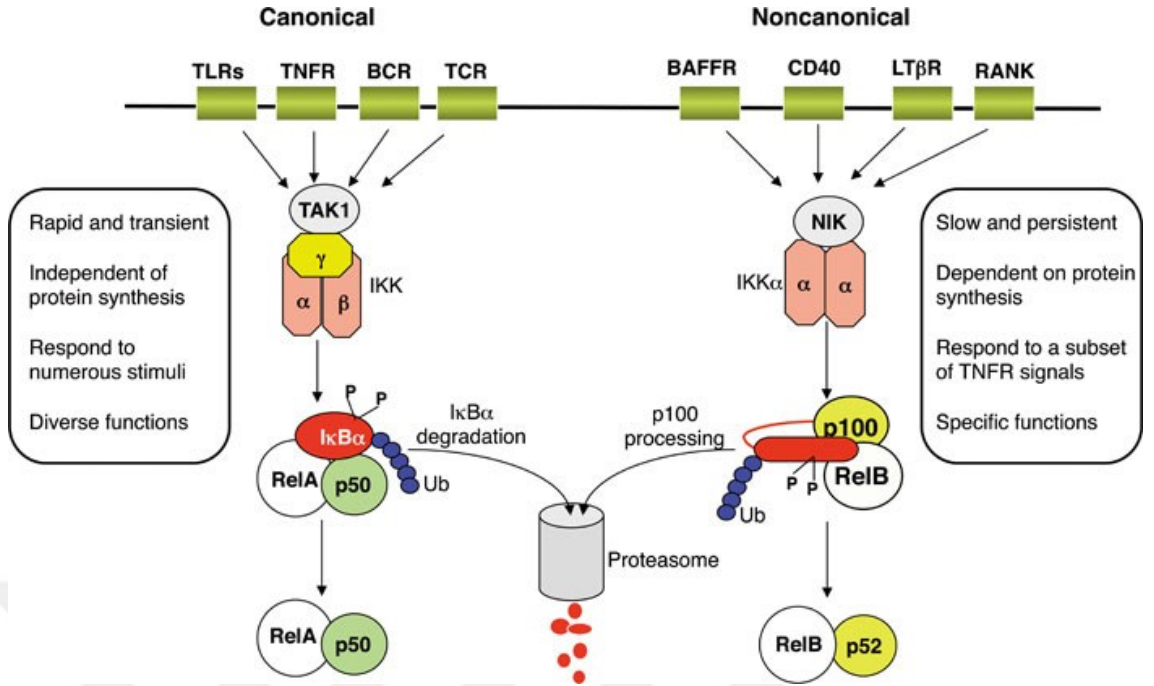
NFκB ailesi üyelerinin ortak bulundurduğu bölge, immünoglobülin benzeri tekrar bölgeleri içeren ve NFκB'nin DNA'ya bağlanmasını, alt birimlerle dimerizasyonunu ve çekirdeğe taşınımı sağlayan Rel-domain bölgesidir. Beş farklı alt birimden yalnızca iki alt birim (p50 ve p52) öncül moleküller olarak sentezlenir ve belirli işlemler sonucunda aktive olurlar. P50 alt birimi, öncüsü olan p105'in devamlı olarak proteolitik işlenmesi sonucu oluşurken; p52 alt birimi ise öncüsü olan p100'ün fosforilasyon ve ubiquitinasyonu sonucu oluşur. Her iki alt birim de transaktivasyon bölgesi (TAD) içermediği için transkripsiyonel açıdan inaktiftir. Bunun tersine RelA, RelB ve cRel alt birimleri hücrede öncül molekül olmadan sentezlenirler ve TAD bölgesi içerdikleri için hedef genlerin transkripsiyonunu başlatırlar. NFκB ailesi üyelerinin homo- ve heterodimerizasyonu ile Şekil 7'de gösterildiği gibi 15 farklı transkripsiyon faktörü oluşturabilmektedir (Concetti ve Wilson 2018).

NFκB'nin aktivasyonu

NFκB genellikle tümör gelişiminin hızlanmasına yol açan proinflamatuvar genlerin ekspresyonunu artırmak için aktive edilir (Khandia ve Munjal 2019). NFκB'nin aktive olabilmesi için alt birimlerin dimerizasyonu 3 farklı yolakla gerçekleşir. Bu yollar; geleneksel (kanonikal), alternatif (kanonikal olmayan) ve DNA hasarı durumunda devreye giren yollardır (Concetti ve Wilson 2018, Şen ve ark. 2017).

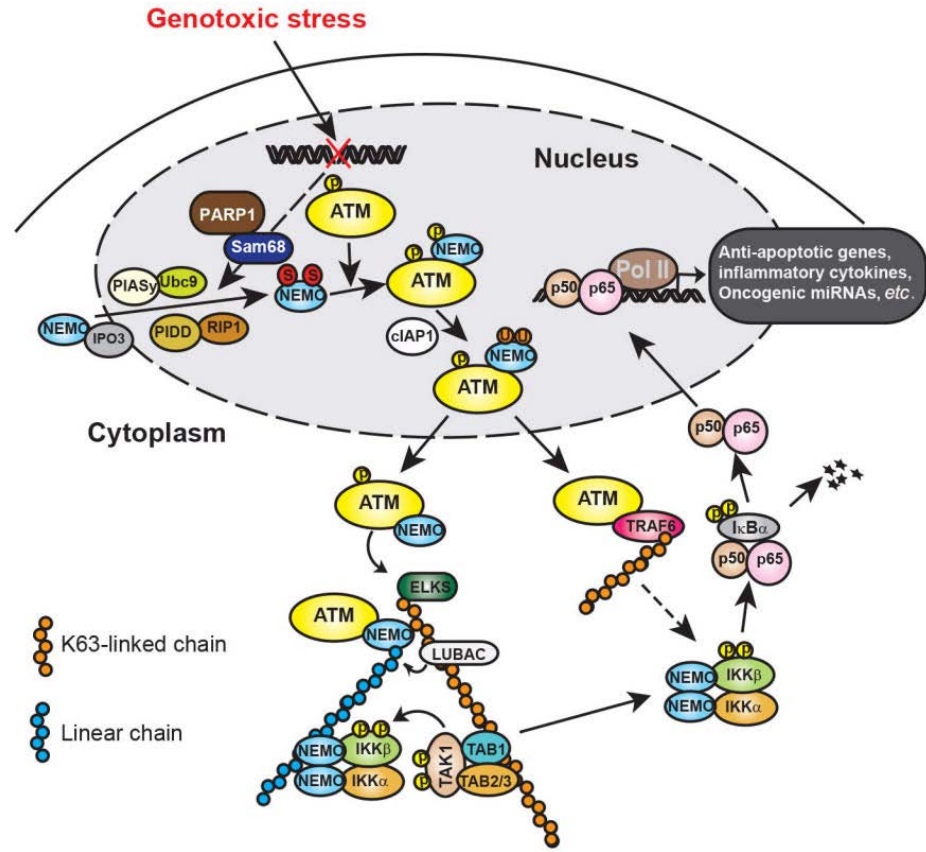
Geleneksel yolak (Şekil 2.8.), immün yanıtta enflamasyonun düzenlenmesi için lenfoid hücrelerin çoğalmasından ve yıkımından sorumludur. En sık görülen aktif formlardan biri olan p50/RelA (p65) dimeri bu yolakla oluşur. NFκB dimerleri (p50/RelA) dinlenme durumundayken IκB adı verilen inhibitör proteinlere bağlı olduğu için inaktif formdadır ve DNA'ya bağlanamaz. İnaktif formdaki bu dimerler, proenflamatuvar sitokinlerce (TNF-α, IL-1β vb.) veya LPS ile uyarılarak enflamatuvar uyarı sağlanır. Ardından dimerleri inaktif formda tutan IκB proteinleri inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi tarafından fosforillenir. Bu olay IκB'yi ubiquitinasyona hazır hale getirir ve ubiquitinasyondan sonra IκB'nin ubiquitin-proteazom sistemi ile degradasyonu gerçekleşir. Sitoplazmada IκB / NFκB kompleksinde serbest kalan NFκB (p50/RelA dimeri) nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe geçer (Christian ve ark. 2011, Concetti ve Wilson 2018, Sun 2011).

Geleneksel olmayan yolda (Şekil 2.8.), en sık görülen diğer bir aktif form p52/RelB dimeri aktive olur. Geleneksel olmayan yolak geleneksel yolağa göre daha yavaş bir kinetiğe sahiptir. Bu yüzden bu yolda görülen p52/RelB dimer aktivitesi geç gerçekleşir, ancak daha uzun süreli aktivasyon sağlanır. Sitoplazmada dinlenme durumunda inaktif formda bulunan p100/RelB dimeri, lenfotoksin β, B-hücre aktive edici faktör (BAFF) ve CD40 ligandları aracılığıyla uyarılır. p52 monomerinin öncülü olan p100, IKK homodimeri tarafından fosforile edilir. Bu fosforilasyon sonucunda p100'ün p52'ye dönüşümü gerçekleşir ve transkripsiyonel açıdan aktif olan p52/RelB dimeri serbest hale gelir ve nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe geçer (Christian ve ark. 2011, Concetti ve Wilson 2018, Sun 2011).



Şekil 2.8. Kanonik ve kanonik olmayan NFκB Yolu. Kanonik yol, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık reseptörlerinin aracılık ettiği sinyaller de dahil olmak üzere çok sayıda sinyal tarafından tetiklenir. Tak1, IKK aracılı IκBα fosforilasyonu ve ardından bozunma ile IKK kompleksinin aktivasyonunu içerir, bu da prototipik NFκB heterodimer RelA/p50'nin hızlı ve geçici nükleer translokasyonu ile sonuçlanır. Kanonik olmayan NFκB yolu, bir TNFR üyeleri alt kümesinden sinyal göndererek tetiklenen fosforilasyon kaynaklı p100'ün işlenmesine dayanır. Bu yol, NIK ve IKKα'ya bağlıdır, ancak trimerik IKK kompleksine bağlı değildir ve RelB/p52 kompleksinin kalıcı aktivasyonuna aracılık eder (Sun 2011).

DNA hasarı sonucu NFκB aktivasyonu ise; DNA hasarına karşı oluşan cevapta etkilidir. Bu yolda, kanonik ve kanonik olmayan yoldan farklı olarak IKK aktivitesine gerek yoktur. Özellikle DNA çift zincir kırık hasarıyla devreye giren bu yolağın iki paralel süreci vardır. İlk olarak PIDD adı verilen ve 'ölüm (death)' bölgesi içeren p53 ile uyarılan protein aktive olur ve çekirdeğe geçer. Çekirdekte bulunan IKK/NEMO'nun, bir çeşit kinaz olan RIP1 (Reseptörler etkileşen protein 1) ile birleşip kompleks oluşturması ve SUMO ve ubiquitin yoluyla modifikasyonu bu yolaktaki ilk süreci oluşturur. İkinci süreçte ise SUMO ve ubiquitin yoluyla modifiye edilen IKK/NEMO kompleksi sitozole geçer ve IKK'yi aktive ederek NF-κB aktivasyonunu sağlar (Şen ve ark. 2017, Wang ve ark. 2017).



Şekil 2.9. Genotoksik stres ile uyarılan NFκB Yolu (Wang ve ark. 2017)

NFκB'nin inhibisyonu

Aktive olup çekirdeğe geçen NFκB, transkripsiyon faktörü olarak görevini yaptıktan sonra tekrar sitozole geçer. Sitozolda dinlenim durumundayken NFκB ile etkileşen ve onun inhibe hale gelmesini sağlayan inhibitör kappa B (IκB) proteinleridir. IκB proteinlerinin NFκB ile protein-protein etkileşimleri IκB'nin yapısında bulunan ankran tekrarları sayesinde olur (Concetti ve Wilson 2018). IκB ailesi 7 üyeden oluşur (IκB, IκBα, IκBβ, IκBγ, IκB3, IκBz, IκB NS ve Bcl-3). IκBz, IκBNS ve Bcl-3 çekirdekte bulunurlar ve transkripsiyonu düzenlemek için NFκB ailesi üyeleriyle etkileşime girerler. IκB ailesinin kalan üyeleri ise sitoplazmada bulunurlar ve bunlar nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile etkileşime girerek NFκB ailesi üyelerinin çekirdeğin içine girişini engellerler. Bu şekilde NFκB transkripsiyon faktörleri, IκB ailesinin üyeleri tarafından transkripsiyonel olarak inaktif tutulur (Khandia ve Munjal 2019).

NFκB'nin regülasyonu

NFκB hedef genlerinin fonksiyonel doğası, düzensiz NFκB 'nin zararlı sonuçlarının ve NFκB aktivitesinin sıkı kontrolünün gerekliliğinin altında yatar. NFκB aktivitesini sınırlamanın birincil yolu, NFκB 'nin neden olduğu IκB ifadesini gerektiren bir negatif geri besleme döngüsüdür. Yeni sentezlenen IκB, çekirdeğe girer, NFκB'yi bağlar ve onu sitoplazmaya aktarır, böylece NFκB yönlendirmeli transkripsiyonu sonlandırır. NFκB alt birimlerinin ubiquitinasyon, asetilasyon, metilasyon, nitrosilasyon ve glikosilasyon ile modifikasyonu, çeşitli düzeylerde bildirilmiştir, ancak en çok dikkat çeken, NFκB'nin fosforilasyonudur. NFκB alt birimlerinin bölgeye özgü fosforilasyonu, diğer faktörlerle olan etkileşimleri ve NFκB dimerlerinin stabilitesini, bozunmasını ve transkripsiyon aktivitesini kontrol eder. Önemli olarak, belirli fosforilasyon olaylarının, gene özel bir tarzda NFκB transkripsiyonel aktivitenin seçici regülasyonuna katkıda bulunduğu da açık hale gelmektedir. NFκB alt birimlerinin fosforilasyonunun, basit bir açma / kapama anahtarı olarak hareket etmek yerine, hedef genlerin transkripsiyonunu artırabileceği veya azaltabileceği veya transkripsiyon yanıtlarını modüle edebileceği açıktır. P65'in fosforilasyonu, p65'in her yerde bulunmasını ve stabilitesini ve ayrıca protein protein etkileşimlerini etkileyen konformasyonel bir değişikliğe neden olur. P65'in transaktivasyon alanında (TAD) S536'da fosforilasyonu, artan CBP / p300 bağlanması ve p65'in K310'unda asetilasyon yoluyla gelişmiş transaktivasyona yol açar (Christian ve ark. 2016, Khandia ve Munjal 2019).

2.2.5. Meme kanserinde enflamatuvar araçlar

Enflamasyon, humoral (sitokinler) ve hücrel (lökositler, monositler ve makrofajlar) bileşenlerden oluşan karmaşık bir fenomendir. Enflamasyonu teşvik eden ve hastalığı daha da kötüleştiren sitokinlere proenflamatuvar sitokinler denir, diğer sitokinler ise enflamasyonu azaltmaya ve iyileşmeyi teşvik etmeye hizmet eder ve anti-enflamatuvar sitokinler olarak adlandırılır. Normal dokularda, anti-enflamatuvar sitokinler, proenflamatuvar sitokinler üretildikten sonra senkronize olarak yukarı regüle edilir ve bu da enflamasyonun çözülmesine yol açar (Hamid ve ark 2011). Bununla birlikte büyüme faktörleri, proenflamatuvar sitokinler, kemokinler, ROS ve RNS gibi bazı enflamatuvar

aracı molekülün yukarı regülasyonu kanserlerin ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır (Khandia ve Munjal 2019). Geçtiğimiz on yıllar boyunca, enflamasyonun tümör gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı kanıtlanırken, başlıca moleküler mekanizmaların çoğu şimdi ortaya çıkarılarak, meme kanseri başlangıcında, göçünde ve ilerlemesinde sitokinlerin ve özellikle interlökinlerin (IL'ler) kilit rolü vurgulanmıştır (Fasoulakis ve ark. 2018)

Kemokinler

Kemokinler, esas olarak bağışıklık hücreleri tarafından salgılanan küçük moleküllerdir, ancak vasküler endotel hücreler gibi immün olmayan hücreler de anjiyogenezi indüklemek için bunları üretebilir. Enflamasyon bölgesinde enflamatuar hücreler, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7 ve CXCL8 kemokinler tarafından toplanır. Kemokinler ve reseptörleri, tümör gelişimi ve metastaz sürecine dahil edilmiştir. Glutamik asit-lösin-arginin (veya kısaca ELR) motifine sahip kemokinler, esas olarak CXCR2'ye bağlanır ve anjiyojenik özelliklere sahiptir. CXCL1 veya CXCL8'in melanomlar durumunda aşırı ifade edildiği ve büyümenin yanı sıra metastazı artırma eğiliminde oldukları bulunmuştur (Khandia ve Munjal 2019).

Sitokinler

Sitokinler biyolojik özellikleri aracılığıyla enfeksiyonlar, hematopoez ve homeostazda önemli bir rol oynayan ve doku yenilenmesi, hücresel filizlenme ve büyümeyi kontrol ederek bulaşıcı hastalıklara ve hatta tümör oluşumuna karşı yanıtı kontrol eden çok işlevli rollere sahip olan biyomoleküllerdir. IL'ler, sitokinlerin süper ailesine ait olan ve sitokinler olarak karmaşık immünolojik fonksiyonlar sunan salgılayıcı immünomodülatör proteinlerdir. IL'lerin temel amacı, enflamatuar yanıtta hayati bir rol oynayan hücre göçü, proliferasyon, olgunlaşma ve yapışma dahil olmak üzere bağışıklık sisteminde hücreler arası iletişime aracılık etmektir. İnterlökinler hem akut hem de kronik enflamatuar yanıtlarda yer alır. Her seferinde belirli bir sinyal yolunu aktive ederek hücre yüzeyinde ifade edilen spesifik reseptörlerin uyarılmasına bir yanıt olarak hareket ederler. Bugüne kadar, her biri benzersiz bir reseptör tipine bağlanan, belirli bir kökene, yapıya ve

özelliklere sahip olan yaklaşık 38 farklı interlökin tanımlanmıştır, ancak birçoğunun mevcut olduğu ve meme kanserinin indüklenmesi ve yayılmasına katıldığı bildirilmektedir (Çizelge 2.5.) (Fasoulakis ve ark. 2018, Khandia ve Munjal 2019).

Çizelge 2.5. Meme kanserinde rol oynayan interlökinlerin ana fonksiyonları ve kaynak hücreleri (Fasoulakis ve ark. 2018)

İnterlökin	Kaynak hücre	Meme kanserinde ana işlevi ve etkisi
IL-1	Epitel hücreleri, Endotel Hücreleri, nötrofiller, mononükleer fagositler	Proenflamatuar sitokin, Th17 hücrelerinin indüksiyonu
IL-2	Th1-hücreleri	İmmün düzenleyici sitokin, NK hücrelerini ve monositleri aktive eder, B ve T lenfositler için ana büyüme faktörü
IL-4	Th2-hücresi, Mast hücreleri, bazofiller	Paraziter enfeksiyonların kontrolü, interlökin-1 inhibisyonu ile antiinflamatuvar etki, monositler tarafından TNF ve IL-6 üretimi, inhibisyon, Th17 yolunun aktivasyonu, antikor aracılı bağışıklık
IL-6	Makrofajlar, T hücreleri, fibroblastlar	Doku istilasını ve epitelden mezenkimale geçişi teşvik eder, Akut faz proteinlerinin uyarılması, B hücreler üzerinde etkiler, Th17 hücrelerinin indüksiyonu
IL-7	Stromal hücreler, timus	Tip 1 bağışıklık tepkisini indükler, CD8+ spesifik sitotoksisiteyi artırır, NK ve LAK hücrelerini indükler
IL-8	Makrofajlar, nötrofiller, endotelial hücreler, fibroblastlar	Nötrofil kemoatraktan ve aktivatörüdür
IL-10	B hücreleri, T hücreleri, monositler	Anjiyogenezi ve doku istilasını teşvik eder, Büyüme ve metastaz süspansiyonu mekanizmalarını inhibe eder.
IL-11	Fibroblastlar, kemik iliğinin stromal hücreleri	Hematopoetik büyüme faktörü, Kemik iliği hücrelerinin (makrofajlara farklılaşan) trombopoezi, büyümesini ve farklılaşmasını uyarır
IL-13	Th2 hücreleri, CD8+ T hücreleri, Mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller	Proinflamatuvar sitokinleri inhibe eder, makrofaj işlevini modüle eder, aktive edilmiş endotel yüzeyleri ile etkileşimi azaltır
IL-17	Th17 hücreleri	Hücre dışı patojenlerin kontrolü, TNF ve interlökin-1 ile sinerji, proinflamatuvar sitokin, matriks yıkımının indüksiyonu
IL-19	B hücreleri, monositler	Büyümeyi, çoğalmayı ve kanser ilerlemesini artırır
IL-21	Th17 hücreleri	Otokrin tarzında Th17 yolunun amplifikasyonu
IL-23	M1 dendritik hücreler, Th1 hücreleri, monositler	İltihabı teşvik eder, Th17 genişletme ve stabilizasyon
IL-32	Keratinositler	Proenflamatuar sitokin
IL-33	Th2 hücreleri, Mast hücreleri, Doğuştan yardımcı 2 hücreleri	Miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerin apoptozunu azaltır

İnterlökin-1 (IL-1)

İnterlökin-1 (IL-1), çeşitli biyolojik fonksiyonlarla karakterize edilen bir 17-20 kilodalton (kDa) sitokin grubunu temsil eder. Enflamatuar süreçlerin başlatılması ve ilerlemesi ile ilgili olan ana temsilcileri ise proenflamatuar sitokinler IL-1 α ve IL-1 β ile interlökin-1 reseptör antagonistidir (IL-1ra) (Fasoulakis ve ark. 2018).

İnterlökin 1 α (IL-1 α) ve IL-1 β , enflamatuar süreci aktive eden eşit derecede güçlü enflamatuar sitokinlerdir ve bunların düzensiz sinyalleşmeleri, şiddetli akut veya kronik enflamasyonla kendini gösteren yıkıcı hastalıklara neden olur (Di Paolo ve Shayakhmetov 2016, Lopez-Castejon ve Brough 2011). Birçok kanser türü, yüksek bir IL-1 ekspresyonu ortaya çıkarırken, virülan bir tümör fenotipi, yüksek IL-1 ekspresyonu ve kötü prognozlu birçok kanser türü ile ilişkilidir. IL-1 β ve NF κ B yolunun aktivasyonunu içeren olası bir otokrin yolunun var olduğundan şüphelenilmektedir. Metastatik meme kanseri hatları, mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) üzerinde etkili olan IL-1 β 'yı salgırlar. MKH'ler, tümör mikroçevresinde pro- veya anti-tümör aktivite sergileyerek kemotaksiyi ve hücre davranışının diğer parametrelerini etkileyen kemokinleri üretirler. Kemokinlerde meme neoplastik hücrelerinin metastatik-invaziv potansiyelini güçlü bir şekilde etkilerler. IL-1 yakındaki hücrelerin büyüme faktörleri ve anjiyojenik proteinler üretmesini sağlayarak matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi metastatik genlerin ekspresyonunu indükler ve böylece neovaskülarizasyon ve metastaz ile kanser gelişimini uyarır (Fasoulakis ve ark. 2018). Ek olarak yapılan birçok çalışmada da IL1'in meme kanseri gelişimi ve kemik metastazında fonksiyonel bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Filippi ve ark 2015, Holen ve ark 2016).

İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 (IL-6) vasküler endotel hücreleri ve mononükleer fagosit fibroblastları tarafından sentezlenen 26 kilodaltonluk bir sitokindir. IL-1 ve TNF α tarafından uyarılma sonucunda salgılanır ve esas olarak hepatositler ve B hücreleri üzerinde etkilidir. B lenfositlerin antikör üreten hücrelere farklılaşmasını sağlarken, hepatositlerden C-Reaktif protein (CRP) ve mannoz bağlayan lektin (MBL) gibi akut faz reaktanlarının salınımına

neden olur. Böylece enflamatuvar cevabın ortaya çıkmasını ve gelişmesini sağlar (Tanaka ve ark. 2014).

Enflamatuvar yanıtın ana indükleyicisi olan interlökin-6, kanserin patolojisinde ve anjiyogenezinde temel rolü taşır. Diğer bir deyişle IL6, kanser mikro ortamında düzensizleşen başlıca sitokinlerden biridir. Her ne kadar ekspresyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla sıkı bir şekilde kontrol edilse de, IL-6'nın düzensiz ve sürekli sentezi kronik enflamasyon ve otoimmünite üzerinde patolojik bir etki yaratır. IL-6 gen transkripsiyonunu düzenleyen NFκB, spesifik protein 1 (SP1), nükleer faktör IL-6 (NF-IL-6) (CAAT olarak da bilinir), aktivatör protein 1 (AP-1) ve interferon düzenleyici faktör 1 gibi bir dizi transkripsiyon faktörü gösterilmiştir (Tanaka ve ark. 2014). Aşırı ekspresyonu, çeşitli sinyal yollarının düzenlenmesi dahil olmak üzere tümör büyümesi için gerekli tüm temel fonksiyonlara hizmet etmenin yanı sıra çoğu tümör arasında bildirilmiştir. Ayrıca, kanser hücrelerini, sağkalım için sinyal verme, anti-apoptoz ve onarım süreçleri yoluyla kanser tedavisinin aracılık ettiği hasardan korumaktadır (Khandia ve Munjal 2019).

Renal, mesane, servikal ve meme hücre dizilerinden seçilen karsinom hücrelerinin potansiyel olarak IL-6 eksprese ettiği kanıtlanmıştır. IL-6, çok işlevli rolünü birçok yönden gösterir. Farklı tümörler tarafından salgılanır ve oto-parakrin bir neoplazm stimülasyonu modu ile proliferasyonu uyarır. IL-6, herhangi bir anti-apoptotik proteini yukarı regüle etme veya proanjiyogenik sitokinlerin kümelenmesini indüklemeye yeteneğine sahiptir. Ayrıca IL-6, hücre dizilerinde vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) üretimini tetikler (Fasoulakis ve ark. 2018) Bununla birlikte IL-6'nın p53 geninin promoter bölgesindeki CpG adalarının hipermetilasyonuna ve p53 fonksiyonunun kaybına neden olduğu da rapor edilmiştir (Khandia ve Munjal 2019). Kötü hayatta kalma oranı genellikle serum IL-6 seviyesi ile bağlantılı olmaktadır (Fasoulakis ve ark. 2018) Yapılan bir çalışmada insan IL-6 ve IL-6 çözünür reseptörü ile kültürlenmiş insan meme adenokarsinomu hücre dizisi MCF-7'nin büyümesinin sürdürülmesinden IL-6'nın sorumlu olduğu rapor edilmiştir (Jiang ve ark. 2011).

İnterlökin-8 (IL-8)

IL-8 / CXCL8, 99 amino asit uzunluğunda 8 kilodaltonluk bir proteindir ve IL-8'in biyolojik etkilerine, CXCR1 ve CXCR2 olarak adlandırılan iki hücre yüzeyi G proteinine bağlı reseptöre bağlanma yoluyla aracılık edilir. IL-8 yaygın olarak, makrofajlardan, epitelial hücrelerden, düz kas hücrelerinden ve endotelden gelen baskın sekresyonla, vücut boyunca eksprese edilir. Bağışıklıktaki rolü, nötrofilleri ve diğer hücre tiplerini CXCR1 ve CXCR2 yoluyla enflamasyon ve enfeksiyon bölgelerine çekmektir. IL-8, hücre içi kalsiyum artışı, ekzositozu, hücre içi depolama organellerinden enzim ve proteinlerin salınımı sağlayan bir nötrofil, kemoatraktan ve aktivatördür. IL-8, endotelial hücre proliferasyonu ve migrasyonunu modüle ederek tümörlerde potent bir anjiyojenik faktör olarak da etki eder (Todorović-Raković ve Milovanović 2013). IL-1 veya TNF- α 'ya maruz kaldıktan sonra, lökositler ve endotelial hücreler IL-8 üretir. Fibroblastlar ve habis tümör hücreleri ayrıca hipoksik koşullara veya kemoterapiye yanıt olarak IL-8 salgılar. Beyin, meme, servikal, kolon, mide, akciğer, melanom, yumurtalık, prostat, renal ve tiroid, Hodgkin lenfoması dahil olmak üzere çeşitli tümör türlerinde ekspresyonunun önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur ve tümör boyutu ve evresi ile pozitif korelasyonu bulunmaktadır. Daha yüksek IL-8 konsantrasyonuna sahip kanser hastaları, genellikle zayıf hayatta kalma oranı sergiler (Khandia ve Munjal 2019). IL-8 ER- meme kanserlerinde ifade edilirken, hem ER- hem de ER+ meme kanseri deneklerinde invazivliği ve metastatik potansiyeli arttırmaktadır (Fasoulakis ve ark. 2018).

Normalde IL-8 üretimi dış bir uyaran olmadığı durumlarda veya sağlıklı dokularda oldukça düşük seviyede tutulmaktadır. TNF- α ve IL-1 gibi pro-enflamatuvar sitokinler, bakteriyel ve viral ürünler ve hücresel stres gibi uyaranlar varlığında ise sinyal yolları transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel seviyede IL-8 ekspresyonunu hızlı bir şekilde aktive etmektedir (Hoffmann ve ark. 2002, Kim ve ark. 2005). TNF- α ve IL-1 gibi uyaranlar 100 kattan daha fazla IL-8 artışına yol açarken bakteri ve EGF gibi faktörler ise 5-10 kat arası IL-8 salınımına yol açmaktadır. Bu uyaranlar dışında hücre içi artan Ca^{+2} seviyesinin NF κ B nükleer translokasyonunu artırarak IL-8 ekspresyonunu uyardığı bulunmuştur (Kim ve ark. 2005). Maksimum IL-8 miktarı ise 3 farklı mekanizmanın kombinasyonu ile sağlanmaktadır: ilk olarak gen promotorunun derepresyonu (represör

genin inaktivasyonu), ikinci olarak NFκB ve JNK yolağı aracılığıyla genin transkripsiyonel aktivasyonu ve üçüncü olarak da p38 MAPK yolağı aracılığıyla mRNA stabilizasyonu. Bu şekilde hücreler salgılanan IL-8 miktarını hızlı bir şekilde artırabilmekte ve doku hasarının olduğu bölgelere lökosit saldırısının boyutunu da kontrol edebilmektedir (Hoffmann ve ark. 2002).

2.3. Kanser ve Eser Elementler

Doğal olarak oluşan bileşikler, yeni antikanser maddeler için potansiyel olarak zengin bir kaynak sınıfıdır. Doğal bileşikler düşük yan etkileri nedeniyle günümüzde kanser tedavisi için çok önemli bir potansiyel kaynaktır. Bunlar arasında en önemli adaylardan biri bor ve bor bileşikleridir (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020)

2.3.1 Bor elementinin genel özellikleri

Periyodik tabloda B sembolünde gösterilen, atom numarası 5 ve atom ağırlığı 10,81 olan bor elementi metal ile ametal arasında yarı iletken özelliktedir. Doğada doğal ve serbest halde bulunmayan bor elementinin doğada bulunan 230 kadar türü olduğu bilinmektedir (Helvacı ve ark. 2010).

Sindirim ve solunum yolu ile %100'e kadar bir oranda emilen bor ve bileşikleri vücuda alındıktan sonra borik asite ($B(OH)_3$) ve bir hayli az bir bölümü borat anyonlarına ($B(OH)_4^-$) dönüşmektedir. Homeostatik bir mekanizma ile kan ve dokularda uzun bir süre sabit bir düzeyde kalmakta ve bu homeostasis böbrek tarafından ayarlanmaktadır. Hayvanlarda ve insanlarda vücuda alınan borik asit parçalanmadan hızlı bir şekilde pasif difüzyon ile vücut sıvılarına yayılmaktadır. Emilen bor bileşiklerinin 24 saat ya da daha kısa sürede yarılanıp birkaç gün içerisinde % 90'dan fazlasının hızlı bir biçimde üriner yolla vücuttan atıldığı ispatlanmıştır. Dolayısıyla uzun yıllar yüksek doz bor etkisinde kalan bireylerin vücudunda bor birikimi gerçekleşmemektedir (Korkmaz ve ark. 2007). Bununla birlikte 2010 yılında bu araştırmanın yapıldığı aynı sahada 6,5 (SH 1.01) mg/günlük kronik bor maruziyetinde ve 2011 yılında bor işçilerindeki $14,45 \pm 6,57$ mg/günlük maruziyette seminal sıvıdaki bor miktarının kandaki seviyesine

göre daha yüksek olduğu bulunmuş ancak bu birikimin FSH, LH ve toplam testesteron seviyesine, sperm konsantrasyonuna ve morfolojisine herhangi bir yan etkisi olmadığı gözlenmiştir (Korkmaz ve ark. 2010, Duydu ve ark. 2011).



Şekil 2.10. Bor elementi

Bor bileşiklerinden etkilenen kanser türleri başlıca prostat kanseri, meme kanseri, rahim ağzı kanseri, akciğer kanseri ve melanomdur (Scorei ve ark. 2010). Umut vadeden yeni bir aday sınıfı bor ve türevleridir. Çalışmalar, borun insan ve hayvan embriyonik gelişimi, enerji substrat metabolizması, mineral metabolizması, hormon metabolizması, kemik yapısı ve işlevi, iltihaplanma ve diğer fizyolojik işlevlerde önemli bir düzenleyici rolü olduğunu göstermiştir. Bor, biyolojik olarak aktif faydalı bir gıda bileşenidir. Çeşitli yapı ve fonksiyonları ile biyokimyasal yolları destekler. Hayvanlar ve insanlar için esansiyel bir eser elementtir (Nielsen ve ark. 2011).

2.3.2 Bor elementinin insan sağlığına etkisi

Yerkabuğu, okyanuslar, yeraltı suları ve yüzey sularının tümü bor içerir. Bor konsantrasyonunun yüksek olduğu yerlerde (bor yataklarının yakınında) yaşayan insanlar, çevre (solunum ve deri yoluyla), yiyecek ve içecekler yoluyla bor ve bileşiklerine maruz kalmaktadır. Son zamanlarda “tolere edilebilir kronik alım/TCI” düzeyinde tüketildiğinde, insan sağlığı üzerinde yeni keşfedilen olumlu etkileri nedeniyle

esansiyel bir unsur olarak yeniden sınıflandırılması gerekmektedir. 70 kg'lık bir yetişkin için TCI limiti günde 28 mg bor'dur (Devirian ve ark. 2003).

Bor; meyvelerde, sebzelerde ve içme suyunda bulunan çoğu diyetin ortak bir bileşenidir. Bor bileşiklerinin etki mekanizması hakkında birtakım eksiklikler olmasına karşın, toksikolojik profilleri konusunda artan veriler insanlara güvenli bir biçimde uygulanabileceğini gösteren kanıtlar sunmaktadır.

Ayrıca insan ve hayvanlarda borun fazlası vücuttan dışarıya atılır. Fakat yüksek dozlarda borik asit alındığı zaman toksik etki gösterebilmektedir. DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) borun insan sağlığı için fizyolojik olarak yarar sağlayabileceğini rapor etmiştir. Deneysel insan çalışmaları borun yaşam döngüsü içerisinde metabolizmaya veya kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glukoz, trigliserid, reaktif oksijen ve östrojen süreçleri gibi ciddi hayatsal faaliyetlere etki edebileceğini göstermiştir. Çeşitli metabolik aktivitelere etki ettiği bilinen bor 1980 senesinde iz element olarak tanımlanmıştır (WHO 1998). Bugün, gün içinde toplam bor alımı dünya ülkeleri arasında farklılık göstermekte fakat Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından günlük güvenli ve sağlıklı bor alımının 1-13 mg arasında olması ve günlük alımın 28 mg/gün değerini çok fazla aşmaması gerektiği önerilmektedir. Dolayısıyla 1mg/gün'den daha az miktarlarda alımın borun optimum aktivitesi için yetersiz kaldığı ve 1mg'dan fazla alımların ise insan sağlığı için faydalı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (Breydo ve ark. 2013).

Deney hayvanlarında yapılan ve kısıtlı epidemiyolojik çalışmalarla desteklenen uygulamalarda, borun insan ve hayvanlar için pek çok faydalı etkisi olan bir biyoaktif mineral element olduğu gösterilmiştir (Nielsen ve Meacham 2011). Son senelerde özellikle bazı kanser türleri için; borun koruyucu, önleyici ve tedavi edici etkileri epidemiyolojik, hayvan ve laboratuvar çalışmalarıyla kanıtlanmıştır (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).

Yetişkinler için tek bir diyetinde bulunan bor miktarı 0,15 ila 0,40 mg olarak kaydedilmiştir. Bu miktarın yaklaşık % 20'si sebze, meyve ve meyve suyu ürünleri tarafından

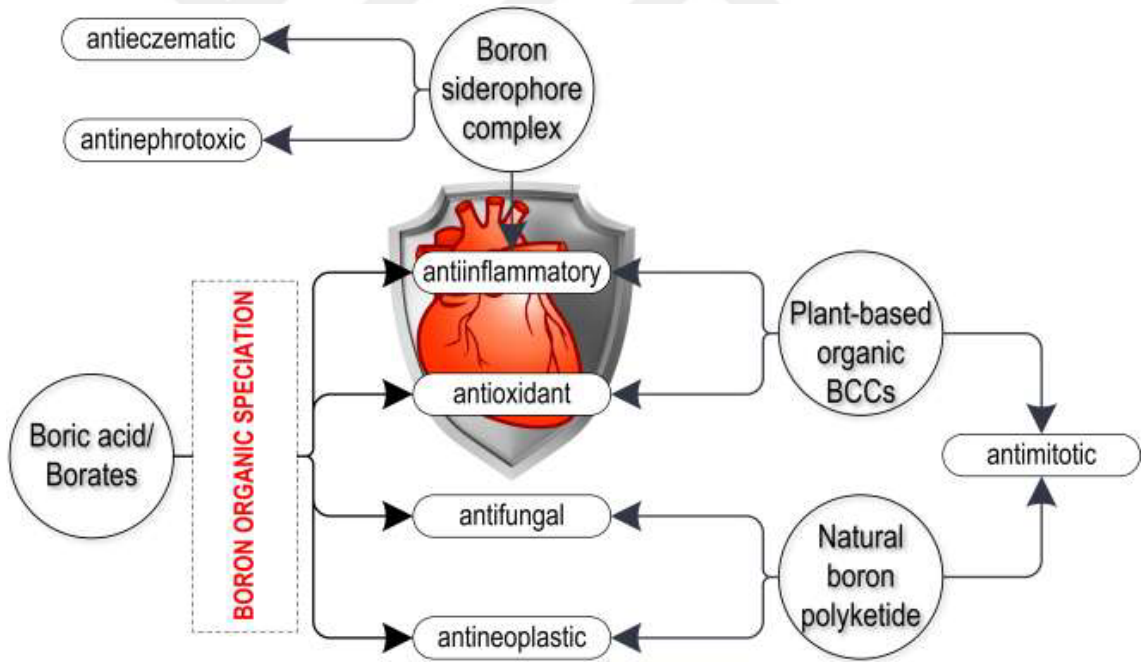
sağlanmaktadır (Hunt ve ark. 2005). Bor; hayvanların başta D vitamini olmak üzere vitaminlerin ve minerallerin metabolizmasında rol oynamaktadır (İnce ve ark. 2014). Bor; magnezyum, D vitamini ve kalsiyum ile ilişkilidir. Kemik metabolizmasında da önemli görevlere sahiptir. Yapılan çalışmalarda bor yoksunluğu sonucu oluşan kemik yapısı ve oluşumundaki değişikliklerin, kemik gücünü etkilediği gibi ve osteoporoz riskini de artırdığı düşünülmektedir, dolayısı ile kalsiyum fruktoboratın osteoporoz tedavisinde iyi bir adjuvan olabileceği sonucuna varılmıştır. Ek olarak 1mg/gün'den yüksek bor alınımlı eklem iltihabı derecesini ve riskini azaltmaktadır (Nielsen ve Meacham 2011, Scorei 2011).

Bor kadınlarda menopoz sonrası steroid hormonların düzenlenmesinde de görev alır ve antioksidan özelliğe sahiptir. Menopoz sonrası osteoporoz görülen kadınların serumlarındaki kalsitonin seviyeleri diğer insanlara göre daha yüksek seviyede bulunmaktadır ve serumda kalsitonin seviyelerinin yüksek olması kalsiyum atılımını artırmaktadır. Bor günlük olarak yeterli miktarda alındığında serumdaki kalsitonin seviyesi düşmekte ve buna bağlı olarak da kalsiyum kaybı azalmaktadır. Borun mikronütrient metabolizmasını olumlu yönde etkilemesi ve bunun yanında serumdaki kalsitonin seviyesini düşürmesi borun osteoporoz oluşumunun önlenmesinde çok önemli bir rol oynayabileceğinin işareti olmuştur (Korkmaz 2010, Korkmaz 2011). Bor beslenmesinin 8. gününde; Ca ve Mg'un boşaltımla atılımının % 40 ve %33 azaldığı görülmüştür. Steroid hormon metabolizması üzerinde yapılan birçok çalışma menopoz sonrası dönemde 7 hafta boyunca günde 3 mg bor kullanan kadınlarda 17- β estradiol hormonun önemli oranda arttığını göstermiştir (Green ve Ferrando 1994).

Yapılan çalışmalarda borun insanın beyin fonksiyonları ve bilişsel performansı üzerine etki ettiği gösterilmiştir. İnsanlarda beyinin ve fizyolojik fonksiyonun ölçülmesi çalışmalarında diyetle yeteri kadar olmayan bor alımının hem elektroensefalogramda (EEG) daha düşük frekans aktivitesine yol açtığı hem de bilişsel ve motor testlerde beklenenden daha az bir performans gösterdiği ortaya çıkmıştır (Penland 1998).

Borik asitin dezenfektan ve antiseptik özelliğinin beraberinde yara iyileşmesi üstünde olumlu etkiye sahibi olduğu yapılan az sayıdaki çalışmalarda da görülmüştür. %3'lük

Borik asit solüsyonuyla tedavinin, derin yaraların iyileşmesini önemli derecede arttırdığının bulunması bu çalışmalardan birisidir (Nzietchueng ve ark. 2002). Benderdour ve arkadaşları (1997) bor elementinin, proteoglikan, kollajen ve proteinlerin salınımını artırma yoluyla yara iyileşmesinde önemli bir rol oynayarak, ekstrasellüler matriksin sentezini etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca kollajen sentezi ve TNF- α salınımını uyardığını bulgulanmıştır. Borik asidin in vivo yara iyileşmesinde TNF- α sekresyonu üstünden etkili olabileceği ve Thp-1 monositlerinde TNF- α sekresyonunu indükleyerek inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Tavuk embriyo kıkırdağı ve insan fibroblast hücrelerinin model olarak kullanıldığı çalışmada, %3'lük borik asit solüsyonunun proteoglikan ve kollajen sentezini artırarak ECM formasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (Benderdour ve ark. 1997, Nzietchueng ve ark. 2002).



Şekil 2.11. Doğal (inorganik ve organik) bor içeren bileşiklerin onaylanmış biyolojik aktiviteleri (Donoi ve ark. 2018)

2.3.3. Bor ve kanser araştırmaları

Normal şartlar altında, hücrelerin iç ve dış ortamlarla iletişim kurmasını sağlayan çeşitli sinyal mekanizmaları, bu hücrelerin kontrollü bir şekilde büyümesini ve üremesini sağlar. Ancak kanser gelişiminde bu mekanizmalardaki çeşitli engeller nedeniyle hücreler aşırı bölünme yeteneği kazanır, ölüm sinyallerine karşı duyarsızlaşma nedeniyle apoptozdan kaçır ve uzak organlara invazyon ve metastaz yapma yeteneği kazanarak çevre doku ve dokulara yayılabilir. Hücre döngüsü kontrol mekanizmasının kontrolü dışında kalan hücreler çoğalmaya ve anormal hücre kümeleri, yani tümörler oluşturmaya devam eder (Patterson ve ark. 2018). Borun düşük toksisiteye sahip olması, vücutta birikmemesi gibi farmakolojik özellikleri çekici bir kanser tedavisi ajanı olmasına yol açmaktadır ancak mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılamaması potansiyel kullanımını engellemektedir (Bradke ve ark. 2008, Mcauley ve ark. 2011).

Son epidemiyolojik in vitro ve hayvan çalışmaları plazmadaki en bol fizyolojik bor olan borik asidin (BA) kemoterapik bir ajan olarak olası bir rolünü ortaya koymaktadır. İnsanda ortalama borik asit alımının yaklaşık olarak 15µM/gün olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda alınan borun fazlası vücuttan atıldığı için borik asit ancak yüksek dozlarda alındığı zaman toksik etki gösterebilmektedir (Bakırdere ve ark. 2010). Borik asit onu kanser tedavileri için umut verici bir farmasötik ajan yapan bir dizi ayırt edici özelliğe sahiptir. Karbona benzer yapısal özelliklere sahip hafif bir organik Lewis asididir ve birçok karbon içeren substrat için rekabetçi bir inhibitör görevi görmesine izin verir. BA'nın bu özelliği onu proteazlar, proteazomlar, arginaz, nitrik oksit sentaz ve transpeptidazlar gibi enzimlerin etkili bir inhibitörü yapar. Borun, hücre sinyal sistemini veya birçok biyokimyasal süreçte rol oynayan olayların oluşumunu ve/veya aktivitesini etkilediğine inanılmaktadır (Nielsen ve Meacham 2011).

Borik asit (H_3BO_3), boraks pentahidrat ($Na_2B_4O_7 \cdot 5H_2O$) ve disodyum pentaborat dekahidrat ($Na_2O \cdot 5B_2O_3 \cdot 10H_2O$) bor türevlerinin MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinin büyümesi üzerindeki etkileri incelenmiş ve özellikle disodyum pentaborat dekahidrat kullanımının hücre büyümesini engellediği gözlemlenmiştir. MCF-7 metastatik meme kanseri hücreleri ile karşılaştırıldığında, ZR-75-1 meme kanseri

hücrelerinde NaBC1 yardımcı taşıyıcısı yoktur. Bor molekülleri hücre dışına çıkar. Öte yandan, CaFB'nin MDA-MB-231 hücreleri (metastatik meme kanseri hücre dizisi) üzerinde engelleyici bir etkisi vardır (Şimşek ve ark. 2019). Benzoxaborol bileşikler ayrıca 1,4-2,8 uM konsantrasyonda SKOV3 (yumurtalık kanseri), MDA-MB-231 (meme kanseri) ve HCT116 (kolorektal kanser) kanser hücrelerinde umut verici anti-proliferatif etkilere sahiptir (Fernandes ve ark. 2019).

Ek olarak borik asit de Ca salınımını etkileyerek bazı tümör hücrelerinin proliferasyonunu önler. Fenilboronik asidin (FBA), ana bileşiği borik asitten daha güçlü ve seçici bir kanser hücresi göçü ve yaşayabilirliği inhibitörüdür. FBA, sekiz günde kanser hücresi canlılığını azaltmada BA'dan daha etkilidir (Tiffany ve ark. 2008). FBA'nın kısa vadede seçici bir anti göç yanıtı ortaya çıkarma yeteneği, uzun vadede kanser hücresi canlılığını azaltırken onu yeni bir anti kanser tedavisi için umut verici bir aday haline getirmektedir. FBA doza bağımlı bir şekilde kanser hücrelerinin kemotaksisini önemli ölçüde inhibe eder. Tümörjenik olmayan hücrelerin kanser hücreleri için etkili dozda FBA'ya en az beş kat daha az duyarlı olması, bunun umut verici bir kanser tedavisi olabileceğini düşündürmekte ve profilaktik olarak kullanılma olasılığını artırmaktadır (Tiffany ve ark. 2008).

Bor ve apoptozun tetiklenmesi

Apoptoz, çeşitli biyolojik olaylarda yer alan hücreleri seçici olarak yok etmek için meydana gelen programlanmış hücre ölümüdür ve önemli bir fizyolojik süreçtir. Homeostaz regülasyonu, DNA hasar yanıtı ve hücre proliferasyon kontrolü için anahtar bir yaklaşımdır (Wei ve ark. 2016). Yüksek dozlarda BA (12,5-50mM), melanom hücrelerinde ve MDA231 meme kanseri hücrelerinde hücre replikasyonunu yavaşlatarak apoptozu indükler. CaFB, negatif östrojen reseptörü ekspresyonu olan metastatik meme kanseri MDA-MB-231 hücrelerinde apoptozu ve apoptoz ile ilişkili proteinlerin aşırı ekspresyonunu indükler. Fokal adezyon kinazındaki (FAK) değişikliklerin, borik asidin meme ve prostat kanseri hücre kültürlerinde apoptozu indüklediği olası mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir (Hazman ve ark. 2018).

Bor ve enzim aktivitesinin düzenlenmesi

Raporlara göre bor, hayvanlarda, bitkilerde, kültür ortamlarında ve kimyasal reaksiyon sistemlerinde en az 26 enzimin aktivitesini etkileyebilir. Bor, bağışıklık sistemi, insülin salınımı ve enerji substrat yolları dahil olmak üzere enzim aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar (Hunt ve ark. 1998). Serin proteazlar (kimotripsin ve allin gibi) hidrolazların bir alt sınıfıdır ve aktif lökositler tarafından salınan en önemli proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler, salınan reaktif oksijen türlerinin beraberinde proteoliz yolu ile bağ dokusu yapısını, membran bileşenlerini ve çözünür proteinleri de bozar, enflamasyonu artırır ve karsinogenezi indükler.

Borik asit üçgen atomlar içerir ve analogların karmaşık bir geçiş formunda serin proteazın aktif bölgesine bağlanır ve etkili bir inhibitör görevi görür. Bu şekilde bor, bağ doku yapılarının ve membran bileşenlerinin degradasyonunu azaltarak hücreleri enflamasyona ve kanser gelişimine karşı korumaktadır (Hunt ve ark. 1999).

Bor ve proteazom aktivitesinin düzenlenmesi

Proteazom (ubikitin-proteazom sistemi /UPS), hücre içi proteinlerin degradasyonundan sorumlu büyük ve çok karmaşık bir enzim kompleksidir. UPS neredeyse tüm hücresel prosesler için esansiyeldir ve hücresel homeostazın korunmasından sorumludur. Ubikitin, proteinleri yıkım için işaretler ve proteazom için bir degradasyon sinyali görevi görür. Bu seçici ve etkin degradasyon sistemi hücre döngüsünün düzenlenmesi, DNA hasar yanıtı, hücre büyümesi, hücre göçü, transkripsiyon, apoptoz, hücre yapışması, anjiyogenez ve tümör büyümesi, antijen işleme ve enflamatuvar yanıtlar gibi pek çok biyolojik süreçte fonksiyon gören proteinlerin regülasyonu için kritik bir rol oynamakta ve bu sebeple kanser tedavisi için önemli bir terapötik hedefi oluşturmaktadır (Finley ve ark. 2009). Proteazom kompleksinin uygun bir biçimde fonksiyon göstermesi için spesifik konsantrasyon aralıklarında bor gerektiği düşünülmektedir. Borun az veya çok olması proteazomu inhibe etmektedir (Daniel ve ark. 2005). Bortezomib kuvvetli ve seçici bir proteazom inhibitörüdür ve hayvan ve hücre kültürü tümör modellerinde apoptozu indüklemektedir. Çalışmalar, bortezomibin hayvan dokularındaki proteazom

aktivitesini inhibe etme, tümörlerin büyümesini durdurma, metastazı engelleme ve VEGF ekspresyonunu ve anjiyogenezi önleme kapasitesini incelemiştir. Bununla beraber bortezomib, MAPK sinyal yolağını, hücre proliferasyonunu ve I κ B α stabilizasyonu aracılığı ile NF κ B yolağını inhibe ederek ilaç dirençliliğinin de üstesinden gelmektedir (Adams ve ark. 2004).

Bor ve oksidatif stresin düzenlenmesi

Oksidatif stres, reaktif olan oksijen türlerinin (ROS), serbest halde bulunan radikallerin ve reaktif olan metabolitlerin artışı, anti-oksidanlar olarak isimlendirilen koruyucu mekanizmaların ortadan kaldırılması ve oksidan-antioksidan dengesinin bozulması olarak tanımlanır. Bu dengesizlik hücre ve dokularda hasara, tümör oluşumunu başlatan ve ilerleten mutasyonlara yol açmaktadır. ROS, membrana bağlı protein kinazları, büyüme faktörlerini ve reseptörlerini etkileyerek sinyal iletiminin bozulmasına, onkogen aktivasyonuna ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olarak kanser oluşumunu tetiklemektedir (Ahmed ve ark. 2016). Son zamanlarda yapılan çalışmalar bor alımının artış göstermesi ile beraber kanser riskinin ve DNA hasarının azalması ve antioksidan düzeylerinin çoğalmasının ilişkili olduğunu rapor etmektedir. Borun aşırı miktarda olan reaktif oksijen türlerinin parçalanmasını etkilediğine dair kanıtlar bulunur. Örneğin borik asit ve boratın aflatoksin B1, kurşun, kadmiyum, nikotin ve çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı mikronukleus and kardeş kromatid değişim oluşumlarını inhibe ettiği, DNA çift zincir kırıklarını azaltarak kromozom yapısını koruduğu gösterilmiştir (Turkez ve ark. 2016). Bununla birlikte borun NADPH düzeylerinin düzenlenmesinde etkin rolü vardır. NADPH molekülü, hücrelerde indirgenmiş olan glutatyon (GSH) miktarını yükselterek oksidatif stresi ve buna bağlı olarak da oksidatif hasarları azaltabilmektedir (Hunt 1998).

Bor ve anti-metastatik etkiler

Birçok kanser türünün erken veya geç evrelerinde primer tümör kitlesinden ayrılan hücreler komşu dokulara veya farklı yollarla uzak dokulara ulaşarak yeni odaklar oluştururlar. Bu süreçte hücrelerin mikroçevresi ile olan bağlantılarının çeşitli

ekstraselüler proteazlar ile yıkımı ön plana çıkmaktadır ve hücre adezyon molekülleri (CAM /cellular adhesion molecules), kalsiyum bağımlı kaderin ailesi ve integrinler önemli hedefler arasındadır (Valastyan ve ark. 2011). Ek olarak BA ve özellikle fruktoborat, Vitamin D3 üzerinden indirekt olarak etki göstermektedir. Vitamin D3 hücre döngüsünü durdurmakta, apoptozu indüklemekte ve metastazı inhibe etmektedir. Borun da hücre içi vitamin D3 konsantrasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Anormal hücre göçü, birçok metastatik tümörün önemli bir özelliğidir. Metastaz için en önemli hücresel hedefler, GTP bağlayıcı proteinlerin Rho ailesinin en iyi karakterize edilmiş üyeleri olan RhoA, Rac1 ve CDC42'dir. Bu moleküller birçok malign kanser türünde aşırı eksprese edilir ve fokal adhezyon regülasyonu, aktin hücre iskeleti organizasyonu, epitelyal yara iyileşmesi ve hücre göçü ve inflamasyonda önemli roller oynar. Çalışmalar, fenilboronik asidin (PBA), farelerde prostat ve meme kanseri hücrelerinin in vivo göçü ve tümör metastazı üzerinde seçici inhibitör etkisi olan önemli bir borik asit türevidir olduğunu bildirmiştir (Van Zijl ve ark. 2011).

Bor ve anti-enflamatuar etkiler

Yetişkinlerde tüm kanser türlerinin %20'si enfekte ajanlara veya diğer çevresel faktörlere maruz kalmaktan dolayı başlayan kronik enflamasyondan kaynaklanmaktadır çünkü tümörle ilişkili enflamatuvar cevap, tümör gelişimini ve ilerleyişini uyarıcı paradoksal etkilere sahiptir (McLaughlin ve ark. 2020). Kanser dokusunda oluşan enflamasyon tümör mikroçevresine; çoğalma sinyalleri oluşturan büyüme faktörlerini, hücre ölümünü sınırlandıran yaşamsal faktörleri, öncül anjiyogenik faktörleri, invazyonu ve metastazı tetikleyen çeşitli ekstraselüler matriks modifiye edici enzimleri ve epitel mezenkim geçişi aktivasyonuna sebep olan uyarıcı sinyalleri sağlamaktadır. Ayrıca enflamatuvar hücreler komşu hücreler için bir hayli mutajenik olan çeşitli kimyasalları ve reaktif oksijen türlerini salarak genetik düzensizliklere neden olmaktadır (Tower ve ark. 2019).

Yapılan çalışmalar borun enflamatuvar yanıtın regülasyonunda önemli bir rolü olabileceğini söylemektedir (Soriano-Ursua ve ark. 2014). Borun enflamatuvar yanıtta da rol oynayan kan hücrelerinin popülasyonunu veya akut ya da kronik enflamasyon sonucu oluşan ROS türlerinin metabolizmasını etkileyerek immün yanıtı etkilediği

düşünülmektedir (Nielsen ve ark. 2017). Aşırı reaktif oksijen türleri glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz reaksiyonunda bozunacaktır. Borun reaktif oksijen türlerinin bozunmasını etkileyebileceğine dair kanıtlar vardır. Bor eksikliği olan (0.25 mg/gün) erkek ve kadınlara bor (3 mg/gün) takviyesi yapmak, kırmızı kan hücresi süperoksit dismutaz konsantrasyonunu önemli ölçüde artırır (Nielsen ve Meacham 2011). Bununla birlikte, kalsiyum frukto boratın, oksidatif strese maruz kalan kültürlenmiş hücrelerde hücre içi süperoksit iyonlarının miktarını azalttığı bulunmuştur. Kalsiyum fruktoz borat LPS ile uyarılan RAW264.7 makrofajlarında, interlökin 1b, interlökin 6 ve nitrik oksit salgısı azaltmaktadır. Dolayısıyla kalsiyum fruktoboratın hem anti-enflamatuvar hem de anti-oksidan ajan olarak rol oynadığı düşünülmektedir (Scorei ve Rotaru 2011). Son çalışmalar borik asidin enflamasyona karşı, konakçı savunması için gerekli olan kimyasal enflamasyon araçlarının salgılanmasını indüklediğini ve dolaşımdaki doğal öldürücü hücrelerin konsantrasyonunu tetiklediğini bildirmiştir. Örneğin lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan farelerde borik asit uygulaması CD4+T ve CD19+B hücre çoğalmasını arttırmaktadır (Khaliq ve ark. 2018).

Ek olarak insan monosit lösemi THP-1 hücrelerinde BA bir tiol bağımlı mekanizma ile LPS ile indüklenen TNF- α üretimini inhibe etmektedir. Durick ve arkadaşları (2005) tarafınca meydana getirilen bir çalışmada borun NF κ B transkripsiyon faktörü aracılığı ile pro-enflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu ve dolayısı ile enflamasyon prosesini engelleyebileceğine dair kanıtlar bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda borik asit ve boronik asit I κ B α degradasyonunu önleyip NF κ B sinyalini bozarak karsinojenik ilerlemeyi yavaşlatmaktadır (Durick ve ark. 2005). Yapılan çalışmada borun; IF- γ , IL-1 β , TNF- α ve NF κ B'nin yüksek ekspresyonlarının sebep olduğu enflamasyonu inhibe edip ekspresyon seviyelerini tersine çevirdiği gözlemlenmiştir. Sıçanlara bor verildiğinde; IF-gamma, TNF- α , IL-1 β ve NF κ B'nin ekspresyon seviyeleri belirgin şekilde azalmış ve bu sonuçlar borun; enflamatuvar yanıtı baskılayarak doku hasarının iyileşebileceğini göstermiştir (Ucaroz ve ark. 2018).

Bir benzoksaborol analogu olan AN3485 (6-[4-(aminomethyl)-2-chlorophenoxy]benzo[c][1,2]oxaborol-1(3H)-ol), insan periferel nükleer kan hücrelerinde (PMBCs) Toll-benzeri reseptörler aracılığıyla TNF- α , IL-1 β , and IL-6 salınımı

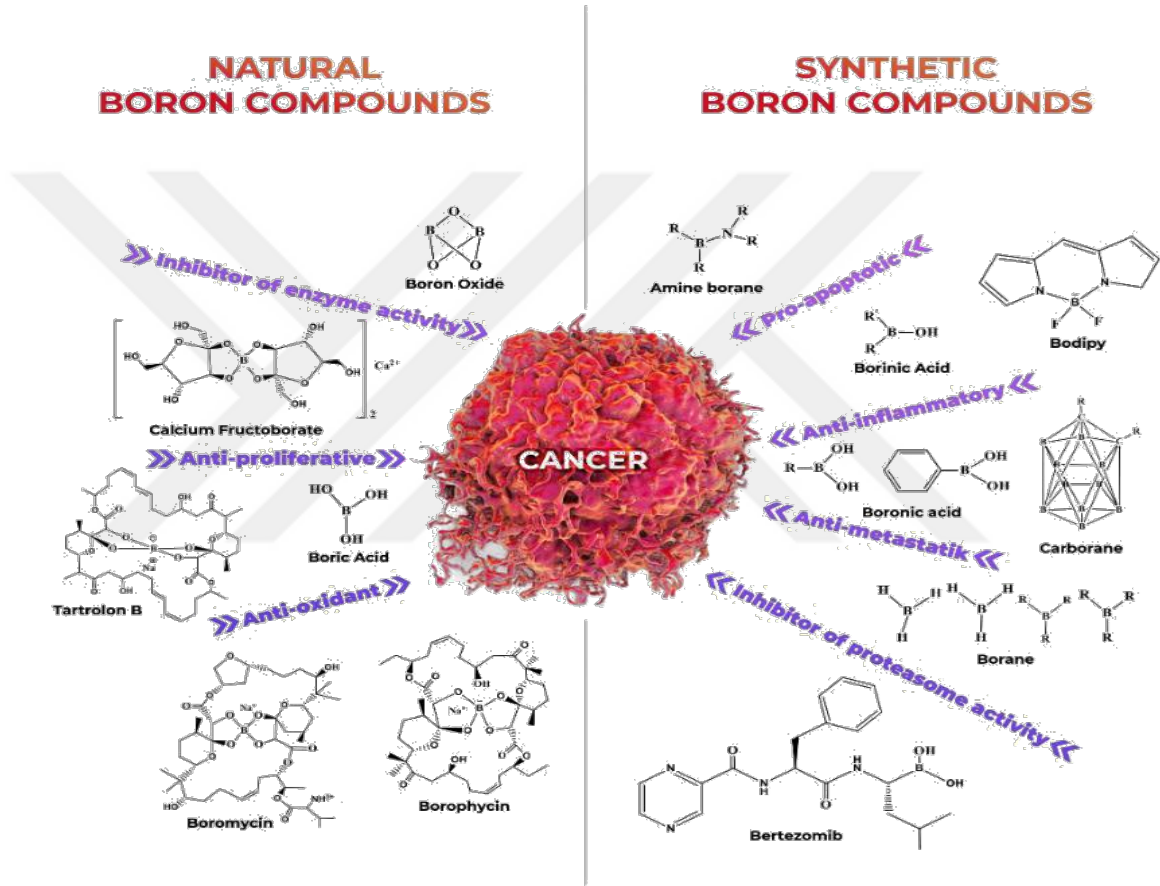
inhibe etmektedir. Farelerde meydana getirilen oral uygulamasında ise doz bağımlı olarak LPS-indüklü TNF- α ve IL-6 üretimini baskılamaktadır (Dong ve ark. 2013). Kalsiyum fruktoborat LPS ile uyarılan RAW264.7 makrofaj hücrelerinde IL-1 β , IL-6 ve nitrik oksit salınımı azalmaktadır. Sıçanlarda sisplatin toksisitesinin incelenmiş olduğu bir çalışmada ise borik asidin ve boraksın değişik dozlarda sisplatin tarafınca yaratılan enflamasyonu ve oksidatif stresi azalttığı bulgulanmıştır (Durick ve ark. 2005). Bor takviyesi bilhassa hücrel immün yanıtı artırmasının bununla beraber fareleri CCl(4) indüklü karaciğer hasarına karşı korumaktadır (Hu ve ark. 2014). Son olarak pulmoner enflamasyon için potansiyel bir tedavi amacı ile kemokin reseptörleri CXCR1 ve CXCR2 antagonistleri olarak boronik asit içeren yeni bileşikler de geliştirilmiştir. Dolayısıyla bor enflamasyon sürecinde, artan enzimatik aktiviteleri azaltacak bir represyon sinyali olarak fonksiyon göstermekte ve başta kanser dahil olmak suretiyle enflamatuvar hastalıklara yakalanma riskini azaltmaktadır (Scorei ve ark 2011).

2.3.4. Bor ve kanser tedavisi

Borun sağlık üzerindeki olumlu etkilerini gösteren az sayıda yayın olmasına rağmen, son zamanlardaki epidemiyolojik, hayvan ve laboratuvar çalışmaları, özellikle bazı malign kanser türleri için bor ve bileşiklerinin koruyucu ve tedavi edici etkileri konusunda umut verici sonuçlar elde etmiştir. Bor bileşikleri son senelerde osteoporoz, metabolik, nörodejeneratif ve kanser gibi enflamasyon sürecini içeren hastalıkların tedavisi için değerlendirilmektedir. Bu bağlamda borik asit ve boraks, siyanoboranlar, karboksiboranlar ve fruktoboratlar bugüne dek en çok test edilen bileşiklerdir (Romero-Aguilar ve ark. 2019). Öte yandan, bor bazlı bortezomib (PS-341/Velcade), FDA tarafından 2003 yılında onaylanmıştır ve klinik olarak multipl miyelom ve mantle hücreli lenfoma tedavisinde etkilidir (Nikkah ve ark. 2017).

Yapılan çalışmalar borun sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir mutajenik ve karsinojenik etkiye sahip olmadığını, aksine genetik hasara karşı koruyucu olabileceğini ileri sürmektedir. Kanser hücreleri üzerinde yapılan deneysel sitotoksite çalışmalarında, bor uygulanan hücrelerde doza ve zamana bağlı olarak antiproliferatif bir etki gözleendiği tespit edilmiştir. Bor yönünden zengin bölgede yaşayan insanlarda diğer bölgelerdeki

insanlara kıyasla bazı kanser türlerinin insidansında azalma olduğu belirlenmiştir (Kahraman ve ark. 2012). Tüm bu çalışmalar ışığında bor ve bileşiklerinin sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olmadığı ve ilaç bileşeni olarak güvenli bir şekilde kullanılabileceği belirlenirken (Goszczyński ve ark. 2018), kanser hücrelerinin çoğalması üzerinde anti proliferatif bir etki oluşturduğu açıkça görülmekte ve araştırmacılar tarafından kanser tedavisi için yeni bir umut olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.12. Çeşitli anti-kanser etkiye sahip doğal ve sentetik bor bileşiklerinin genel kimyasal yapıları (Erbaykent Tepedelen ve Korkmaz 2020)

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

Bu çalışmada kullanılan materyaller aşağıdaki başlıklarda listeler halinde sıralanmıştır.

3.1.1 Kimyasal Maddeler

- Borik asit, BA, H_3BO_3 (Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü)
- Etidot-67 (Disodyum oktaborat tetrahidrat), ETD 67, $Na_2B_8O_{13}.4H_2O$ (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)
- $NaVO_3$ 100X (200 mM) (FLUKA)
- NaF 100X (100 mM) (Merck)
- Etanol (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)
- GAPDH antikoru (Cell signaling 9284)
- NFκB p65 antikoru (Cell signaling 8242)
- Phospho- NFκB p65^(Ser536) antikoru (Cell signaling 3033)
- IκBα antikoru (Cell signaling 4814)
- Phospho- IκBα^(Ser32) antikoru (Cell signaling 2859)
- IKKα antikoru (Cell signaling 11930)
- IKKβ antikoru (Cell signaling 8943)
- PARP antikoru (Cell signaling 9532)
- 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)

- Anti-rabbit ve Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham NA934/ Amersham NA931)
- Aurum™ Total RNA İzolasyon Mini Kiti (Bio-Rad)
- BioRad's iScript™ Revers Transcription Supermix
- Spektrofotometre (Amersham Biosciences- Ultraspec 100 Pro., ABD)
- LC-480 RT-PCR (Roche, Almanya)
- SYGR Green (Biorad)
- Primerler

3.1.2 Hücre hattı

İnsan meme kanseri hücre hattı MCF-7 hücreleri Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK'tan temin edilmiştir.

3.1.3 Kullanılan malzemeler

- 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

- +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

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 kabinine 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 Etidot-67’nin Hazırlanması

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

Çizelge 3.1. Borik Asit (BA) ve Etidot-67 (ETD 67) Moleküler ağırlıkları

Bor Maddesi	Moleküler Ağırlık
BA	61,832
ETD 67	412,52

- 100 mM 1 mL BA için 0,0062 g, 100 mM 1 mL ETD 67 için 0,041 g,
- 6,2 mg BA ve 41 mg ETD 67 tartılarak 1 mL dH₂O’da çözündürüldü (Maksimum bir ay olacak şekilde oda sıcaklığında tutuldu).

▪ Fosfat Tamponu (Phospate Buffered Saline / PBS)

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- 0,2 g KCl
- 1 L dH₂O

- 1,41 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 8,0 g NaCl

Bunlar tartılarak 900 mL damıtılmış su ile çözündürüldükten 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 dH_2O

EDTA 90 mL dH_2O içerisinde çözündürüldükten 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 dH_2O

EGTA 90 mL dH_2O içerisinde çözündürülmesine müteakip pH 7 olarak ayarlandı. Sonrasında 100 mL'ye tamamlanıp oda koşullarında muhafaza edildi.

▪ **10 M NaOH**

Kullanılan kimyasallar aşağıda sıralanmıştır.

- o 40 g NaOH
- o 100 mL dH_2O

NaOH, 100 mL dH₂O içerisinde çözündürüldü 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 çözündürüldü 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 çözündürüldü 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 çözündürüldü 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 çözündürüldükten 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-merkaptoetanol 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

		10 ml	5 ml	2.5 ml
Ön Ayırma (Stacking) Jeli	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 MCF-7 hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılması için DMEM-F12 besiyerine ilaveten;

- o %1 Penisilin/ Streptomisin (P/S)
- o İnaktif hale getirilmiş %5 Fötal Sığır Serum
- o %1 L-glutamin (L-glu) de eklenerek ortam kullanıma hazır hale getirildi.

Hücrelerin Üretilmesi

Hücre üretim aşamaları aşağıda listelenmiştir.

- o Steril cam pastör pipetleri kullanılarak vakum pompasıyla ortam ayrıştırıldı.
- o Kültür yüzeyi tripsin muamelesinin etkisini arttırmak için Ca^{2+} ve Mg^{2+} bulundurmayan steril PBS kullanarak bir kez yıkandı.
- o PBS uzaklaştırılmasını takiben 1 mL Tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2 'li inkübatörde 1-2 dakika hücreler yüzeyden ayrışana duruldu.
- o Hücre yoğunluğuna göre taze ortam hücreler üzerine eklendi ve hücreler pipet yardımıyla homojenizasyon sağlandı.
- o Homojenizesi sağlanan hücreler, dikkatli bir şekilde yeni kültür kabına eklendi ve büyümeleri için 37 °C sıcaklıkta %5 CO_2 'li inkübatöre yerleştirildi.

Hücrelerin Dondurulma ve Çözdürülme İşlemi

Hücre dondurulma ve çözündürülme aşamaları aşağıda listelenmiştir.

- o 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.

- o 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.
- o Buzu çözülecek hücreler -86 °C dondurucudan çıkarıldığı andan itibaren 37 °C 'lık 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.

- o Hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücrelere pasajlanma yapılrırken doğru miktarlarda ekim yapılabilmesi için hemositemetri yardımıyla sayım yapıldı.
- o 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.
- o 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 (sitotoksosite)

Sitotoksosite 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 üretme ortamıyla 1:10 oranında seyreltilmiş ve 0,5 mg/mL'de hazırlanmıştır. Ulusal Boron Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen BA ve ETD 67 maddelerinin anti-proliferatif etkileri MCF-7 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 kuyucuklu kültür tabakalarına kuyucuk başına 6×10^3 hücre ekilerek gerçekleştirildi. Süre dolduktan sonra maddeli ortam vakum pompası ile uzaklaştırıldı ve 5 mg/mL MTT stok sölüsyonu, 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 inkübatörde 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. İmmünoblotlama analizleri (Western-blot)

Protein izolasyonu

- o Deney setleri için kullanılan inkübasyon sürelerinin bitiminde hücreler inkübatörden çıkarılarak bir kez soğuk PBS ile yıkandı.
- o Hücreler üzerine RIPA Modifiye lizis tamponu eklenip hücreler kazıyıcı yardımıyla kazınmış ve eppendorflara eklenmiştir. (Buz üzerinde yapılan tüm prosedürler gerçekleştirilmiştir).
- o Kullanmadan öncesinde RIPA lizis tamponunun içine gerekli miktarda proteaz inhibitörleri eklenmiştir.
- o Örneklerimiz her 15 dakikada karıştırılarak 45 dakika buz üzerinde inkübasyon yapılmıştır.

- o Hücre liziz işleminin tam olarak gerçekleşmesi için ayrıca sonikasyon gerçekleştirilmiştir.
- o 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 miktarının belirlenmesi

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

- o Eppendorf tüplere dağıtılan 149'ar µl RIPA tamponu üzerine 1'er µl protein lizatı örneği eklendi.
- o BCA çalışma reaktifi; her örnek başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olacak şekilde bütün örnekler için toplam bir karışım hazırlanarak vortekslendi ve her örnek başına 150 µl olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı. Kör olarak protein lizatı bulunmayan RIPA tamponu kullanıldı.
- o Tüpler vortekslenip kısa santrifüjden sonra 60 °C'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi.
- o İnkübasyon bitiminde kısa bir santrifüjden sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek spektrofotometrede 562 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.
- o Elde edilen absorbans değerleri referans değer ile normalize edilerek protein miktarları µg /µl olarak belirlendi.

Proteinlerin SDS-PAGE ile ayrılması

- o Camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silindive birleştirilen iki cam arasına %6-15'lik ayırma jeli (5-10 ml) döküldü. Jelin düzgün bir şekilde donabilmesi için üzerine izopropanol döküldü.
- o Donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol uzaklaştırıldıktan sonra depolama jeli (5 ml) dökülüp tarak yerleştirildi.

- o Kullanımdan önce gerekli hacimde 4×yükleme tamponu içerisine %10 oranında beta-merkaptoetanol eklendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.
- o Protein lizatlarından 50-100 µg miktara karşılık gelen hacim üzerine su ve 4×yükleme tamponu (7,5 µl) eklenerek toplam hacim 30 µl'ye tamamlandı.
- o Hazırlanan protein örnekleri 95° C' de 5 dakika denatüre edildi.
- o Denatürasyonun hemen ardından örnekler buz üzerine alındı ve jele yüklemekten önce kısa bir santrifüj yapıldı.
- o Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (80 V) ve jelin en sonuna gelene dek (3-4 saat) yürütüldü.

Membrana transfer

- o Western-blot sandviç aparatının içine sırasıyla bir sünger, 2 adet Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, 2 adet Whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirilerek aparat hazır hale getirildi.
- o PVDF membran aparat içine yerleştirilmeden önce metanol içinde ıslatıldı.
- o Oluşturulan sandviç aparatı, jeldeki proteinlerin membrana transfer edilebilmesi amacıyla transfer tankına yerleştirildi.
- o Transfer aparatının içerisine 1X transfer tamponu döküldü ve aparatın kenarlarına soğutucu bloklar yerleştirildi. Gece boyu +4°C'de 90 mA'de transfere bırakıldı.

Primer antikor ile işaretleme

- o Transfer tankından çıkarılan membran 2 sefer TBS-T ile çalkalandıktan sonra TBS-T'de hazırlanan % 5 süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı.
- o Bloklamadan sonra membran TBS-T ile 2 sefer çalkalandı ve daha önce kullanım oranı optimize edilmiş primer antikor solüsyonunda, oda sıcaklığında ve karıştırıcı üzerinde 1 saat boyunca yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Primer antikorsolüsyonu olarak % 0,5 süt tozu içeren TBS-T veya %5 BSA içeren TBS-T kullanıldı.
- o Membran 2 sefer çalkalama, 1 sefer 15 dk ve 3 sefer de 5 dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

Sekonder antikor ile işaretleme

- o Membran daha önce kullanım oranı 1/5 000 veya 1/10 000 olarak optimize edilmiş HRP bağlı tavşan (rabbit) veya fare (mouse) sekonder antikorları ile oda sıcaklığında 1 saat yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Sekonder antikorsolüsyonu olarak % 0,5 süt tozu içeren TBS-T veya %5 BSA içeren TBS-T kullanıldı.
- o Membran 2 sefer çalkalama, 1 sefer 15 dk ve 3 sefer de 5 dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

Bantların görüntülenmesi

- o 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-aminoflatatı oluşturur. Bu ürün, 425 nm'de ışıma verir. Bu ışıma, yalnızca enzim-substrat reaksiyonu sırasında oluşur. Yani geçici ve kısıtlı süre zarfında gözlenebilir. Substratın aşırı yoğun sinyal çıkışı pikogram düzeyindeki antijenin tespitini mümkün kılar. Sinyalin hassasiyeti, yoğunluğu ve süresi fotoğraflanarak kolaylıkla belirlenmektedir.
- o 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.
- o Kemilüminesans görüntüleme için Vilber Lourmat FX-7 cihazı (Thermo) kullanıldı.
- o Cihaz ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar çalıştırılarak FX-7 yazılımı açıldı.
- o Kamera sisteminin soğutma işlemini tamamlaması beklendikten sonra cihazın odak noktası ayarlanarak kemilüminesans görüntülemeye geçildi.
- o Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra membran cihazın tablasına yerleştirilerek görüntüleme süreleri saniye ve dakika cinsinden seçilerek fotoğraflama işlemi yapıldı.

3.3.6. RNA İzolasyonu, cDNA Sentezi ve qRT-PCR

RNA izolasyonu

MCF-7 hücrelerinden RNA izolasyonu Aurum™ Total Rna İzolasyon Mini Kiti (Bio-Rad)'nin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

- o Toplama tüplerine mini kolonlar yerleştirildi.
- o 350 µl Lizis Buffer hücreler üzerine ilave edildi ve hücreler bir kazıyıcı yardımıyla kazınarak ependorf tüplerine aktarıldı. Kullanımdan önce Lizis Buffer içerisine %1 oranında β-merkaptoetanol ilave edildi.
- o Pelletlerin tamamen parçalanması amacıyla insülin enjektörü ile homojenizasyon yapıldı.
- o Homojenat üzerine kendi hacmi kadar % 70 etanol eklendi ve pipetlenerek homojen hale getirildi.
- o Homojenat Aurum RNA bağlama mini kolonlarına aktararak 30'' 13000'rpm de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- o 700 µl Low Stringency yıkama solüsyonu kolona eklendi ve 30'' 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- o 80 µl DNaz eklendi ve inkübasyon için 15' beklendi.
- o İnkübasyon sonrası 700 µl High Stringency yıkama solüsyonu eklenerek 30'' 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- o 700 µl Low Stringency yıkama solüsyonu eklenerek 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
- o 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- o Toplama tüpü atıldı ve yerine ependorf yerleştirildi.
- o 50 µl Elüsyon Tamponu eklendi ve 1 dakika beklendi.
- o 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj yapıldı.
- o Kolon atıldı ve hücrelerden izole edilen RNA'lar ependorf tüpe aktarıldı.
- o Nanodropta 260/280 nm'de ölçüm yapıldı.

cDNA sentezi

MCF-7 hücrelerinden izole edilen RNA'lar BioRad's iScript™ Revers Transcription Supermix Kiti'nin protokolüne uygun şekilde cDNA'ya çevrildi.

Elüsyon Tamponu kör olarak kullanılmıştır.

Konsantrasyon = nanogram / μl

1 nanogram = $10^{-3} \mu\text{g}$

- o Her örnek için 2 μg RNA olacak şekilde gerekli örnek hacmi alındıktan sonra, son hacmi 15 μl 'ye tamamlamak için gerekli olan dH₂O miktarları eklendi.
- o Ardından bütün örneklerin üzerine 4 μl reaksiyon karışımı ve 1 μl ters transkriptaz enzimi eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 μl 'ye tamamlandı.
- o Kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra gerekli reaksiyon koşullarının sağlanması için örnekler konvansiyonel PCR cihazına yerleştirildi.
- o RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılması için örnekler 5 dakika 25 °C, 30 dakika 42 °C ve 5 dakika 85 °C' de inkübe edildi.
- o Elde edilen cDNA'lar -20°C'ye kaldırıldı.

Real-Time PCR (qRT-PCR)

MCF-7 hücrelerine yapılan uygulamalardan sonra elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak tez kapsamında 13 adet hedef genin ekspresyon profilleri RT-PCR amplifikasyonu ile analizlendi.

- o Bir reaksiyon için 10 μl hacim kullanıldı.
- o Reaksiyon başına 5 μl SYBR-Green master mix (2X) ve 1 μl cDNA kullanıldı.
- o F+R primerler için; 1 μl primer ve 3 μl dH₂O kullanıldı.
- o PCR amplifikasyonu
 - 1. Denatürasyon;
95 °C'de 3', 1 döngü
 - 2. Amplifikasyon;

95 °C'de 3', (95 °C'de 10'', 58 °C'de 10'', 72 °C'de 10'') 45 döngü

➤ 3. Çift zincirin açılması

Amplifikasyon basamağındaki her döngüden sonra 95 °C'de 30 sn.

➤ Soğutma;

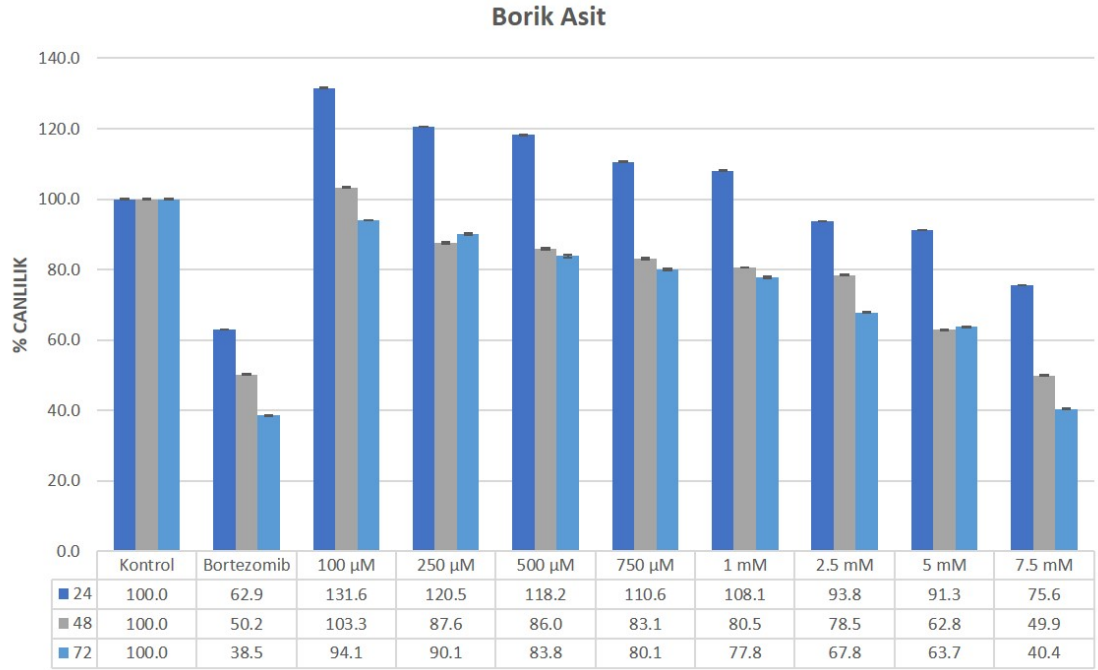
37 °C'de 10 sn

- o Amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerinin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla yapılan erime eğrisi ve relatif kantitasyon analizleri TATA-Binding Protein (TBP) referans geni (housekeeping genes) kullanılarak gerçekleştirildi.
- o RT-PCR da relatif kantitasyon analizleri $\Delta\Delta^{CT}$ yöntemi kullanılarak Biorad CFX Manager 3.1 yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi

4.BULGULAR

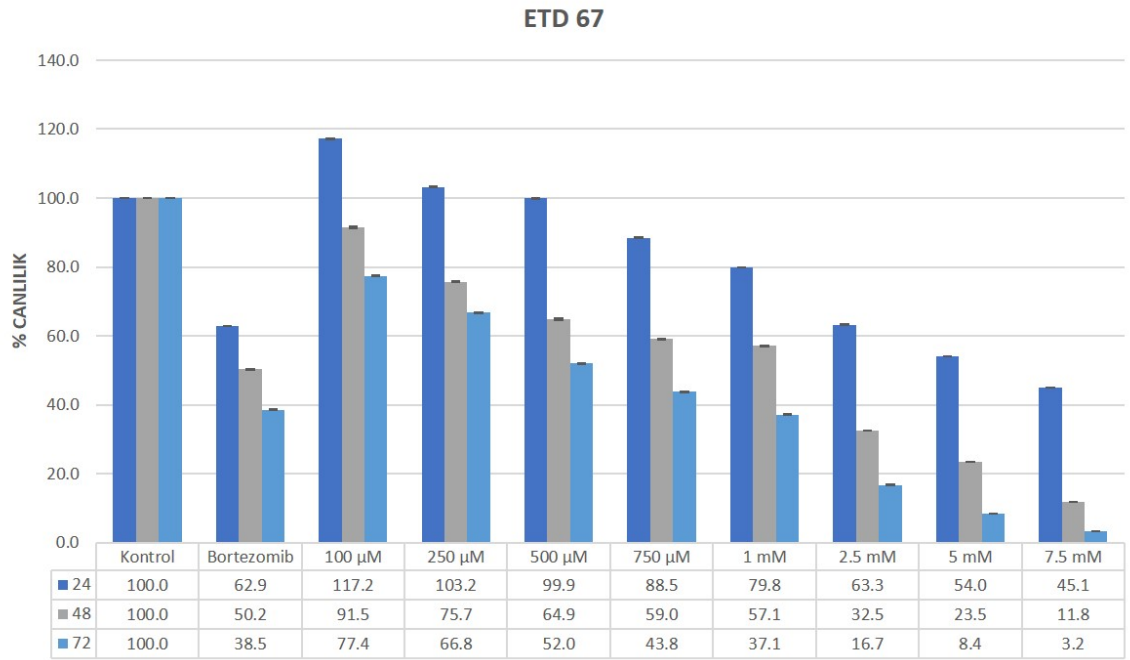
4.1. Sitotoksisite Sonuçları

Tez çalışması kapsamında MTT yöntemi ile sitotoksisite denemeleri, hücrelere uygulanan borik asit (BA) ve etidot-67 (ETD 67) bileşenlerinin uygulama süresi ve dozlarına bağlı gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkilerin ve bu etkilerin gözleendiği optimum konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. İlk olarak MCF-7 hücre hattında BA ve ETD 67'nin anti-proliferatif etkileri karşılaştırmalı olarak denendi. MCF-7 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 konsantrasyonlarında 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 ve pozitif kontrol olarak 20 µM konsantrasyonda Bortezomib bileşiği kullanıldı. Ölçümlerden elde edilen absorbans değerlerinden, kontrol hücreleri % 100 olacak şekilde kabul edilip madde uygulamalarıyla gözlenen % canlılık değerleri hesaplandı ve MCF-7 hücre hattı için % canlılık eğimleri oluşturuldu.



Şekil 4.1. BA'in hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi MTT denemesi sonucunda oluşturulan % canlılık grafiği incelendiğinde, BA'in konsantrasyonu ve maruz kalma süresi arttıkça hücre canlılığının azaldığı belirlendi. 24 saat BA uygulamasında % 50 canlılık oranı gözlenmediğinden dolayı 24 saat için IC_{50} değeri belirlenemedi ancak 7,5 mM konsantrasyon değerinin üzerinde olduğu saptandı. BA'in 48 ve 72 saatteki IC_{50} değerlerinin ise sırasıyla 7,5 mM ve 5,7 mM olduğu hesaplandı.



Şekil 4.2. ETD 67'nin hücre canlılığına etkisi

Şekil 4.2'de ETD 67 için oluşturulan hücre canlılığı grafiği incelendiğinde, BA'e benzer fakat daha etkili bir şekilde MCF-7 hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak hücre canlılıklarının azaldığı belirlendi. ETD 67 için 24, 48 ve 72 saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,7 mM, 1,2 mM ve 0,52 mM olarak hesaplandı. Pozitif kontrol olarak 20 µM konsantrasyonda kullanılan bortezomib uygulamasında ise 48 saatte % 50 canlılık oranı elde edildi.

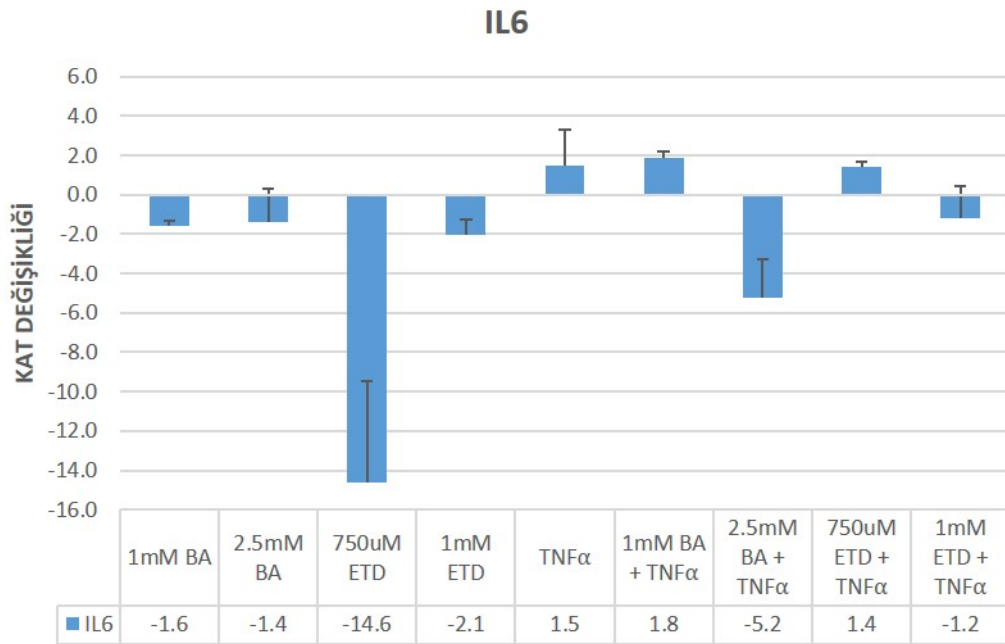
MTT analizi ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda qRT-PCR ve western-blot analizlerinde her iki bileşik için de 48 saat süreyle iki farklı konsantrasyon değerinin kullanılmasına karar verildi. Bu konsantrasyon değerleri IC₅₀ değerleri göz önüne alınarak BA için 1 mM ve 2,5 mM, ETD 67 için 750 µM ve 1mM olarak seçildi. Bununla birlikte qRT-PCR ve western-blot analizleri, MCF-7 hücrelerinde enflamatuvar yolları tetiklemek amacıyla TNFα varlığında ve yokluğunda gerçekleştirildi. Bu amaçla hücrelere bor bileşikler uygulandıktan sonra 47. saate 40ng/mL konsantrasyonda olacak şekilde 1 saat süreyle TNFα uygulaması yapıldı.

4.2. Gerçek Zamanlı PCR Sonuçları

qRT-PCR (Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR) metodolojisi, MCF-7 hücrelerinde BA ve ETD 67 bor bileşikleri varlığında ve/veya yokluğunda enflamasyon ile ilişkili olan sitokinlerin ve NF κ B, MAPK ve JAK/STAT3 sinyal yollarında rol oynayan hedef genlerin transkripsiyonel regülasyonlarını belirleyebilmek amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla MCF7 hücrelerine 48 saat süreyle BA ve ETD 67 uygulaması yapıldı ve 47. Saatte TNF α ilave edildi. Ardından RNA izolasyonları ve cDNA çevrimleri yapılarak hedef genlere ait primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyonun sonunda elde edilen C_t değerleri (eşik değeri) kullanılarak gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla *TBP* (TATA binding protein) referans geni ile relatif kantitasyon analizleri yapıldı ve elde edilen değerler (kat değişiklikleri) grafiğe aktarıldı.

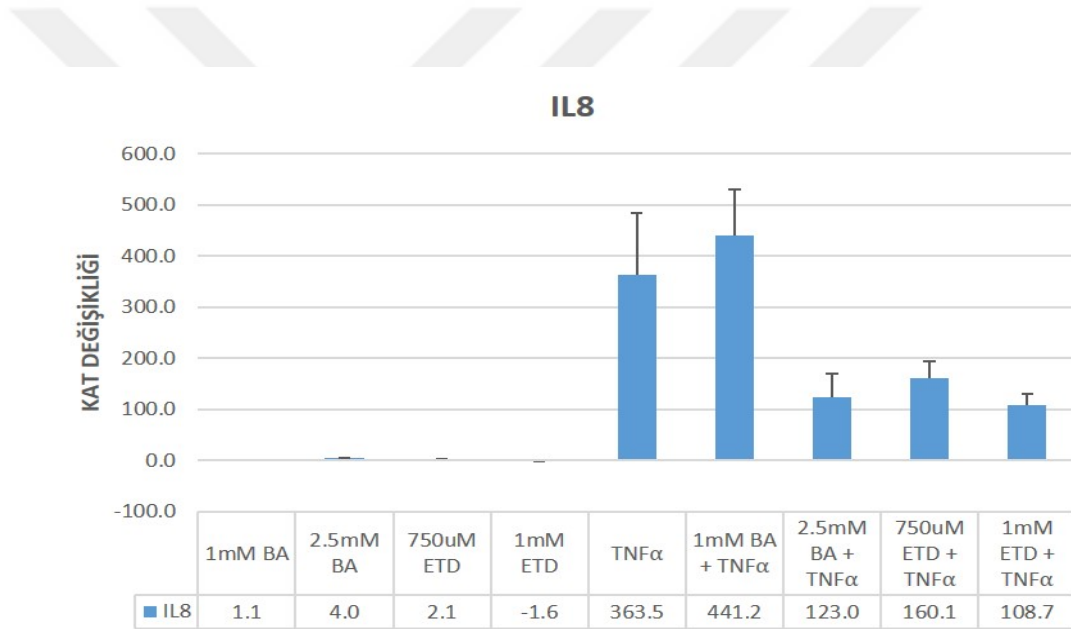
4.2.1. BA ve ETD 67'nin sitokin salınımına etkisi

İlk olarak qRT-PCR ile bor bileşiklerinin, meme kanseri gelişiminde enflamatuvar süreçlerde etkin rol oynadığı bilinen IL6, IL-8, IL1 α ve IL1 β sitokinlerinin ekspresyon seviyelerine etkisi incelendi.



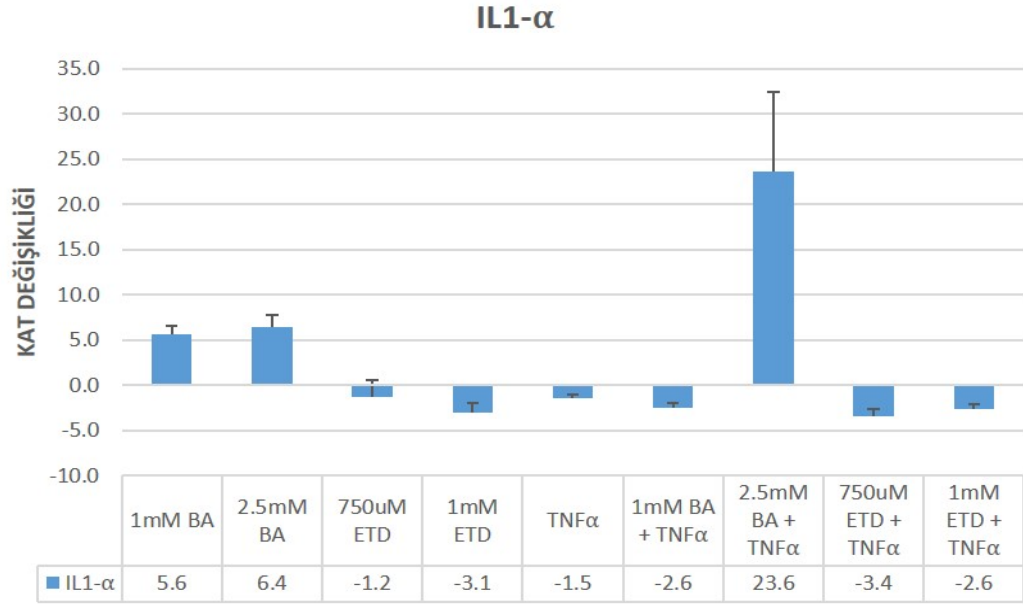
Şekil 4.3. IL6 gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi

Şekil 4.3'te IL6 gen ekspresyonu için elde edilen kat değişiklikleri incelendiğinde, tek başına 1mM ve 2,5 mM BA uygulamasının sırasıyla 1,6 ve 1,4 katlık bir azalmaya yol açtığı belirlendi. Benzer şekilde tek başına 750 µM ve 1mM ETD 67 uygulamasının da IL6 seviyesini sırasıyla 14,6 ve 2,1 kat aşağı regüle ettiği gözlemlendi. Beklenildiği şekilde tek başına TNFα uygulaması enflamasyonu tetikleyerek IL-6 seviyesinde 1,5 katlık bir artışa neden olmuştur. 1mM BA ve 750 µM ETD 67 varlığında bu artışın değişmediği ancak 2,5 mM BA ile 1 mM ETD 67 varlığında sırasıyla 5,2 ve 1,2 katlık bir azalma olduğu gözlemlendi.



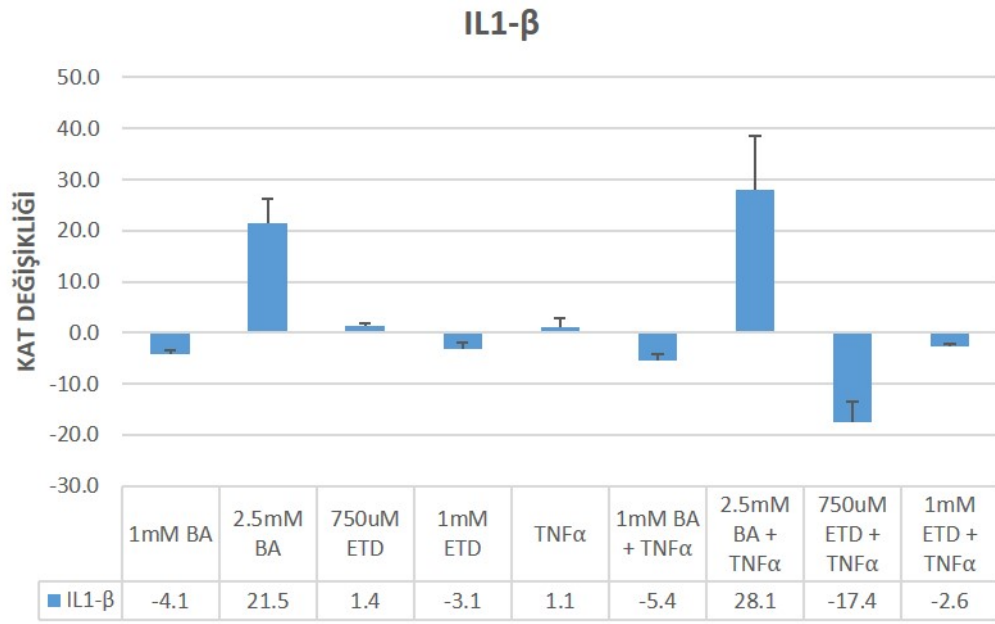
Şekil 4.4. IL-8 gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi

Şekil 4.4'te IL8 gen ekspresyonu için elde edilen kat değişiklikleri incelendiğinde, NFκB yolğunun aktivasyonu ve sitokin salınımını artırmak amacıyla kullanılan TNFα'nın tek başına oldukça yüksek oranlarda (363,5 kat) IL-8 gen ekspresyonunun artışına yol açtığı belirlendi. İlginç olarak 2,5 mM BA uygulamasının 4,0 katlık ve 750 µM ETD 67 uygulamasının da 2,1 katlık bir artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte bu bileşiklerin varlığında TNFα ile artan IL-8 seviyelerinin aşağı regüle edilerek azaldığı gözlemlendi. TNFα ile birlikte gözlenen 363,5 katlık artışın, 2,5 mM BA ile 123 kata, 750 µM ETD 67 ile 160 kata ve 1 mM ETD 67 ile de 108,7 kata gerilediği saptandı.



Şekil 4.5. IL1- α gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi, BA uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak IL1 α seviyesini 5,6 kat ve 6,4 kat artırdığı gözlemlendi. Tersi olarak ETD 67 uygulamasının konsantrasyona bağlı olarak tek başına IL1 α seviyesini 1,2 ve 3,1 kat azalttığı belirlendi. Tek başına TNF- α uygulaması ile IL1 α seviyesinde beklenen artış gözlenmezken 1,5 katlık bir azalma olduğu gözlemlendi. TNF α ile birlikte 1 mM BA'nın IL1- α seviyesini 2,6 kat azalttığı, 2,5 mM BA'nın ise IL1- α seviyesini 23,6 kat artırdığı belirlendi. 750 μ M ve 1 mM ETD 67 varlığında uygulanan TNF α örneklerinde ise sırasıyla 3,4 ve 2,6 katlık azalışlar olduğu gözlemlendi.

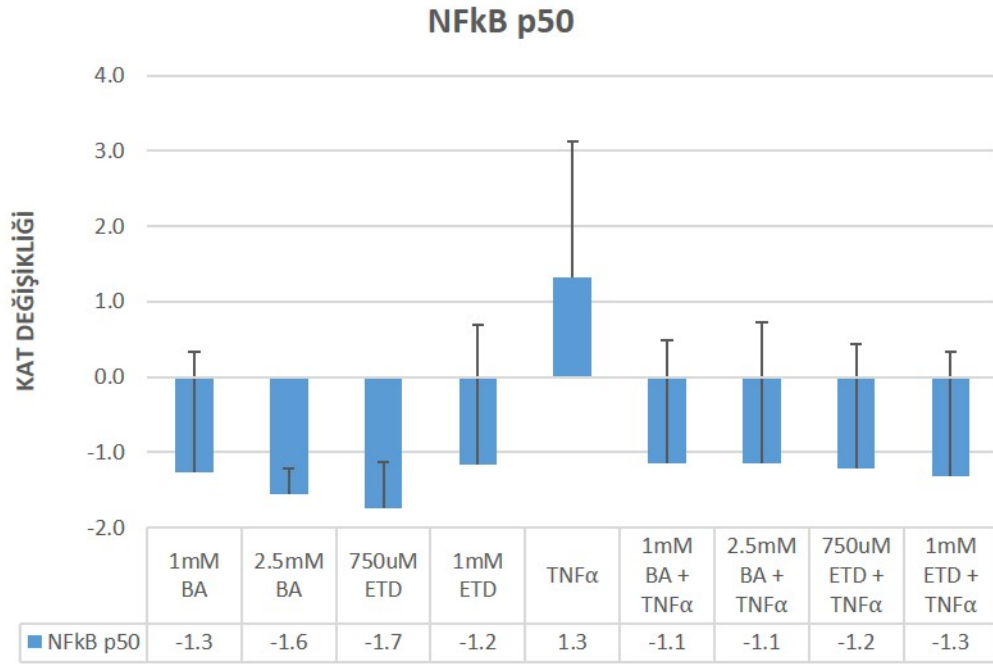


Şekil 4.6. IL1 β gen ekspresyonuna BA ve ETD 67'nin etkisi

Şekil 4.6'da IL1 β gen ekspresyon değişiklikleri incelendiğinde, BA uygulamasının düşük konsantrasyonda IL1 β seviyesini 4,1 kat azalttığı, yüksek konsantrasyonda ise 21,5 kat artırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte özellikle 1 mM ETD 67 uygulaması ile 3,1 katlık bir azalma olduğu belirlendi. TNF- α 'nın tek başına IL1 β seviyesini anlamlı olarak değiştirmedi belirlendi. Tek başına BA uygulamaları ile BA + TNF α uygulamalarının birbirlerine benzer değişikliklere yol açtığı gözlenirken, ETD 67'nin daha etkin bir rol oynayarak 2,6 ve 17,4 kat olacak şekilde IL1 β seviyesinin azalmasına neden olduğu belirlendi.

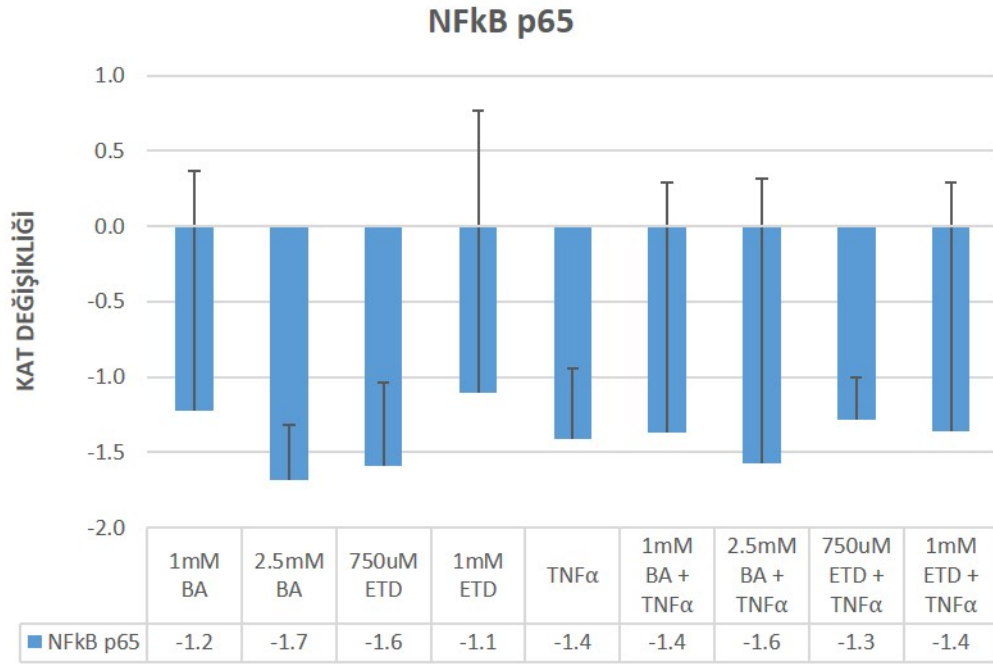
4.2.2. BA ve ETD 67'nin NF κ B sinyal yolağına etkisi

Bor bileşikler varlığında hedef sitokin gen ekspresyonlarının incelenmesinin ardından, özellikle bu sitokinlerin salınımından sorumlu olduğu düşünülen NF κ B sinyal yolağındaki NF κ B p50, NF κ B p65 ve I κ B α hedef genlerinin transkripsiyonel regülasyonları incelendi.



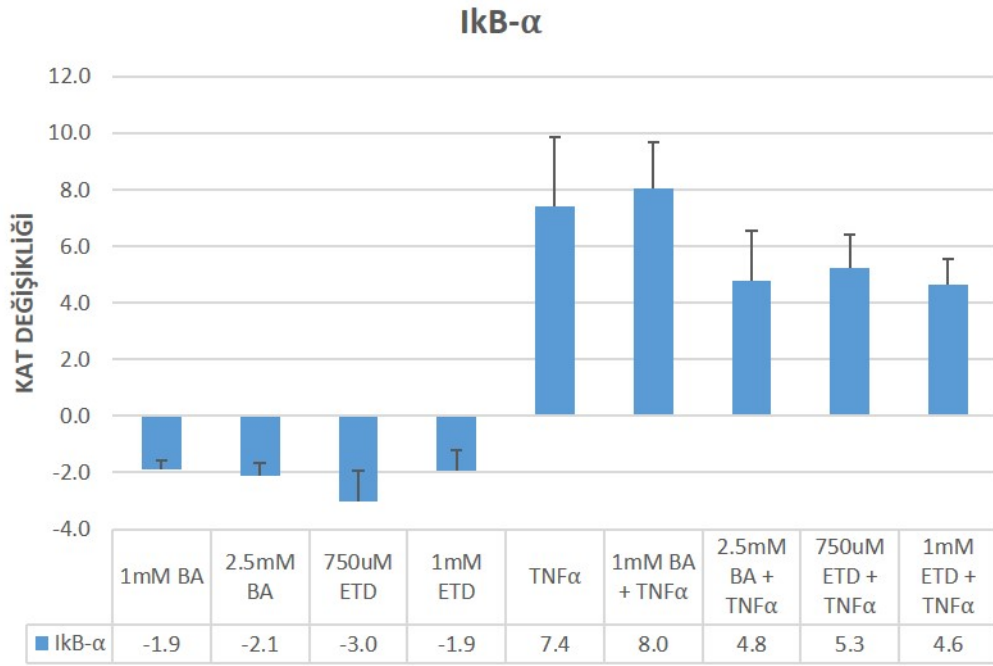
Şekil 4.7. BA ve ETD 67'nin NFκB p50 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.7'de NFκB p50 genine ait kat değişiklikleri incelendiğinde yapılan tüm uygulamalarda 2 katın üzerinde bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle gözlenen değişikliklerin çok anlamlı olmadığı sonucuna varıldı. Bununla birlikte beklenildiği şekilde TNF-α uygulaması ile gen ekspresyonunda artışların ve bor bileşikleri varlığında ise azalışların olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.8. BA ve ETD 67'nin NFκB p65 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.8'de görüldüğü üzere, NFκB p50'ye benzer şekilde NFκB p65 gen ekspresyonunda da yapılan uygulamalar ile çok anlamlı değişiklikler olmadığı belirlendi. NFκB p50 geninin aksine NFκB p65 için tüm uygulamalarda aşağı regülasyon ile azalan kat değişikliklerinin olduğu gözlemlendi.

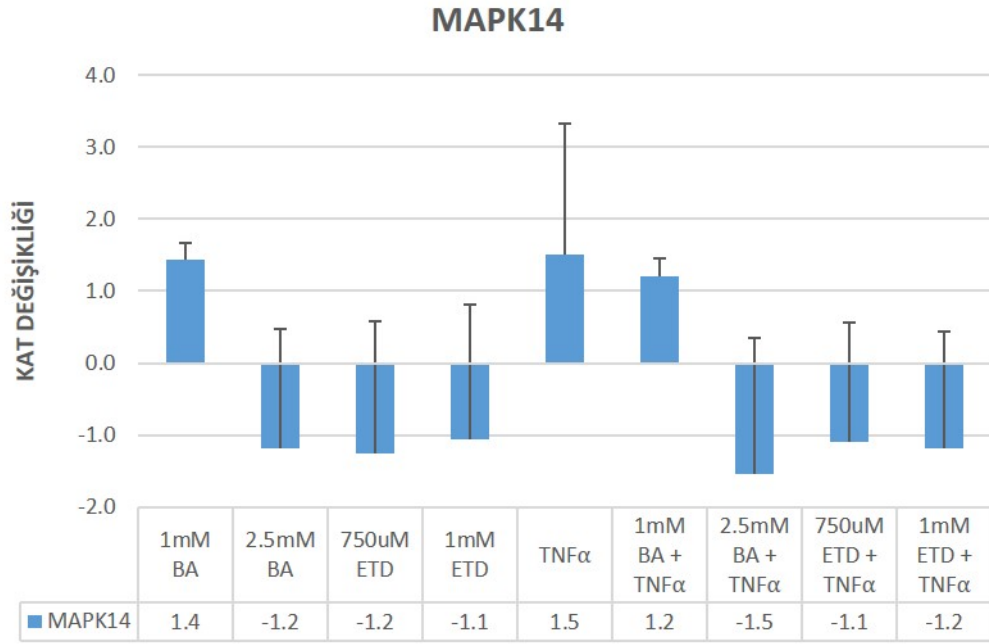


Şekil 4.9. Borik asit ve ETD 67'nin IκB-α gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, bu tez kapsamında NFκB sinyal yolağında incelenen hedef genlerden yalnızca IκBα ekspresyon seviyesinde 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler elde edildi. Tek başına bor bileşikleri varlığında azalan IκBα ekspresyon seviyesinin, TNFα ile birlikte arttığı gözlemlendi. Tek başına 1 mM ve 2,5 mM BA uygulaması sırasıyla 1,9 ve 2,1 kat azalışa yol açarken, 750 µM ve 1 mM ETD 67 uygulaması sırasıyla 3,0 ve 1,9 katlık azalışa yol açtı. Bununla birlikte TNFα ile birlikte 7,4 kat artan IκBα ekspresyon seviyesinin 2,5 Mm BA, 750 µM ve 1 mM ETD 67 için sırasıyla 4,8, 5,3 ve 4,6 kata gerilediği gözlemlendi.

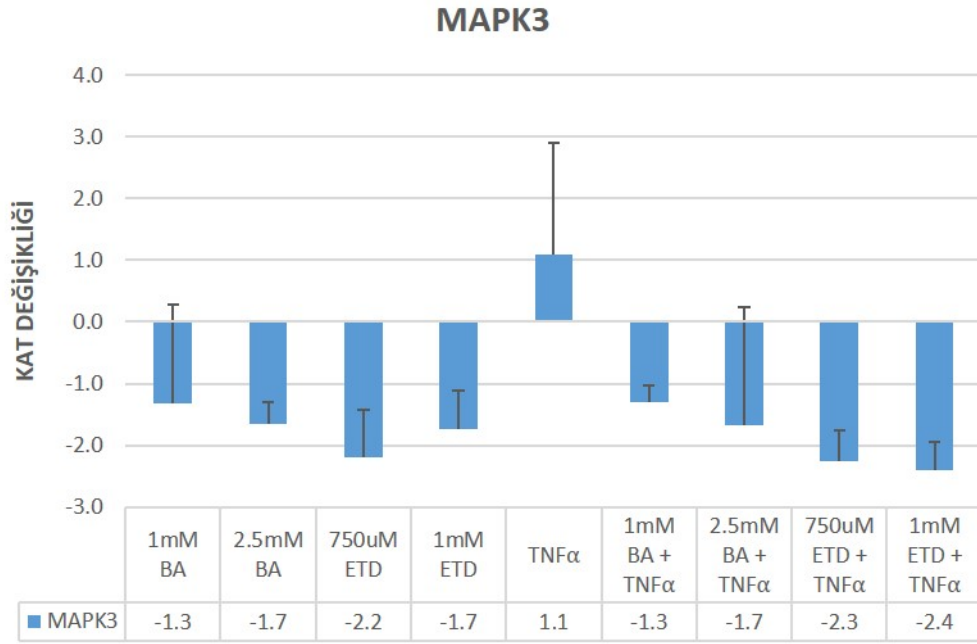
4.2.3. BA ve ETD 67'nin MAPK yolağına etkisi

Bor bileşiklerinin MAPK sinyal yolağının regülasyonunda bir etkisi olup olmadığını sorgulamak için bu sinyal yolağında rol oynayan MAPK14 (p38), MAPK3 (ERK1) ve MAPK8 (JNK1) genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile incelendi.



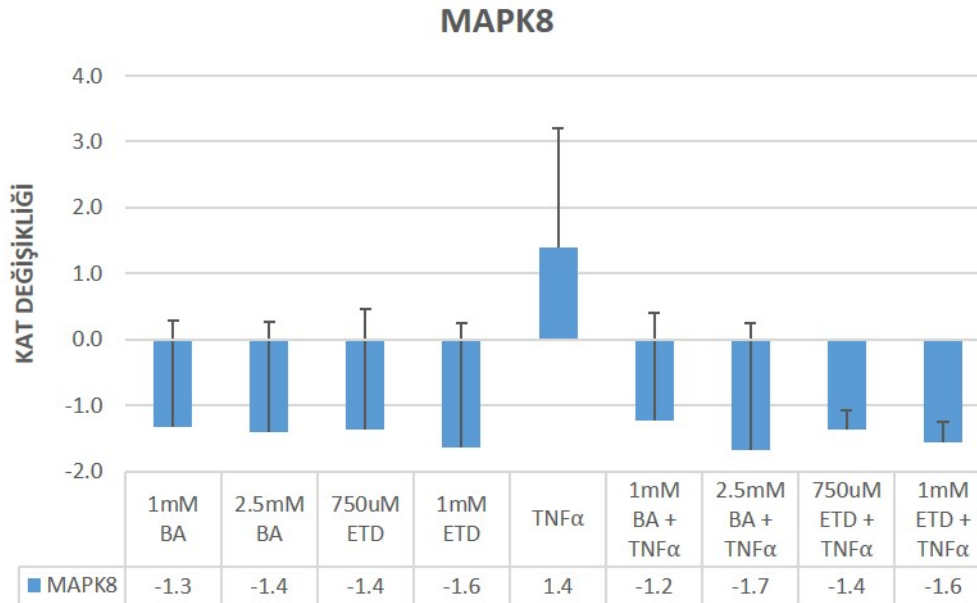
Şekil 4.10. BA ve ETD 67'nin MAPK14 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.10'da MAPK14 (p38) genine ait kat değişiklikleri incelendiğinde yapılan tüm uygulamalarda 2 katın üzerinde bir değişiklik olmadığı gözlemlendi. Bu nedenle gözlenen değişikliklerin çok anlamlı olmadığı sonucuna varıldı. Bununla birlikte TNF- α uygulaması ile belirli bir miktar (1,5 kat) artan gen ekspresyonunun bor bileşikleri varlığında azaldığı gözlemlendi.



Şekil 4.11. BA ve ETD 67'nin MAPK3 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.11'de görülen MAPK3 (ERK1) genine ait kat değişiklikleri incelendiğinde, ekspresyon seviyesinin TNFα ile değişmediği, bununla birlikte bor bileşikler varlığında azalışlar olduğu gözlemlendi. Özellikle TNFα varlığında ve yokluğunda ETD 67 ile 2 katın üzerinde anlamlı azalışlar olduğu belirlendi.

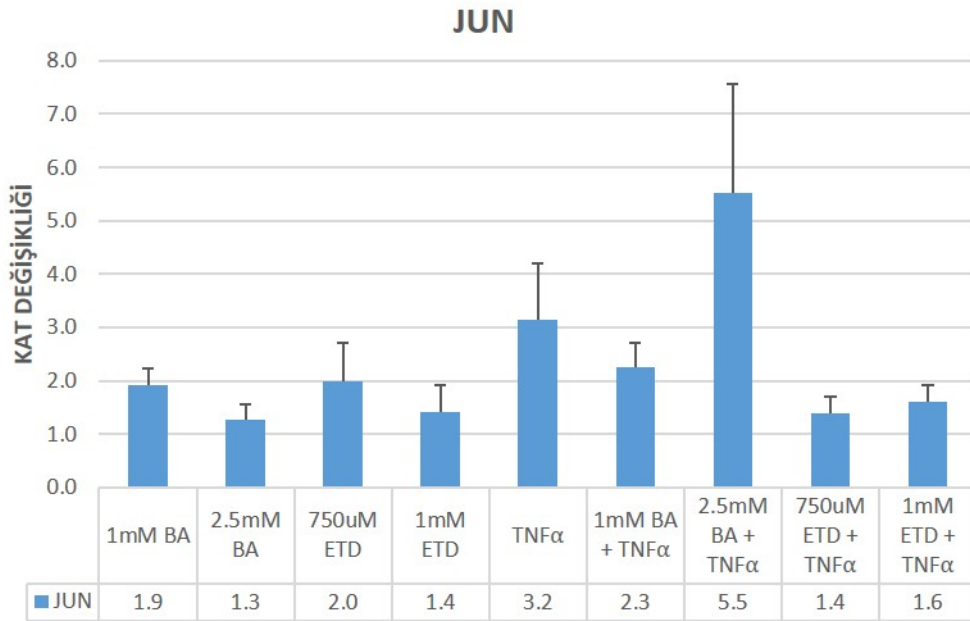


Şekil 4.12. BA ve ETD 67'nin MAPK8 gen ekspresyonu üzerine etkisi

MAPK sinyal yolağında araştırılan diğer hedef genlere benzer şekilde Şekil 4.12’de görüldüğü gibi MAPK8 (JNK1) gen ekspresyonunda da yapılan uygulamalar sonucunda 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler olmadığı belirlendi. Benzer şekilde yine TNF α uygulaması ile az miktarda artan gen ekspresyonunun, bor bileşikleri varlığında azaldığı gözlemlendi.

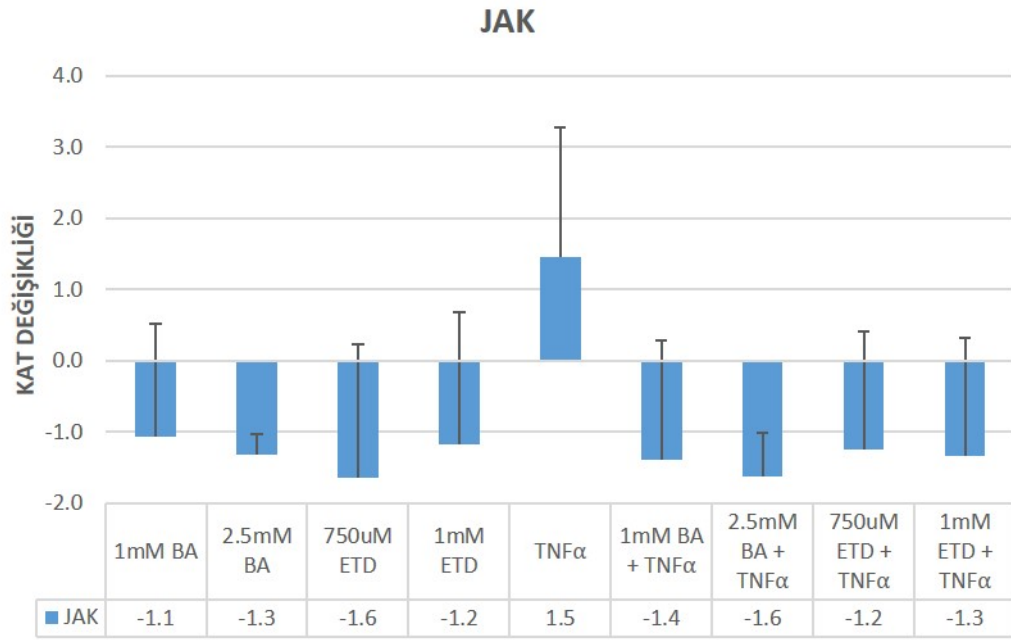
4.2.4. BA ve ETD 67’nin JAK/STAT3 yolağına etkisi

Son olarak qRT-PCR analizi ile JAK/STAT3 sinyal yolağı ile ilişkili olabilecek JUN (AP-1), JAK ve TP53 (p53) genlerinin transkripsiyonel regülasyonları bor bileşiklerinin varlığında ve yokluğunda araştırıldı.



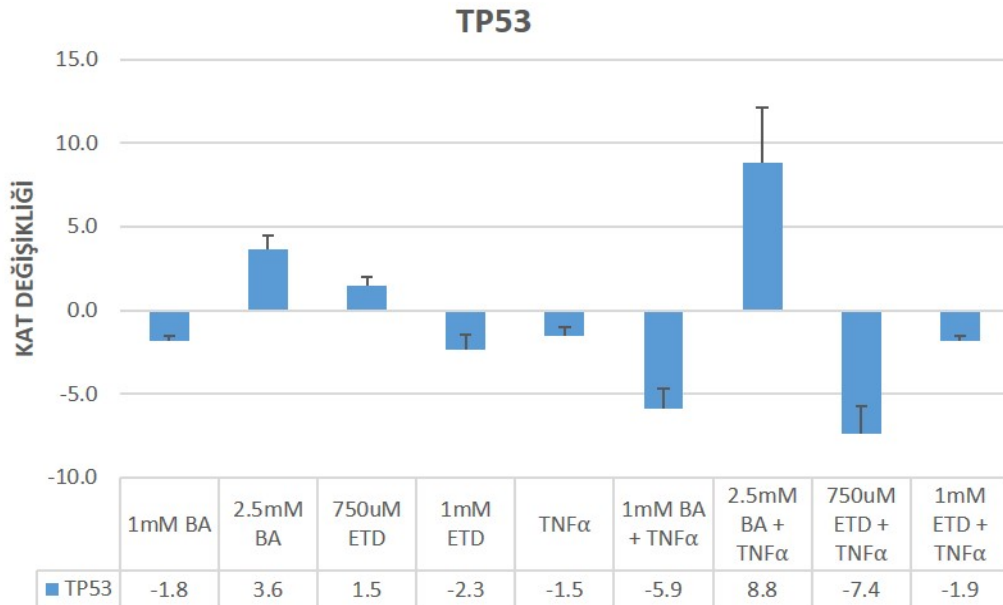
Şekil 4.13. BA ve ETD 67’nin JUN gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.13’de görülen JUN (AP-1) gen ekspresyon kat değişiklikleri incelendiğinde, tek başına bor bileşikler uygulaması ile 2 katın üzerinde anlamlı bir değişikli olmadığı belirlendi. Tek başına TNF α uygulamasının JUN gen ekspresyonu 2,3 kat artırdığı saptandı. BA uygulaması ile 5,5 değerine yükselen bu kat değişikliğinin, 750 μ M ve 1 mM ETD 67 için sırasıyla 1,4 ve 1,6 kata azaldığı belirlendi.



Şekil 4.14. BA ve ETD 67'nin JAK gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.12'de görüldüğü gibi JAK gen ekspresyonunda yapılan uygulamalar sonucunda 2 katın üzerinde anlamlı değişiklikler olmadığı belirlendi. TNFα uygulaması ile az miktarda artan gen ekspresyonunun (1,5 kat), bor bileşikleri varlığında azaldığı gözlemlendi.



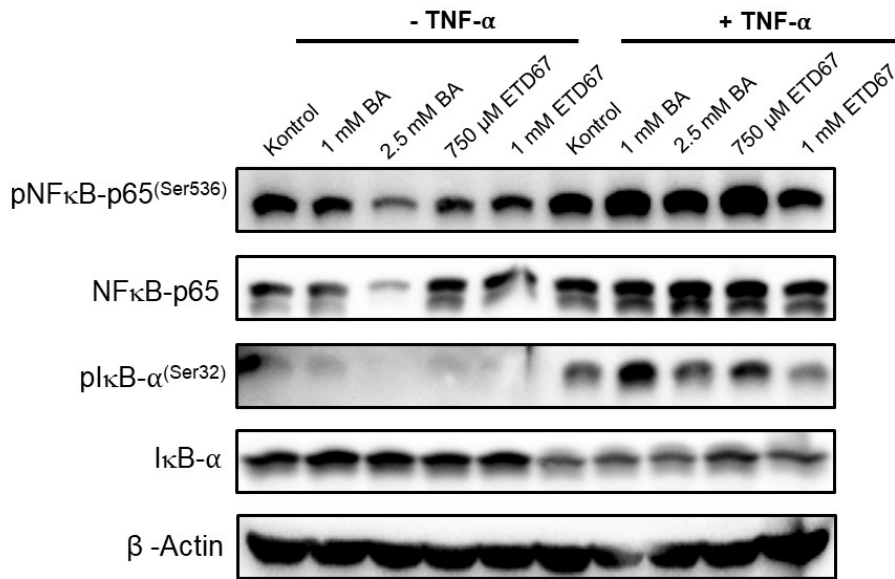
Şekil 4.15. BA ve ETD 67'nin TP53 gen ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 4.15’de TP53 gen ekspresyonuna ait kat değişiklikleri incelendiğinde tek başına uygulanan 2,5 mM’lık BA uygulamasının TP53 gen ekspresyonunu 3,6 kat artırdığı, aksine 1 mM ETD 67 uygulamasının ise 2,3 kat azalttığı belirlendi. Tek başına uygulanan TNF- α ’nın, TP53 protein ekspresyonunu 1,5 kat azalttığı gözlemlendi. Tek başına BA varlığına benzer şekilde TNF- α ile birlikte uygulanan 1mM’lık BA’ın TP53 ekspresyon seviyesini 5,9 kat azalttığı ancak 2,5 mM’lık BA’ın ise 8,8 kat artırdığı saptandı. TNF- α ile birlikte ETD 67’nin her iki konsantrasyonu için de TP53 seviyesinde azalışlar olduğu ve sırasıyla 7,4 ve 1,9 kat azaldığı belirlendi.

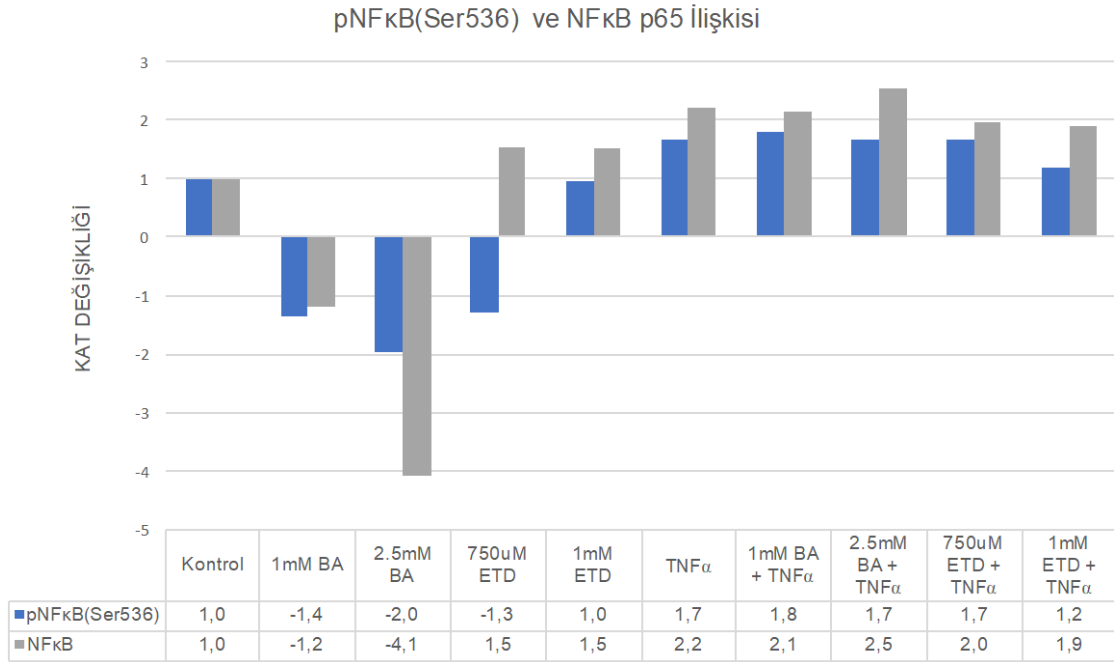
4.3. Western Blot Sonuçları

Bu tez kapsamında western blot ile BA ve ETD 67’nin MCF-7 hücre hattında NF κ B sinyal yolağı üzerine bir etkisi olup olmadığı sorgulandı. Bu amaç doğrultusunda farklı konsantrasyonlarda 48 saat süreyle BA ve ETD 67 uygulanan MCF-7 hücrelerine son 1 saatte TNF- α ilave edildi. Ardından protein izolasyonları yapıldı, proteinler SDS-PAGE jellerinde yürütüldü ve PVDF membranlar üzerinde antikorlar aracılığıyla görüntülendi. Membran görüntülerinin kantitatif analizleri ise housekeeping gen olan GAPDH’e karşı; Image J yazılım programı kullanılarak yapıldı ve protein seviyesindeki değişimler kat cinsinden belirlendi.

4.3.1. NF κ B ve I κ B α yolağı sonuçları



Şekil 4.16. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen NF κ B sinyal yolağı ile ilgili proteinlerin seviyesi

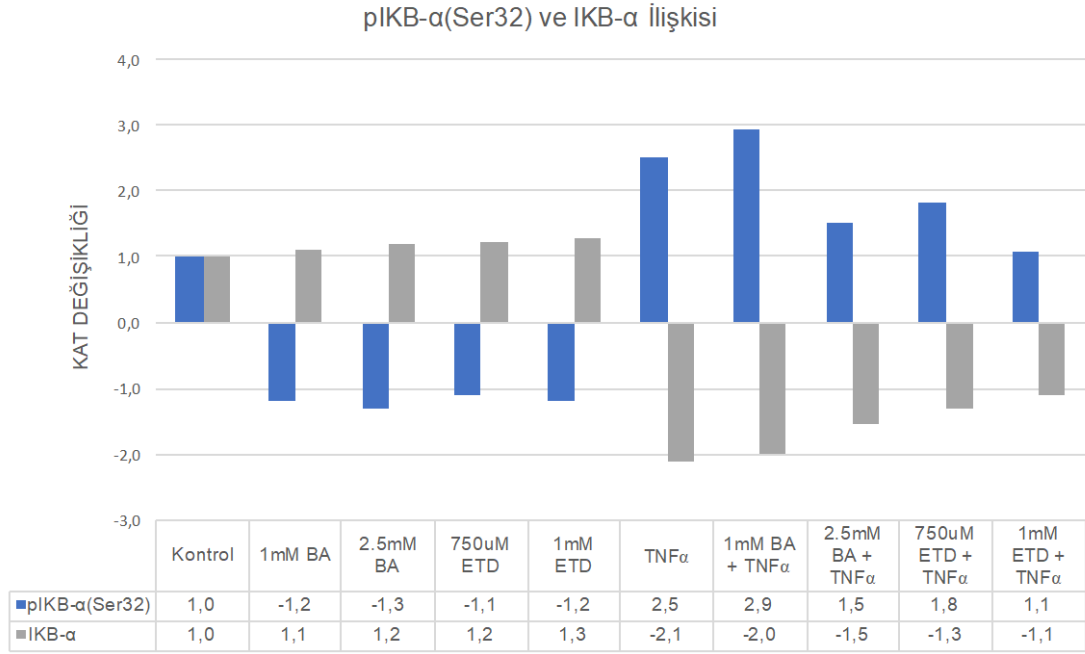


Şekil 4.17. MCF-7 hücrelerine TNF-α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen NFκB ve pNFκB^(Ser536) (p65) proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri

Şekil 4.16'daki membran görüntüleri ve Şekil 4.17'deki kat değişiklikleri incelendiğinde, TNF-α yokluğunda 1mM borik asite maruz kalan MCF-7 hücrelerinde fosforile NFκB protein seviyesi 1,4 kat, NFκB seviyesi ise 1,2 kat azalmıştır. TNF-α yokluğunda 2,5mM borik asite maruz kalan MCF-7 hücrelerinde fosforile NFκB protein seviyesi 2,0 kat, NFκB seviyesini ise 4,1 kat azalmıştır. TNF-α yokluğunda 750 µM ETD67'ye maruz kalan MCF-7 hücrelerinde fosforile NFκB seviyesi housekeeping gen aktine göre 1,3 kat azalırken, NFκB seviyesini ise 1,5 kat artmıştır. TNF-α yokluğunda 1mM ETD67'ye maruz kalan MCF-7 hücrelerinde fosforile NFκB seviyesi 1,05 kat azalırken, NFκB seviyesi ise 1,5 kat artmıştır.

TNF-α uygulaması ile birlikte NFκB fosforilasyon seviyesi 1,7 kat, toplam p65 protein seviyesi ise 2,2 kat artmıştır. TNF-α varlığında her iki konsantrasyonda BA uygulaması NFκB fosforilasyon seviyesini değiştirmezken, 2,5 mM BA uygulaması NFκB p65 protein seviyesini 2,5 kat artırmıştır. TNF-α varlığında 750 µM ETD 67 uygulaması NFκB fosforilasyon ve toplam protein seviyesini tek başına TNF-α'ya göre

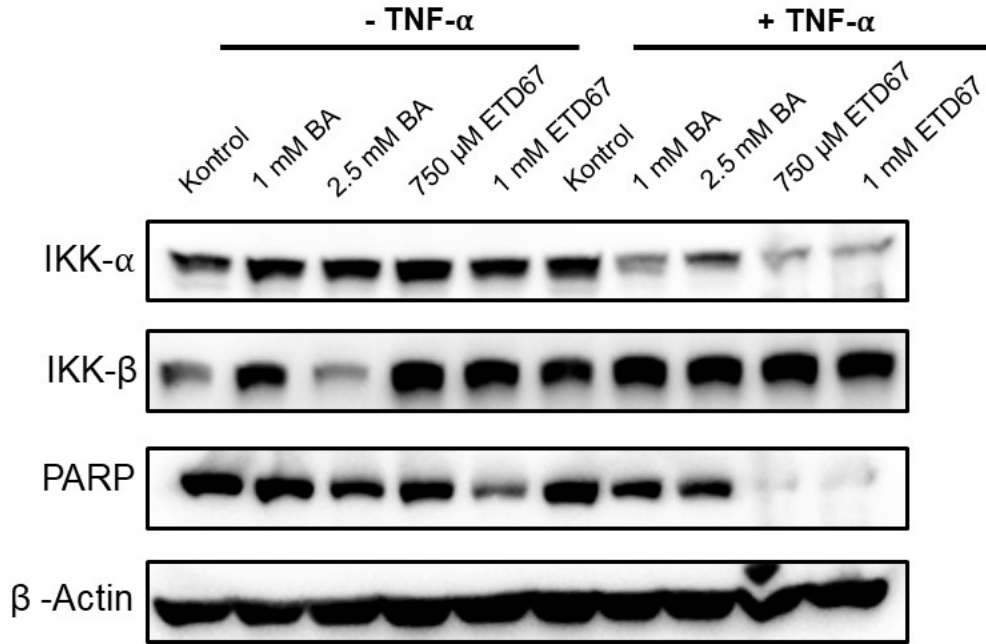
değiştirmemiş, ancak 1 mM ETD 67 uygulaması TNF- α ile artan NF κ B fosforilasyon ve protein seviyesini sırasıyla 1,2 ve 1,9 kata azaltmıştır.



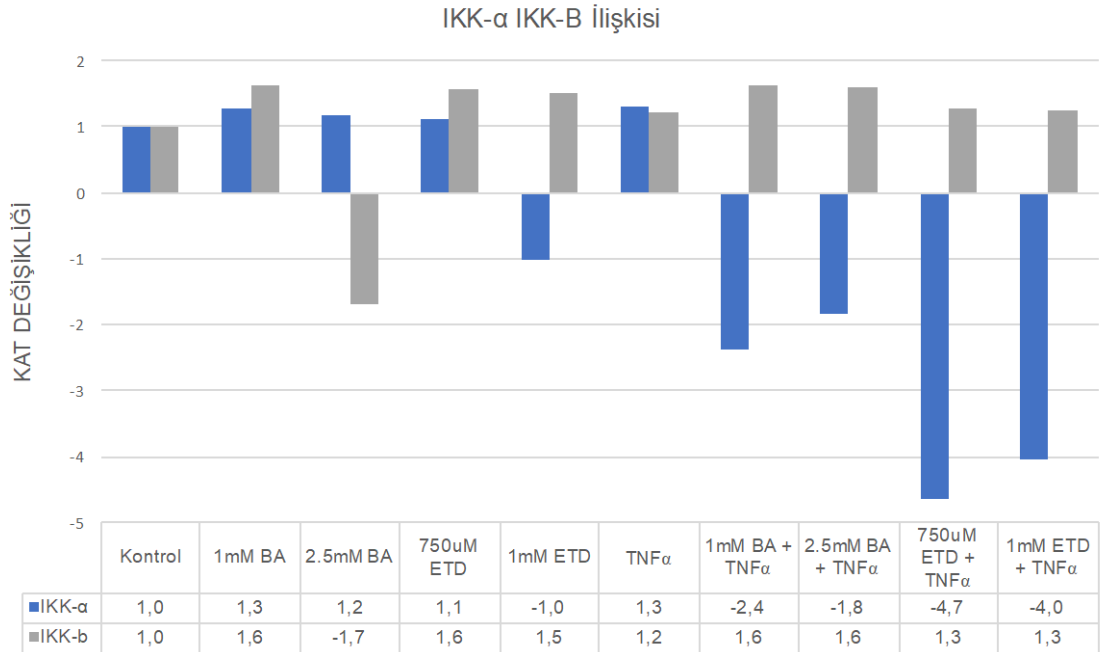
Şekil 4.18. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKB- α ve pIKB- α ^(Ser32) proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri

Şekil 4.18’de IKB- α ve pIKB- α ^(Ser32) protein seviyeleri için hesaplanan kat değişiklikleri incelendiği zaman, tek başlarına bor bileşikleri uygulandığında pIKB- α ^(Ser32) seviyesinin azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte TNF- α uygulaması ile 2,5 kat artan pIKB- α ^(Ser32) seviyesinin 2,5mM BA, 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD 67 ile sırasıyla 1,5, 1,8 ve 1,1 kata azaldığı belirlendi. IKB- α protein seviyesinde ise tek başlarına bor bileşikleri belirli bir miktar artışa yol açarken, TNF- α varlığında gözlenen 2,1 katlık azalışı engelleyerek IKB- α protein seviyelerinin artmasına yol açtığı gözlemlendi. Özellikle ETD 67’nin IKB- α protein seviyesini yaklaşık 2 kat artırdığı belirlendi.

4.3.2. IKK- α ve IKK- β yolağı sonuçları

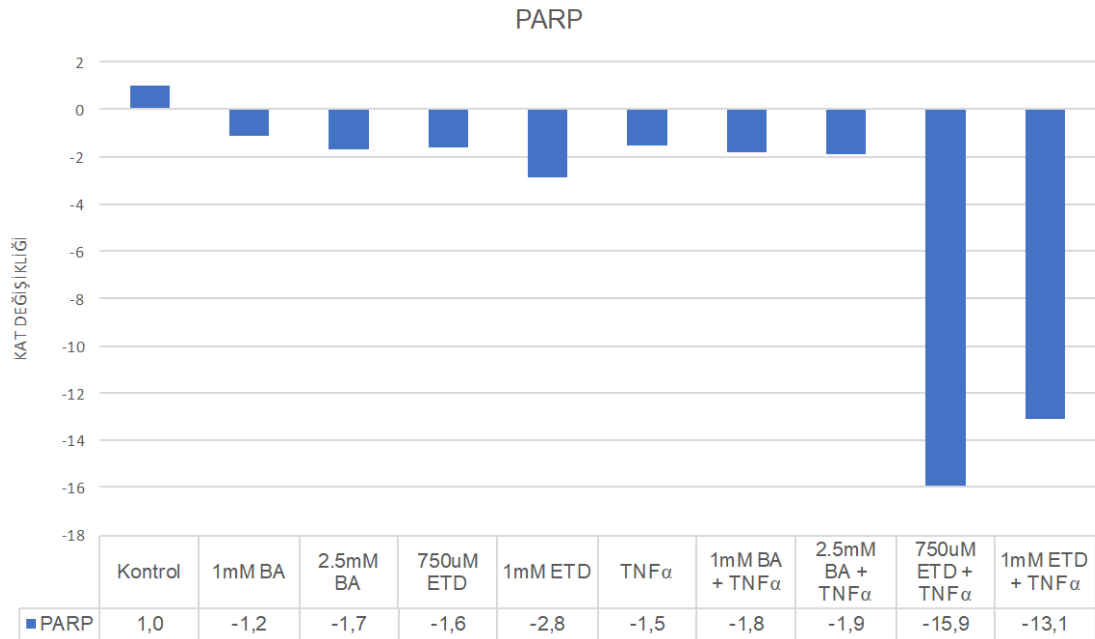


Şekil 4.19. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKK- α , IKK- β ve PARP proteinlerinin seviyesi



Şekil 4.20. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen IKK- α ve IKK- β proteinlerinin kat cinsinden elde edilen değişimleri

Son olarak bu tez kapsamında IKK- α , IKK- β ve PARP proteinlerinin seviyesi western-blot ile incelendi. IKK- α ve IKK- β için Şekil 4.16'daki membran görüntüleri ve Şekil 4.17'deki kat değişiklikleri incelendiğinde, tek başına bor bileşikleri uygulandığında kontrol hücrelerine kıyasla IKK- α protein seviyesi yüksek oranlarda ve anlamlı kat değişiklikleri elde edilmemiştir. Bununla birlikte tek başına TNF- α uygulamasında IKK- α protein seviyesi 1,3 kat artmıştır. İlginç olarak ise bor bileşikleri varlığında yapılan TNF- α uygulamalarında yüksek oranlarda azalışlar olmuştur. 1mM BA, 2,5 mM BA, 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD 67 varlığında yapılan TNF- α uygulamalarında IKK- α protein seviyesi sırasıyla 2,4, 1,8, 4,7 ve 4,0 kat azalmıştır. IKK- β protein seviyesi tek başına bor bileşikleri uygulandığında sadece 2,5 mM BA uygulamasında 1,7 kat azalırken; 1mM BA, 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD 67 ile sırasıyla 1,6, 1,6 ve 1,5 kat artmıştır. IKK- α 'ya benzer şekilde tek başına TNF- α uygulamasında kontrol hücrelerine kıyasla IKK- β protein seviyesi 1,2 kat artmıştır. Bununla birlikte IKK- α ile ters olarak bor bileşikleri varlığında yapılan TNF- α uygulamalarında artışlar olmuştur. 1mM BA, 2,5 mM BA, 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD 67 varlığında yapılan TNF- α uygulamalarında IKK- β protein seviyesi sırasıyla 1,6, 1,6, 1,3 ve 1,3 kat azalmıştır.



Şekil 4.21. MCF-7 hücrelerine TNF- α varlığında ve yokluğunda BA ve ETD 67 uygulanması sonucunda gözlenen PARP proteininin kat cinsinden elde edilen değişimleri

Bu tez kapsamında apoptoz ile ilişkili olarak sadece toplam PARP protein seviyesi incelendi. Şekil 4.21’de PARP proteini için elde edilen kat değişiklikleri incelendiğinde, kontrol hücrlerine kıyasla tek başına bor uygulaması yapılan hücrelerde PARP protein azalmıştır. PARP protein seviyesi 1mM BA, 2,5 mM BA, 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD 67 için sırasıyla 1,2, 1,7, 1,6 ve 2,8 kat azalmıştır. Tek başına TNF- α uygulamasında 1,5 katlık bir azalma elde edilmiştir. Bor bileşikleri varlığında yapılan TNF- α uygulamalarında ise bor bileşikleri sinerjik bir etki göstererek PARP protein seviyesinin yüksek oranlarda azalmasına yol açmıştır. Özellikle 750 μ M ETD 67 ve 1 mM ETD varlığında yapılan TNF- α uygulamasında sırasıyla 15,9 ve 13,1 kat azalma olmuştur.



5. TARTIŞMA

Yetişkinlerde tüm kanser türlerinin %20'si enfekte ajanlara veya diğer çevresel faktörlere maruz kalmaktan dolayı başlayan kronik enflamasyondan kaynaklanmaktadır çünkü tümörle ilişkili enflamatuvar cevap, tümör gelişimini ve ilerleyişini uyarıcı paradoksal etkilere sahiptir (McLaughlin ve ark. 2020). Kanser dokusunda oluşan enflamasyon tümör mikroçevresine; çoğalma sinyalleri oluşturan büyüme faktörlerini, hücre ölümünü sınırlandıran yaşamsal faktörleri, öncül anjiyogenik faktörleri, invazyonu ve metastazı tetikleyen çeşitli ekstraselüler matriks modifiye edici enzimleri ve epitel mezenkim geçişi aktivasyonuna sebep olan uyarıcı sinyalleri sağlamaktadır. Ayrıca enflamatuvar hücreler komşu hücreler için bir hayli mutajenik olan çeşitli kimyasalları ve reaktif oksijen türlerini salarak genetik düzensizliklere neden olmaktadır (Tower ve ark. 2019).

Borun Geleceğini Tasarlayan Eti Maden bor ve bor ürünlerinin tarım alanlarında kullanımının yaygınlaştırılması amacıyla yürüttüğü Ar- Ge projeleri sonucunda Etidot 67 ürününü geliştirmiştir. Tarım endüstrisinin verimli alanlara sahip olması amacıyla sektöründe uzmanlaşmış profesyoneller tarafından 2010 yılında geliştirilen ve %20.8 oranında bor içeren Etidot-67, Türkiye ve dünyadaki tarım alanlarından alınan verimi, toprak kalitesini ve bitkilerin gelişimini olumlu olarak etkilemektedir. Bu doğrultuda meyve ve bitki kalitesi artmakta Türkiye ve dünyada tarım ekonomisi büyümeye devam etmektedir. Boraks ve borik asit reaksiyonundan üretilerek önemli bir bitki besin maddesi olan Etidot 67, %67 oranında boroksit içermektedir (www.etimaden.gov.tr). Son epidemiyolojik in vitro ve hayvan çalışmaları plazmadaki en bol fizyolojik bor olan borik asidin (BA) kemoterapik bir ajan olarak olası bir rolünü ortaya koymaktadır. (Nielsen ve Meacham 2011). Bor bileşiklerinden etkilenen kanser türleri başlıca prostat kanseri, meme kanseri, rahim ağzı kanseri, akciğer kanseri ve melanomdur (Scorei ve ark. 2010). Borun düşük toksisiteye sahip olması, vücutta birikmemesi gibi farmakolojik özellikleri çekici bir kanser tedavisi ajanı olmasına yol açmaktadır ancak mekanizmasının henüz tam olarak anlaşılamaması potansiyel kullanımını engellemektedir (Bradke ve ark. 2008, Mcauley ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar borun enflamatuvar yanıtın regülasyonunda önemli bir rolü olabileceğini söylemektedir (Soriano-Ursua ve ark. 2014). Borun enflamasyon sürecinde, artan enzimatik aktiviteleri azaltacak bir represyon sinyali olarak

fonksiyon gösterdiği ve başta kanser dahil olmak suretiyle enflamatuvar hastalıklara yakalanma riskini azalttığı düşünülmektedir (Scorei ve ark 2011). Yüksek bor konsantrasyonuna sahip olması açısından bu tez çalışmasında borik asit (BA) ve Etidot 67 (ETD 67) kullanılmıştır.

Enflamatuvar süreçleri inhibe etmek veya enflamasyonu ortadan kaldırmak, kanserin baskılanmasında ve tedavi stratejisinde mantıklı bir rolü temsil etmektedir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında bor bileşiklerinin anti-enflamatuvar özelliklerinden yola çıkarak meme kanseri gelişiminde rol oynadığı düşünülen enflamasyon da fonksiyon gösteren gen ve proteinlerin bor bileşikleri varlığında nasıl bir değişime uğradığını araştırmak amaçlanmıştır. MCF-7 hücreleri, hücre sitoplazmasında östrojen reseptörleri (ER) yoluyla östrojenin östradiol formunda işlenmesi gibi meme epiteline özgü birkaç ideal özelliği korudukları için in vitro meme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Camarillo ve ark. 2014). Bu amaç doğrultusunda çalışmamızda MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. ETD 67 yüksek MCF-7 hücreleri uygun koşullarda büyütülmüş daha sonrasında ise MTT deneyleri ile bu hücrelere uygulanacak borik asit (BA) ve Etidot 67 (ETD 67) bileşiklerinin sitotoksikite 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 qRT-PCR ve western blot analizleri ile NFκB sinyal yolağı başta olmak üzere enflamasyon ile ilişkili olan hedef gen ve proteinlerin seviyelerindeki değişimler incelenmiştir.

NFκB'nin aktivasyonu, çeşitli sitokin ve büyüme uyarılarına yanıt olarak ortaya çıkar ve çoğalma ve hayatta kalma gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesine yol açar. NFκB'nin klasik aktivasyonu, IκB kinaz (IKK) kompleksi tarafından IκB'nin fosforilasyonu, ardından IκB ubiquitination ve degradasyonu ve ardından NFκB'nin nükleer translokasyonu ile gerçekleşir. Ek olarak, NFκB'nin farklı bölgelerde fosforilasyonu, DNA bağlama yeteneğini düzenler ve NFκB'nin nükleer translokasyonunu artırır. Ayrıca, NFκB, PI3K-Akt yolundan büyüme ve hayatta kalma sinyallerinin bir aracısı olarak hareket edebilir. TNK bağlayıcı kinaz (TBK), IKKa, IKKb, IKKe, ve p38'in tümü, Ser536'da IL-1 ile indüklenen p65 fosforilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. (Emdal ve ark. 2012).

İlk olarak MTT hücre canlılığı sonuçları ışığında BA uygulamasında 24 saat için IC₅₀ değeri belirlenemezken, 48 ve 72 saatteki IC₅₀ değerlerinin ise sırasıyla 7,5 mM ve 5,7 mM olduğu hesaplandı. ETD 67 bor bileşiği için ise 24, 48 ve 72 saatteki IC₅₀ değerleri sırasıyla 6,7 mM, 1,2 mM ve 0,52 mM olarak hesaplandı. Sonuç olarak BA ve ETD 67 bileşiklerinin pozitif kontrol olarak kullanılan bortezomib kadar etkili olmadığı ancak bununla birlikte her ikisinin de zamana ve konsantrasyona bağımlı bir şekilde hücre canlılıklarını azalttığı belirlendi. Aynı zamanda ETD 67'nin BA'e göre hücre proliferasyonunu azaltmada 6 kat daha başarılı olduğu ve daha etkili bir anti-proliferatif ajan olarak rol oynayabileceği düşünüldü.

MTT sonuçları baz alınarak, antikanser ajan olarak kullanılmak istenen konsantrasyon değerleri borik asit için 1mM ve 2,5mM; ETD67 için ise 750 µM ve 1mM seçilmiş ve 48 saat süreyle uygulandı. NFκB yolağının aktifleşmesi ve sitokin salınımlarının artması amacıyla da hücrelere 1 saat süreyle TNF-α ilave edildi. Ardından tez çalışması kapsamında belirlenen hedef gen ve proteinlerin seviyelerindeki değişimler qRT-PCR ve western blot ile incelendi.

Normal dokularda, anti-enflamatuar sitokinler, proenflamatuar sitokinler üretildikten sonra senkronize olarak yukarı regüle edilir ve bu da enflamasyonun çözülmesine yol açar (Hamid ve ark 2011). Bununla birlikte büyüme faktörleri, proenflamatuar sitokinler, kemokinler, ROS ve RNS gibi bazı enflamatuar aracı molekülün yukarı regülasyonu kanserlerin ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır (Khandia ve Munjal 2019). Geçtiğimiz on yıllar boyunca, enflamasyonun tümör gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı kanıtlanırken, başlıca moleküler mekanizmaların çoğu şimdi ortaya çıkarılarak, meme kanseri başlangıcında, göçünde ve ilerlemesinde sitokinlerin ve özellikle IL-6, IL-8, IL1-α ve IL1-β gibi interleukinlerin (IL'ler) kilit rolü vurgulanmıştır (Fasoulakis ve ark. 2018).

Kumar ve arkadaşları; IL-1 aşırı ekspresyonunun kanser ilerlemesi üzerindeki etkisini anlamak canlıda, çıplak fare modelini kullanmış ve IL-1'in; biri tümörün büyümesi ve diğeri metabolik durum (IL-1'i aşırı eksprese eden tümör hücrelerinin metastaz

yapamamasıdır) üzerinde olmak üzere iki ana etkisi gözlemlenmiştir (Kumar ve ark. 2003).

Parakrin IL-6'nın ortak kültür çalışmalarında STAT3 fosforilasyonunun ana aracısı olduğu bulunmuştur. Parakrin ve otokrin IL-6 maruziyetinden sonra ER pozitif meme tümörü hücre hattı MCF-7'de gelişmiş tümör hücresi büyüme oranları gözlemlenmiş, burada MCF-7 büyüme oranları, MSC ile birlikte kültürlendiğinde >2 kat artmıştır. Meme kanserinden bağımsız olarak, yüksek IL-6 serum seviyeleri, metastatik meme kanserli kadınlarda hastalık evrelemesi ve olumsuz klinik sonuçlarla doğrudan ilişkilidir. Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 3 aktivatörü (STAT3), IL-6'ya maruz kaldıktan sonra aktive edilen birincil hücre içi hedeflerden biridir ve STAT3 aktivasyonu, meme kanserinde gelişmiş tümör hücresi büyümesi, hayatta kalma ve bağışıklık kaçırma ile bağlantılıdır. IL-6'nın heterodimerik IL-6 reseptörüne bağlanması üzerine (IL-6 reseptöründen ve her yerde eksprese edilen sinyal alt birimi gp130, bir 130 kDa transmembran sinyal glikoproteininden oluşur), STAT3 tipik olarak sitoplazmada aktif olmayan bir monomer olarak tutulur. Fosforillendikten sonra STAT3 homodimerler oluşturur, çekirdeğe girer ve çoklu progrowth ve prosurvival genleri aktive eder. Sasser ve arkadaşlar; IL-6'nın MCF-7'nin büyüme hızını artırıp artıramayacağını belirlemek için, yaptığı çalışmada 6 hafta boyunca MCF-7 ksenograftlarını aşılamış ve hücre genişlemelerini göstermişlerdir. Buna karşılık IL-6'ya maruz kalmayan MCF-7 ksenograftları, küçük elle hissedilen tümör nodüllerinin ötesine geçememiştir. Sasser ve arkadaşları son olarak, IL-6'nın ER-pozitif hücre dizisi MCF-7 için güçlü bir büyüme faktörü olarak hareket edebileceğini laboratuvar ortamında ve canlıda göstermiştir. Parakrin veya otokrin tarzda murin tümör mikro-ortamlarına insan IL-6'sının eklenmesi, sağlam MCF-7 tümör hücresi büyümesiyle sonuçlanmıştır (Sasser ve ark. 2007).

IL-6'nın otokrin veya parakrin mekanizmalar yoluyla hareket ederek meme kanseri hücre büyümesini ve göçünü uyardığı bilinmektedir. Hem rekombinant VEGF hem de IL-6, MCF-7 hücrelerinin göç etme kabiliyetinde önemli bir artış üretir. Benzer şekilde, IL-6'nın serum seviyelerinin meme kanseri hastalarında daha kötü bir sonucu öngördüğü görülmektedir (De Luca ve ark. 2012).

IL-6'nın MCF-7 hücrelerinde mutidrug direncini indüklediğini ve hücre proliferasyonu üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Meme kanseri hastalarının sıklıkla serum IL-6 düzeylerinin yükseldiği bulunmuştur (Jiang ve ark. 2019).

Bir immünomodülatör sitokin rolüne ek olarak, IL-8'in metastaz ve anjiyogenezi modüle ederek insan kanserlerinde bir büyüme ve farklılaşma faktörü olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. interlökin-1B (IL1B) veya tümör nekrozu-a (TNFa), MCF-7 hücre sistemlerinde IL-8 üretiminin bilinen aktivatörleridir. IL-8 salgılanması, IL1 ile muamele edilerek MCF-7 hücrelerinde kuvvetli bir şekilde yukarı regüle edilir. IL1B veya TNFa, IL-8 geninin MCF-7 hücrelerinde tamamen işlevsel olduğunu gösterir. IL-8'in ER-pozitif meme kanseri hücrelerinin istilasını da artırabileceği gösterilmiştir (Freundye ve ark. 2003). IL-8'in sadece kanser hücrelerinin istilasını ve metastatik yayılmasını desteklediğine değil, aynı zamanda büyüyen tümörlerde anjiyogenezi arttırdığına inanılmaktadır (Chavey ve ark. 2008).

Son zamanlarda IL-8'in ayrıca bir endotelyal hücre kemoatraktanı olduğu bulunmuştur. Daha spesifik olarak, IL-8 ekspresyonunun bazal seviyesi, metastatik olmayan hatlara kıyasla metastatik hücre hatlarında önemli ölçüde daha yüksektir. Ek olarak, tümörün enflamatuvar ortamı sıklıkla artan TNF- ve/veya IL-1 seviyelerine sahiptir, bu da hem daha mezenkimal bir fenotip ifade eden tümör hücrelerinde hem de tümörde IL-8 üretimini orantısız bir şekilde artıracaktır (De Larco ve ark. 2001).

Bu tez çalışmasında TNF- α sitokin salınımının indüklenmesi amacıyla kullanıldı. IL6, IL1- α ve IL1- β sitokinleri için oldukça az miktarlarda bir artış olduğu gözlenmesine rağmen IL8 seviyesinde 363,5 kat gibi ciddi bir artış olması enflamatuvar yolların tetiklendiğini düşündürdü. Literatür bilgisi ışığında TNF- α ve IL-1 gibi uyarıların 100 kattan daha fazla IL-8 artışına yol açarken bakteri ve EGF gibi faktörlerin ise 5-10 kat arası IL-8 salınımına yol açtığı bilinmektedir (Kim ve ark. 2005). Bu bağlamda tez kapsamında elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu kanısına varıldı. Genel olarak elde edilen sonuçlar incelendiğinde IL1- α ve IL1- β sitokinleri için BA uygulamasında hafif bir artış varken, ETD 67 ile seviyelerinin azaldığı belirlendi. Bu nedenle ETD 67'nin IL1- α ve IL1- β sitokinleri için daha etkili bir anti-enflamatuvar ajan

olabileceği düşünöldü. IL6 seviyesi için her iki bor bileşığının de belirli miktarlarda azalmaya yol açtığı bununla birlikte BA için elde edilen sonuçların konsantrasyona bağımlı olarak daha tutarlı olduğı gözlendi. TNF- α ile IL8 dışında diğeri interlökinlerde istenilen yanıtlar alınamadığından dolayı bor bileşikleri varlığında net bir değeriendirme yapılamadı. IL8 gen ekspresyonu incelendiğinde ise sadece 1mM ETD 67 uygulamasında 1,6 katlık bir azalma gözlenirken TNF- α ile yüksek oranda artan IL8 seviyelerinin bor bileşikleri ile birlikte etkili bir şekilde baskılandığı bulundu. IL-8 seviyesinin Beyin, meme, servikal, kolon, mide, akciğer, melanom, yumurtalık, prostat, renal ve tiroid, Hodgkin lenfoması dahil olmak üzere çeşitli tümör türlerinde ekspresyonunun önemli ölçüde yüksek olduğı bulunmuştur ve tümör boyutu ve evresi ile pozitif korelasyonu bulunmaktadır. Daha yüksek IL-8 konsantrasyonuna sahip kanser hastaları, genellikle zayıf hayatta kalma oranı sergiler (Khandia ve Munjal 2019). IL-8 ER- meme kanserlerinde ifade edilirken, hem ER- hem de ER+ meme kanseri deneklerinde invazivliği ve metastatik potansiyeli arttırmaktadır (Fasoulakis ve ark. 2018). Bu bilgiler ışığında bor bileşiklerinin IL-8 seviyesini etkili bir şekilde azaltmalarından dolayı anti-enflamatuvar ajanlar olarak değeriendirilebilecekleri ve meme kanseri hücrelerinin invazyon ve metastazını azaltabilecekleri kanısına varıldı.

MAPK'lar; hücre farklılaşması, büyüme, çoğalma, göç ve apoptozun kontrolünde anahtar bileşenlerdir. TNF- α ise JNK, PI3K/AKT ve p38/ MAPK yolaklarının aktivasyonu aracılığıyla cJun ve NF κ B transkripsiyon faktörlerini tetikler. cJun (AP-1), MMP9 ve ZEB2 gibi proteinlerin ekspresyonunu tetikleyerek kanser hücresinin invazyon yeteneğini artırır (Fernando ve ark. 2011). STAT-3 transkripsiyon faktörü, meme kanserlerinin %70'inde uygunsuz bir şekilde aktive edilir ve hastalığın patogeneze doğrudan katkıda bulunur. Janus kinazlar (JAK) gibi tirozin kinazlar STAT-3 aktivasyonunu sağladıktan sonra STAT-3'ler çekirdeğe yer değıştiren aktif dimerler oluşturur ve hedef genlerin düzenleyici bölgesindeki aynı kökenli bağlanma bölgelerinde DNA'ya bağlanır. STAT-3 daha sonra proliferasyon, farklılaşma, göç, hayatta kalma ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan anahtar hedef genlerin (IL6, BCL-2, m-cyc gibi) ekspresyonunu düzenler (Egusquiguirre ve ark. 2018). Bu tez çalışmasında MAPK sinyal yolağı ile ilişkili olarak yapılan bütün uygulamada 2 katın üzerinde anlamlı ekspresyon değışiklikleri gözlenmedi. Ancak genel olarak bakıldığında

TNF- α ile artan gen ekspresyon seviyelerinin bor bileşikleri varlığında azaldığı gözlemlendi. JUN, JAK ve TP53 gen ekspresyonlarında ise özellikle ETD 67 uygulamasının TNF- α ile artan gen ekspresyon seviyelerini azalttığı belirlendi. Bu doğrultuda bor bileşiklerinin MAPK ve JAK/STAT3 sinyal yolağının regülasyonu üzerinden de anti-enflamatuar etkiler gösterebileceğine dair kanıtlar elde edildi.

NF κ B; TNF- α tarafından aktive edilen hücre göçünü ve istilasını teşvik etmede en önemli transkripsiyon faktörlerinden biridir (Cruceiru ve ark. 2019). Ayrıca TNF- α ve IL-1 gibi pro-enflamatuar sitokinler ve hormonlar gibi çeşitli uyarıcı moleküller tarafından aktive olan NF κ B çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolağı olarak görev yapar (Concetti ve Wilson 2018, Şen ve ark. 2017). Hücrenin TNF- α ile stimülasyonu üzerine, NF κ B kompleksi çekirdekte aktive olur ve burada TWIST ve SNAIL ailesi üyeleri dahil olmak üzere bu süreçlerde yer alan çeşitli proteinlerle etkileşime girerek meme kanseri hücrelerinde enflamasyonu ve metastazı tetikler (Cruceiru ve ark. 2019).

En sık görülen aktif formlardan biri olan p50/RelA (p65) dimeri bu yolla oluşur. NF κ B dimerleri (p50/RelA) dinlenme durumundayken I κ B adı verilen inhibitör proteinlere bağlı olduğu için inaktif formdadır ve DNA'ya bağlanamaz. İnaktif formdaki bu dimerler, proenflamatuar sitokinlerce (TNF- α , IL-1 β vb.) veya LPS ile uyarılarak enflamatuar uyarı sağlanır. Ardından dimerleri inaktif formda tutan I κ B proteinleri inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi tarafından fosforillenir. Bu olay I κ B'yi ubiquitinasyona hazır hale getirir ve ubiquitinasyondan sonra I κ B'nin ubiquitin-proteazom sistemi ile degradasyonu gerçekleşir. Sitoplazmada I κ B / NF κ B kompleksinde serbest kalan NF κ B (p50/RelA dimeri) nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe geçer (Christian ve ark. 2011, Concetti ve Wilson 2018, Sun 2011).

NF κ B, yalnızca çekirdeğe translokasyon ve dimerizasyondan sonra aktiftir. I κ B, NF κ B'yi sitoplazmada tutarak inaktive eder. Proinflamatuar mediatörlere yanıt olarak I κ B, IKK tarafından fosforile edilerek bozulur ve ardından NF κ B'nin aktivasyonunu sağlar. Michael Karin ve diğerleri; bununla birlikte, iki katalitik alt birimden yalnızca IKK β 'nin proinflamatuar uyarılara yanıt olarak NF κ B aktivasyonu için gerekli olduğunu bildirdi. İkinci katalitik alt birim olan IKK α , özellikle epidermin oluşumu ve farklılaşması

olmak üzere gelişimsel süreçlerde kritik bir rol oynar. Hücre döngüsü ilerlemesinin pozitif bir düzenleyicisi olarak NFκB, siklin D1 c-myc ve cmyb gibi hedef genleri veya lenfoid ve miyeloid hücrelerin proliferasyonunu otokrin bir şekilde uyaran büyüme faktörlerini aktive eder (IL-2, GMCSF, CD40L). Cyclin D1, normal meme bezi gelişimi ve meme karsinogenezinde muhtemelen en önemli NFκB hedef genlerinden biridir. Ayrıca, siklin D1 ekspresyonunun, meme bezi gelişimi sırasında işleyen bir NFκB aktivasyon yolu gerektirdiği gösterilmiştir (Kordestani ve ark. 2020).

Bu tez çalışmasında NFκB sinyal yolağında rol oynayan hedef genlerin ekspresyon seviyeleri bor bileşikleri varlığında incelendi ancak NFκB p50 ve NFκB p65 mRNA seviyelerinde anlamlı kat değişiklikleri elde edilemedi. Ek olarak IκBα mRNA seviyesini tek başına bor bileşikleri azaltırken, TNF-α ile birlikte artırdıkları gözlemlendi. Bununla birlikte IκBα mRNA seviyesinde görülen bu değişiklikler protein seviyesinde doğrulanamadı. Bu bağlamda bor bileşiklerinin NFκB sinyal yolağının transkripsiyonel regülasyonunda rol oynamadığı sonucuna varıldı.

Western blot analizi ile NFκB sinyal yolağında fonksiyon gösteren proteinlerin seviyesindeki değişiklikler incelendiğinde, tek başına TNF-α uygulaması ile NFκB p65 fosforilasyon ve protein seviyelerinin arttığı, IκBα fosforilasyon seviyesinin arttığı ve IκBα protein seviyesinin ise azaldığı belirlendi. Bu sonuçlar ile TNF-α varlığında, IκB proteinleri inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi tarafından IκBα'nın fosforile edilerek degradasyona uğratıldığı ve bu nedenle fosforilasyon seviyesi artarken protein seviyesinin azaldığı düşünüldü. Bununla birlikte TNF-α varlığında NFκB p65 fosforilasyon ve protein seviyelerinin artması sonucunda MCF-7 hücrelerinde TNF-α ile NFκB sinyal yolağının aktivasyonu sağlanarak enflamasyonun tetiklendiği kanısına varıldı.

Bor bileşikleri varlığında gözlenen protein değişiklikleri incelendiğinde, hem tek başlarına hem de TNF-α ile birlikte NFκB p65 fosforilasyon ve protein seviyelerinin bir miktar azaldığı belirlendi. Bor bileşikleri tek başlarına IκBα fosforilasyonunu azaltırken, TNF-α ile birlikte 2,5 kat artan pIKB-α^(Ser32) seviyesini etkili bir şekilde azalttıkları gözlemlendi. IκB-α protein seviyesinde ise tek başlarına bor bileşikleri belirli bir miktar

artıŖa yol açarken, TNF- α varlığında gözlenen 2,1 katlık azalıŖı engelleyerek IKB- α protein seviyelerinin artmasına yol açtığı gözlendi. Özellikle ETD 67'nin IKB- α protein seviyesini yaklaŖık 2 kat artırdığı belirlendi. Bu veriler doğrultusunda TNF- α varlığında IKB- α fosforilasyonu ve degradasyonu aracılığıyla gözlenen NF κ B aktivasyonunun bor bileŖikleri ki özellikle ETD 67 ile engellenerek baskılandığı sonucuna varıldı.

IKB proteinleri inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi tarafından fosforillenir ve IKB- α 'nın değrede olarak NF κ B'nin aktif olması sağlanır (Christian ve ark. 2011, Concetti ve Wilson 2018, Sun 2011). Bu tez alıŖmasında da bor bileŖikleri varlığında IKK- α protein seviyesinin azaldığı belirlenirken, IKK- β protein seviyesinde anlamlı deęiŖiklikler olmadığı gözlendi. Bu bağlamda bor bileŖiklerinin özellikle IKK- α protein seviyesini azaltarak NF κ B aktivasyonunu engelleyebileceği sonucuna varıldı.

Apoptotik uyarma PARP'i aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu yahut PAR polimerazlar yöntemiyle apoptoza neden olur. Son olarak bu tez kapsamında bor ve türevlerinin apoptoz üzerine etkisi olup olmadığı merak edilip BA ve ETD 67 varlığında apoptoz regülasyonu ile iliŖkili olarak PARP protein seviyeleri incelendi. PARP seviyesinin bor bileŖikleri varlığında genel olarak azaldığı ancak özellikle TNF- α ve ETD 67 uygulamasında 15,9 ve 13,1 kat olacak Ŗekilde azalıŖlar olduğu belirlendi. Bu veriler ile özellikle ETD 67'nin MCF-7 meme kanseri hücrelerinde apoptozu tetikleyebileceğine dair kanır elde edildi.

Yüksek konsantrasyonlarda borik asit ve boronik asit IKB α degradasyonunu önleyip NF κ B sinyalini bozarak karsinojenik ilerlemeyi yavaŖlatmaktadır (Durick ve ark. 2005). Yapılan bir alıŖmada borun; IF- γ , IL-1 β , TNF- α ve NF κ B'nin yüksek ekspresyonlarının sebep olduğu enflamasyonu inhibe edip ekspresyon seviyelerini tersine çevirdiği gzlemlenmiŖtir. Yapılan bir diğer alıŖmada ise sıçanlara bor verildiğinde; IF-gamma, TNF- α , IL-1 β ve NF κ B'nin ekspresyon seviyeleri belirgin Ŗekilde azalmıŖ ve bu sonuçlar borun; enflamatuar yanıtı baskılayarak doku hasarının iyileŖebileceęini gstermiŖtir (Ucaroz ve ark. 2018). Bu bilgiler ile uyumlu olarak tez alıŖmasında NF κ B p65 proteininin seviyesi ve aktivasyonun ve böylece sitokin salınımının azalması nedeniyle BA ve ETD 67 gibi bor bileŖiklerinin anti-enflamatuar bir etki

gösterebileceğine ve aynı zamanda apoptozu indükleyebileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir. 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, Elisa veya immünopresipitasyon gibi yöntemler ile interlökin salınımlarının protein seviyesinde incelenmesiyle, NFκB sinyal yolağındaki proteinlerin sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlarındaki farklılıkların belirlenmesiyle ve apoptoz regülasyonunun ayrıntılı bir şekilde incelenmesi ile daha ayrıntılı sonuçlar elde edileceği ve bu şekilde çalışmanın daha ileri seviyelere taşınabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

Acaroz, U., Ince, S., Arslan, D., Gurler, Z., Kucukkurt, İ., Demirel, H., Arslan, H., Varol, N., Zhug, K. (2018). The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 118, 745-752.

Adachi, Y. (2018). Acute phase dynamics of circulating tumor cells after paclitaxel and doxorubicin chemotherapy in breast cancer mouse models. *Breast cancer Research Treatment*, 167, 439-450.

Adams, J. (2004). The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*, 4(5), 349-360.

Ahmad, N., Ammar, A. (2018). IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67, 537-549

Baker, A., Wyatt, D., Bocchetta, M., Li J., Filipovic, A., Green, A., Peiffer, D., Fuqua, S., Miele, L., Albain, K., Osipo, C. (2018). Notch-1-PTEN-ERK1/2 signaling axis promotes HER2+ breast cancer cell proliferation and stem cell survival. *Oncogene*, 37, 4489-4504.

Bakirdere, S., Orenay, S., Korkmaz, M. (2010). Effect of Boron on Human Health. *The Open Mineral Processing Journal*, 3, 54-59.

Ban, H.S, Nakamura, H. (2015). Boron-Based Drug Design. *Chemical Record*, 5, 616-635.

Banikazemi, Z., Aghagolzadeh, H., Mohammadi, M., Taheripak, G., Iranifar, E., Poursadeghiyan, M., Moridikia, A., Rashidi, B., Taghizadeh, M., Mirzaei, H. (2017). Diet and cancer prevention: Dietary compounds, dietary MicroRNAs, and dietary exosomes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1),185-196.

Bannenberg, G., Serhan, C. (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(12), 1260-1273.

Batra, H., Pawar, S., Bahl, D. (2018). Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review. *Pharmacological Research*, 139, 91-105.

Benderdour, M., Hess, K., Dzondo-Gadet, M., Dousset, B., Nabet, P., Belleville, F. (1997). Effect of boric acid solution on cartilage metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 234, 263-268.

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 Adhesion & Migration*, 2(3), 153-160.

Breydo, L. (2013). Boron, Biologically Active Compounds. *Kretsinger R.H, Uversky V.N, Permyakov E.A. (eds.) Encyclopedia of Metalloproteins. New York: Springer.*

Brook, N., Brook, E., Dharmarajan, A., Dass, C., Chan, A. (2018). Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 96, 63-78.

Cabré, N., Mateo, F., Arenas, M., Camps, J., Joven, J., Domingo, J. (2018). Trace element concentrations in breast cancer patients. *The Breast*, 42, 142-149.

Caffarel, M., Pensa, S., Wickenden, J., Watson, C. (2011). Molecular Biology of Breast Cancer. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.* DOI: 10.1002 / 9780470015902.a0023164

Camarillo I., Xiao F., Madhivanan S., Salameh T., Nichols M., Reece L., Leary J., Otto K., Natarajan A., Ramesh A., Sundararajan R. (2014). Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. *Electroporation-Based Therapies for Cancer From Basics to Clinical Applications*, 2014, 55-102.

Cao, J., Jiang, L., Zhang, X., Yao, X., Geng, C., Xue, X., Zhong, L. (2008). Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP- 1 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22, 189-195.

Chavey C., Muhlbauer M., Bossard C., Freund A., Durand S., Jorgensen C., Jobin C., Lazennec G. (2008). Interleukin-8 Expression Is Regulated by Histone Deacetylases through the Nuclear Factor- κ B Pathway in Breast Cancer. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Mol Pharmacol*, 74, 1359–1366.

Christian, F., Smith, E. L., Carmody, R. J. (2016). The Regulation of NF κ B Subunits by Phosphorylation. *Cells*, 5(1), 12.

Cole, S. (2009). Chronic Inflammation and Breast Cancer Recurrence. *Journal of clinical oncology*, 21, 3418-3419.

Concetti J., Wilson C. (2018). NF κ B and Cancer: Friend or Foe? *Cells*, 7(9), 133.

Coussens L., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860-870.

Cristian F., Smith E., Carmody R. (2016). The regulation of NF κ B Subunits by Phosphorylation. *The Cell*, 5(1), 12.

Cruceriu, D., Baldasici, O., Balacescu, O., Berindan-Neagoe, I. (2019). The dual role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cellular Oncology*, 43, 1–18.

Çapanoğlu, G., Bakar, G. (2018). Meme Kanseri ve Metastazında Rol Oynayan Moleküler Prognostik Faktörler. *Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 3(2), 40-44.

Daniel, K.G, Kuhn, D.J, Kazi, A, Dou, Q.P. (2005). Anti-angiogenic and anti-tumor properties of proteasome inhibitors. *Current Cancer Drug Targets*, 5, 529-541.

De Larco J., Wuertz B., Rosner K., Erickson S., Gamache D., Manivel C., Furcht L. (2001). A Potential Role for Interleukin-8 in the Metastatic Phenotype of Breast Carcinoma Cells. *American Journal of Pathology*, 158(2), 639-646.

De Luca A., Lamura L., Gallo M., Maffia V., Normanno N. (2012). Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin-6 and Vascular Endothelial Growth Factor Promote Breast Cancer Cell Migration. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 3363–3370.

DeNardo, D., Coussens, L. (2007). Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 9(4), 212.

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

Di Paolo N. C., Shayakhmetov D. M. (2016). Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nature immunology*, 17(8), 906–913.

Dong, C., Sexton, H., Gertrudes, A., Akama, T., Martin, S., Virtucio, C., Chen, C.W., Fan, X., Wu, A., Bu, W., Liu, L., Feng, L., Jarnagin, K., Freund, Y.R. (2013). Inhibition of Toll-like receptor-mediated inflammation in vitro and in vivo by a novel benzoxaborole. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(2), 436-446.

Donoiu, I., Militaru, C., Obleagă, O., Hunter, J., Neamțu, J., Biță, A., Scorei, I., Rogoveanu, O. (2018). Effects of boron-containing compounds on cardiovascular disease risk factors. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 47-56.

Duncan R., Sat-Klopsch Y., Burger A., Bibby M., Fiebig H., Sausville E. (2013). Validation of tumour models for use in anticancer nanomedicine evaluation: the EPR effect and cathepsin B-mediated drug release rate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 72, 417–427.

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., Ustundag, A., Behm, C., Föllmann, W., Degen, G. (2014). Protective effect of boric acid on lead- and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of Toxicology*, 88, 1281-1289.

Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *The New England journal of medicine*, 315(26), 1650-1659.

Eguesquiaguirre, S., Yeh, J., Walker, S., Liu, S., Fran, D. (2018). The STAT3 Target Gene TNFRSF1A Modulates the NF κ B Pathway in Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, 20, 489-498.

Erbaykent Tepedelen, B., Korkmaz, M. (2020). Effects of natural and synthetic boron compounds on cancer prevention and cancer treatment. M. Korkmaz (Ed.), *Boron and Human Health* (s. 129-147). Ankara: Nobel Yayın.

Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A. (2011). Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *National Library of Medicine*, 38(6), 698-707.

Fasoulakis Z., Kolios G., Papamanolis V., Kontomanolis E. (2018). Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus*, 10(11), 3549.

Feng, Y., Spezia, M. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*, 5, 77-106.

Fernando, J., Bianco, A., Farias, J. (2017). The crossroads of breast cancer progression: Insights into the modulation of major signaling pathways. *OncoTargets and Therapy*, 10, 5491–5524.

Filippi I., Carraro F., Naldini A. (2015). Interleukin-1 β affects MDAMB231 breast cancer cell migration under hypoxia: role of HIF-1 α and NF κ B transcription factors. *Mediators Inflamm.*, 2015, 789414.

Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 477-513.

Freund A., Jolivel V., Durand S., Kersual N., Chalbos D., Chavey C., Vignon F., Lazennec G. (2004). Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. *Oncogene*, 23, 6105-6114.

Galdiero, M., Marone, G., Mantovani, A. (2018). Cancer Inflammation and Cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(8), a028662

Goszczynski, T. (2018). Icosahedral boron clusters as modifying entities for biomolecules. *Expert opinion on biological therapy*, 18, 205-213.

Granata, R., Licitra, L., Locati, L., Greco, A., Bossia, P. (2010). Multikinase inhibitors in thyroid cancer. *European Journal of Cancer*, 46(6), 1012-1018.

Green, N.R., Ferrando, A.A. (1994). Plasma boron and the effects of boron supplementation in males. *Environ. Health Perspect.*, 102, 73–77.

Grivennikov S., Greten F., Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6). 883-990.

Güngör, N., Knaapen, A., Munnia, A., Peluso, M., Haenen, G., Chiu, R., Godschalk, R., Schooten, P. (2010). Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*, 25(2), 149–154.

Hamd A., Umbas R., Mochtar C. (2011). Recent Role of Inflammation in Prostate Diseases: Chemoprevention Development Opportunity. *Acta Med Indones*, 43(1), 59-65.

Hanada, T., Nakagawa, M., Emoto, A., Nomura, T., Nasu, N., Nomura, Y. (2000). Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *International Journal of Urology*, 7(7), 263-269.

Hayden, M. S., Ghosh, S. (2012). NFκB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development*, 26(3), 203–234.

Hazman, O., Bozkurt, M.F, Fidan, A.F, Uysal, F.E, Celik, 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. TÜBA- Bilim ve Düşün Dizisi (s. 21-43). Ankara 2010

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

Holen I., Lefley D., Francis SE. (2016). IL-1 drives breast cancer growth and bone metastasis in vivo. *Oncotarget*, 2016, 75571-75584.

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.

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.

Ince, S., Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, İ., Demirel, H., Arslan, H., Varol, N., Zhu, K. (2017). The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative

stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 745-752.

Jiang XP., Yang DC., Elliott RL., Head JF. (2011). Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Res.*, 31, 2899-2906.

Jurikova M., Danihe L., Polak S., Varga I. (2016). Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. *Acta Histochemica*, 118(5), 544-552.

Kahraman, E., Boyacioglu, S.O., Korkmaz, M., Yildirim, H., Borac, S., Ataman, O.Y. (2017). Biological effects of tolerable level chronic boron intake on transcription factors. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 39, 30-35.

Kamaruzman NI., Poh CL., Chowdhury EH. (2019). Oncogenic Signaling in Tumorigenesis and Applications of siRNA Nanotherapeutics in Breast Cancer. *Cancers*, 11(5), 632.

Kamel, H.F.M., Al-Amodi, H.S.B., AbdElmoneim, H.M. (2017). Molecular Fingerprints and Biomarkers of Breast Cancer. Pham P.V. (Ed.), *Breast Cancer-From Biology to Medicine* (ch.17). London: IntechOpen.

Katoh, M. (2018). Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation. *National Library of Medicine*, 42(2), 713-725.

Khaliq, H., Juming, Z., Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of Boron on health. *Biological Trace Element Research*, 186, 31-51.

Khandida R., Munjal A. (2019). Interplay between inflammation and cancer. *Adv Protein Chem Struct Biol.*, 119, 199-245.

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.

Kordestani Z., Shahrokhi-Farjah M., Rouholamini S., Saberi A. (2020). Reduced IKK/NF- κ B Expression by Nigella Sativa Extract in Breast Cancer. *Middle East Journal of Cancer*;11(2), 150-158.

Korkmaz, M., Şimşek, F., İnan, S. (2019). Yeni Boron Türevlerinde Bir İn Vitro Çalışma: Belki de Meme Kanseri Tedavisi için bir Seçenek. *EJMO*, 3(1), 22-27.

Kumar S., Kishimoto H., Chua H., Badve S., Miller K., Bigsby R., Nakshatri H. (2003). Interleukin-1 α Promotes Tumor Growth and Cachexia in MCF-7 Xenograft Model of Breast Cancer. *American Journal of Pathology*, 163(6), 2531-2541.

Liu J., Liu M., Wang S., Yapeng Y., Yang Z., Cao X. (2018). Alantolactone induces apoptosis and suppresses migration in MCF-7 human breast cancer cells via the p38 MAPK, NF- κ B and Nrf2 signaling pathways. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(4), 1847-1856.

Lopez-Castejon G., Brough D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(4), 189–195.

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.

McLaughlin, M., Patin, E.C., Pedersen, M., Wilkins, A., Dillon, M.T., Melcher, A.A., Harrington, K.J. (2020). Inflammatory microenvironment remodelling by tumour cells after radiotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2020; doi.org/10.1038/s41568-020-0246.

Montovani, A. (2012). The inflammation – cancer connection. *The Febs Journal*, 285(4), 638-640.

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

Nielsen, F.H. (2008). “Is boron nutritionally relevant?” *Nutrition Reviews*, 66(4):183-191.

Nielsen, F.H. (2017). Historical and recent aspects of boron in human and animal health. *Bor Dergisi*, 2(3), 153-160.

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.

Nzietchueng, R.M., Dousset, B., Franck, P., Benderdour, M., Nabet, P., Hess, K. (2002). Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J Trace Elem Med Biol.*, 16(4), 239-44.

Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., Perdew, G.H., Peters, J.M. (2018). Molecular regulation of carcinogenesis: Friend and foe. *Toxicological Sciences*, 165(2), 277-283.

Penland, J.G. (1998). The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological Trace Element Research*, 66, 299-317.

Pollard, J., Qian, Z. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell*, 141(1), 39-51.

Queen, M., Ryan, R., Holzer, R., Keller-Peck, C., Jorcyk, C. (2005). Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896-8904.

Rashid, S. (2017). Molecular Mechanism of Carcinogenesis. Cancer and Chemoprevention (s. 27-29). Springer 2017.

Romero-Aguilar, K.S., Arciniega-Martínez, I.M., Farfán-García, E.D., Campos-Rodríguez, R., Reséndiz-Albor, A.A., Soriano-Ursúa, M.A. (2019). Effects of boron-containing compounds on immune responses: review and patenting trends. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(5), 339-351.

Sasser A., Sullivan N., Studebaker A., Hendey L., Axel A., Hall B. 2007. Interleukin-6 is a potent growth factor for ER-a-positive human breast cancer. *The FASEB Journal*, 21, 3763-3770.

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

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

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.

Sun SC. (2011). Non-canonical NFκB Signaling Pathway. *Cell*, 21, 71-85.

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.

Tanaka T., Narazaki M., Kishimoto T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295.

Tiffany, L., Ford, J., Howerton, M., Lai, G., Bolen, S., Gibbons, C., Tilburt, J., Baffi, C., Wilson, R., Powe, N., Bass, E. (2008). Barriers to recruiting underrepresented populations to cancer clinical trials: A systematic review. *Cancer*, 112, 228-242.

Todorović-Raković N., Milovanović J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. Journal of interferon & cytokine research. *The official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 33(10), 563–570.

Tower, H., Ruppert, M., Britt, K. (2019). The immune microenvironment of breast cancer progression. *Cancers*, 11(9), 1375.

Turkez, H., Arsian, M.E., Ozdemir, O., Chikha, O. (2016). Ameliorative effect of boric acid against nicotine-induced cytotoxicity on cultured human primary alveolar epithelial cells. *Boron*, 1, 104-109.

Tüzün E., Küçükali C. (2017). NFκB, SUMO ve Ubikitinasyon İlişkisi. *Deneyisel Tıp Dergisi*, 7, 13.

Valastyan, S., Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275-292.

Van Zijl, F., Krupitza, G., Mikulits, W. (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research*, 728, 23-34.

Velloso, F., Bianco, A., Farias, J., Torres, N., Ferruzo, P., Anschau, V., Jesus-Ferreira, H., Chang, T., Sogayar, M., Zerbini, L., Correa, R. (2017). The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Journals*, 10, 5491-5524.

Wang W., Mani A., Wu Z. (2017). DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat*, 3, 45-59.

Wei, Y., Yuan, F.J., Zhou, W.B., Wu, L., Chen, L., Wang, J.J., Zhang, Y.S. (2016). Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 15 (2), 10.4238.

Yang, W., Gao, X., Wang, B. (2003). Boronic Acid Compounds as Potential Pharmaceutical Agents. *Medicinal Research Reviews* 2003, 23(3),346-368.

Yde C., Emdal K., Guerra B., Lykkesfeldt A. (2012). NFκB signaling is important for growth of antiestrogen resistant breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 135(1), 67-78.

Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews cancer*, 9(11), 798-809.