

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BORİK ASİTİN MEDÜLLER TİROİD KANSERİ
HÜCRELERİNDE İNVAZYON, MİGRASYON,
PROLİFERASYON, APOPTOZİS, HÜCRE DÖNGÜSÜ VE
MİRNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ONURCAN YILDIRIM

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMİN MELAHAT FENKÇİ**

DENİZLİ – 2019

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**BORİK ASİTİN MEDÜLLER TİROİD KANSERİ
HÜCRELERİNDE İNVAZYON, MİGRASYON,
PROLİFERASYON, APOPTOZİS, HÜCRE DÖNGÜSÜ VE
MİRNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ONURCAN YILDIRIM

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMİN MELAHAT FENKÇİ

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 24.10.2018 tarih ve 2018TIPF040 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ- 2019

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Semin Melahat FENKCI danışmanlığında Dr. Onurcan YILDIRIM tarafından yapılan 'Borik Asitin Medüller Tiroid Kanseri Hücrelerinde İnvazyon, Migrasyon, Proliferasyon, Apoptozis, Hücre Döngüsü ve miRNA'lar Üzerine Etkileri' başlıklı tez çalışması 24.12.2019 tarihinde yapılan tez sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucunda jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı' nda tıpta uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

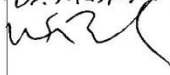
BAŞKAN

Prof. Dr. Semin. U. Fenkci



ÜYE

Prof. Dr. Mustafa Kemal BACCI



ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Senay TOPSAKAL

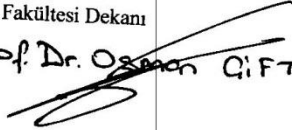


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu doğrularım.

Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı

Prof. Dr. Osman ÇiFTÇİ:



TEŞEKKÜR

Dört yıllık uzmanlık eğitimim süresince her daim bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, başta İç Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ahmet Nadir YÖNETÇİ ve bu tezin hazırlanmasında bana tüm özveri ve sabrıyla yardımcı olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Semin Melahat Fenkci olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma,

Hayatıma girdikten sonra beni her zaman destekleyen en yakın arkadaşım, sevgili eşim Dr. Açelya Gökdeniz YILDIRIM'a,

Bugüne kadarki eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve maddi manevi desteklerini hiç esirgemeyen kıymetli annem Tünel ve babam Ahmet YILDIRIM ve sevgili kardeşim Dr. Anıl YILDIRIM'a,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji A.D araştırma görevlisi Mücahit SEÇME'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
ÖZET	XII
SUMMARY	XIV
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1.Kanser	5
2.1.1 Kanserın Moleküler Temeli ve Kanser Hücresinin Özellikleri	5
2.1.2.Kanserın genetik temeli.....	8
2.1.3. Hücre Döngüsü	8
2.1.4. Apoptoz	13
2.1.5. Tiroid Kanserleri.....	16
2.1.6 Medüller Tiroid Kanserı	17
2.2 Borik Asit	26
2.2.1. Bor'un Biyolojik ve Kimyasal Özellikleri	26
2.2.2 Borik Asitin Etkileri	27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	29
3.1 Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kitler	29
3.2. Hücre Kültürü.....	30
3.3. XTT Testi (Hücre Canlılığı Testi).....	32
3.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini	33
3.5. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu	34
3.6. cDNA Sentezi	35
3.7. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR).....	36
3.8 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi	39
3.9 Koloni Oluşum Testi.....	40
3.10 Wound healing migrasyon Assay	40
3.11 TAS TOS Yöntemi	40
3.11.1 TOS Protokolü (Total Oksidan Durumu).....	41
3.11.2 TAS Protokolü (Total Antioksidan Durumu).....	41

3.12 Comet Assay- Genotoksisite Testi	42
3.13 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	43
4.BULGULAR	44
4.1. XTT Sonuçları.....	44
4.2 Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR)	47
4.3 TUNEL Testi ile Apoptoz Sonuçları	49
4.4 Matrigel- İnvazyon Testi Sonuçları	51
4.5 Koloni Oluşum Sonuçları	53
4.6 TAS ve TOS Sonuçları.....	54
4.7 Wound Healing (Yara İyileşme) Testi.....	55
4.8 Comet Assay- Genotoksisite Testi	56
5.TARTIŞMA	58
6.SONUÇ	70
KAYNAKLAR.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKT: Protein kinaz B

APAF-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör- 1

ARTN: Artemin

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein

CDK: Siklin Bağımlı Kinaz

CDKi: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

CDKN: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

Chk1: Kontrol noktası kinaz

CIP/KIP: CDK ilişkili protein/Kinaz inhibitör protein

CKI: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü

CTL: Sitotoksik T hücreler

DISC: Ölüm ilişkili sinyal kompleksi

ERK: Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz

GDNF: Glial hücre türevli nörotrofik faktör

GFRA: GDNF reseptör-alfa

GPI: glikosilfosfatidilinositol

GRB: Adaptör protein büyüme faktörü reseptör bağı proteini

HTF: Human tiroid fibroblast hücre hattı

IAP: Apoptoz önleyici protein

INK4: CDK4 inhibitör ailesi

MAPK: Mitojen aktivi protein kinaz

MEN: Multiple endokrin neoplazi

MPF: Olgunlaşma teşvik edici faktörleri

MTC: Medüller tiroid kanseri

NK: Doğal öldürücü hücreler

NRTN: Nörturin

PDCD4: Proglamlanmış hücre ölüm proteini 4

PI3K: Fosfotidil inozitol 3 kinaz

PSPN: Persephin

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RB: Retinoblastom

RTK: Reseptör tirozin kinaz

SMAC: İkincil mitokondi türevli kaspaz aktivatörü

TGF-B: Dönüştürücü büyüme faktörü beta

TNF: Tümör nekrozis faktör

TT cell line: Medüller tiroid kanseri hücre kültürü

VEGF: Vaskütelyal endotelyal büyüme faktörü

XTT: 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5- carboxanilide

µL: Mikrolitre

ml: Mililitre

µg: Mikrogram

µM: Mikromol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 Kanser hücrelerinin özellikleri	6
Şekil 2 Kanser hücrelerinin özellikleri	6
Şekil 3 Hücre Döngüsü	9
Şekil 4 Apoptotik süreçteki mekanizmalar	16
Şekil 5 RET reseptör aktivasyonu	20
Şekil 6 RAS sinyal yolağı	21
Şekil 7 RB1 aracılı hücre döngüsü regülasyonu	23
Şekil 8 Borik asitin yapısı	27
Şekil 9 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 24.saatte hücre canlılığına etkisi.....	44
Şekil 10 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 48.saatte hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 11 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 72.saatte hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 12 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 24. saatte hücre canlılığına etkisi	46
Şekil 13 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 48. saatte hücre canlılığına etkisi	46
Şekil 14 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 72. saatte hücre canlılığına etkisi	47
Şekil 15 Kontrol ve doz gruplarında ortalama apoptotik hücre yüzdeleri	50
Şekil 16 Kontrol grubu hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst Boyaması sonrası floresan mikroskopu görüntüleri.....	50
Şekil 17 Doz grubu hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst Boyaması sonrası floresan mikroskopu görüntüleri.....	51
Şekil 18 Borik asit uygulanan TT hücrelerinde kontrole göre % İnvazyon Oranı.....	52
Şekil 19 Kontrol ve borik asit uygulanan hücrelerdeki invaze olan hücrelerin krsital viole ile boyanmış görüntüleri (Büyütme: 40x)	52
Şekil 20 TT hücreleri Kontrol ve Doz grubu koloni görüntüsü	53
Şekil 21 Kontrol ve doz gruplarındaki ortalama koloni sayıları.....	54
Şekil 22 Kontrol ve borik asit eklenmiş doz grubunda wound healing petri görüntüleri	56

Şekil 23 Örneklere ait komet görüntüleri..... 57

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1 Medüller tiroid karsinomunun sınıflandırılması (MTC) (85).....	18
Tablo 2 Hücre Hatları	30
Tablo 3 Gerekli Besiyeri Detayları	31
Tablo 4 cDNA Sentez Karışımı.....	35
Tablo 5 Genlerin Primer Sekansları.....	38
Tablo 6 Real-Time PCR Sonuçları Hücre Döngüsü Gen Değişimleri.....	47
Tablo 7 Real-Time PCR Sonuçları miRNA Değişimleri.....	49
Tablo 8 TOS (Total Oksidan) Sonuçları.....	54
Tablo 9 TAS (Total Antioksidan) Sonuçları.....	55
Tablo 10 OSI (Oksidatif Stres İndeksi) Sonuçlar.....	55
Tablo 11 Comet Assay- Genotoksisite Testi Sonuçları	57

ÖZET

Borik asitin medüller tiroid kanseri hücrelerinde invazyon, migrasyon, proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve miRNA'lar üzerine etkileri

Dr. Onurcan YILDIRIM

Medüller tiroid kanseri, tüm tiroid kanserlerinin %5-22'ni oluşturan, tiroidin parafoliküler c hücrelerinden gelişen, nöral krest kökenli oldukça agresif ve kemoterapötiklere dirençli bir kanser türüdür. Medüller tiroid kanseri de dahil olmak üzere kanser, giderek artan insidansı, yeni geliştirilen tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen ölüm nedenleri arasında yükselen sırasıyla önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllarda, kanser tedavisinde kullanılan mevcut ajanlara alternatif olarak yeni biyolojik, kimyasal ya da doğal bileşiklerin test edilmesi popüler araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu bileşiklerden bir tanesi olan Bor elementi kökenli borik asitin anti-kanserojen, anti-inflamatuar, anti-osteoporotik, anti-oksidan etkileri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, borik asitin TT medüller tiroid kanseri hücre hattında hücre proliferasyonuna, invazyonuna, migrasyonuna ve koloni oluşumuna ve hücre döngüsü ve apoptoz mekanizmaları üzerine etkisinin ve terapötik etkinliğinin *in vitro* olarak belirlenmesidir. Borik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi ve %50 letal doz tespiti için XTT yöntemi kullanılmış ve IC50 dozu 48.saatte 35 µM olarak bulunmuştur. Hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkili genlerin ve proteinlerin ve belirlenen miRNA'ların borik asit ilavesi altındaki değişimlerini incelemek amacıyla Gerçek Zamanlı PZR testi kullanılmıştır ve hücre döngüsünde yer alan proliferasyon ile ilişkili genlerden SiklinD1, SiklinE, CDK4 ve CDK6'nın ekspresyonlarının azaldığı, apoptozisde görevli Kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, NOXA ve APAF-1 gibi apoptozisi indükleyen genlerin ve proteinlerin ekspresyonlarının arttığı, Bcl-2 ve Bcl-x gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır. Ayrıca medüller tiroid kanserinde, kanser agresifliği ve kötü prognozla ilişkili miR-21'in anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Tunel testi kullanılarak doz grubu hücrelerinde apoptozis oranı %14 olarak tespit edilmiştir. Matrigel invazyon testi ile doz grubunda invazyonun %30,8 azaldığı, koloni oluşum testi ile de yine doz grubunda koloni oluşumunun %67,9 azaldığı saptanmıştır. Wound healing testi kullanılarak migrasyonun azaldığı ve comet assay testi ile borik asit ile muamele sonrası DNA kırıklarının arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, çalışma sonucu elde edilen veriler ışığında, borik asitin medüller tiroid kanseri ve benzer mekanizmalar ile gelişen diğer kanser türlerinde potansiyel bir

anti-kanser ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu konuda daha fazla *in vitro* ve *in vivo* alışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Medüller tiroid kanseri, Borik asit, Apoptoz, Hücre Döngüsü, miRNA

SUMMARY

Effects of boric acid on invasion, migration, proliferation, apoptosis, cell cycle and miRNAs in medullary thyroid cancer cells

Dr. Onurcan YILDIRIM

Medullary thyroid cancer, which makes up 5-22% of all thyroid cancers, is a highly aggressive and chemotherapeutically resistant cancer originating from parafollicular C cells of the thyroid. Cancer, including medullary thyroid cancer, is a major public health problem, rising among the causes of death despite its increasing incidence, and newly developed diagnostic and therapeutic methods. In recent years, testing of new biological, chemical or natural compounds as an alternative to existing agents used in cancer treatment has been a popular research topic. One of these compounds is boric acid originating from the element boron, and studies have shown that it has anti-carcinogenic, anti-osteoporotic and anti-oxidant effects. The aim of this study is to determine the therapeutic effects of boric acid on cell proliferation, invasion, migration colony formation, cell cycle and apoptosis mechanisms in TT medullary thyroid cancer cell line under in vitro conditions. In order to determine the effect of boric acid on cell viability and 50% lethal dose, the XTT method was employed and IC50 dose was found to be 35 μ M at 48th hour. Real-time PCR test was used to investigate changes in cell cycle and apoptosis-related genes and proteins and identified miRNAs under the addition of boric acid. According to the Real-time PCR results, it was found that boric acid causes cell cycle arrest by downregulating of CylinD1, CylinE, CDK4, CDK6. Boric acid also induces apoptosis by inhibiting of Bcl-2 and Bcl-x and activating of Bax, caspase-9, caspase-3, NOXA and APAF-1 gene expressions. In addition, miR-21 was significantly reduced in medullary thyroid cancer which is associated with cancer aggressiveness and poor prognosis. Using the Tunnel test, the apoptosis rate in the dose group cells was found as 14%. Matrigel invasion test showed a 30.8% decrease in invasion in the dose group and colony formation test decreased 67.9% in the dose group. Using Wound healing assay, it has been found that migration was reduced and the Comet assay has shown that DNA fractures increased after treatment with boric acid. In conclusion, the findings of this study have shown that boric acid can be used as a potential anticancer agent in medullary thyroid cancer and other cancers caused by similar mechanisms. Further in vitro and in vivo studies are needed.

Key words: Medullary thyroid cancer, Boric acid, Apoptosis, Cell Cycle, miRN

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, yüksek oranda mortalite ve morbidite sebebi olması nedeniyle günümüzün en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2018 yılı içerisinde 18,1 milyon yeni kanser teşhisi koyulmuş ve 9,6 milyon insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir. 5 erkekten ve 6 kadından birinde yaşamı boyunca kanser gelişmekte ve 8 erkekten biri ve 11 kadından biri kanser nedeniyle yaşamını yitirmektedir (1). Kanser, genetik, çevresel, moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirildiğinde, bir hastadan diğerine ve kanser türleri arasında değişiklik gösteren kompleks bir hastalıktır (2). Temel olarak kanser, genetik kararsızlığa neden olan genleri, tümör supresör genleri ve onkogenleri içeren kansere duyarlı genlerdeki mutasyonlar sonucu gelişir (3).Çeşitli mekanizmalar sebebiyle oluşan genetik mutasyonlar sonucu, replikasyon kontrol mekanizmalarından kaçan hücre serileri kontrolsüz çoğalmaya başlar ve bunun sonucunda ait olduğu doku ve organda ve metastaz sonucu uzak doku ve organlarda hasara neden olur.Genetik,kimyasal ve çevresel faktörler kanserin oluşumuna sebep olabilir (4).

Türkiye verilerine bakıldığında, 2018 yılında tüm yaş ve her iki cinsiyette toplam 210.537 yeni kanser vakası bildirilmiştir. Bunlardan 13.033 (%6,2)'nü tiroid kanserleri oluşturmaktadır. Tiroid kanserleri en sık görülen endokrin malignitesidir ve tüm dünyada son 3 dekatta insidansı giderek artmaktadır (5). Son verilere göre dünyada, kadınlarda en sık görülen 5. kanser türüdür. Türkiye'de ise kadınlarda meme kanserinden sonra 2. sırada yer almaktadır (6).

Tiroid kanserleri, tiroid dokusunun epitelyal ve non-epitelyal kısımlarından gelişir. Tiroid foliküler epitelyal papiller, foliküler ve anaplastik kanserler köken alır. Tiroidin diğer kanserleri medüller, primer lenfoma, sarkom ve diğer organlardan tiroide yayılan, yani metastaz yapan kanserlerdir. Medüller tiroid kanseri, tiroid bezinde bulunan, kalsitonin hormonu salgılayan, nöral krest kökenli parafoliküler hücrelerinden köken alan nadir bir kanser türüdür. Tüm tiroid kanser türlerinin %5-10' u kadarını oluşturur (7). Medüller tiroid kanseri (MTC) vakalarının çoğunluğu sporadiktir (%75) (sMTC). Geriye kalan olgular ise RET protoonkogeninin germline aktive edici mutasyonlarının neden olduğu kalıtsal formlardan (Hereditör medüller tiroid kanseri (hMTC)) kaynaklanmaktadır. Somatik RET gen mutasyonları sMTC'nin %40-50'sinde de bulunabilir (8-9). Sporadik MTC'de en yaygın klinik prezentasyon

soliter tiroid nodülüdür. (%75-95 hastada). Tanı anında hastaların %70 inde lenf nodu metastazı, %5-10 kadarında karaciğer, akciğer, kemik gibi organ ve dokulara uzak metastaz mevcuttur (10-11). Herediter MTC, tipik olarak multisentrik ve bilateraldir. Multiple endokrin neoplazi tip 2 içerisinde yer alır (MEN2A, MEN2B). Otozomal dominant kalıtılan RET protoonkogenlerindeki germline mutasyonlara bağlıdır. MEN 2'li hastaların yaklaşık %98'inde RET geninin 5, 8, 10, 11, 13, 14, 15 ve 16 eksonlarında germline mutasyonlar mevcuttur. Herediter medüller karsinomlarda genetik tanı, profilaktik total tiroidektomi ile olası bir kür sağlamada fırsat sağlar, fakat çoğu sporadik tipde tanı koyulduğu anda, lenf nodlarına ve özellikle akciğer, karaciğer ve kemik gibi uzak organlara metastaz mevcuttur. Günümüzde her iki tip içinde (sMTC, hMTC) total tiroidektomi ve lenf nodu diseksiyonundan oluşan cerrahi protokol uygulanmaktadır. Dacarbasine, 5-fluorouracil ve doxorubicin içeren sistemik kemoterapilerin etkinliği çok düşüktür (11). İleri ve metastatik hastalıkta kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinin ise etkinliği düşük ve yan etki profili yüksektir (12).

MTC tümörögenezini açıklamada RET onkogen mutasyonları, belirli seviyede açıklayıcı mekanizmalar ortaya koymaktadır ancak tamamen yeterli değildir. MTC progresyonunda RET'in rolü hala iyi aydınlatılamamıştır ve özellikle metastatik bağlamda, RET'nin farklı sinyal iletim yollarıyla iş birliği yaptığı gösterilmiştir (13). Bu bağlamda son yıllarda MTC ve diğer kanser türlerinde metastaz, progresyon, tümör gelişimi ve benzeri mekanizmaları daha iyi ortaya koymak adına MicroRNA (miRNA) ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça fazladır.

MicroRNA (miRNA)'lar, gelişme, farklılaşma, çoğalma ve hücre ölümü gibi temel hücresel süreçlerde, bağışıklık ve kanser gibi büyük biyolojik alanları etkileyen önemli düzenleyici işlevlere sahip, kanser progresyonunun epitelden mezenkimal geçiş, invazyon ve proliferasyon gibi çeşitli mekanizmalarını kontrol eden, birçok kritik yollardaki kilit moleküllerin ekspresyonlarını post-transkripsiyonel olarak düzenleyen, küçük kodlamayan RNA gen ürünleridir (14-15). Kodlamayan RNA'nın bir sınıfı olan MicroRNA'lar, tamamlayıcı mRNA hedef sekanslarına spesifik bağlanma yoluyla (tipik olarak 3' çevrilmemiş düzenleyici bölgelerinden) hedef mRNA'ların bozunmasına ve / veya translasyon işleminin inhibisyona neden olurlar (16).

Tümör oluşumundaki miRNA'lar için olası bir rolde, özellikle kanser hücresi biyolojisinde yer alan genleri hedefleyerek, tümör ilerleticiler veya tümör baskılayıcılar olarak işlev görebilmeleridir. Bu sebeple epitelden mezenkime geçiş,

invazyon gibi tümörün metastazını ve progresyonunu artıracak durumları indükleyen ya da baskılayan yolları (TGF- β sinyal yolağı; gerekli TGF- β reseptör 1 (TGFB1) ve TGF- β reseptör 2 (TGFB2)) hedef alan miRNA ekspresyonundaki normalden sapmalar, bu yolların aşırı aktivasyonlarına veya inhibisyonlarına yol açabilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı miRNA'lar; tümör baskılayıcı veya onkogenik olarak fonksiyon gösteren genler olarak sınıflandırılmakta ve günümüzde kanser vakalarında olası prognostik ve prediktif moleküller olmaları bakımından yoğun olarak çalışılmaktadırlar (17). Özellikle MTC'deki miRNA'lar üzerine yapılmış çalışmalar incelendiğinde miRNA 9, 21, 127, 154, 183, 224, 323, 370, 375 ekspresyonlarının PDCD4 (Programlanmış hücre ölümü proteini 4) moleküler hedefi üzerinden arttığı, miRNA 129-5p ve miRNA 200 'ün RET onkogeni üzerinden down regülasyona ve yine miRNA 455'in saptanamayan bir gen üzerinden down regüle olduğu tespit edilmiştir (18-20). Yine yapılan farklı çalışmalarda miR 9, miR 10a, miR 124a, miR 127, miR 129, miR 137, miR 154, miR 224, miR 323, miR 370 mi rna 375 ve mi rna 21 'in up regüle olduğu, up regüle olan miRNA 21'in lenf nodu metastazı, down regüle miRNA 200 ailesinin ise uzak metastazlar ile ilişkili olduğu saptanmıştır (19-24).

Kanser tedavilerinin maliyeti ,hem bireysel, hemde ülke ekonomileri açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir.Kanser mekanizmalarının ayrıntılı olarak incelenmesi ve detaylandırılarak ,yapılan çalışmalarla birlikte daha açık bir şekilde ortaya koyulması hem ekonomik anlamda hem de hasta sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir (25).Çeşitli kanser türleri için farklı mekanizmalar ile kanser hücrelerini öldürmeyi yada çoğalmasını durdurmayı hedefleyen birçok farklı tedavi yöntemi mevcuttur.Kemoterapi,radyoterapi,immunterapi ve monoklonal antikor tedavisi mevcut tedaviler arasındadır.Kemoterapi ve radyoterapi özelinde Bu tedaviler kanser hücrelerini öldürmekle birlikte sağlıklı hücrelerde zarar vermektedirler.

İn vitro, hayvan ve insan deneyleri, borun, kemik büyümesini ve merkezi sinir sistemi fonksiyonunu olumlu yönde etkileyen, artritik semptomları hafifleten, hormon hareketlerini kolaylaştıran ve bazı kanser türlerinde risk azalması sağlayan biyoaktif bir element olduğunu göstermiştir. Borun, etkilerini biyokimyasal süreçlerde yer alan maddelerin oluşumunu ve /veya aktivitesini etkileyerek gösterdiği düşünülmektedir (26). Bor elementi, içme suyundan ve bitki kökenli gıdalardan hemen hemen tama yakın emilir ve kan dolaşımı içinde borik asit (BA) olarak dolaşır (27). Çeşitli antibiyotiklerin yapısında bakteriler tarafından kullanılır. Mineral ve hormonal

metabolizmalar, hücre zar fonksiyonları ve enzim reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır (28).

Günlük tolere edilebilir düzeyde tüketildiğinde, yeni keşfedilen insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeni ile borun yeniden düzenlenmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Bu doğrultuda bor ile ilgili yapılan son çalışmalarda, bor kullanımının bazı kanser türlerinin insidansında azalma sağladığı görülmüştür. Günlük tolere edilebilir bor alımı ve prostat kanseri arasında ters bir ilişki bulan Cui ve arkadaşları tarafından yapılan epidemiyolojik bir çalışma ile başlayan süreç, borun bazı kanser tiplerinde kanser hücrelerinin büyümesini engellediğini gösteren diğer çalışmalar ile devam etmiştir (29). Prostat ve meme kanseri hücre kültürlerinde ve farelerde insan prostat adenokarsinom tümörleri üzerinde bor ile yapılan çalışmalarda borun apoptozisi indüklediği ve tümör proliferasyonu ve migrasyonunu azalttığı görülmüştür. Borun ayrıca servikal ve akciğer kanserleri üzerine de olumlu etkileri olduğu saptanmıştır (30-34).

Tıpta bor kullanımı konusunda giderek artan kanıtlar bulunmaktadır. Destekleyici olguların birisi de ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından multipl myelom tedavisinde kullanılan bor içeren bir molekül olan bortezomibin (Velcade®) myelom hastalarında tedaviamacıyla kabul edilmesidir. Bortezomibin memeli hücrelerinde proteozomun reversibl bir inhibitörü gibi davrandığı tespit edilmiştir (35). Kanıtların birikimi, bor ve bor içeren moleküllerin günlük diyetle doğal anti kanser ajanı olarak kullanılabilmesini ve borun potansiyel ilaçlar için kaynak olarak sunulabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, borun uygun bir şekilde kullanılabilmesi için, etki mekanizmaları ve toksisite riski hem in vivo hem de in vitro olarak yeni yaklaşımlarla aydınlatılmalıdır.

Bor ve bor temelli moleküller üzerine yapılan antikanser çalışmaları ve medüller tiroid karsinomuyla ilgili miRNA artışı ve azalışının progresyon ,metastaz ve invazyon üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmaları dikkate alarak bizim bu çalışmadaki amacımız ; TT cell line (tiroid medüller karsinom hücre kültürü) üzerinden borik asitin tiroid medüller karsinom hücrelerinde apoptozis,migrasyon ,proliferasyon ve hücre döngüsüne olan etkilerini ve sectiğimiz mi-rna lardaki (miRNA-21(artmış regülasyon), miRNA-224(artmış regülasyon),miRNA-375 (artmış regülasyon),miRNA-200 (azalmış regülasyon)) değişimi inceleyerek borik asitin medüller tiroid kanseri üzerindeki antikanser etkilerini incelemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

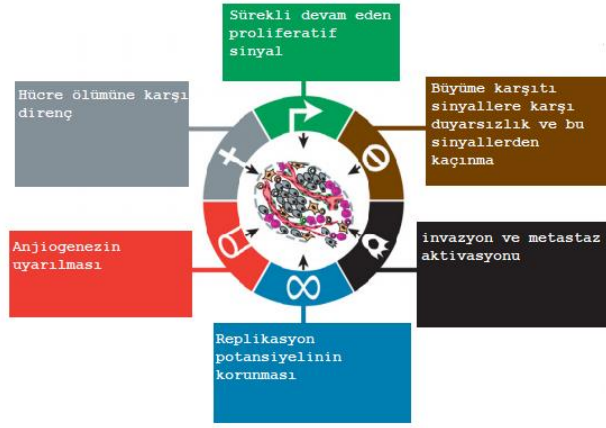
Yetişkin bir insanda yaklaşık 10^{15} hücre bulunur. Bu hücrelerin organ ve dokulardaki hücre dönüşümünü sağlaması için belirli aralıklarla bölünmesi ve farklılaşması gerekir. Hücre çoğalması ve değişimi, birbirleri ile uyum içinde çalışan moleküler mekanizmalar ağı tarafından yönetilir. Bu ağ aynı zamanda programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozisi de düzenler. Hücre doğumu ve ölümü arasındaki bu dengeyi değiştiren herhangi bir faktörde eksiklik ya da bozukluk düzeltilemediği takdirde, etkilenen organ ya da dokudaki hücre sayısı da değişmiş olur ve yeterli zaman sonra bu hücreler klinik olarak saptanabilir hale gelen tümörleri oluştururlar (36).

Kanserler köken aldığı hücre türüne göre sınıflandırılabilir. Bu türler beş ana grupta toplanabilir. Bunlar karsinomlar, sarkomlar, lösemiler, lenfomalar ve beyin ve spinal kord kanserleridir. Karsinomlar, epitel dokudan köken almaktadır. Epitel doku hücreleri tüm vücudumuzu kaplayarak derimizi oluşturur, sindirim sistemi mukozasını oluşturur ve ayrıca göğüs boşluğu ve karın boşluğu gibi vücut boşluklarını sarar. Karsinomların, adenokarsinom, bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom ve geçiş hücreli karsinom dahil olmak üzere farklı alt tipleri vardır. Sarkomlar, kemik, kas, fibröz doku ve kıkırdak gibi bağ dokudan gelişen kanserlerdir. Karsinoma göre daha az sıklıkla görülürler. Kemik sarkoması (osteosarkom) ve yumuşak doku sarkomu olarak iki ana gruba ayrılabilirler. Lösemiler, kemik iliğinde üretilen lökositlerin kontrolsüz çoğalması sonucu meydana gelir. Lenfomalar, lenfoid kökenli kanserlerdir. Lenfoid sistem vücudu tamamen sardığı için vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilirler. Anormal lenfosit çoğalması sonrası lenf nodlarında kemik iliği ve dalak gibi diğer organlarda başlayabilir ya da bu organlarda tutulum yapabilirler. Beyin ve spinal kord kanserleri ise santral sinir sisteminde köken alan kanserlerdir. Daha çok glial hücrelerden gelişirler ama diğer santral sinir sistemi hücrelerinden köken alan kanser türleride mevcuttur (37).

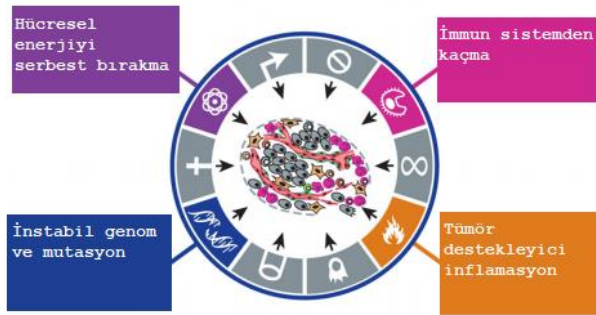
2.1.1 Kanserinin Moleküler Temeli ve Kanser Hücresinin Özellikleri

Karsinogenez süreci sonrası farklılaşan kanser hücresini normal hücreden farklı kılan altı ayırt edici özellik mevcuttur. Bunlar, büyüme faktörlerinden bağımsız bir şekilde büyüebilme, büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlık, programlanmış hücre

ölümünden kaçınma (apoptoz), replikasyon potansiyelinin korunması, angiogenez ve metastazdır. Bu özellikler malign davranışın altında yatan temel özelliklerdir (Şekil 1) (38). Son yapılan çalışmalarla birlikte bu temel ayırt edici özelliklere dört yeni yaklaşım daha eklenmiştir. Bunlar, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, immün yıkımdan kaçış, genomik kararsızlık ve inflamasyondur (Şekil 2) (39)



Şekil 1 Kanser hücresinin özellikleri (38) (Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer 'dan modifiye edilmiştir.)



Şekil 2 Kanser hücresinin özellikleri (39) (Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer 'dan modifiye edilmiştir.)

Kanser hücreleri, büyüme faktörünün kontrolünden çıkıp, kendi büyümesini kontrol etmek için, üç ana stratejiden yararlanır: Kendi kendilerini (otokrin) ve komşu kanser hücrelerini (parakrin) uyarabilen büyüme faktörleri üretir ve salgırlar, yüzeylerindeki büyüme hormonu reseptörlerinin sayısını, yapısını ve fonksiyonunu değiştirirler, büyüme faktörü reseptörlerinin sinyal yolunu sürekli bir şekilde açık tutarlar ve bu sayede hücreler, büyüme faktörü denetiminden kaçarak kendi sınırsız büyüme döngüsünü oluşturur ve bunu kontrol ederler (40-41)

Hücrelerde büyümeyi destekleyen sinyal yolları ve faktörler olduğu gibi bunlara karşı ve bu yolları baskılayan, büyüme karşıtı faktör ve sinyallerde mevcuttur. Büyüme önleyici sinyallere TGF-B (dönüştürücü büyüme faktörü -beta) gibi ligandlar aracılık eder (42). Hücre reseptörleri üzerinden çekirdeğe mesaj gönderirler. Bu yollar, temel olarak hücre döngüsü kontrolündedir ve etkilerini retinoblastoma proteini (Rb), siklinler (CDK), sikline bağımlı kinazlar (CDKi) içeren proteinler aracılığıyla oluştururlar. Büyüme önleyici sinyal yollarındaki anormallikler kanserde oldukça yaygındır ve kanser hücrelerinin hücre döngüsü boyunca ilerlemesine yardımcı olmada rol oynar. Bu nedenle, Rb ve CDKi ailesinin üyelerinin kaybı ve belirli siklinlerin ve CDK'nın aşırı ifadesi çok sayıda tümör tipinde karşımıza çıkar (38,43)

Normal dokularda yeni kan damarlarının büyümesi (anjyogenez), pozitif (proanjyojenik) ve negatif (anti-anjyojenik) sinyaller arasındaki dengeye bağlı denetlenir. Kanser hücrelerinde büyüme, hücrelerin kan ihtiyacını karşılamadaki yetenekleriyle yakından ilgilidir. Temel olarak, kanserler, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi pro-anjyojenik proteinlerin üretimini yeniden düzenleyerek ve / veya trombospondin-1 gibi anti-anjyojenik proteinlerin üretimini azaltarak kendi anjiogenezlerini düzenlerler (44,45)

Karsinogenez sürecinde hala çözülememiş mekanizmalardan biri de, immün sistemin kanser üzerindeki rolüdür. Son yapılan ve immünsupresif bireylerde, artan kanser insidansını merkeze alan çalışmalarla birlikte, immün sistemin bir şekilde kanser hücrelerini taradığı, tanıdığı ve öldürüldüğü bilinmektedir (46). Normalde immün sistem için yüksek immunojenik olan kanser hücrelerinin immün sistemin bileşenlerini devre dışı bırakarak immün sistemin öldürücü etkisinden kurtulduğu düşünülmektedir. Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kanser hücrelerinin TGF-b'yi veya diğer immünosüpresif faktörleri salgılayarak, sızan CTL'leri (sitotoksik

T hücreleri) ve NK (Doğal öldürücü hücreler) hücrelerini paralyze ettiği saptanmıştır (47).

2.1.2.Kanserin genetik temeli

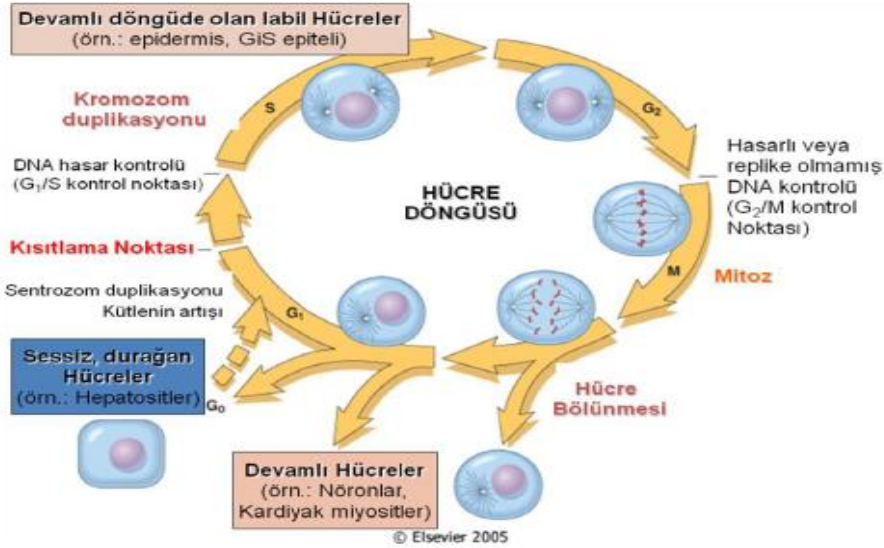
Karsinogenez, 3 temel gen grubu üzerinde şekillenir bunlar; onkogenler, tümör supresör genler ve DNA onarımını sağlayan genlerdir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumuna neden olur (48). Bu mutasyonların sonucu bazı değişimler meydana gelir bunlar; mikrosatellit kararsızlık, kromozomal yeniden düzenlenme, tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinin inaktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonu ve programlı hücre ölümünün (apoptoz) baskılanmasını içermektedir (39).

Karsinogenez sürecinin başlamasına sebep olan genler, temel anlamda iki ana mekanizmaya etki eden genler olarak sınıflandırılabilir. Hücrenin kontrolsüz bölünmesini ve büyümesini engelleyen ve bunu, hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre-hücre iletişimi gibi mekanizmaları denetleyerek yapan genler, tümör supresör genler olarak adlandırılır. Örnek olarak, hücre dönüğüne G1-S fazında denetleyici rolde görev alan p53 bir tümör supresör genidir (49). Kanser oluşumu mekanizmalarında ana rolü oluşturan bir diğer gen grubu ise proto-onkogen grubudur. Proto-onkogenler temelde hücre içi sinyal iletimini sağlayan alıcı ve verici proteinleri, büyüme faktörlerini, transkripsiyonda rol alan proteinleri kodlarlar. Telomerazları kodlayan ve hücrenin apoptozis mekanizmalarını denetleyen genlerde proto-onkogen olarak adlandırılabilir. Proto-onkogenlerde çeşitli sebepler sonrası meydana gelen mutasyonlar ve aşırı gen ifadesi sonucu, proto-onkogenler onkogenlere dönüşürler. Hücre bölünmesinin kontrolsüz bir şekilde indüklenmesi, angiogenezis ve apoptozisten kurtulma v.b mekanizmalar sonucu hücre karsinogenez sürecine girmiş olur (50).

2.1.3. Hücre Döngüsü

Bir hücrenin genomunu çoğalttığı, hücrenin diğer bileşenlerini sentezlediği ve nihayetinde iki yeni hücreye bölündüğü olaylar düzeni, hücre döngüsü olarak adlandırılır. DNA replikasyonu dahil, hücre bölünmesiyle ilişkili tüm süreçlerin başarılı bir şekilde tamamlanması için, bu süreçle ilgili tüm genomların düzgün ve birbirleri ile koordineli şekilde çalışması gerekmektedir. Hücre döngüsü temel olarak iki ana fazda tanımlanır. Bunlar interfaz ve M fazıdır (mitotik faz). M fazı, gerçek

hücre bölünmesi veya mitozun meydana geldiği fazı temsil eder. M fazı, nükleer bölünme ile başlar, kromozomların ayrışması ile devam eder(karyogenez) ve sitoplazma bölünmesi ile son bulur (sitogenez). Dinlenme fazı olarak adlandırılan interfaz, hücrenin hem hücre büyümesini hem de DNA replikasyonunu düzenli bir şekilde gerçekleştirerek bölünmeye hazırlandığı zamandır. İnterfaz, dört aşamaya ayrılır, Bunlar; G₀, G₁, S (sentez), G₂' fazlarıdır. G₀ fazı dinlenme safhasıdır ve hücre büyüme faktörü ile uyarılmadığı sürece, farklılaşmış hücreler bu safhada beklemektedir. G₁ fazı DNA replikasyonun başlaması ile mitoz arasındaki geçen süreye karşılık gelir. G₁ fazı sırasında hücre metabolik olarak aktif ve sürekli büyür fakat DNA'sı replike olmaz. S veya sentez fazı, DNA sentezinin veya replikasyonunun gerçekleştiği fazdır. Bu süre zarfında hücre başına düşen DNA miktarı iki katına çıkar, DNA duplikasyonundan sonraki faz ise G₂ fazıdır. Bu fazda hücre M fazı için gerekli proteinlerin sentezine devam eder ve hücre büyümesini sürdürür. M fazında ise artık hücre bölünme için hazırdır. Profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz olarak adlandırılan farklı evrelerden geçen hücre, hücre döngüsü sonucunda kendisinin bir kopyasını oluşturmuş olur (Şekil 3) (51-52).



Şekil 3 Hücre Döngüsü (52)(Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Pathologic Basis of Disease'den alınarak modifiye edilmiştir.)

2.1.3.1. Hücre Döngüsünün Kontrolü

Hücre içerisinde, hücrenin kendi yaşam ve bölünme döngüsünün düzgün bir şekilde ilerleyip ilerlemediğinin değerlendirildiği, belirli kontrol noktaları mevcuttur. Bu kontrol noktaları; G₁-S, G₂-M ve M kontrol noktalarıdır.

2.1.3.1.1. G1-S Kontrol Noktası

G1-S kontrol noktası, tüm koşulların hücre bölünmesinin devam etmesi için uygun olup olmadığını belirler. Sınırlama noktası olarak da adlandırılan G1-S kontrol noktası, hücrenin hücre bölünme işlemine geri dönüşümsüz biçimde müdahale ettiği bir noktadır. Büyüme faktörleri gibi dış etkiler, hücrenin G1-S kontrol noktasından geçerek S fazında doğru ilerlemesine hücre boyutunu belirli bir büyüklüğe getirerek yardımcı olurlar. Yeterli rezervlere ve hücre boyutuna ek olarak, G1-S kontrol noktasında genomik DNA hasarı için de bir kontrol mekanizması vardır. Tüm gereklilikleri karşılamayan hücrelerin, S aşamasına ilerlemesine izin verilmez. Hücre döngüyü durdurabilir ve sorunlu durumu gidermeye çalışabilir veya hücre G0'a ilerleyebilir ve koşullar düzeldiğinde başka sinyalleri bekleyebilir (53). G1-S kontrol noktasında, hücrenin bir sonraki aşamaya geçmek için yeterli olup olmadığını ya da DNA'sında herhangi bir hasar olup olmadığını anlamak için işletilen mekanizmanın en önemli proteini p53 proteindir. p53 proteini hücreyi DNA hasarı ve hücre dışı büyüme düzenleyici sinyallere cevabı açısından değerlendirir. Çoğu sporadik ve familial kanser türünde p53 geninde mutasyon tespit edilmiştir. Mutasyona uğramamış bir p53 proteini eğer hücrenin DNA'sında hata varsa p21 proteinini uyararak hatanın giderilmesini sağlar, hata giderilemeyecek seviyede ise hücreyi apoptozise götürür (49).

G1 fazında yer alan ve kontrolden görevli başka proteinlerde mevcuttur. Bunlar daha çok düzenleme görevini üstlenen siklinlerdir. Siklinler, siklin bağımlı kinaz (CDK) enzimlerini ve hücre sentezi için gerekli olan enzim grubularını aktive ederek hücre döngüsünün ilerlemesini kontrol eden bir protein ailesidir (54). Siklinler, CDK (Siklin bağımlı kinaz)'lar ile etkileşime girerek, öncelikli olarak aktif olmayan kompleksler oluştururlar. Enzimatik olarak aktif olmayan siklinlerin, CDK'lar ile oluşturduğu kompleksler, CDK'ların aktif bölgelerinin, aktivasyonu ile sonuçlanır. Siklinler, p34 / cdc2 / cdk1 proteinleri gibi bağımlı kinazlarla birlikte olgunlaşma teşvik edici faktörleri (MPF) oluşturur ve MPF'ler fosforilasyon yoluyla diğer proteinleri aktive ederler. Bu fosforlanmış proteinler, sırayla, mikrotübül oluşumu ve kromatin yeniden yapılanması gibi döngü bölünmesi sırasındaki spesifik olaylardan sorumludur. Siklinler, omurgalı somatik hücrelerinin hücre döngüsündeki davranışlarına bağlı olarak dört sınıfa ayrılabilir: G1 siklinleri, G1 / S siklinleri, S siklinleri ve M siklinleri. G1-S fazında görevli siklinler G1 fazının sonunda yükselir ve S fazının erken döneminde düşerler. G1-S fazı siklinleri ve CDK'ların oluşturduğu

kompleks, DNA replikasyonunun başlamasını indükler. G1 siklinlerin konsantrasyonu hücre döngüsü boyunca artar ve G1 siklin-CDK kompleksi hücre büyümesinden sorumludur. S fazı siklinleride, G1-S fazı siklinleri gibi CDK kompleksi oluşturduktan sonra direk olarak DNA replikasyonunu uyarır. G2 boyunca ve Mitozun erken fazlarına kadar yüksek seviyelerde eksprese edilirler. M fazı siklinleri ise M fazı başlangıcında artmaya başlar ve metafazda en yüksek seviyesine ulaşır. Mitotik iğlerin bir araya getirilmesi ve kardeş kromatitlerin hizalanmasında görev alırlar. Genel olarak bilinen başlıca Siklin-CDK kompleksleri, S fazında etkin Siklin A/CDK2 kompleksi, G1'den S'e geçişi kontrol eden Siklin D/CDK4, Siklin D/CDK6, Siklin E/CDK2 kompleksleri ve G2'den M fazına geçişi denetleyen Siklin B/CDK1 kompleksidir (55).

2.1.3.1.2. CDK İnhibitörleri

Hücre bölünme döngüsü boyunca ilerleme, siklin ve sikline bağlı kinazların (CDK) koordineli aktiviteleri ile düzenlenir. Bu siklin-CDK komplekslerinin, düzenli bir şekilde çalışması ve kontrolü, CDK inhibitörleri (CKI) tarafından sağlanır. Evrimsel kökenlerine, yapılarına ve CDK özelliklerine göre iki CKI ailesi tanımlanmıştır. Bunlar CIP/KIP VE INK 4 aileleridir (56). INK4 gen ailesi, p16INK4a, p15INK4b, p19INK4d ve p18INK4c'yi kodlar ve hepsi CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak onların tirozin kinaz aktivitesini durdurur ve sonucunda D-Siklinler ile olan ilişkilerini engellenmiş olur. Buna karşılık, CIP/KIP ailesinin CKI'leri hem siklin hem de CDK alt birimlerine bağlanır ve siklin D, E, A ve B-CDK komplekslerinin aktivitelerini düzenleyebilir (57). CDK inhibitörleri Siklin A/E CDK 2 kompleksleri aracılığı ile Rb geninin fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünün kontrolünü sağlar. Bu sebeple hücre döngüsünün negatif düzenleyicisidirler. Cip / Kip ailesi üç proteinden oluşur, bunlar; p21(cdkn1a) ,p27(cdkn1b),p57 (cdkn1c) 'dir. Bu proteinlerin, N-terminal bölgesinde, hem sikline hem de CDK'ya bağlanmalarına izin veren sekansları mevcuttur ve her birinin farklı fonksiyonları ve düzenlemeleri mevcuttur (58).

INK4/ARF ailesi p16-INK4a, p15-INK4b, p18-INK4c, p19-INK4d 'en oluşur. CDK4 ve CDK6'nın inhibitörleridir. INK4 proteinlerinin kuvvetli ifadesi, Cip / Kip proteinlerinin yeniden dağılımını teşvik ederek ve siklin E-CDK2 aktivitesini bloke ederek G1'de hücrenin duraklamasına yol açabilir. CDK4 ve CDK6'ya bağlandıklarında, CDK-siklin kompleksleri yerine, CDK-INK4 komplekslerinin oluşumuna yol açan allosterik bir değişime neden olurlar. Bu, aşağı akışta

retinoblastoma (Rb) fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açar. Bu nedenle, p15INK4b veya p16INK4A'nın ifadesi, Rb-ailesi proteinlerini hipofosforile tutar. Hipofosforile edilmiş Rb, G-fazında hücre döngüsünün durmasına ve S-fazi genlerinin transkripsiyonunun bastırılmasına sebep olur (59).

Retinoblastom geni G1-S kontrol noktasında görevli anahtar düzenleyici elemanlardan biridir. Siklin-CDK kompleksleri Rb veya diğer aile üyelerini fosforile eder. İnaktif Rb, hücre bölünme döngüsünün G1'den, S aşamasına ilerlemesini önleyerek hücrenin DNA'yı çoğaltma kabiliyetini kısıtlar. Rb, hücreyi S fazına iten E2F ailesinin transkripsiyon faktörleri olan E2 promotör bağlayıcı-protein-dimerizasyon ortağı (E2F-DP) dimerlerini bağlar ve inhibe eder. E2F-DP'nin aktif olmamasını sağlayarak, hücreyi G1 fazında tutar, hücre döngüsü boyunca ilerlemeyi önler ve büyüme baskılayıcı olarak görev yapar. Rb-E2F / DP kompleksi ayrıca, kromatine histon deasetilaz (HDAC) proteinini çekerek S fazını arttırıcı faktörlerin transkripsiyonunu azaltarak DNA sentezini daha da baskılamaktadır (60-61)

2.1.3.1.3. G2-M Kontrol Noktası

S fazında DNA replikasyonunu takiben, hücre G2 olarak bilinen bir büyüme fazına maruz kalır. Bu süre zarfında, gerekli mitotik proteinler üretilir ve hücre, proliferatif Mitotik (M) faza giriş için bir kez daha düzenleyici mekanizmalara tabi tutulur. G2'den M fazına geçişte, ortak bir birleştirici faktör olan siklin-CDK aktivitesi tarafından denetlenen kontrol noktaları yer alır. Siklin B, G2 / M kontrol noktası geçişinin değerlendirilmesi için referans görevi görür. Hücre S Faz'a benzer şekilde G2 fazında da DNA hasarı açısından tekrar değerlendirilir. Bir kez daha DNA hasarı veya eksik replikasyon alanları incelenir. Hücre döngüsünün durdurulmasını indüklemek ve mitoz içine ilerlemeyi durdurmak için p53 aktivasyonunun yanı sıra Chk1 (kontrol noktası kinaz 1) ve Chk2'(kontrol noktası kinaz 2) de aktive edilir. Ayrıca, S fazının ilave bir bileşeni olan Replikatif Öncesi Kompleks, siklin B-Cdk1 fosforilasyonu ile etkisizleştirilmelidir. DNA hasarına cevap olarak mitotik girişin önlediği mekanizmalar, G1 / S kontrol noktasındaki benzerdir. DNA hasarı, ATM (ataxia telangiectasia mutated) / ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related protein)'nin fosforile olduğu ve Chk1 / Chk2 kontrol noktası kinazlarını aktive ettiği ATM / ATR yolunun aktivasyonunu tetikler ve p53, p21'i harekete geçirir (62-63)

2.1.3.1.4. M Kontrol Noktası

Mitotik kontrol noktası, tüm kromozomların mitotik plaka üzerinde hizalandığı metafaz noktasında gerçekleşir. Bu iki kutuplu dizilimin yarattığı gerilim, anafaza girişi başlatan olaydır. Hücrenin anafaza girmesi için anafaz destekleyici kompleksin inhibisyonunun, ortadan kalkması gerekmektedir. Gerilim sonucu inhibisyonu ortadan kalkan anafaz destekleyici kompleks, Siklin-b yi bozar ve ayrışmayı engelleyen bir protein olan securin parçalanır (64). Bunun sonucunda kardeş kromatitlerin birlikte tutulmasından sorumlu kohezın proteinleri kesilir ve kromatitler birbirinden ayrılır ve ardından hücre G1 fazına girer (65). Eğer DNA hasarı sonrası, DNA onarımında ve kromozom düzenlenmesinde bir hata söz konusu olursa hücre, M fazında duraklatılarak hataların giderilmesine çalışılır. Ancak hatalar düzeltilemez ve geri döndürülemez ise hücre, apoptozise gider.

2.1.4. Apoptoz

Apoptozis, çok hücreli organizmalarda meydana gelen programlanmış bir hücre ölümü şeklidir. Ortalama yetişkin bir insan apoptozis nedeniyle her gün 50 ila 70 milyar hücre kaybeder (66). Akut hücreyel yaralanmadan kaynaklanan travmatik bir hücre ölümü şekli olan nekrozun aksine, apoptozis, organizmaya avantajlar sağlayan oldukça düzenli ve kontrollü bir süreçtir. Örneğin, gelişmekte olan bir insan embriyosunda parmakların ve ayak parmaklarının ayrılması, hücrelerin apoptoz geçirmesi nedeniyle oluşur (67). Apoptozis, oldukça düzenli bir süreçtir ve bir kez tetiklendiğinde geri döndürülemezdir. Apoptoz iki yoldan biri ile başlatılabilir. İntrinsik(iç) yoldaki hücre, hücre stresini algıladığı için apoptozise giderken, ekstrinsik(dış) yoldaki hücre, diğer hücrelerden gelen sinyaller nedeniyle apoptozise uğrar. Ayrıca zayıf ekstrinsik sinyaller de apoptozun intrinsik yolunu aktive edebilir (68). Her iki yolda, proteaz olan kaspazları veya proteinleri parçalayan enzimleri aktive ederek hücre ölümünü indükler. Aşırı apoptoz atrofiye neden olurken, yetersiz apoptoz kanser gibi kontrolsüz hücre proliferasyonuna neden olur. Fas reseptörleri ve kaspazlar gibi bazı faktörler apoptozu teşvik ederken, Bcl-2 protein ailesinin bazı üyeleri apoptozu inhibe eder (69).

Apoptozisin başlatılması aktivasyon mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir, çünkü apoptoz başladıktan sonra, kaçınılmaz olarak hücrenin ölümüne yol açar. En iyi anlaşılan iki aktivasyon mekanizması, intrinsik (aynı zamanda

mitokondriyal yol olarak da bilinir) ve ekstrinsik yoldur. İntrensik yol, hücreler stres altındayken üretilen hücre içi sinyallerle aktive olur ve proteinlerin, mitokondrinin intermembran boşluğuna salınmasına bağlıdır. Ekstrinsik yol, hücre kaynaklı ölüm reseptörlerine bağlanan hücre dışı ligandlar tarafından aktive edilir ve bu, ölüme neden olan sinyal kompleksi oluşumuna yol açar (67). Bir hücre, hücre intiharına neden olabilecek bir strese yanıt olarak, hücre içi apoptotik sinyali başlatır. Apoptozis süreci başlamadan önce, apoptozis düzenleyici genlerin süreçte görevli proteinleri aktive hale getirmesi gerekmektedir. Mitokondriyi hedef alan apoptotik proteinlerin, farklı etkileri mevcuttur. Bu proteinler, membran gözeneklerinin oluşumuyla mitokondriyal şişmeye neden olabilirler veya mitokondriyal zarın geçirgenliğini artırabilir ve apoptotik efektörlerin membrandan sızmasına neden olabilirler (70). Apoptoz sırasında sitokrom c, Batok ve Bak proteinlerinin etkileriyle mitokondrilerden salınır. Bu salıvermenin mekanizması gizemlidir, ancak çok sayıda Bax / Bak homo ve dış membran içine yerleştirilmiş Bax / Bak hetero-dimerlerinden kaynaklanıyor gibi görünmektedir (71). Sitokrom c salındıktan sonra Apoptotik proteaz aktive edici faktör- 1 (Apaf-1) ve ATP ile bağlanır, oluşan bu kompleks, apoptozom olarak bilinen bir protein kompleksini oluşturmak amacıyla pro-kaspaz-9'a bağlanır. Apoptozom, pro-kaspazı aktif kaspaz-9 formuna ayırır, aktif kaspaz-9 ise efektör kaspaz-3'ü aktive eder. Mitokondri ayrıca, mitokondri membranlarının geçirgenliğindeki artışın sonrası SMAC'ler (ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü) olarak bilinen proteinleri salgılar. SMAC, apoptozu önleyen proteinleri (IAP) bağlar, böylece onları devre dışı bırakır ve IAP'lerin işlemi durdurmasını önler ve böylece apoptozun ilerlemesini sağlar. IAP, ayrıca kaspazlar olarak adlandırılan bir grup sistein proteazının aktivitesini de baskılar (72). Memelilerde, apoptotik mekanizmaların doğrudan başlatılması hakkında iki teorisi öne sürülmüştür: TNF ile indüklenen (tümör nekroz faktörü) model ve Fas-Fas ligand aracılı model. Her iki modelde ekstrinsik sinyallere bağlanmış TNF reseptörü (TNFR) ailesinin reseptörlerini içerir (73). TNF-alfa esas olarak aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilen bir sitokindir ve apoptozun ana ekstrinsik aracısıdır. İnsan vücudundaki hücrelerin çoğu TNF-alfa için iki reseptöre sahiptir: TNFR1 ve TNFR2. TNF-alfa'nın, TNFR1'e bağlanmasının, TRADD (TNFR1 ile ilişkili ölüm proteini) ve FADD (Fas ile ilişkili ölüm proteini) yoluyla kaspaz aktivasyonuna neden olan yolu başlattığı gösterilmiştir (218). Bununla birlikte, TNFR1'den çıkan sinyallerin, kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptozu indükleyebildiği de gösterilmiştir (219).

Fas reseptörü (Apo-1 veya CD95 olarak da bilinir), TNF ailesinin Fas ligandını (FasL) bağlayan bir transmembran proteindir (73). Fas ve FasL arasındaki etkileşim, FADD, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u içeren, DISC (ölüme neden olan sinyal kompleksi) oluşumuyla sonuçlanır. Bazı hücre tiplerinde (tip I) işlenmiş kaspaz-8, kaspaz ailesinin diğer üyelerini doğrudan aktive eder ve hücrenin apoptozunun yürütülmesini tetikler. Diğer hücre tiplerinde ise (tip II), Fas-DISC kompleksi, mitokondriden proapoptotik faktörlerin salınımına neden olarak apoptozisi indükler (74).

Memeli hücrelerinde TNF-R1 ve Fas aktivasyonunun ardından, Bcl-2 ailesinin proapoptotik (BAX, BID, BAK veya BAD) ve anti-apoptotik (Bcl-XI ve Bcl-2) üyeleri arasında bir denge kurulur. Bu denge mitokondrinin dış zarında oluşan proapoptotik homodimerlerin oranıdır. Proapoptotik homodimerlerin, mitokondriyal zarı, sitokrom c ve SMAC gibi kaspaz aktivatörlerinin serbest bırakılması için geçirgen hale getirmesi gerekir. Proapoptotik proteinler Bax ve Bak, sadece Bcl-2 ailesinin bir parçası olan BH3-proteinlerinin aktivasyonu ile aktive edilir (75).

Kaspazlar, yüksek oranda korunmuş, sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlar olan proteinlerdir ve apoptotik sinyallerin iletilmesinde merkezi bir rol oynarlar. İki tür kaspaz vardır: başlatıcı kaspazlar, kaspaz 2,8,9,10,11,12 ve efektör kaspazlar, kaspaz 3,6,7. Başlatıcı kaspazların aktivasyonu, spesifik oligomerik aktivatör proteinine bağlanmayı gerektirir. Efektör kaspazları daha sonra bu aktif başlatıcı kaspazlar tarafından proteolitik bölünme yoluyla aktive edilir. Aktive olan efektör kaspazlar, proteolitik etkinlikleri ile hücre içi proteinlerin yapılarını bozarak hücre ölüm programını başlatırlar. (Şekil 4)

7) Diğerleri; Tiroid lenfoması, Skuamöz hücreli tiroid karsinomu, Tiroid sarkomu, Hürthle hücreli karsinom'dur (77-78).

2.1.6 Medüller Tiroid Kanseri

2.1.6.1 Tanım, Epidemiyoloji ve Sınıflama

Medüller tiroid karsinomu, biyokimyasal ve patolojik özelliklerini koruyan, nöroendokrin kökenli, kalsitonin üreten parafoliküler C hücrelerinden gelişen bir tiroid tümörüdür. Medüller tiroid karsinomunun kökeni onu diğer tiroid kanserlerinden ayırır (11). Medüller tiroid karsinomunun prevalansı, tüm tiroid malignitelerinin içinde % 5-10 arasındadır, tüm tiroid nodüllerinde% 0,4-1,4 ve otopsiye başvuru olanların % 1'den azında saptanmıştır. Papiller ve foliküler karsinomların aksine, kadınlar ve erkekler arasındaki dağılımda, belirgin bir fark gözlenmemektedir. Esas olarak dördüncü ve beşinci on yılda prezente olur, ancak her yaşta görülebilmektedir. (79)

Medüller tiroid karsinomu gelişimi ile ilgili, her ne kadar önceki tiroid hastalıkları, hipertansiyon, alerji ve safra kesesi hastalıkları gibi diğer rahatsızlıklar ile ilişki belirtilmiş isede, önemli çevresel faktörler veya etnik farklılıklar, karsinomun etiolojisinde tam bir etken olarak saptanamamıştır (80).

Medüller tiroid kanserinin patogenetik mekanizması RET protoonkogeni aktivasyonu içerisinde tanımlanmıştır. Aktif RET onkogeninin somatik veya germ hattı lokalizasyonuna göre, iki farklı form mevcuttur, bunlar; vakaların yaklaşık%75'ini oluşturan sporadik form ve kalan %25'ini oluşturan kalıtsal veya ailevi form'dur (81). Anasplastik karsinom kadar agresif olmasa da diğer tiroid kanserleri değerlendirildiğinde, medüller tiroid karsinomunun biyolojik davranışları oldukça agresiftir (82).

Sporadik hastalık insidansı, yaşamın beşinci on yılında artarken, genetik ve biyokimyasal taramalar düzenli bir şekilde yapıldığı takdirde, kalıtsal hastalık daha erken teşhis edilebilir. Sporadic MTC'deki genetik değişiklikler herediter MTC ile yüksek oranda benzerlik gösterir. Mayıs 2016'da yayınlanan Kanserde Somatik Mutasyonlar Kataloğu (COSMIC) veritabanına göre, 1719 vakanın 710 (%41)'nin da RET mutasyonları saptanmıştır (83). Ailesel MTC tipi otozomal dominant olarak kalıtılır ve neredeyse %100 MEN2 sendromu ile birliktelik gösterir. Kalıtsal MTC,

RET proto-onkogenin germ hattı aktive edici mutasyonlarından kaynaklanır (84). MEN2A sendromu, feokromositoma, paratiroid tümörleri ve MTC birlikteliği ile karakterize bir hastalıktır. MEN2A, MEN2 sendromlarının en yaygın şeklidir, tüm vakaların%95'ini oluşturur ve ayrıca 4 gruba ayrılır, bunlar ;(i) Feokromositoma veya hiperparatiroidizm bulunan veya her ikisini içeren Klasik MEN2A; (ii) Hirschsprung hastalığı olan MEN2A; (iii) kutanöz liken amiloidozlu MEN 2A; ve (iv) FMTC (ailesel MTC)'dir. (Tablo 1). MEN2B sendromu nadirdir (tüm MEN2 vakalarının% 5'i) ve MTC, feokromositoma, ganglionöromatoz ve marfanoid habitustan oluşur. MEN2B, MEN2 sendromunun en agresif şeklidir. Bu üç MTC çeşidi, yani iki kalıtsal form ve bir sporadik form, insidans, genetik, başlangıç yaşı, diğer hastalıklarla ilişki, tümör histopatolojisi ve prognoz açısından klinik olarak farklıdır (11).

Tablo 1 Medüller tiroid karsinomunun sınıflandırılması (MTC) (85)

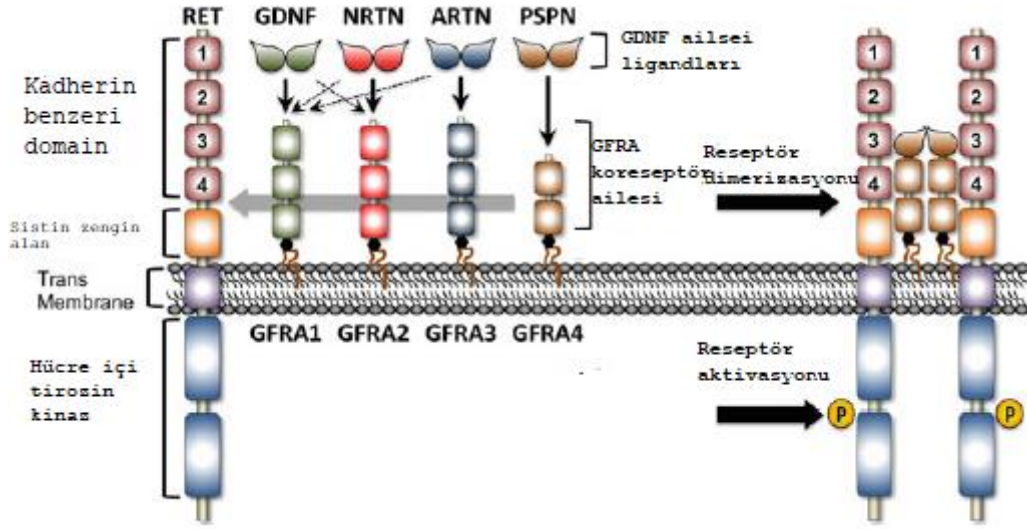
MTC Tipi	İnsidans	Klinik Tanı Koyulma Yaşı	Endokrinopatiler ile birlikteliği
Sporadic MTC	75	5.Dekat	Yok
Ailesel MTC	25	-	-
--MEN2A	-23	3.Dekat	Feokromasitoma,Paratiroid adenomu,Kutanöz liken amiloidozis
--MEN2B	-2	1.Dekat	Feokromasitoma,Mukozal neuroma

2.1.6.2 Onkojenik Transformasyon ve Moleküler Patogenez

Pleiotropik büyüme faktörlerinin ve reseptörlerin düzensizliği, karsinogenezin ortak bir özelliğidir ve tümör hücrelerinin proliferasyonuna, antiapoptotik ve istilacı davranışına katkıda bulunur. C hücresi neoplazisinde gözlemlenen ilgili mutasyonlar, esas olarak RET ve RAS genlerini içerir, ancak diğer yollardaki komponentlerde de mutasyonlara sık rastlanır. Aslında, bu genler, normal C-hücre gelişimi ve nöral krestten göç için düzenleyici genlerdir. Tetikledikleri yollar, normalde sıkı bir şekilde düzenlenir. Çeşitli nedenlerle, bu faktörlerin ve etkili oldukları yollardaki bileşenlerinin düzensizliği, tümör hücresi çoğalması, hücre döngüsü kontrol noktaları hataları ve istilacı davranış gibi temel MTC özelliklerinin açığa çıkmasına neden olur.

2.1.6.2.1 RET Sinyali ve Onkojenik Dönüşümü

RET reseptörü, insan kromozomu 10q11.2'de lokalize edilmiş RET proto-onkogeniyle kodlanır. Bu gen, tirozin kinaz reseptör (RTK) familyasına ait, tek geçişli bir transmembran proteinini kodlar (86). Bu proteinin hücre dışı bölgesi, cadherin benzeri alanlar içerirken, hücre içi bölgesi aktif tirozin kinaz bölgesini içerir. RET, nörturin (NRTN), persephin (PSPN) ve artemin (ARTN) içeren, glial hücre türevli nörotrofik faktör (GDNF) ligand ailesinin, hücre dışı bağlanması yoluyla aktive edilir. Büyüme faktörlerinin, RET'in, tirozin kinaz aktivitesini uyarmak için, önce GDNF reseptör-alfa familyasına (GFRA) ait olan glikosilfosfatidilinositol (GPI) 'a bağlanarak GFRA ile bir kompleks oluşturması gerekir. Oluşan büyüme faktörü-GFRA kompleksi RET reseptörünü dimerleştirir ve otofosforilasyon sonucu RET aktive hale gelir (Şekil 5) (87).



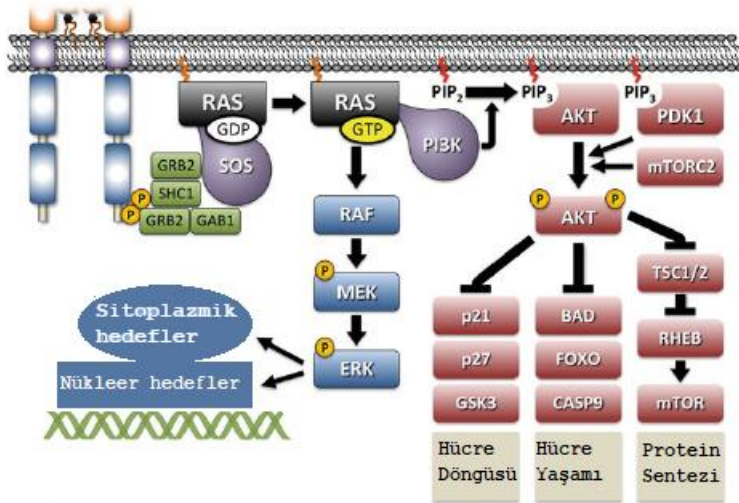
Şekil 5 RET reseptör aktivasyonu (99) (Friedheim Raue, eds. Medullary thyroid Carcinoma'dan alınarak modifiye edilmiştir.)

RET onkogeninin aktive edici mutasyonları, hücre dışı ve hücre içi olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Hücre dışı ve sistein bakımından zengin RET alanı, en sık sistein 634'te (vakaların%85'i) mutasyona uğrar, ancak mutasyonlar aynı zamanda tüm sisteinler arasında da dağılır (C609, C611, C618, C620, C630) (88). Daha önce belirtildiği gibi, aktivasyona giden normal yol, GFRA1-4 / ligand kompleksinin RET'e bağlanmasını içerir; bu kompleks, dimerizasyonu ve ardından reseptörün otofosforilasyonunu destekler. Mutasyona uğramış RET reseptörü ise, normalde molekül içi disülfid bağları oluşturan sistein artıklarını hedef alır ve molekül içi serbest sülfidril grupları oluşturur ve sonuçta mutant RET reseptörleri moleküller arası disülfid bağları oluşturularak uyarıcı ligand yokluğunda bile dimerizasyonu sürekli bir şekilde uyarırlar (89-91)

2.1.6.2.1 RAS Sinyali ve Onkojenik Dönüşümü

RAS protein ailesi, ligand-reseptör etkileşimlerinin, düzenli bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan anahtarlar gibi davranan küçük GTPazlardan oluşur (92). Esas olarak RET gibi reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanan, büyüme faktörleri yoluyla aktive edilirler. RAS proteinleri, fonksiyon kazanmak için prenilasyon yoluyla plazma zarına bağlanır (93). RTK otofosforilasyonu, RAS'ın, adaptör protein büyüme faktörü reseptör bağı proteini 2 (GRB2) ile etkileşime girmesini sağlar.

GRB2, guanodin difosfat (GDP) yerine guanodin trifosfatın bağlanması sağlayarak RAS'ı aktive eden bir guanodin nükleotit değişim faktörü (GEF) olan SOS'a bağlanır (94). Sonuçta RAS, aktif olmayan "kapalı" formdan (GDP bağlı) aktif "açık" forma (GTP bağlı) geçer. GTP'nin bağlanması, RAS afinitesinde, hücre durumuna bağlı olarak, RAF veya PI3K ailesi üyeleri gibi, maddelere bağlanmayı sağlayan konformasyonel bir değişime neden olur. RAF bir serin-treonin kinazdır. RAS, onu plazma membranına almak için hareket eder ve dimerizasyonu ve aktivasyonunu destekler (95). Aktive edilmiş RAF, MEK kinazı aktive eder ve MEK kinaz da ERK kinazı aktive eder. Aktive edilmiş ERK, hücre döngüsü ilerlemesini uyaran diğer kinazlar ve transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere birçok substratı fosforile eder (96). PI3K'nın aktivasyonu ise, AKT'nin fosforilasyonunu indükleyerek, birkaç tümör baskılayıcının inhibe edilmesine veya mTORC1 kompleksinin aktivasyonuna yol açar (Şekil 6) (97-98)



Şekil 6 RAS sinyal yolağı (99) (Friedheim Raue, eds. Medullary throid Carcinoma'dan alınarak modifiye edilmiştir.)

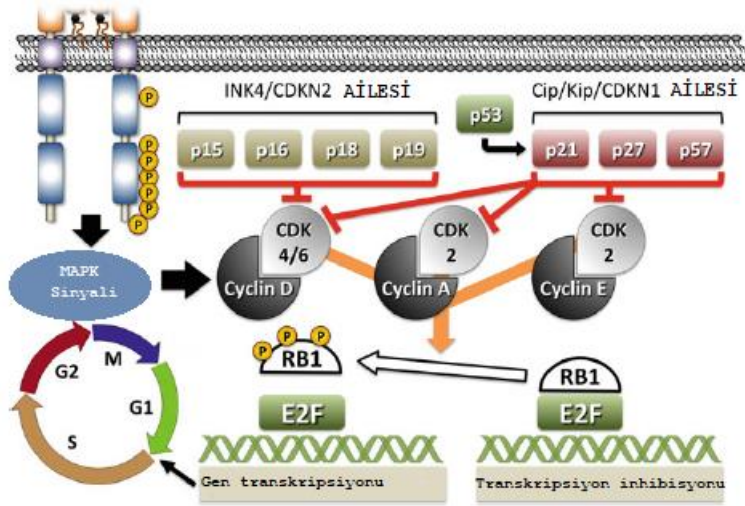
2.1.6.2.1 Diğer Sinyal Yolakları

RET ve RAS yollarının, C hücresi neoplazisi için baskın onkojenik yollar olduğu ortaya koyulmuştur, ancak, bu genlerin mutasyonları, MTC genetik karsinogenez mekanizmalarının yaklaşık sadece %60'ını açıklamaktadır. Alternatif kanser gelişimi yolları ile ilgili yapılan çalışmalar, C hücresi onkogenesinin önemli bir kısmının, gen mutasyonundan ziyade, gen kopya numarası değişiklikleriyle meydana geldiğini öne sürmektedir. Kopya sayısındaki değişikliklerin rolü, yüksek

yoğunluklu, karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CGH) dizi çalışmaları ile desteklenmiştir. (100-101). Bazı çalışmalarda, retinoblastom tümör baskılayıcı (RB1) yolunun, farelerde C hücresi onkogenezinde etkin bir yol olarak rol oynadığı saptanmıştır ve insanlarda da potansiyel olarak, önemli bir yol olarak düşünülmüştür. Bu yolun, esas olarak sikline bağımlı protein kinazlarından (CDK), sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinden (CDKN), siklinlerden (A, D ve E), RB proteinlerinden ve E2F-transkripsiyon faktörleri ailesinden oluştuğu tespit edilmiştir (102-103).

Hücre siklusu ilerlemesi, CDK'lerin aktifleştirdiği siklinler tarafından pozitif olarak ve CDKN'ler tarafından negatif olarak düzenlenir. Her ikisinin de etkinliği, çevresel ve hücresel sinyallerle düzenlenir. Örneğin, MAPK sinyalleri, artan siklin D ifadesine yol açarken, p53 aktivasyonu, p21 fonksiyonunu artırır. Bu nedenle CDKN ailesi üyeleri, negatif CDK düzenlemesi ve G1 fazında hücre döngüsünü durdurma yoluyla, uygunsuz hücre bölünmesinin önlenmesinde merkezi bir rol oynamaktadır.

CDKN'ler iki ana aileden oluşur, bunlar; p15, p16, p18 ve p19'u içeren INK4 / CDKN2 ailesi ve p21, p27 ve p57'yi içeren Cip / Kip / CDKN1 ailesidir. CDKN supresyonunun olmaması, RB'nin fosforilasyonunu artırarak, hücre döngüsünde, inhibe edici bir etkisi bulunan RB-E2F etkileşiminin bozulmasına neden olur. E2F, RB baskılamasından kurtulduktan sonra, S fazı boyunca ilerlemek için gereken genlerin, transkripsiyonunu gerçekleştirir. CDKN'lerin ve RB'nin anormal kaybı, çok sayıda kanser tipinin gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 7) (104,103).



Şekil 7 RB1 aracılı hücre döngüsü regülasyonu (99) (Friedheim Raue, eds. Medullary throid Carcinoma'dan alınarak modifiye edilmiştir.)

2.1.6.3 MicroRNA'ların MTC 'deki Rolü

MiRNA'lar, bitkilerde, hayvanlarda ve bazı virüslerde bulunan, 19 ile 25 nükleotit arasında değişen uzunluklara sahip, endojen, kodlayıcı olmayan RNA'lardır. Temel olarak, gen ekspresyonunun, transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde görev alırlar ve mRNA molekülleri içindeki tamamlayıcı sekanslarla birlikte, baz eşleştirme yoluyla işlev görürler (105). MiRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonlarını, transkripsiyonun stabilitesini azaltarak ve / veya translasyonu inhibe etme yoluyla, azaltırlar (106). Bu şekilde spesifik proteinlerin bolluğunu azaltarak, birçok fizyolojik süreç üzerinde temel düzenleyici rol oynarlar (107-108).

Son yapılan meta-analizler, spesifik tiroid kanseri histotiplerinde, en sık görülen düzensiz miRNA'lara, daha net ve genel bir bakış açısı sağlamayı amaçlamıştır. MTC özelinde değerlendirildiğinde, miRNA-21, miRNA-183 ve miRNA-375'in artmış ekspresyonu, hastalarda persistan ve metastatik hastalıkla ilişkilendirilmiştir (20). Yine darklı bir çalışmada, MiRNA-21 ve MALAT-1 'in MTC'de progresyonu arttırdığı saptanmış ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (22). Yapılan son çalışmalar, miR-21'in PTEN, PDCD4, RECK ve TPM1 gibi tümör baskılayıcı genleri baskılayarak hücre dönüşümünü desteklediğini göstermiştir (109). Sporadik ve herediter MTC'nin miRNA profillerinin incelendiği ve karşılaştırıldığı bir

çalışmada, miRNA-183 ve 375' in sporadik tipde herediter tipe göre anlamlı şekilde arttığı ve miRNA-9 'unda anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, miRNA-183 ve 375 artışının, lenf nodu metastazı, rezidüel hastalık ve mortalite ile ilişkili olduğu saptanmıştır (110).

Aksine miRNA-224 ekspresyonundaki artış, metastatik olmayan MTC ve biyokimyasal kür ile ilişkili saptanmış ve genel olarak daha iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (23,111). Metastatik MTC hücre kültürü üzerinde, miRNA'ların regülasyonunun incelendiği başka bir çalışmada, miR-10a, miR-200b/-200c, miR-7 and miR-29c'nin azaldığı ve miR-130a, miR-138, miR-193a-3p, miR-373 and miR-498 'ün arttığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, miRNA-200'ün tümörögenез üzerine etkilerini anlamak için miRNA-200 antagomiR' leri ile muamele edilmiş MTC hücre hattında , migrasyon, proliferasyon ve invazyon ile ilgili deneyler yapılmıştır. Sonuç olarak miRNA-200 etkinliği azalmış hücrelerde ,E-cadherinin azalmış ekspresyonu ve vimentinin artmış ekspresyonu sonucu, mezenkimal dönüşümün arttığı ve invazyon ve proliferasyonun arttığı gözlenmiştir (112). Yine yapılan farklı çalışmalarda, miR 9, miR 10a, miR 124a, miR 127, miR 129, miR 137, miR 154, miR 224, miR 323, miR 370, miR 375 ve miR 21 'in PDCD4 moleküler hedefi üzerinden arttığı, miR 200'ün ise RET onkogeni üzerinden azaldığı tespit edilmiştir. Artan miR 21'in lenf nodu metastazı, azalan miR 200 ailesinin ise uzak metastazlar ile ilişkili olduğu saptanmıştır (20,113). Bu çalışmalar, mikroRNA'ların onkojenik ve tümör baskılayıcı fonksiyonlarının, MTC'nin patogenezinde ve ilerlemesinde önemli roller oynayabileceğini ve MTC'nin erken tanısı için prediktif amaçlı, tedavisi için hedef ve tedavi sonrası takip ve prognozu belirlemek için yardımcı belirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

2.1.6.4 MTC Tedavi

Erken tanı ve cerrahi tedavi, medüller tiroid karsinomlu hastaların tedavisi için temel oluşturur. Minimal standart prosedür, sporadik ve ailesel formların her ikisinde de, merkezi boyun lenf nodu diseksiyonu ile birlikte total tiroidektomidir. Cerrahi tedavinin yeterliliği MTC'nin etkili tedavisi için çok önemlidir (114).

Hastalarda birincil cerrahi tedavi ile kür sağlanamadığında, lokalizasyon ve lezyon sayısına göre diğer tedavi prosedürleri değerlendirilmelidir. Uzak bazı metastazların cerrahi tedavisi, bazı hayati fonksiyonları tehlikeye atabilecek

lezyonlar hariç, endike değildir. Omurilik fonksiyonunu bozabilecek vertebral metastazların cerrahi olarak kesilmesi küratif olmayan ancak uygun bir palyatif prosedür örneğidir (115). Cerrahi tedavi sonrası kür sağlanamayan hastalarda, eğer hastalık nüks etmiş ya da metastaz mevcut ise, kemoterapide tedavi seçenekleri arasında yer alır. Ancak MTC'li hastalarda geleneksel kemoterapinin etkinliği çok sınırlıdır. Hastalığa tam yanıt çok nadir görülür ve hastaların üçte birinden daha azında kısmi yanıtlar görülmüştür. Bu nedenle, kemoterapi sadece yaygın ve ilerleyici hastalığı olan hastalarda kullanılmalıdır. Doksorubisin, dakarbazin, kapesitabin ve 5-fluorourasil gibi tek ajan rejimlerinin kullandığı çalışmalarda %24-%29'a varan kısmi yanıt oranları bildirilmiştir. İrinotekan (bir topoizomeraaz I inhibitörü) ve 17-AAG (bir ısı şok proteini 90 inhibitörü) gibi daha yeni kemoterapötik ajanlar şu anda faz II klinik çalışmalarında değerlendirilmektedir (116-117).

Medüller tiroid karsinomu bir nöroendokrin tümördür ve vakaların% 30-50'si, somatostatin reseptörleri eksprese eder (118). Somatostatin analogları ile yapılan bazı çalışmalarda, kalsitonun düşüşleri saptanmıştır ancak tümör boyutu ve sayısında azalma saptanmamıştır (119). RET proto-onkojenin keşfedilmesi ve MTC'nin patogenezindeki bütünleyici rolü ile, MTC'nin gelişiminde ve ilerlemesinde merkezi rol alan, moleküler yolaklara yönelik yeni tedavi protokolleri geliştirilmektedir. Kendisinde bir tirozin kinaz ailesi üyesi olan RET reseptörünün MTC deki rolü, tirozin kinaz inhibitörlerinin MTC tedavisinde kullanılabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Keşfedilen ilk tirozin kinaz inhibitörlerinden olan ve KML (kronik myeloid lösemi) ve gastrointestinal stromal tümörlerde tedavi amaçlı kullanılan imatinib, ile ilgili MTC üzerine yapılan bir faz II çalışmasında, etkinliğin sınırlı olduğu belirtilmiştir (120). Halen araştırılmakta olan tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğunun, RET, epidermal büyüme faktörü reseptörü ve vasküler endotel büyüme faktörü dahil olmak üzere birçok reseptörü inhibe ettiği bilinmektedir (121). Tirozin kinaz yolağı dışında, farklı birkaç sinyal iletim yolunda, MTC tümörlerinin büyümesine ve hormon üretimine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Bunlar arasında; PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz), MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) ve Notch-1 ve glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) gibi yolaklar mevcuttur (122-124).

Günümüzde ileri ve metastatik medüller tiroid karsinomunun tedavisi yetersizdir. Yeni alternatif tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır ve birçok deneysel çalışma halen devam etmektedir.

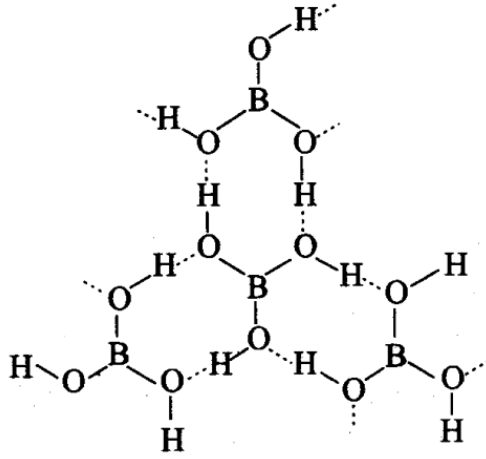
2.2 Borik Asit

2.2.1. Bor'un Biyolojik ve Kimyasal Özellikleri

Bor ile ilgili yapılan son yıllardaki çalışmaların merkez noktası borun, toksik etkisi ve diyet önerilerinden daha çok borun vücuttaki biyokimyasal mekanizmalarını ve nutrisyonel gerekliliğini anlamak üzerine olmuştur (125).

Yer kabuğundaki her yerde bulunan bor, çoğu toprak türünde, tatlı ve tuzlu suda bulunabilir. Çoğu çevresel boron kaynağı doğada jeojenik olmakla birlikte, bor, iyot ve selenyum gibi bazı eser elementlerle birlikte, deniz ortamından atmosferik taşıma ile toprağa karışabilir. Bor (B), Periyodik tabloda grup 13'te bulunan metal olmayan bir elementtir. Özellikleri karbon ve silikona çok yakındır ancak yörüngesinde diğer elementlere göre daha az değerlikli bir elektrona sahiptir. Küçük boyutlu ve yüksek iyonlaşma enerjisi nedeniyle, borda metalik bağlanma yerine kovalent bağlanma mevcuttur (126). Doğada saf element şeklinde mevcut değildir. Boraks, borik asit, kolemanit, kernit, uleksit ve borat şeklinde moleküler yapıda bulunur (127). Endüstride deterjan üretimi, cam ve seramik üretimi, tarım ve tekstil gibi farklı birçok alanda kullanılmaktadır (128).

Bor, neredeyse tamamen gastrointestinal ve solunum sistemleri tarafından emilir ve çoğunlukla vücut dokularında ve sıvılarda Borik asit B (OH) 3 olarak bulunur (129). Borik asit, doğal bir bileşik olarak bilinir ve sudan, sebzelerden ve diğer birçok gıdadan diyet yoluyla alınır (130). H₃BO₃ kimyasal formülüne sahiptir (bazen B (OH) 3 ile yazılmıştır) ve renksiz kristaller veya suda çözünen beyaz bir toz şeklinde bulunur. Yiyecek ve su kaynaklarından günlük bor alımı olan yetişkinlerin, tipik olarak plazma bor konsantrasyonları 60 µM'dir. Hem borik asit hem de bor oral yolla alındığında kolay ve tamamen emilir (insanlarda ve sıçanlarda%95) ve emilimin ardından kan ve vücut dokularında hızlı bir şekilde borik aside dönüşür. Bağırsakta emilen ve asgari miktarlarda solunum yolundan emilen bor, yağ dokusu dışındaki yumuşak dokularda eşit bir şekilde dağılır. Bilim insanları kemikte birikim olabileceğini, ancak alımları yansıtan ve en kolay erişilen örneklerin semen ve kan olduğunu belirtmektedir (131).



Şekil 8 Borik asitin yapısı

2.2.2 Borik Asitin Etkileri

Bor, hormonal metabolizmalar, hücre zarı fonksiyonları ve enzim reaksiyonlarında önemli roller oynayan bir elementtir. Vucuda alınan bor, idrarla hızla atılır ve dokularda birikmez, Borun vücut dokularında biriken moleküler hali, borik asit formudur. Sağlıklı insanlarda, toplam bor kanı konsantrasyonları, 15.3-79.5 ng / g 'dır ve bunun %98,4'ü borik asitten ve %1,6'sı borat anyonu (B (OH) 4) 'dan oluşur (125,132).

Çeşitli vücut organlarının bor içeriği değişkendir; kalp, karaciğer, akciğer, böbrek ve beyindeki borik asit konsantrasyonları sırasıyla 28, 2.31, 0.6, 0.6, 0.06 ppm'dir. Bu, bor tarafından gerçekleştirilen herhangi bir fonksiyonun, organdan organa farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır (133-134). Diyetteki bor alımının, artrit ve osteoporoz gibi önemli metabolik süreçler üzerindeki etkisi de kanıtlarla desteklenmektedir (135). Borun, bazı steroid hormonlarının yapımını azaltarak, bazı kronik rahatsızlıkları önleyebildiği (136), diyetde miktarı arttığında, östrojen, testosteron ve plazma iyonize kalsiyum seviyelerinin arttığı ve D vitamini ve magnezyum eksikliklerinin olumsuz etkilerini azalttığı gösterilmiştir (125,137-138).

Borun, antioksidan etkinliği (139), immün sistem fonksiyonlarını regüle ettiği, (140-141), mineral ve vitamin metabolizmasını kontrol ettiği (142-143), steroid hormon metabolizmasını düzenlediği (136,144) yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Araştırmalar, borun, beyin fonksiyonlarını ve insanların bilişsel performansını etkileyebileceğini de doğrulamıştır (146-147). Borun ayrıca kemik gelişiminde,

“inflamatuar yanıt” ve santral sinir sistemi fonksiyonlarında hayati bir rol oynadığı ve eksikliği durumunda kemik hacmi ve trabekül kalınlıkların azaldığı ve trabeküler ayrışmanın arttığı saptanmıştır (138). Park ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada böbrek tübüllerinde, voltaj bağımlı sodyum-borat transporterları bulunmuştur. Bunun, kan borat seviyelerini düzenlemek için kullanıldığı ve hücre büyümesi ve proliferasyonda, önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür (148). 7 haftadan fazla bir süre, günlük 3mg bor alımının, menopoz sonrası kadınlarda, osteoporozu önlediği gösterilmiştir. Bor, kalsiyum ve magnezyumun, idrarla atılımını sırasıyla%40 ve %33 oranında azaltmıştır. Başka bir çalışmada ise diyetle alınan borun, postmenopozal osteoporozu olan kadınlarda, östrojene benzer etkiler gösterdiği kanıtlanmıştır. Bor alımı ayrıca kan serumu içindeki iyonize kalsiyum miktarını arttırmış, serum kalsitonin konsantrasyonlarını azaltmış ve serum 1,25-dihidroksikolekalsiferol seviyelerini arttırmıştır (149).

Deneysel çalışmalar borun prostat kanserine karşı koruyucu özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (29). Düşük konsantrasyonlardaki borik asitin, prostat spesifik antijenleri (PSA) ‘nin proteolitik aktivitesini kısmen baskıladığı gösterilmiştir. Bu nedenle, PSA aktivitelerini düzenlemek için bor bileşikleri kullanılabilir ve ayrıca, bor kaynaklı PSA aktivitelerinin baskılanmasının, prostat kanserinin artışı ve gelişimini önlemeye yardımcı olabileceği öne sürülmüştür (150). Borik asitin, prostat kanseri hücre kültürleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda, borik asitin belirli konsantrasyonlarda, çeşitli mekanizmalar sonucu, prostat kanseri hücrelerindeki proliferasyonu inhibe ettiğini gösterilmiştir. (30,151)

ABD Teksas'ta yapılan bir araştırma, yeraltı sularındaki bor konsantrasyonlarının, prostat kanserine yakalanma ve ölüm oranlarıyla ters bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (31). Korkmaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sırasıyla borondan fakir ve borondan zengin bölgelerde yaşayan 587 ve 472 kadından alınan smear örnekleri karşılaştırılmıştır. Borondan zengin bölgede yaşayan kadınlardan alınan smear örneklerinde, sitopatolojik olarak serviks kanseri kanıtına rastlanmazken, borondan fakir bölgede yaşayan kadınlardan alınan örneklerden, 15 ‘inde sitopatolojik olarak serviks kanseri bulgularına rastlanmıştır (34). Borun, akciğer, meme kanseri ve malign melanom üzerine, mekanizmaları net olmamakla birlikte, anti-proliferatif etkileri olduğu yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiştir (152-154).

Kanıtların birikimi, bor ve bor içeren moleküllerin günlük diyetle doğal anti kanser ajanı olarak kullanılabilirliğini ve borun, kanser tedavisi amaçlı, potansiyel ilaçlar için kaynak olarak sunulabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, borun uygun bir şekilde kullanılabilmesi için, etki mekanizmaları ve toksisite riski hem in vivo hem de in vitro olarak yeni yaklaşımlarla aydınlatılmalıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Kitler

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler Tween 20 (BioShop), Skim Milk (BioShop), Magnesium Chloride (BioShop), 2-Mercaptoetanol (Merck), Bromfenol Mavisı (BioShop), Dietanolamin (BioShop), BCIP (BioShop), Fenazin metosülfat (BioShop), Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (BioShop), Etanol (Riedel), Tris (BioShop), Hidroklorik asit (HCl) (Sigma), Akrilamid (Sigma), Sodyum bikarbonat (Riedel), Amonyum persulfat (Sigma), Coomassie Pırlanta Mavisı (BioShop), Asetik Asit (Merck), N,N-Metilenbisakrilamid (Sigma), Glisin (BioShop), Borik Asit, Akrilamid (Sigma), Kloroform (Sigma), 2-propanol (Sigma), Amonyum persulfat (Sigma), Trizol (Hibrogen), Matrigel Invasion Chamber (Thermo scientific Lot:159467) Fötal Sığır Serumı (Capricorn) Kristal Viyole (BioShop), Hoechst (Sigma), Penisilin/Streptomisin (Biological Industries), DMEM (Sigma), PBS (Serox), Tripın Mavisı Boyası (%0,5 (w/v) fizyolojik tuz içinde), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Gibco), DNAaz/RNase free su (Multicell), Steril kültür kapları (Petri), (Greiner) 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Greiner) 96-Kuyucuklu PCR Array Plate (Qiagen)

Çalışmalarda Kullanılan Kitler; XTT proliferation Kit (Biotium), Thermo Scientific Maxima SYBR (Evagreen abm) qPCR Master Mix, Tunel In Situ Cell Detection Kit (Cell meter™ tunel apoptosis assyn kit catalog no. 22844), Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (High Capacity Revers transkription kit),

Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar; CO₂'li inkübatör (Nuaire), Biological Safety Cabinets Class II Laminar Flow (Nuaire), İnverted Mikroskop (Olympus), Floresan Mikroskop (Olympus), Otomatik mikropipetler (10, 20, 100, 200, 1000 µl'lik) (Biohit), Hassas Terazı (Denver Instrument), Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo), Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Mikro Santrifüj (Hettich Zentrifugen), Soğutmalı Santrifüj (Hettich Zentrifugen), RT- PCR (Applied Biosystems)

StepOnePlus), -20 Derin Dondurucu (BEKO), No Frost Buzdolabı (BEKO), Ph metre (Metler Toledo MP 220), Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı (IKA RH basic 2), Otoklav (Nuve), Vorteks(IKA Yellow Line), Güç Kaynağı(Bio-Rad), Mikrodalga Fırın (BEKO MD1500), Hücre sayıcı (Cellometer)(Nexcellum), -80°C Dondurucu (Nuaire)

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmamızda hücre kültürü olarak, *in vitro* koşullarda TT (ATCC® CRL-1803™) tiroid medullar karsinomu hücre hattı ve HTF (Human Thyroid Fibroblasts Cat no:3730, LOT no: 8355) hücre hatları, kendi stoklarımızdan kullanılmış olup, deneyler Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji AD. hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan TT hücre hattına ve HTF hücre hattına ait bazı özellikler şu şekildedir (Tablo 2) (156-157)

Tablo 2 Hücre Hatları

Hücre Hattı	TT (ATCC® CRL-1803™)	HTF (Human Thyroid Fibroblasts)
Organizma	(Homo sapiens)	(Homo sapiens)
Cinsiyet-Yaş	Dişi- 77	--
Büyüme Özelliği	Yapışarak	Yapışarak
Morfoloji	Epitelyal	Epitelyal

Borik asidin, TT ve HTF hücre hattına olan moleküler ve biyolojik etkilerini incelemek amacıyla hücre kültürleri üzerinde bazı kültür basamakları gerçekleştirilmiştir. Bu kültür basamakları; hücrelerin çoğaltılması, pasajlanması, daha sonra sayılması ve kültür plakalarına ekilmesi, son olarak dondurulması ve yapılacak işlemler öncesi çözülmesini içermektedir. *In vitro* koşullarda hücrenin gerekli bazal ihtiyaçlarını karşılayarak sorunsuz bir şekilde çoğalabilmesi için ortama

hücrenin gereksinim duyduğu maddeler eklenmelidir. Tarafımızca hücreler, %10 fetal sığır serum (FBS), %1 L-glutamin, 10 mg/ml streptomisin ve 100IU/ml penisilin içeren DMEM besi yerinde çoğaltılmıştır. Hücreler, 37°C de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmişlerdir (Tablo 3).

Tablo 3 Gerekli Besiyeri Detayları

DMEM L-Glutamine(Sigma)
%10 FBS (Yeni Doğan Sığır Serumu) (Capricorn)
0.1mM Aminoasit solusyonu (01-340-1B, Biological Industries)
2mM Glutamin (03-020-1B, Biological Industries)
1mM Sodyum Piruvat (03-042-1B, Biological Industries)
100U/0.1mg Penisilin/Streptomisin (03-031-1C, Biological Industries)

TT ve HTF hücrelerinin çoğaltılması ve pasajlanması işleminde DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37°C de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler yapışarak çoğaldıkları için ilk olarak hücreleri yapıştıkları yüzeyden ayırmak gerekir. Petri kapları öncelikli olarak PBS ile yıkanarak ölü hücrelerden arındırılıp daha sonra tripsin ile hücreler, yapıştıkları yüzeyden kaldırılmıştır. Oluşan hücreler ve eklenen bileşik çözeltisi 1500g'de 4 dakika santrifüj

edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücreler petri kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin sayım işleminde, tripan mavisi boyası kullanılmıştır. Tripan mavisi ölü hücreleri boyayıp canlı hücreleri boyamadığı için sayım açısından oldukça fayda sağlamaktadır. Hücreler, hücre sayar (cellometer) cihazı yardımıyla sayılmıştır. Santrifüj edilen tripsinizasyon işlemi ile kaldırılan hücrelerin üzerine, hazırlanmış olan besi yeri eklenmiştir. Ependorfta, 400 µl PBS, 100 µl hücre süspansiyonu karıştırılmış hücreler 5 kat dilüe edilmiştir ve karışımın içine boyama amaçlı 1 µl tripan mavisi eklenmiştir. Hazırlanan karışımdan alınan 20 µl'lik örnekler hücre sayarda sayılmıştır.

Hücrelerin dondurulma işlemi kriyotüpler içerisinde gerçekleştirilmiştir. 1,5 ml hacimli kriyotüplere, 9:1 oranında besi yeri ve DMSO (Dimetil sülfoksit) (%10 DMSO) olacak oranda hücre süspansiyonu eklenerek koyulmuştur. Daha sonra hücreler resüspansiyon edilerek -80 derecede saklanmıştır. Dondurulan kriyotüpteki hücrelerin 37°C de su banyosunda çözülüp taze besi yeri eklenerek falkona alınıp santrifüj işlemi ile DMSO içeren besi yeri uzaklaştırılıp yeni besi yeri eklenerek pasaj yapılmış ve hücreler inkübe edilmiştir.

3.3. XTT Testi (Hücre Canlılığı Testi)

Değişen dozlarda borik asit, TT hücrelerine uygulanarak zamana ve doza bağımlı olarak hücre canlılığının tespiti ve hücrelerin yüzde ellisinin yaşadığı dozu bulmak için XTT testi kullanılmıştır. Test temel olarak suda eriyebilen bir bileşik olan XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)'nin canlı hücrelerde turuncu renkli formazon bileşenlerine indirgenmesi prensibine göre çalışmaktadır. Borik asidin sitotoksitesisi ve doz ve zamana bağlı etkisi "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (biotium CAT no: 30007)" ile yapılmıştır.

TT ve HTF hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında 1×10^4 /kuyucuk miktarında ekilmiştir. 10 µM, 20 µM, 35 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM çalışma konsantrasyonları %10 serumlu tam besi ortamı ile hazırlanmıştır. Belirlenen konsantrasyonda borik asit uygulaması sonrasında hücre proliferasyonu "Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit (Biotium cat no : 30007)" ile saptanmıştır. Aynı zamanda, zamana bağımlı etkinin araştırılması amacıyla test işlemi 24, 48 ve 72. saatlerde çalışılmıştır. Bu saatler sonunda her bir

kuyucuğa 100 µL ortam koyulduktan sonra 50 µL aktive edilmiş XTT solüsyonu (5 mL XTT Reagent Solüsyonu ve 25 µL Aktivatör Solüsyonu) eklenmiştir. Madde eklenmesinden 4 saat sonra çalışılan grupların absorbands değerleri (OD) ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda ve 630 nm referans aralığında okunmuştur. Hücre canlılığı yüzdesi her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplanarak IC₅₀ oranı belirlenmiştir.

3.4. TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini

TUNEL (Terminal deoksinükleotit transferaz dUTP etiketleme), DNA fragmantasyonunu tespit etmek amacıyla, apoptozis sırasında, çift iplikli DNA'ların kopmaları sonucu ortaya çıkan 3'-hidroksil ucunun etiketlenmesi yoluyla çalışan bir apoptozis tayin yöntemidir. Test, bir florokrom veya başka bir marker ile etiketlenmiş deoksinükleotitlerin, DNA çift iplik kopanlarının 3'-hidroksil uçlarına bağlanmasını katalize eden, terminal deoksinükleotit transferaz (TdT) isimli bir enzimin kullanımına dayanır. TdT enzimi sayesinde DNA kırıklarının 3'-OH uçlarına eklenen floresan işaretli nükleotidler floresan mikroskop altında, değerlendirilerek yüzde apoptoz tayini yapılır.

Çalışmamızda AAT bioquest Kit, POD kullanılmıştır. TUNEL testi için hücreler, 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) eklenmiştir. Her bir odacığa içine 4×10^3 hücre olacak şekilde 4 kontrol ve 4 adet etkili bulunan doz aralığında (35 µM) borik asit ilave edilmiş doz grubu hücreleri eklenmiş ve IC₅₀ dozunun belirlendiği zaman aralığında (48 saat) hücreler inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, besi yeri aspire edilmiş ve PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Kit protokolüne göre;

- ✓ Odacık başına 500 µl olacak şekilde fiksasyon solüsyonu ile bir saat inkübasyon
- ✓ PBS ile yıkama
- ✓ 350 µl bloklama solüsyonu (metanol içerisinde %3 H₂O₂) ile inkübasyon
- ✓ PBS ile yıkama işlemi

- ✓ Buz üstünde iki dakika süre ile permeabilizasyon solüsyonu (%0,1 Triton-X-100 olacak şekilde sodyum sitrat çözeltisi) ile muamele
- ✓ PBS ile yıkama
- ✓ Her bir odacığa 0.5 µl 100X TF3-dUTF(component A) ve 50 µl Reaction Buffer (Component B) olacak şekilde 50.5 µl kit solüsyonu karışımı ile muamele edilmiştir ve 37 c de 60 dk inkübe edilmiştir.
- ✓ PBS ile yıkama

İşlem gören hücrelerin üzerlerine 10µl PBS içinde Hoechst 33332 (100 µg/ml) içeren %50 gliserol eklenmiş ve floresan mikroskopunda apoptotik ve canlı hücre sayımı yapılmıştır.

3.5. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu

Kontrol ve doz gruplarında RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirilmiştir ve gen ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir.

- ✓ 3×10^6 hücre olacak şekilde 6'lık well plakalara hücre ekimi
- ✓ Hücrelere borik asitin tespit edilen IC₅₀ dozu ve zamanı (35 µM, 48 saat) ölçüsünde etken madde verilmesi
- ✓ Hücrelerin, plaka başına 500 µl olacak şekilde trizol ile tamamen kaldırılıp, ependorf tüplere (1 ml'lik) transferi edilmesi
- ✓ Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip, pipetlendikten sonra, oda sıcaklığında 15 dakika tekrar inkübe edilmesi,
- ✓ Solüsyonun +4°C' de 15.000 g'de 20 dakika santrifüj edilmesi ve üst fazın toplanıp, ependorf tüplere alınması,
- ✓ Toplanan üst fazın üzerine 500 µl izopropanol eklenip, pipetlenmesi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmesi,
- ✓ +4°C'de 15.000 g'de 30 dakika santrifüj
- ✓ Peletin üzerine %70'lik etanol konulması ve +4°C'de 12.000 g'de 10 dakika santrifüj,
- ✓ Süpernatantın atılması
- ✓ Pellet 40 µl RNase-DNase free su ile çözünmesi işlemleri sırası ile gerçekleştirilir.

3.6. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan, mRNA cDNA sentezi High Capacity cDNA revers transcription kiti (LOT:00325690) ile oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi (RT) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MiRNA ekspresyon testi için abm miRNA cDNA synthesis kit (abm) kullanılmıştır. Karışım hazırlandıktan sonra cDNA sentezi için 50°C' de inkübe edilmiş, enzimi inhibe etmek için 85°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapmak üzere -20°C'de saklanmıştır (Tablo 4).

Tablo 4 cDNA Sentez Karışımı

	Hacim	Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2µg
Oligo(dT) Primer	1µl	2,5 µM
dNTP karışımı (10 mM)	1 µl	500 µM
5X RT tamponu	4 µl	1X
DTT	1 µl	5mM

Tablo 5 Devam cDNA Sentez Karışımı

ProtectorRNase Inhibitör	0,5 µl	20 U
Easyscript plus RTase (200U/µL)	1 µl	200 ünite
RNAaz içermeyen su	Değişken	-
Son hacim	20 µl	-

3.7. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real-Time PZR)

Gerçek zamanlı PCR, her numuneyi en az bir adet belirlenmiş dalga boyunda bir ışık huzmesi ile aydınlatarak ve uyarılmış fluorofor tarafından yayılan flüoresansı saptayabilecek kapasitede bir termal döngüleyicide gerçekleştirilir. Termal döngüleyici, numuneleri hızlı bir şekilde ısıtabilir ve soğutabilir, böylece nükleik asitlerin ve DNA polimerazın fiziko- kimyasal özelliklerinden faydalanmış olur.

Borik asit eklenmesi sonrasında belirlenen hücre dizini kullanılarak, hücre döngüsünde rol alan genlerin RNA düzeyindeki ekspresyonları "Real Time Custom Panel" kullanılarak saptanmıştır. Mevcut hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış ve sonrasında elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır. PZR işlemi sonrası elde edilen ampikonlar, LightCycler cihazında, logaritmik artışa geçtikleri döngü sayısınıca değerlendirilmiştir. Bu sebeple

önce konsantrasyonları bilinen GAPDH ve diğer housekeeping genlerin bir standart amplifikasyon eğrisi oluşturulmuştur. Hedef miktarı; hedef (T) gen kopyalarının housekeeping (H) gen kopyalarına oranı şeklinde ölçülmüştür. İkinci basamakta, hedefin housekeeping gen kopyalarına oranı (T/H), her reaksiyonda koşulan kontrol RNA'nın T/H oranına bölünmesi ile elde olunmuştur.

Step One Plus Real-time PCR System, hızlı soğuma ve ısıtma kapasitesine sahip bir gerçek zamanlı pcr cihazıdır. Bu sistemde modifiye SYBR Green methodu kullanılmıştır. Amaç amplifikasyon ürünlerini eş zamanlı takip edebilmektir. SYBR Green boyası DNA' nın hem büyük hemde küçük girintisine bağlanmaktadır. DNA boyları ile gerçek zamanlı PCR'de reaksiyon her zamanki gibi hazırlanır, floresan DNA boyası eklenir. Daha sonra reaksiyon, gerçek zamanlı bir PCR cihazında gerçekleştirilir ve her döngüden sonra, florasan yoğunluğu bir detektör ile ölçülür; boya sadece DNA'ya bağlandığında florasanlaşır. Ortam ısısına bağlı olarak denature olan DNA'nında florasan sinyali düşmektedir.

Gerçek-zamanlı PCR işleminde, "Beta Aktin, Kaspaz-3,8,9,10, Siklin D1, CDK6, Bax, P16, P21, P53, Bcl-2, BCL-XL, Bid, PUMA, NOXA, CDK2, Siklin D2, FADD, TRADD, DR4, DR5, TNF, FAS, Siklin B, Siklin E APAF1, Retinoblastoma, CDK4" genlerinin mRNA ekspresyonu değişimi ve miR-21, miR-224, miR-375, miR-200 miRNA'larının değişimi araştırılmıştır. Bu genlere ait forward ve reverse dizileri tablo 5'de özetlenmiştir. Bunun için housekeeping gen olan Beta aktin geni ve miRNA deneyleri içinde U6 normalizasyon amaçlı kullanılmıştır. Reaksiyon aşamasında, her bir kuyucuk başına "5 µl SYBR Green" (Applied Biosystem, USA), "6.5 µl moleküler biyolojik saflıkta su", "1.5 µl cDNA", "1 µl Forward Primer" ve "1 µl Reverse Primer" kullanılmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları 96-kuyucuklu plakaya bölünmüş ve plakanın yüzeyi şeffaf yapışkan etiketle kaplanmıştır. StepOne Plus gerçek-zamanlı PCR cihazına yüklenen plaka, 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 10 dakika olacak şekilde çoğaltılmıştır.

Tablo 6 Genlerin Primer Sekansları

Gen İsimleri	Primer sekansları
BAX	F: AGAGGATGATTGCCGCCGT R: CAACCACCCTGGTCTTGGATC
CASPASE-3	F: GCAGCAAACCTCAGGGAAAC R: TGTCGGCATACTGTTTCAGCA
BCL-2	F: TTGGCCCCCGTTGCTT R:CGGTTATCGTACCCCGTTCTC
Beta aktin	F: TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC R: CTGCTTGCTGATCCACATCTG
CASPASE-9	F: GGCTGTCTACGGCACAGATGGA R: CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG
P21	F: TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA R: GGCGTTGGAGTGGTAGAAATC
P53	F: ATCTACAAGCAGTCACAGCACAT R: GTGGTACAGTCAGAGCCAACC
BID	F: CCTACCCTAGAGACATGGAGAAG R: TTTCTGGCTAAGCTCCTCACG
DR4 (TNFRSF10A)	F:GCGGGGAGGATTGAACCAC R: CGACGACAAACTTGAAGGTCTT
DR5 (TNFRSF10B)	F:ACAGTTGCAGCCGTAGTCTTG R:CCAGGTCGTTGTGAGCTTCT
FADD	F:GCTGGCTCGTCAGCTCAAA R:ACTGTTGCGTTCTCCTTCTCT
TRADD	F:GCTGTTTGAGTTGCATCCTAGC R:CCGCACTTCAGATTTTCGCA
CCND1 (Siklin D1)	F: AGCTCCTGTGCTGCGAAGTGGAAC R: AGTGTTCAATGAAATCGTGCGGGT
CDK4	F: ATGTTGTCCGGCTGATGGA R: CACCAGCGTTACCTTGATCTCCC
CDK6	F: AGACCAAGAAGCAGTGTGG R: AAGGAGCAAGAGCATTACAGC
P16	F: CAGTAACCATGCCCGCATAGA R: AAGTTTCCCGAGTTTCTCAGA

CASPASE-8	F:TCTGGAGCATCTGCTGTCTG
Retinoblastom	R:CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT
	F: ATCTATATTTTACCCCCTGAAGAGTC
TNF	R: TTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACA
	F: GCCATTGGCCAGGAGGGC
APAF1	R: CGCCACCACGCTCTTCTG
	F: ATGAGCCCCTCAACAGCAA
CDK2	R: TGTCTTACTACTGGAAGAAGAGAC
	F: GCTAGCAGACTTTGGACTAGCCAG
BCL-XL	R: AGCTCGGTACCACAGGGTCA
	F: GGTTCGATTGTGGCCTTTTTTC
PUMA	R: TGCTGCATTGTTCCCATAGAG
	F: GACCTCAACGCACAGTACGAG
NOXA	R: AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
	F: ACCAAGCCGGATTTGCGATT
CASPASE-10	R: ACTTGCACTTGTTCCCTCGTGG
	F: TAGGATTGGTCCCCAACAAGA
FAS	R: GAGAAACCCTTTGTCTGGGTGG
	F: CACTTCGGAGGATTGCTCAACA
CCND2(Siklin D2)	R: TATGTTGGCTCTTCAGCGCTA
	F: TTCCGCAGTGCTCCTACTTC
	R: CGCACTTCTGTTCCCTCACAG

3.8 İnvazyon Kapasitesinin Belirlenmesi

İnvazyon kapasitesi “trans-well matrigel invasion chamber”- invazyon kapları (Thermo scientific LOT:159467) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları içerisinde değerlendirilmiştir. İnvazyon odacıkları 8 micron çapında olup üstleri porlu bir membran olan matrigel matrix ile kaplıdır. Bu membran sayesinde in vitro bazal membran koşulları sağlanmış olur. Membran sayesinde invaziv özelliği olmayan hücreler membranın diğer yüzeyine geçemez. Bu sayede invaziv ve non-invaziv hücreler birbirinden ayrılabilir. Matrigel membranın (8 µm por açıklıklı) üst kısmına borik asit (35 µM) uygulanan TT hücreleri eklenmiştir. TT hücreleri, her invazyon odasında $2,5 \times 10^5$ olacak şekilde serum içermeyen 0.5 ml DMEM içerisine konulmuştur. İnvazyon odacığının dışına ise, 0.75 ml %10 FBS içeren DMEM koyulmuştur. Hücreler 48 saat 37°C’de CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir.

İnvazyon odacığının içindeki besi yeri ve iç yüzeydeki hücreler uzaklaştırılmıştır. Gece boyunca inkübasyonu takiben, membranın üst kısmında kalan invaze olmamış hücreler de temizlenmiştir. Dış yüzeye göç etmiş invaziv özellikteki hücreler, 2 ml metanol ile fikse edilmiş ve 1 ml kristal viyole ile boyanarak ışık mikroskobunda sayılmıştır. Son olarak aşağıdaki formül kullanılarak % invazyon hesaplanmıştır.

% İnvazyon= matrijel matriks bazal membrandaki hücre sayısı/Kontrol membrandaki hücre sayısıX100

3.9 Koloni Oluşum Testi

Belirlenen dozda borik asit eklenen TT hücrelerinde koloni oluşumunun etkilerini inceleyebilmek amaçlı, 6 kuyucuklu kaplara kontrol ve doz grupları için 10^3 adet hücre ekimi yapılmış ve 14 gün boyunca 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası, hücreler soğuk metanolla -20°C'de 10 dakika fikse edilmiştir. Fikse olmuş koloniler kristal viole boyası ile 15 dakika boyanmıştır ve kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak sayılmıştır.

3.10 Wound healing migrasyon Assay

Wound healing (yara iyileşmesi) testi hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimini incelemek için kullanılan bir laboratuvar tekniğidir. Aynı zamanda çizik deneyi olarak da bilinir, çünkü hücre tek tabaka üzerinde çizik yapılarak mikroskopta düzenli aralıklarla görüntülenir.

Borik asitin TT hücrelerinde migrasyona olan etkisi wound healing (yara iyileşmesi) testi ile belirlenmiştir. Bunun için %100 konfluentiyeye ulaşan hücrelere, 200 µl pipet ucuyla çizik atılmıştır.0.saat ve 24. Saatlerdeki hücrelerin bu boşluğu doldurma kapasiteleri inverted mikroskop yardımı ile izlenmiş ve fotoraflanmıştır.

3.11 TAS TOS Yöntemi

Çalışmamızda, kontrol grubu ve borik asit uygulanmış olan doz grubu TT hücrelerinde, TAS TOS yöntemi ile total oksidan ve total antioksidan seviyelerin

belirlenmesi amacıyla, Rel ASSAY Diagnostics (Türkiye) kit kullanılmıştır. Kit protokolleri aşağıda belirtildiği gibidir.

3.11.1 TOS Protokolü (Total Oksidan Durumu)

Kit içeriğinde, Buffer (Reagent 1), Prochromogen (Reagent 2), Standard (Reagent 3) olmak üzere üç adet kimyasal mevcuttur. Kit Protokolü;

1- 96 well plakalı platelerin her bir kuyucuğuna 200 µl Reagent 1 (Buffer) koyulmuştur.

2- Reagent 1'in üzerine 30 µl ripa solüsyonunda çözülmüş hücre örneği eklenmiş ve diğer kuyucuğa standart (Reagent 3) eklenmiş (30 µl) ve 30 saniye sonra Eliza reader (BioTek) yardımıyla 660 nm dalga boyunda okunmuştur. (Birinci okuma A1)

3- Okuma sonrası 10 µl Reagent 2 (Prochromogen) karışıma eklenmiştir ve Eliza Plaka okuyucu ile 660 nm dalga boyunda tekrar okunmuştur. (ikinci okuma A2)

4- Elde edilen birinci ve ikinci okuma değerleri (A1 ve A2) kullanılarak üretici firmanın belirlemiş olduğu formülasyona göre TOS değeri hesaplanmıştır.

$A2-A1 = \text{standart ve örnek(serum)} \Delta\text{Abs}$ Sonuç= $(\Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs Standart}) *$
Standart Konsantrasyonu

*Standart Konsantrasyonu kit içeriğinde 20 µmol/L 'dur.

3.11.2 TAS Protokolü (Total Antioksidan Durumu)

Kit içeriğinde, Buffer (Reagent 1), Prochromogen (Reagent 2), Standard (Reagent 3) olmak üzere üç adet kimyasal mevcuttur. Kit Protokolü;

1- 96 well plakalı platelerin her bir kuyucuğuna 200 µl Reagent 1 (Buffer) koyulmuştur.

2- Reagent 1'in üzerine 12 µl ripa solüsyonunda çözülmüş hücre örneği eklenmiş ve diğer kuyucuğa standart (12 µl) (Reagent 3) eklenmiştir. Ayrıca üç kuyucuğa

moleküler biyolojik grade su (H₂O) eklenmiştir. 30 saniye sonra Eliza reader (BioTek) yardımıyla 660 nm dalga boyunda okunmuştur. (Birinci okuma A1)

3- Okuma sonrası 30 µl Reagent 2 (Prochromogen) karışımın üzerine eklenerek karıştırılmış ve Eliza Plaka okuyucu ile 660 nm dalga boyunda tekrar okunmuştur. (ikinci okuma A2)

4- Elde edilen birinci ve ikinci okuma değerleri (A1 ve A2) kullanılarak üretici firmanın belirlemiş olduğu formülasyona göre TAS değeri hesaplanmıştır.

$A2-A1 = \text{standart ve örnek (serum)} \Delta\text{Abs}$ Sonuç= $(\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs Örnek}) / (\Delta\text{Abs H}_2\text{O}) - (\Delta\text{Abs standart})$

Kit içeriğine göre; TOS için normal değerler: 4.00-6.00 µmol/L, TAS için normal değerler: 1.50-1.20 mmol/L dir. Elde edilen TOS ve TAS değerlerine göre oksidatif stres indeksi (OSİ) belirlenmiştir. OSİ değeri için kullanılan formülasyon;

$OSİ = TOS / TAS * 1/10$ şeklindedir.

3.12 Comet Assay- Genotoksisite Testi

Comet assay testit, tek hücreli jel elektroforez tahlili ve kuyruklu yıldız tahlili olarak da bilinen, ökaryotik hücre seviyesinde DNA hasarının tespiti için kullanılan hassas bir tekniktir. Lizis ile hücrelerdeki DNA serbest bırakıldıktan sonra, alkali ortamda DNA'nın süperkoil yapısı bozulur ve anod ve katod uçları bulunan jel elektroforezde kızırılmış DNA zincileri anoda doğru göçer ve florasen mikroskopunda bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşur. Baş ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti gibi değerler ölçülerek DNA 'da meydana gelen hasar değerlendirilir. Kontrol ve borik asit uygulanmış TT hücrelerinde DNA hasarını belirlemek için alkali comet yöntemi kullanılmış ve aşağıdaki prosedür izlenmiştir.

1- Deneyden bir gün önce lamlar %1,8'lik HMA çözeltisine maruz bırakıldı. İşlem boyunca agarozun donmaması için kap 40°C'lik su banyosunda tutuldu.

2- Deneyde, %1'lik LMA çözeltisi hazırlandı ve 37,5°C'lik su banyosuna yerleştirildi. Lizis ve elektroforez çözeltileri hazırlanarak soğumaları için buzdolabına koyuldu.

3- 3 mL hücre süspansiyonu 3mL histopaque solüsyonu üzerine eklendi. +40C'de 2100 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi.

4- Hücre tabakası alınarak PBS ile yıkandı.

5- Bu süspansiyondan alınan 60 µL hücre süspansiyonu ve 180 µL LMA ayrı bir ependorf tüp içerisinde karıştırıldı ve karışımdan 40 µL alınarak lamlara damlatıldı.

6- Lamlara yayılan hücrelerin düzgün dağılması amacıyla üzerlerine lamel kapatıldı. Agarozun katılaşması için lamlar 45 dakika boyunca buzdolabında tutuldu.

7- Lizis çözeltisine alınan lamlar 1 saat 15 dakika boyunca buzdolabında bekletildi.

8- Lizis çözeltisinden çıkarılan lamlar, distile suyla yıkayıp elektroforez tankına yerleştirildi. Tanka elektroforez çözeltisi eklendikten sonra lamlar 20 dakika akım uygulamadan bekletildi. Ardından uygun akım (1V/cm, 300mA) ayarlandı ve 20 dakika, 4°C' de elektroforez yapıldı.

9- Elektroforez tankından alınan lamlar distile su ile yıkandı ve nötralizasyon çözeltisinde 15 dakika bekletildi. Ardından lamlar -200C'lik metanole 5 dakika daldırıldı. Metanolden çıkarılan lamlar kurutulduktan sonra etidyum bromür (45 µL) ile boyandı ve görüntü analizi yapıldı.

10- Comet yönteminde görüntü analizinde hazırlanan preparatlar, Comet Assay IV Version 4.3.2 for Basler FireWire görüntü analiz programı kullanılarak Floresan Mikroskop (Nikon) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.13 Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

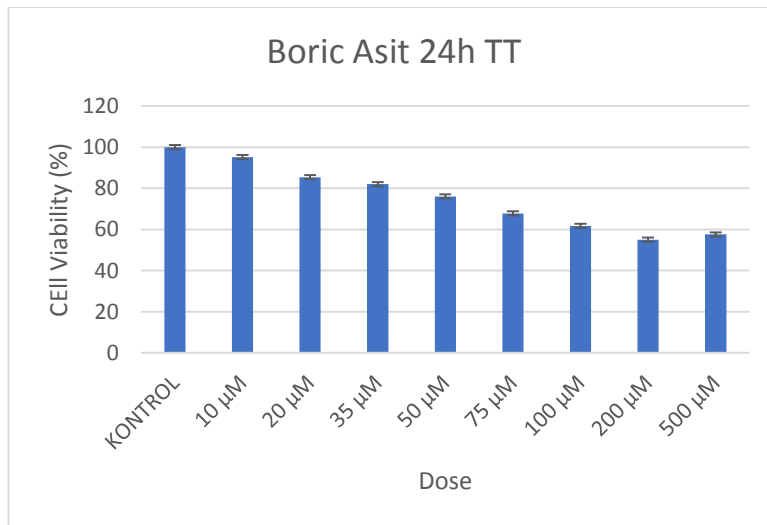
Gerçek-zamanlı PCR verilerinin analizi ve kantitasyonu, $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak bilgisayar programı ile yapılacaktır. Web tabanlı "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanılacaktır. Metodun amacı, iki ekspresyon sonucunun $\pm 3SD$ karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Böylelikle, gen ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda kontrol ve doz grubu ilgili genlerin ekspresyon değerleri rölatif olarak belirlenecektir. Grupların karşılaştırılması "RT² Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında

bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilicektir. Gerekli diğer istatistiksel analizler SPSS (versiyon 17.0) ile yapılacaktır.

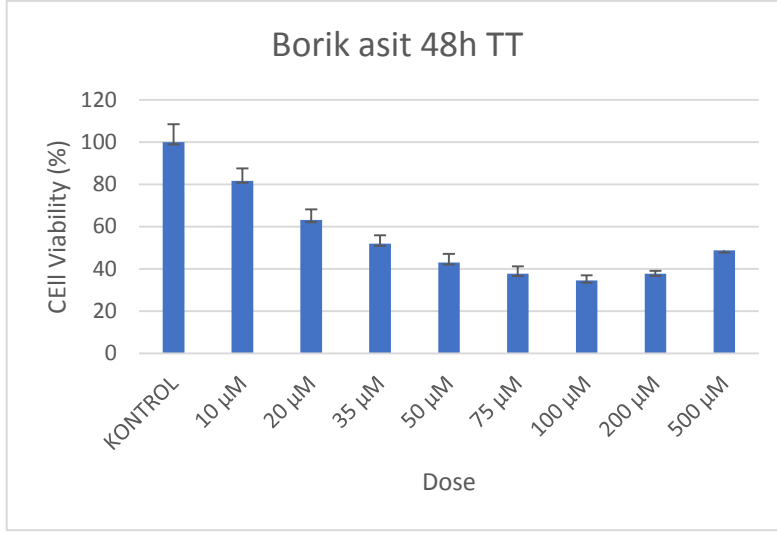
4.BULGULAR

4.1. XTT Sonuçları

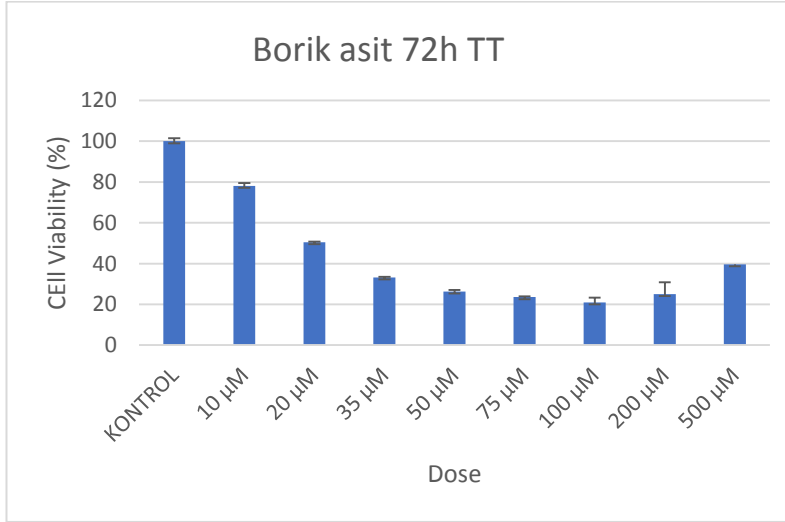
Borik asit uygulanan TT ve HTF hücrelerinde sitotoksik etki ve canlılığı ölçmek için XTT (2,3-bis(2-methoxy-4 nitro-5- sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)) metodu ile Cell Proliferation Assay with XTT Reagent-Cell Proliferation Kit(biotium) kullanılmıştır. Kit içinde tetrazolium mevcut olduğu için canlı hücreler tetrazoliumu turuncu renkli formazana indirgemıştır. Bu sayede borik asitin, TT VE HTF hücre kültürüne etkisi zamana ve doza bağımlı olarak incelenmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki TT hücrelerine, borik asit 10 μ M ile 500 μ M arasında 8 farklı, HTF hücrelerine ise 10 μ M ile 500 μ M arasında 7 farklı doz konsantrasyonunda eklenerek 24, 48 ve 72. saatlerdeki etkinlik araştırılmıştır. Borik asitin TT hücrelerindeki IC₅₀ dozu GraphPad Prism 8.0.1 programı ile belirlenmiş ve 48. Saate 35 μ M olarak elde edilmiştir. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48.saatteki doz oranı IC50 olarak kabul edilmiştir. Normal hücrelerde borik asitin sitotoksik etkilerinin ölçülmesi amacıyla ise HTF hücreleri kullanılmış. Kontrol gruplarına göre değişimler şekil.9,10,11,12,13,14 'de gösterilmiştir.



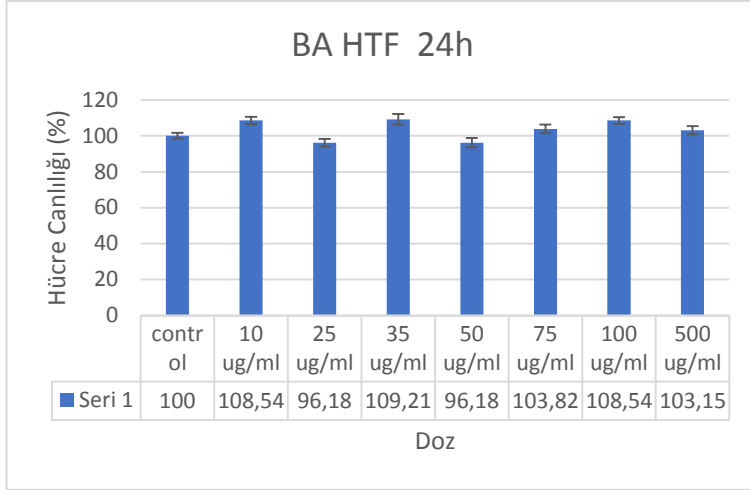
Şekil 9 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 24.saatte hücre canlılığına etkisi



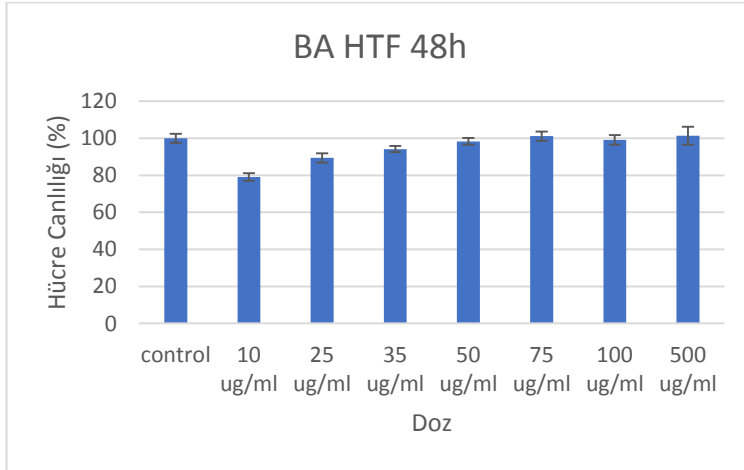
Şekil 10 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 48.saatte hücre canlılığına etkisi



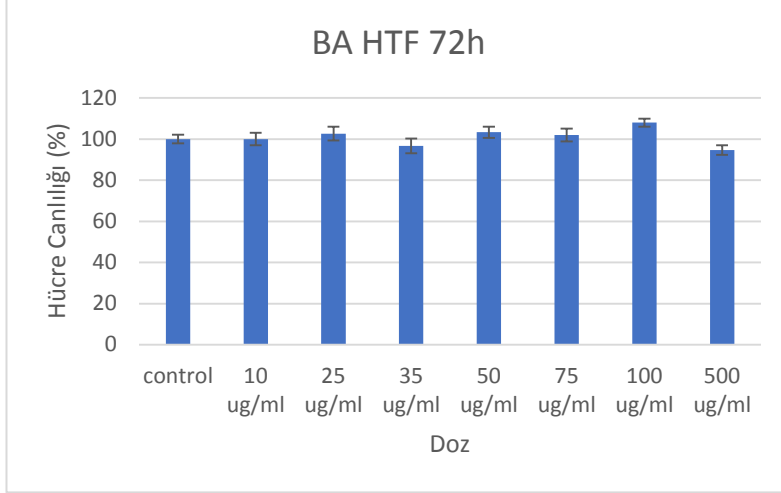
Şekil 11 Borik asitin TT hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 72.saatte hücre canlılığına etkisi



Şekil 12 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 24. saatte hücre canlılığına etkisi



Şekil 13 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 48. saatte hücre canlılığına etkisi



Şekil 14 Borik asitin HTF hücreleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlarda 72. saatte hücre canlılığına etkisi

4.2 Gerçek-Zamanlı PZR (Real-Time PCR)

Konsantrasyonları 260/280 nm ölçümü ile belirlenen RNA'lardan 2µg olacak şekilde seçilen genlerin, cDNA sentezi sonrası mRNA seviyelerindeki ekspresyon düzeyleri farklılıkları gerçek zamanlı PZR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Borik asit (35 µM) uygulanması ile TT hücrelerinde kontrol grubuna göre apoptoz ve hücre döngüsündeki genlerin ekspresyonlarındaki farklılıklar ve bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. İşlem sonucunda elde edilen ct değerleri kullanılarak kontrol ve doz gruplarındaki gen ifadelerindeki değişimi dökümanite edilmiştir (Tablo 6, Tablo 7)

Tablo 7 Real-Time PCR Sonuçları Hücre Döngüsü Gen Değişimleri

Position	Symbol	Up-Down Regulation (comparing to control group)		
		Group 1-BA		
		Fold Regulation		P değeri
1	Beta Aktin	1		Housekeeping-Normalizasyon
2	Kaspaz-3	2,3613		0,015
3	Kaspaz-8	-1,7323		0,924

Tablo 8 Devam Real-Time PCR Sonuçları Hücre Döngüsü Gen Değişimleri

4	Kaspaz-9	1,3332		0,046
5	Kaspaz-10	-1,5979		0,114
6	Siklin D1	-1,4746		0,042
7	CDK6	-2,0665		0,032
8	Bax	4,2143		0,024
9	p16	-4,122		0,64
11	BCI-2	-2,1713		0,038
12	BCL-XL	-2,1624		0,002
13	PUMA	1,1171		0,642
14	NOXA	3,0652		0,022
15	CDK2	-1,5935		0,246
16	Siklin D2	1,4012		0,06
17	FADD	-1,0251		0,066
18	TRADD	-1,0914		0,424
19	DR4	1,6179		0,0564
20	DR5	1,4175		0,074
21	TNF	-8,931		0,48
22	FAS	-3,1807		0,086
23	Siklin E	-9,7741		0,0498
24	APAF1	7,8504		0,03
25	Retinoblastoma	-2,0502		0,14
26	CDK4	-9,8864		0,002

Tablo 9 Real-Time PCR Sonuçları miRNA Değişimleri

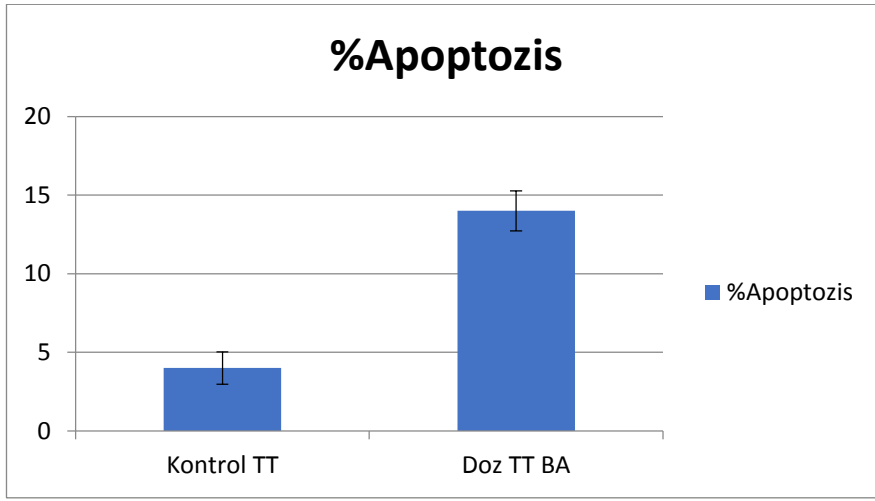
Position	Symbol	Up-Down Regulation (comparing to control group)	
		Group 1-BA	
		Fold Regulation	P değeri
1	U6	1	Housekeeping
2	miR-21	-4,3648	0,026
3	miR-224	-8,9801	0,004
4	miR-375	1,7461	0,562
5	miR-200	-3,06	0,08
6	miR-130a	-6,5987	0,0624

4.3 TUNEL Testi ile Apoptoz Sonuçları

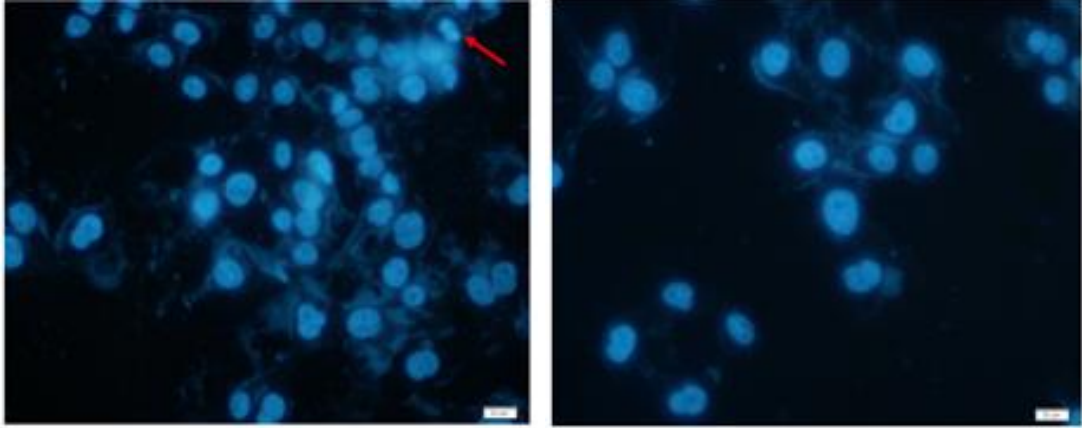
Çalışmada AAT Bioquest Cell Meter TM TUNEL APOPTOSIS ASSAY KIT, POD (Cat. No. 11 684 817 910) kullanılmıştır. TUNEL testi için hücreler 8 odacık içeren lamlara (BD Falcon Culture Slides; 8 Chamber Polystyrene Vessel Tissue culture treated Glass Slide) ekilmiştir. Her bir chamber içine 4×10^3 hücre ,4 adet kontrol odacığı ve 4 adet de borik asit doz grubu hücreler eklenmiş ve etkili bulunan doz ve zaman aralığında (35 μ M ve 48 saat) hücreler inkübe edilmiştir. Hoechst boyası ile boyama yapıldıktan sonra, floresans mikroskobu ile apoptotik hücrelerin sayımı yapılmıştır.

Floresan mikroskobu, organik veya inorganik maddelerin özelliklerini incelemek amacıyla kullanılan, saçılma, yansıma, zayıflama, absorpsiyon gibi özellikleri mevcut optik bir mikroskoptur. Floresan mikroskopu yardımı ile ölü hücreleri tespit edebilmek için, DNA'yı boyayabilen Hoechst boyası ve propidium iyodid gibi boyalara ihtiyaç vardır. Bu boyalar nükleusu boyanır hale getirerek ölü ve canlı hücrelerin ayrımının yapılmasını sağlar. Hoechst boyası, ölü ve canlı hücrelerin tamamını boyar fakat ölü hücrelerin apoptoz veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı nükleus morfolojisine ve membran bütünlüğüne bakılarak yapılır. Apoptozis

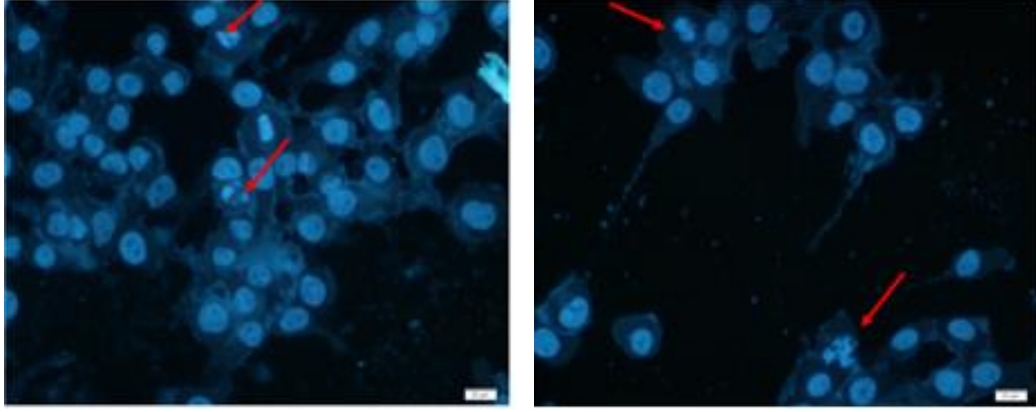
yolu ile ölen hücrelerde, hücrenin kendi organelleri ve nükleusundan oluşan apoptotik cisimler bulunur. Çalışmamızda, mikroskop altında kontrol ve doz gruplarının herbiri için 5 farklı alan değerlendirilmiş ve canlı hücreler apoptotik hücelere oranlanarak yüzde apoptoz bulunmuştur. Apoptotik hücre oranı kontrol grubunda %4, borik asit uygulanan grupta %14 olarak tespit edilmiştir (Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17). Bu sonuç, borik asit uygulaması ile hücrelerdeki apoptoz oranının arttığını ve borik asitin kanser hücrelerindeki apoptotik ölüm mekanizmasını aktive ederek etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 15 Kontrol ve doz gruplarında ortalama apoptotik hücre yüzdeleri



Şekil 16 Kontrol grubu hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst Boyaması sonrası floresan mikroskobu görüntüleri



Şekil 17 Doz grubu hücrelerin TUNEL Testi ile Hoechst Boyaması sonrası floresan mikroskobu görüntüleri

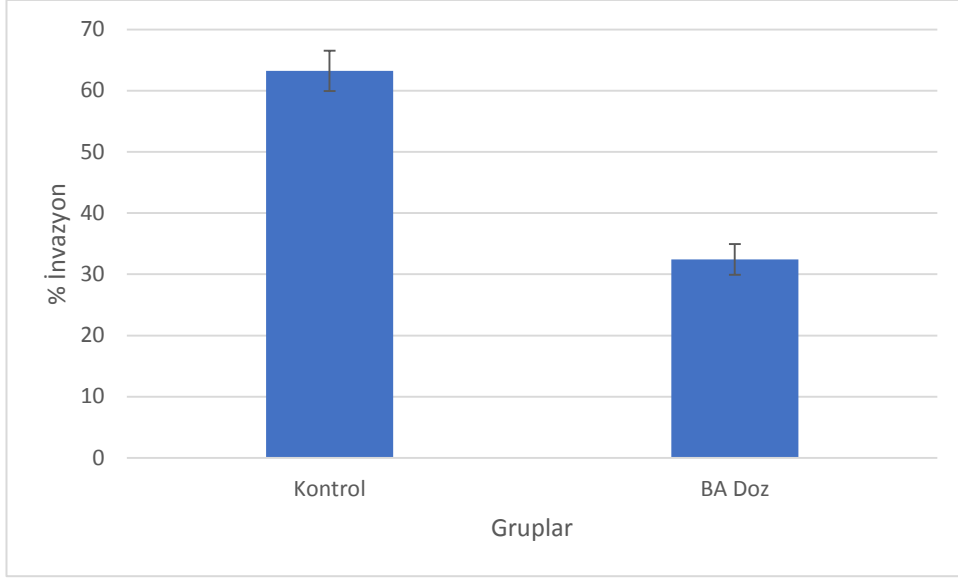
4.4 Matrigel- İnvazyon Testi Sonuçları

Borik asitin TT hücrelerinde invazyon üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla matrigel-invazyon testi kullanılmıştır. TT hücrelerinin invazyon kapasitesi “trans-well matrigel invasion chamber”- invazyon kapları (BD Biosciences, USA) kullanılarak 24-kuyucuklu kültür plakları kullanılarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu hücreler ve 35 µM borik asit uygulanan doz grubu hücreler, matrigel invazyon odacıklarına serum içermeyen besiyeri içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre/ml ve invazyon odacığının dışına ise %10 serum (FBS) içeren besiyeri konulmuştur. Hücreler 37°C’de CO₂’li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Seruma kemoatraksiyonu mevcut invaziv karakterli hücreler, 8mm çaplı porlardan geçerek matrigel matriks ortamına geçmişlerdir. Yüzde invazyonu saptayabilmek için BD Bioscience firmasından temin edilen kontrol odacıkları kullanılmıştır. Aynı ortam koşullarında $2,5 \times 10^5$ hücre/ml kontrol odacıklarına yerleştirilmiştir. Matrigel matrikste bulunan invaziv hücreler metanol ile fikse edilip kristal viyole ile boyandıktan sonra mikroskop altında 40X büyütmede sayılmışlardır. Aşağıdaki formül % invazyonu saptamak amaçlı kullanılmıştır;

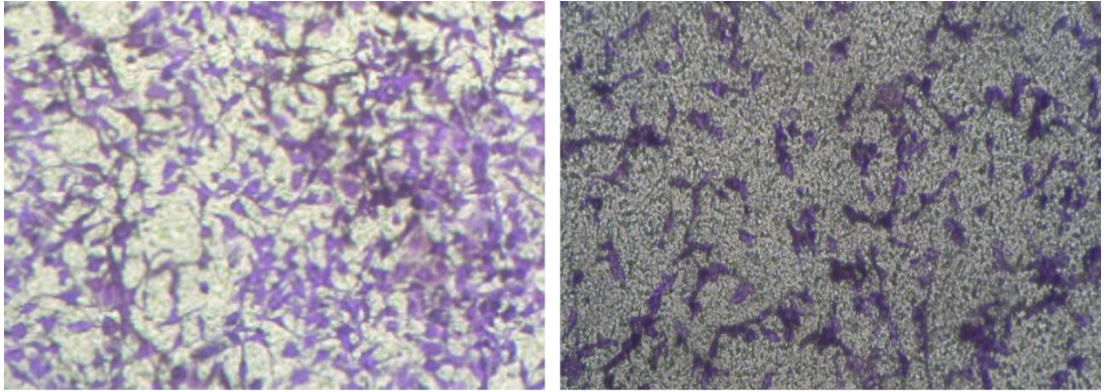
$\% \text{ İnvazyon} = \frac{\text{matrijel matriks bazal membrandaki hücre sayısı}}{\text{Kontrol membrandaki hücre sayısı}} \times 100$

Elde edilen verilerle % invazyon hesaplaması doz ve kontrol grupları için hesaplanmıştır. Formül sonuçlarına göre kontrol hücrelerinin invazyon kapasiteleri %63,22±3,5 iken borik asit uygulanan doz grubunda invazyon yüzdesi %32,44±2,5

olarak saptanmıştır (Şekil 18). Matrigel-invazyon deneyi sonucunda, borik asit uygulanmış doz grubu TT kanser hücrelerinin invazyon durumlarının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir. İnvazyon chamberlardan elde edilen görüntüler Şekil.19'da belirtilmiştir.



Şekil 18 Borik asit uygulanan TT hücrelerinde kontrole göre % İnvazyon Oranı



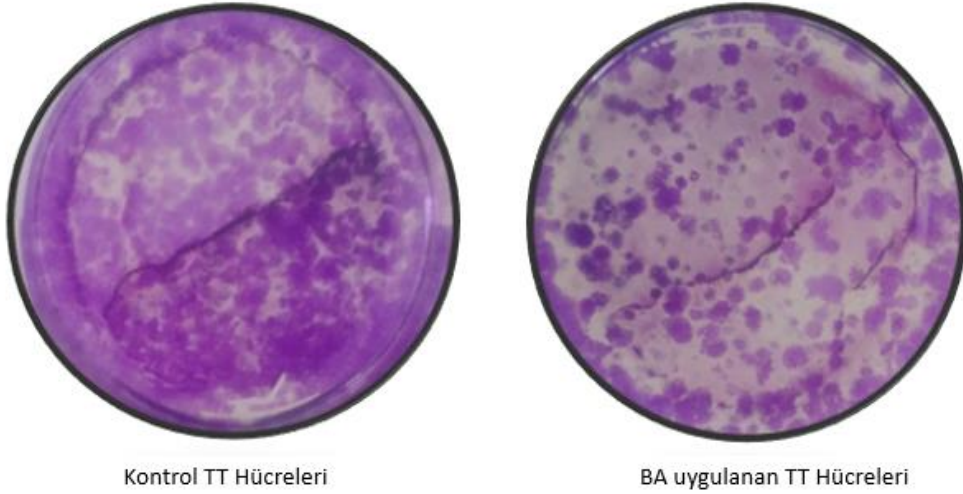
TT Kontrol Grubu

TT Borik Asit Doz Grubu

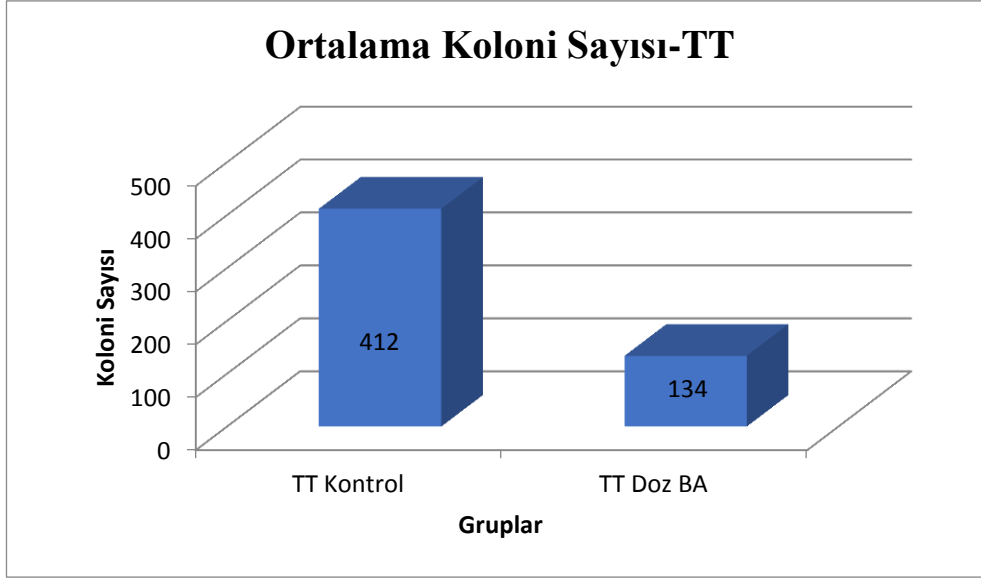
Şekil 19 Kontrol ve borik asit uygulanan hücrelerdeki invaze olan hücrelerin krsital viole ile boyanmış görüntüleri (Büyütme: 40x)

4.5 Koloni Oluşum Sonuçları

Borik asitin TT hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla, kontrol ve doz grupları (35 µM) için 10^3 hücre ekimi yapılmış ve 37 C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler metanolle fikse edildikten sonra, sayım işlemi için kristal viole ile boyanmışlardır. Borik asitin koloni formasyonuna etkisini anlamak amacıyla 0,1 cm'den büyük koloniler değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması 412 iken, borik asit (35 µM) uygulanmış doz grubu hücrelerde koloni sayısı 134 olarak saptanmıştır. Şekil 20'de hücrelerin koloni görüntülerine bakıldığında, kontrol grubu koloni sayısı ile borik asit uygulanan doz grubu arasındaki koloni sayısının belirgin şekilde farklı olduğu ve borik asit sonrası TT hücre hattı koloni sayısında belirgin bir azalma olduğu göze çarpmaktadır. Sayım işlemi sonrası da bu belirgin azalma grafiksel olarak ifade edilmiş olup, borik asit maruziyeti ile TT hücrelerinde koloni sayısının %67,9 oranında baskılandığı saptanmıştır. (Şekil.21)



Şekil 20 TT hücreleri Kontrol ve Doz grubu koloni görüntüsü



Şekil 21 Kontrol ve doz gruplarındaki ortalama koloni sayıları

4.6 TAS ve TOS Sonuçları

Real Assay Diagnostics Total Oxidant Status kit ve Rel Assay Diagnostics Total Antioxidant Status kit yardımıyla borik asit muamelesi ile TT hücrelerinden total oksidan ve total antioksidan seviyelerine etkisi ve sonucundan ortaya çıkan oksidatif stres indeksi hesaplanmıştır. Borik asit uygulandığında kontrole göre çok küçük bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu için 17,7 $\mu\text{mol/L}$, borik asit uygulanan grupta ise 17,2 $\mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilmiştir (Tablo 8). Antioksidan kapasiteleri ile ilgili tespit edilen sonuçlara baktığımızda kontrol grubunun 0,21 mmol/L, doz grubunda 0,27 mmol/L olarak tespit edilmiştir (Tablo 9). $OSI=TOS/TAS*1/10$ formülü kullanılarak oksidatif stress indeksi kontrol grubunda 8,05 borik asit uygulanan doz grubunda 6,25 olarak tespit edilmiştir (Tablo 10). Borik asit uygulanan grupta oksidatif stresin azaldığı bulunmuştur.

Tablo 10 TOS (Total Oksidan) Sonuçları

Gruplar	2.Abs	2.Abs-2	1.Abs	1.Abs-2	2. Abs ort	1.Abs ort	Δ Abs	TOS
standart	0,132	0,136	0,04	0,036	0,134	0,038	0,096	
H2O	0,129	0,136	0,037	0,035	0,1325	0,036	0,0965	10,05208
TT control	0,96	1,013	0,837	0,796	0,9865	0,8165	0,17	17,70833
TT Borik asit	0,982	0,989	0,852	0,788	0,9855	0,82	0,1655	17,23958

Tablo 11 TAS (Total Antioksidan) Sonuçları

Gruplar	2.Abs	2.Abs-2	1.Abs	1.Abs-2	2.Abs ort	1.Abs ort	Δ Abs	TAS
standart	0,044	0,072	0,041	0,043	0,058	0,042	0,016	
H2O	0,102	0,101	0,041	0,039	0,1015	0,04	0,0615	
TT control	0,101	0,102	0,054	0,046	0,1015	0,05	0,0515	0,21978
TT Borik asit	0,107	0,089	0,05	0,048	0,098	0,049	0,049	0,274725

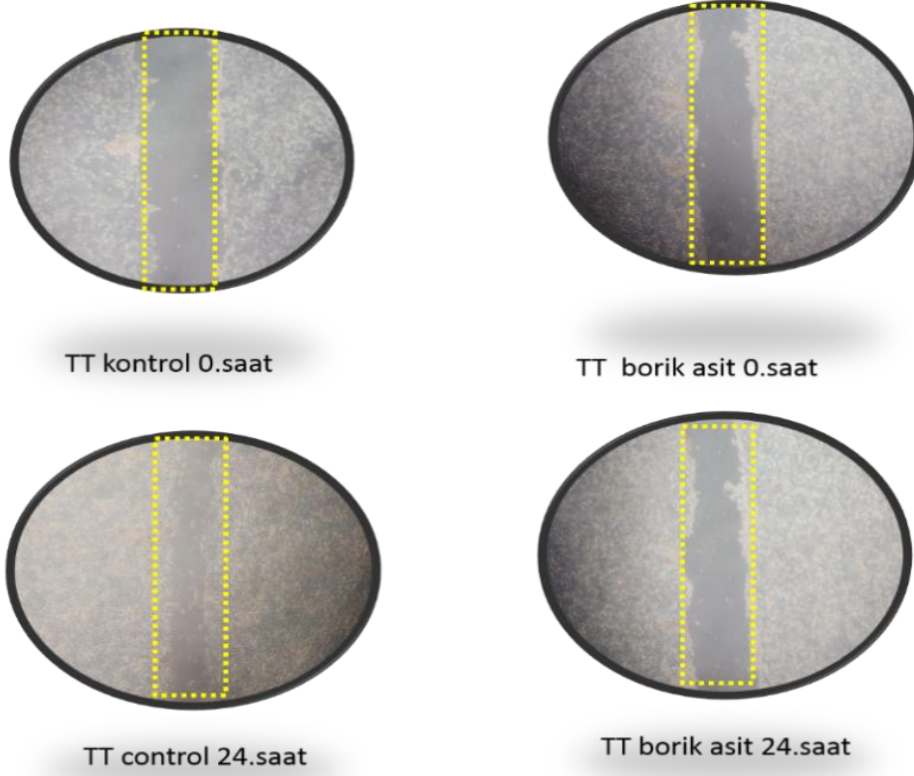
OSI=TOS/TAS*1/10

Tablo 12 OSI (Oksidatif Stres İndeksi) Sonuçlar

	TOS	TAS	OSİ
TT control	17,70833	0,21978	8,05729167
TT Borik asit	17,23958	0,274725	6,27520833

4.7 Wound Healing (Yara İyileşme) Testi

Borik asitin migrasyon üzerine etkisini belirlemek için ilgili hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve %90 confluent duruma geldiğinde hücrelerin bulunduğu medyum çekilip PBS ile yıkanmıştır. 200 µL steril pipet ucu kullanılarak petri düz bir şekilde çizilmiştir. Çizilme işleminden sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkanarak hücre artıkları giderilmiştir. Kontrol ve doz grubundaki hücreler 0. ve 24. saatlerde fotoğraflanmıştır (Şekil 22). Deney sonucunda borik asitin hücre göçünü kontrol grubuna oranla daha fazla inhibe ettiği gösterilmiştir.



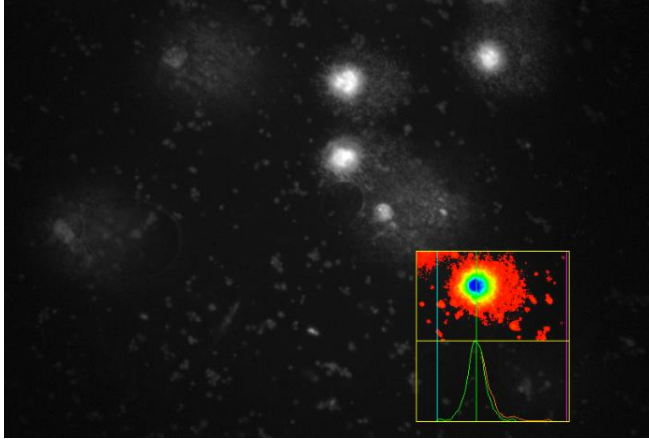
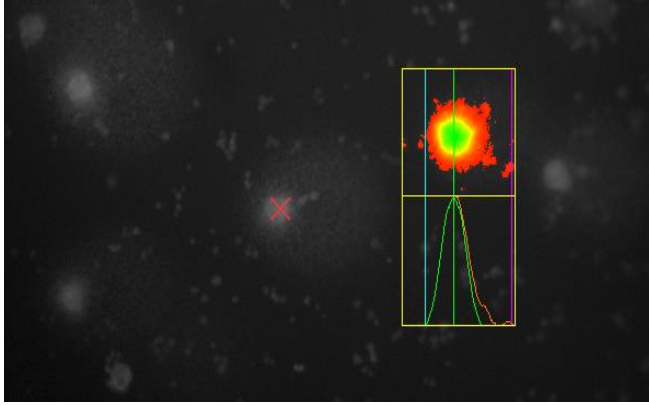
Şekil 22 Kontrol ve borik asit eklenmiş doz grubunda wound healing petri görüntüleri

4.8 Comet Assay- Genotoksisite Testi

Comet assay testi, tek hücreli jel elektroforez tahlili ve kuyruklu yıldız tahlili olarak da bilinen, ökaryotik hücre seviyesinde DNA hasarının tespiti için kullanılan hassas bir tekniktir. Lizis ile hücrelerdeki DNA serbest bırakıldıktan sonra, alkali ortamda DNA'nın süperkoil yapısı bozulur ve anod ve katod uçları bulunan jel elektroforezde hasarlı DNA zincileri anoda doğru göçer ve florasan mikroskopunda bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşur. Baş ve kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti gibi değerler ölçülerek DNA 'da meydana gelen hasar değerlendirilir. Bizim çalışmamızda ortaya çıkan değerler Tablo 11 'de listelenmiştir. Şekil 23'de ise sağlam ve hasarlı DNA'ların oluşturduğu kuyruklu yıldız görünümü mevcuttur.

Tablo 13 Comet Assay- Genotoksisite Testi Sonuçları

	Kontrol grubu	Doz grubu
Baş Uzunluğu	48.72 μm	44.31 μm
Kuyruk Uzunluğu	38.15 μm	44.68
Baş Yoğunluğu	%84.03	%66.92
Kuyruk Yoğunluğu	%15.96	%33.07
Kuyruk Momenti	3.19	7.4



Şekil 23 Örneklere ait komet görüntüleri

5.TARTIŞMA

Hücrelerin, çeşitli sebeplerle hücre çoğalması kontrol mekanizmalarından kurtulup, kontrolsüz bir şekilde çoğalarak bulunduğu doku ve organın ve çeşitli süreçlerle göç ettiği diğer doku ve organların düzenli bir biçimde çalışmasını bozarak, hücrenin ve dolayısıyla vücudun homeostazisini etkileyen, genetik ve moleküler düzeyde bilinen ve bilinmeyen birçok mekanizması mevcut hastalık, kanser olarak isimlendirilmektedir. Kanser, dünyada etkilediği insan popülasyonları, önlenabilir sebepleri, tarama, tanı ve tedavi amaçlı harcanan bütçeler ve ölüm sebepleri arasında giderek artan oranıyla başlı başına ciddi bir halk sağlığı sorunudur. Karsinogenezin genetik, moleküler vb. mekanizmaları ve kanserin tanı ve tedavisi ile ilgili yapılan birçok çalışma, bu hastalığı daha iyi anlamamıza, olası etiyolojik önlenabilir faktörlerden korunmamıza, hastalığa daha kolay ve erken tanı koymamıza ve daha etkin ve yan etki profili daha düşük tedaviler üretmemize yardımcı olmaktadır. Hücre döngüsü regülasyonu, DNA hasarının tespitinde ve tamirinde görevli kontrol noktası proteinlerinin etki mekanizmaları, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin çalışma prensipleri ve bu genlerin mutasyonları sonucu gelişen problemler, daha da ayrıntılı incelenmeli ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Kanser ilgili yapılan çalışmalar umut vaatmesine, her geçen gün yeni tanı, takip ve tedavi yöntemleri bulunmasına rağmen, kansere bağlı ölümler halen ilk sıralarda yer almaktadır. Bu sebeple, yeni kimyasal, biyolojik, farmakolojik ve hedefe yönelik farklı ajanlarla ilgili çalışmaların artarak devam etmesi gerekmektedir.

Günümüzde kanser tedavisi ile ilgili standart kemoterapötikler haricinde anti kanser özellikleri araştırılan yeni ajanlar mevcuttur. Bunlardan bir tanesi de Bor elementi ve Bor kökenli bileşiklerdir. Bor elementi doğada çeşitli bileşikler halinde bulunabilir. Ancak insan vücut dokuları ve sıvılarında borik asit (B(OH)₃) olarak bulunur. Yapılan çalışmalar bu bileşenin, kardiyoprotektif, anti-osteoporotik, anti-inflamatuar, hipolipidemik, anti-koagülan, anti-neoplastik ve sss 'nin fonksiyonlarını artıran etkilerinin olduğunu tespit etmiştir. Barranco ve Echert'in DU-145 prostat kanseri hücreleri üzerinde borik asidin anti-kanser etkilerini incelediği *in-vitro* çalışmada, borik asite maruz kalan tüm kanser hücre hatlarında doza bağlı, antiproliferatif bir etki saptanmıştır (30). Yine Barranco ve Eckert'in 2006 yılında yaptığı borik asit ile muamele edilmiş DU-145 prostat kanseri hücrelerindeki hücresel değişikliklerin incelendiği bir diğer çalışmada ise, hücre döngüsünün

ilerlemesinden sorumlu beş ana siklin proteininin ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir. (Siklin A, B1, C, D1, E) (158). Yan Cui ve arkadaşlarının bor alımı ve prostat kanseri riski arasındaki ilişkiyi inceleyen epidemiyolojik çalışmasında ise, günlük diyetle bor alımının prostat kanseri riskini azalttığı saptanmıştır (29).

Biz bu çalışmamızda, borik asitin medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki, migrasyona, invazyona, hücre çoğalmasına ve hücre döngüsüne olan etkilerini, *in vitro* olarak inceleyerek, borik asitin olası anti-kanser özelliklerini tespit etmeyi amaçladık. Bu doğrultuda apoptozis ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerin ve yine medullar tiroid kanseri hücrelerinde artmış ve azalmış ekspresyonları bulunan miRNA'ların ekspresyonlarının değişimini gözlemlemek amacıyla Real Time PCR yöntemini, borik asitin hücre canlılığı üzerine etkilerini anlamak için XTT assay hücre canlılığı testini, apoptozis tayini için TUNEL testini, koloni oluşumunu test etmek için Koloni formasyon testini, invazyonu değerlendirmek için matrigel invazyon testini, oksidan ve anti-oksidan etkileri belirlemek için TAS-TOS deneylerini, DNA hasarını belirlemek için Comet genotoksisite testini ve migrasyon tespiti için ise Wound healing yöntemini kullandık. Literatürde, borik asitin direk olarak medullar tiroid kanseri hücreleri üzerine olan etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmadığı için bulguların kıyaslanabileceği literatür bilgisi bulunmamaktadır, ancak borik asidin diğer kanser hücre hatları üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda benzer deneyler karşılıklı kıyaslama amaçlı değerlendirilmiştir.

Borik asitin çeşitli dozlardaki ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki sitotoksik etkileri araştırılmış ve TT hücrelerinin %50 sinde ölüme yol açan miktar yani IC50 (LD50) dozu 48. Saatte 35 µM olarak tespit edilmiştir. 24 saatlik hücre canlılığı testi sonuçlarında, hücre proliferasyonunun %50'lerin altına düşmemesi sebebiyle, 48.saatteki doz oranı IC50 olarak kabul edilmiştir. XTT hücre canlılığı testi harici devam eden çalışmalar, kontrol gurubu ve tespit edilen IC50 dozunun uygunlandığı doz grubu arasındaki değişimler esas alınarak yapılmıştır. XTT testi ile letal doz saptandıktan sonra borik asitin normal hücreler üzerine sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla belirlenen dozlarda borik asit HTF (human thyroid fibroblast) hücrelerine uygunlanmıştır ve XTT testi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak borik asitin HTF hücrelerinde sitotoksisiteyi belirgin derecede arttırmadığı tespit edilmiştir. Kontrol ve doz grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Real-Time PCR testinde, apoptozis ve hücre döngüsü ile ilgili genlerin, mRNA düzeyindeki ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir. Bu genlerden, apoptozis ilgili olan panelden istatistiksel olarak anlamlı değişim saptananlar; Kaspaz -3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, Bcl-xl, NOXA ve APAF-1 'dir. Hücre döngüsü ile ilişkili genlerden istatistiksel olarak anlamlı değişim saptanmış olanlar ise; Siklin D1, CDK4(Siklin bağımlı kinaz 4), CDK6 (Siklin bağımlı kinaz 6) ve Siklin E genleridir. Yine PCR yöntemiyle elde edilen miRNA ekspresyonlarından anlamlı değişiklik saptananlar miRNA -21, miRNA-224'tür.

Medullar tiroid kanseri dahil diğer kanser türlerinde de hem in vivo hem de in vitro apoptozis ile ilgili genlerdeki değişimleri inceleyen birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları borik asit ve medullar tiroid kanseri hücrelerini içermektedir. Ancak her ikisinin de bulunduğu ve apoptotik genlerin incelendiği başka bir çalışma bulunmamaktadır.

Kaspaz-3 proteini, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ile etkileşime giren bir kaspaz proteindir ve sistein aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesinin bir üyesidir (159). Kaspaz-3 apoptotik hücrede hem ekstrinsik (ölüm ligand) hem de intrinsik (mitokondriyal) yollarla aktive olur ve hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptozisde kilit rol oynar. Kaspaz-3'ün aktive olması sonrası hücre apoptozise gider.

Kaspaz-9 birçok dokuda bulunan apoptotik yol için kritik olan bir başlatıcı kaspazdır. Kaspaz-9, kaspaz -3,6 ve 7'yi aktive ederek apoptozis kaskadını devam ettirir. Kaspaz-9, mitokondriyal veya intrinsik yolağın başlatıcısı kaspazıdır (160-161).

Bcl-xl, bcl-2 ve bax, bcl2 gen ailesinin üyeleridir. Bcl-xl ve bcl-2, kaspaz aktivasyonuna ve nihayetinde programlanmış hücre ölümüne yol açan sitokrom c gibi mitokondriyal içeriklerin salınmasını önleyerek, anti-apoptotik protein görevi görürken, Bax, mitokondriden sitokrom-c ve pro-apoptotik faktörlerin salınımını sağlayarak apoptozisde etkin bir rol oynar (162).

NOXA, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir. Noxa'nın ekspresyonu, tümör baskılayıcı p53 tarafından düzenlenir ve Noxa'nın, p53 aracılı apoptozda yer aldığı gösterilmiştir (163), Yarmand ve arkadaşları tarafından yapılan RET proto-onkogeni ile ilgili çalışmada, RET proto-onkogeninin ATF4(aktive transkripsiyon faktör 4) üzerinden pro-apopitotik genler olan NOXA ve PUMA ekspresyonunu negatif olarak düzenlediği saptanmıştır (164).

Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) apoptozisin intrinsik veya mitokondriyal yolundaki ölüm sinyalinin iletiminde görevlidir. Sitokrom c'nin mitokondrinin intermembran boşluğundan salınması ve APAF-1 moleküllerine bağlanması üzerine, heptamerik bir apoptozom kompleksi oluşur ve bu kompleks kaspaz 9 'u uyararak apoptozis ile sonuçlanacak olan kaspaz kaskadının başlamasını sağlar (165).

Barranco ve Eckhert'in 2004 yılında yaptığı DU-145 prostat kanseri hücreleri üzerinde, borik asitin anti-kanser etkilerinin incelediği in-vitro çalışmada, apoptotik hücre ölümü sırasında eksprese edilen Kaspaz-3 'ün borik asit ilavesi sonrası aktivesinin ve ekspresyonunun indüklendiği gösterilmiştir (158) Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak çalışmamızda borik asit grubunda kontrol grubuna göre kaspaz 3 ekspresyonunda 2,3 kat artış saptanmıştır. Bu değer istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur ($p < 0,015$). Daha önce borik asitin, herhangi bir hücre kültüründe Kaspaz-9 üzerine etkisi araştırılmamıştır. Ancak çeşitli ajanlar, medüller tiroid kanseri hücrelerinde apoptozis üzerine etkileri açısından değerlendirilmiştir. Valproik asitin medullar tiroid kanseri hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği Greenblatt ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, valproik asit uygulanmış kanser hücrelerinde aktif kaspaz-9 ve kaspaz-3 'ün arttığı saptanmıştır (166). Li ve ark. tarafından *Cautleya gracilis* isimli bitkinin insan medullar tiroid kanseri hücreleri üzerine etkilerini araştıran başka bir çalışmada, kaspaz-9 un arttığı ve apoptozisin indüklendiği tespit edilmiştir (167). Ning ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada suberoyl bis-hidroksamik asitin medullar tiroid kanseri hücrelerinde apoptozis üzerine etkileri incelenmiş olup, anti-apoptotik protein bcl-xl'in downregüle olduğu, apoptotik protein kaspaz-3 'ün ise upregüle olduğu saptanmıştır, suberoyl bis-hidroksamik asit'in medullar tiroid kanseri hayvan modellerinde, apoptozis üzerine etkilerini inceleyen aynı çalışmada, bcl-2 ve bcl-x'in azaldığı ve bax proteininin arttığı tespit edilmiştir (168). Hinze ve arkadaşlarının medullar tiroid kanserindeki apoptozis genlerini inceleyen çalışmalarında, MEN ile ilişkili MTC 'lerde, bcl-2 'nin güçlü bir şekilde eksprese edildiği, bcl-x'in orta düzeyde eksprese edildiği ve bax geninin zayıf bir şekilde eksprese edildiği saptanmıştır (169).

Bizim çalışmamızda, belirlenen lethal dozda borik asit uygulanan doz grubu ve kontrol grubu TT hücreleri incelendiğinde, apoptozis açısından anlamlı değişimler saptanan proteinler ve genler Kaspaz-3 ($p = 0,015$), Kaspaz-9 ($p=0,046$), Bax ($p=0,024$), Bcl-2 ($P=0,038$), Bcl-xl($p=0,002$), NOXA($p=0,022$) ve APAF-1($p=0,03$)

olmuştur. Literatürle de uyumlu olarak Kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, NOXA ve APAF-1 gibi apoptozisi indükleyen genlerin borik asit uygulanan TT hücrelerinde ekspresyonlarının arttığı, Bcl-2 ve Bcl-x gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar ve benzer konularda yapılan diğer çalışmalar değerlendirildiğinde, borik asitin TT hücrelerinde apoptozisi, apoptotik genlerin ekspresyonlarını artırarak ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını azaltarak, indüklediği söylenebilir. Çalışmamızda ayrıca, apoptozis ile ilgili verilerin kontrol edilmesi amaçlı TUNEL testi kullanılmıştır. Elde edilen veriler ışığında, doz grubu ve kontrol grubu arasında apoptotik hücre yüzdesi karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda apoptotik hücre oranı %4 olarak tespit edilmiş olup IC50 (35 µM) dozda borik asit ilave edilen doz grubunda ise, apoptotik hücre oranı %14 olarak tespit edilmiştir. Gen düzeyinde borik asitin TT hücrelerinde apoptozisi indüklediği savının, TUNEL testi ile birlikte morfolojik olarak da sağlanması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, borik asitin TT hücrelerinde apoptozisi indüklediğini göstermektedir. Literatürde, medüller tiroid kanseri üzerine borik asitin apoptotik etkilerini çalan başka bir çalışma bulunamamıştır.

Hücre döngüsü, hücrenin dinlenme evresi, bölünmeye hazırlık evresi ve bölünme evresi olarak üç bölümde değerlendirilebilir. G0 evresi hücrenin dinlenme evresi olup, bölünme uyarısı ile başlayan G1, S, G2, M evreleri hücrenin bölünmeye hazırlık ve bölünme evreleridir. Hücre bölünmesi sayesinde bir hücredeki genler diğerine aktarılmış olur. Bu nedenle, böylesine önemli bir olay birçok kontrol mekanizması tarafından denetlenir. Daha önce bahsedildiği gibi siklin bağımlı kinaz (CDK)'lar ve siklinler hücre kontrol noktaları için temel bileşenlerdir. CDK'lar aktif kinazlara dönüşebilmek için siklinler ile kompleks oluşturmak zorundadırlar. Hayvan hücreleri, CDK1, 2, 3 ve 4 ile doğrudan hücre döngüsü düzenlemesine katılan en az dokuz CDK içerir. Siklin-CDK kompleksi, hücre döngüsünün belirli fazlarında, uygun substratları fosforile ederek hücre döngüsünde kilit rol oynar. G0 fazında Siklin C 'nin CDK3 ile, G1 fazında Siklin D ve E 'nin CDK4 ve 6 ile, S fazında Siklin A ve E 'nin CDK2 ile, G2 fazında Siklin A 'nın CDK1 ve 2 ile ve M fazında Siklin B 'nin CDK1 ile birlikte belirtilen fazlarda hücre kontrolünde rol oynadığı bilinmektedir (170).

Siklin D1 kromozom 11q13 bölgesinde lokalizedir ve CDK4 VE CDK6 ile ilişkilidir. Hücre fazının G1-S fazında düzenleyici rol oynamaktadır. Siklin D1 ve ilişkili kinazlar, CDK4 ve CDK6 ile birlikte, Rb ve Rb aile üyelerinin fosforilasyonunu başlatarak, onların E2F transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girme kapasitelerini

inaktive ederler. Bu fosforilasyon, E2F ailesinin birikmesine neden olur ve DNA replikasyonu için gerekli olan çok sayıda genin transkripsiyonunu ve ayrıca hücre döngüsü ilerlemesini aktive eder. G1 fazında görevli ikinci bir olan siklin E ve CDK2 de E2F tarafından kodlanır. E2F'nin siklin E / CDK2 kompleks aktivitesi ile aktifleştirilmesi, Rb'nin daha fazla fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna yol açar, böylece E2F aktivitesini daha da artırır ve siklin E / CDK2 birikimini artırır (171-172).

Sporny ve arkadaşlarının primer tiroid kanserlerinde Siklin-D1 ekspresyonunu araştırdığı, cerrahi sonrası tümör dokuları kullanılan ve 4'ü medüller tiroid kanseri olmak üzere 35 tiroid kanseri vakasının kullandığı çalışmada, medullar tiroid kanseri hücrelerinde Siklin D1 pozitif hücre oranı %27,4 bulunmuş ve Siklin D1 pozitifliğinin kanserin agresifliği ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (173). Drosten ve arkadaşları ve Watanebe ve arkadaşları tarafından yapılan RET onkogeninin, medullar tiroid kanseri 'nin karsinogenezi üzerine olan rolünü inceleyen benzer çalışmalarda, onkojenik RET ifade eden hücrelerde siklin D1'in mRNA düzeyinde yüksek eksprese olduğu saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmalarda onkojenik RET içeren hücrelerde artmış bcl-2 ekspresyonu saptanmıştır (174-175). Basolo ve arkadaşlarının tiroid karsinomlarında Siklin D1 'in aşırı ekspresyonunu araştırdıkları 54 tiroid kanseri örneğinin bulunduğu bir çalışmada, 8 medullar tiroid karsinomu örneğinin 2'sinde Siklin D1 düzeylerinin arttığı saptanmıştır. Normal tiroid dokusunda ise Siklin D1 artışı saptanmamıştır. Bu sebeple çalışma sonucunda, SiklinD1'in tiroid karsinomları için diagnostik ve prognostik bir marker olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (176).

Siklinler ve siklin bağımlı kinazlarla ilgili medüller tiroid kanseri dışında diğer kanserler ile ilgili de birçok çalışma mevcuttur. Wang ve ark. transgenik farelerde siklin D1'nin aşırı ekspresyonunun, meme kanseriyle sonuçlandığını saptamışlardır (177). Primer insan meme kanserlerinin en az%15'inde ve baş, boyun, özofagus ve akciğerin küçük hücreli dışı kanserlerinde siklin D1'in aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. (178-190).

Siklin D1 ile birlikte yine G1-S fazında görevli Siklin E ile ilgili Schraml ve arkadaşları tarafından yapılan ve 48 farklı tümör tipinde Siklin E'nin amplifikasyonunu ve aşırı ekspresyonunu araştıran bir çalışmada, birçok farklı tümör tipi incelenmiş ve Siklin E ekspresyonu yüksek olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada, 13 medüller tiroid kanseri örneği incelenmiş bunların %69,2 sinde Siklin E

aşırı ekspresyonu saptanmamış olup %30,2 sinde zayıf protein ekspresyonu saptanmıştır. Gen amplifikasyonu bakılan 10 tümörden ise hiçbirinde Siklin E geni amplifikasyona edilememiştir (191)

Tagliati ve arkadaşları tarafından Somatostatin ve subtiplerinin Siklin D1/CDK 4 aracılı medüller tiroid kanserinin proliferasyonu üzerine yaptığı çalışmada, somatostatin uygulanan TT kanser hücre kültüründe Siklin D1 ve CDK 4 miktarlarının azaldığı ve hücrelerin G2-M kontrol noktasında areste uğradığı tespit edilmiştir (192). Kunnimalaiyaan ve arkadaşları tarafından PI3K(fosfotidil inozitol 3) inhibitörü LY294002 'in medüller tiroid kanseri hücrelerinde apoptozisi indüklediğini gösteren bir çalışmada da Siklin D1 seviyelerinde düşüş saptanmıştır (122). Y.J. Chung ve arkadaşları tarafından dekzametazonun medüller tiroid kanseri hücre hattı üzerindeki anti proliferatif etkilerini araştıran bir çalışmada, dekzametazon uygulaması sonrası kanser hücrelerindeki Siklin D1, CDK2 ve CDK4'ün ekspresyonlarının azaldığı tespit edilmiştir (193). J Klubo-Gwiedzinska ve arkadaşları tarafından metforminin medüller tiroid kanseri hücreleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada Siklin D1 azalmasının hücre büyümesinin inhibisyonu ile ilgili olduğu ancak apoptozisin indüklenmesi ile ilgili herhangi bağlantısı saptanamamıştır (194).

Borik asit ve MTC'nin birlikte kullanıldığı ve hücre kontrol noktası genlerinin ekspresyonlarının araştırıldığı herhangi bir çalışma literatürde bulunamamıştır. Ancak borik asit ile ilgili diğer kanser türlerinin bazılarında hücre döngüsü üzerine çalışmalar mevcuttur. Barranco ve Echert tarafından borik asit ilavesi sonrası DU-145 prostat kanseri hücrelerindeki hücresel değişikliklerin incelendiği çalışmada, prostat kanseri agresifliği ile ilişkilendirilmiş Siklin A, B1, E, D1, düzeylerinde azalma olduğu tespit edilmiş. Bunun borik asitin apoptozisi dışı anti-proliferatif etkisi olduğu düşünülmüştür (158).

Bizim çalışmamızda, daha önce belirlenen IC50 dozunda 35 µM borik asit ilave edilen doz grubu ve kontrol grubu hücre kültürleri kıyaslandığında, doz grubunda kontrol grubuna göre, Siklin D1 gen ekspresyonunun 1,4 kat azaldığı (p=0.042), Siklin E gen ekspresyonunun 9,7 kat azaldığı (p=0.049), CDK4 ekspresyonunun 9,8 kat azaldığı (p=0.002), CDK 6 ekspresyonunun ise 2 kat (p=0.032) azaldığı tespit edilmiştir. Daha önce yapılan benzer çalışmalarla uyumlu olarak, siklinler ve CDK'ların hücrelerde proliferatif bir rol üstlendikleri göz önüne alındığında, borik asit maruziyeti sonrası TT medüller tiroid kanseri hücre

kültüründe, siklinlerin (Siklin D1, E) ve CDK4 ve CDK6 'nın baskılanmasının, hücreleri G1-S kontrol noktasında arreste uğratarak hücre proliferasyonunu durdurduğu veya azalttığı ön görülebilir.

Son zamanlarda, mikroRNA'ların (miRNA'ların) MTC'deki gen düzenleme rolleri, kapsamlı bir şekilde çalışılmaktadır. MTC'de potansiyel prognostik, terapötik, prediktif etkileri olan, çoklu miRNA düzensizlikleri keşfedilmiştir. Pennelli ve arkadaşları tarafından yapılan medüller tiroid kanserinde PDCD4(Proglamlanmış hücre ölümü 4) /miR-21 yolağını inceleyen ardışık 64 MTC serisi incelenerek yapılan çalışmada, miR-21'in artmış ifadesinin, MTC gelişimi ile tutarlı bir ilişkisi olduğu saptanmıştır (p=0,0016). p=0,0013). Ayrıca yüksek miR-21 değerleri, yüksek kalsitonin seviyeleri(p=0.0003), lenf nodu metastazı(p=0.001), ileri hastalık(p=0.0003) ve dirençli hastalık(p=0.0076) ile ilişkili bulunmuştur. MiR-21'in aşırı ifadesi ile PDCD4 'nin azalmış ifadesinin birbiri ile ters ilişkili olduğu saptanmış olup daha önce yapılan benzer çalışmalar da göz önüne alındığında, bu çalışmalar bize mi-R 21'in PDCD4'ü hedef alarak onu negatif yönde düzenlediğini göstermektedir (195-196). Micro RNA 21 'in MTC hücrelerinde aşırı ekspresyonu üzerine Y.H.Chu ve arkadaşları tarafından yapılan ve 42 MTC vakası içeren bir diğer çalışmada ise, miR-21, MTC hücrelerinde normal tiroid dokusuna göre belirgin şekilde yüksek saptanmıştır (p<0.001). Aynı çalışmada, MTC hücre kültüründe miR-21 ve MALAT-1 'in uzaklaştırılması sonrası, hücre proliferasyonu (p<0.05) ve invazyonunda (p<0.05) belirgin derecede düşüş saptanmıştır (22). Son çalışmalar, miR-21'in PTEN, PDCD4, RECK ve TPM1 gibi tümör baskılayıcı genleri baskılayarak hücre proliferasyonunu desteklediğini göstermiştir. (109). Mian ve arkadaşları tarafından yapılan familial ve sporadic medüller tiroid kanserlerinde miRNA profillerini inceleyen 34 sMTC (sporadik), 6 hMTC (herediter) ve 2 C hücre hiperlazişinin dahil edildiği çalışmada, miR-21 hastalıklı dokuda, normal tiroid dokusuna göre 4,2 kat artmış bulunmuştur. Ayrıca aynı çalışmada, miR-224'ün de 6,6 kat artmış olduğu saptanmıştır (p<0.0001). PDCD4 ekspresyonu, miR-21 artışı ile tutarlı olarak MTC numunelerinde önemli ölçüde azalmış olarak tespit edilmiştir. MiR-224 artışı ise, lenf nodu metastazı yokluğu ve düşük evre hastalık ile ilişkilendirilmiştir (23). Cavedon ve arkadaşlarının 134 MTC'li (107sporadik,27 familial) hastanın tümör dokularında miR-224 ve RAS onkogeni ekspresyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada, miR-224 'ün azalmış ekspresyonu, yüksek kalsitonin seviyeleri (p=0,03) , ileri evre (p = 0,001) ve kalıcı hastalık (p = 0,001) ve hastalığı bağlı ölüm (p=0,0001) ile yüksek derecede ilişkili saptanmıştır. Genel olarak, düşük miR-224 ekspresyonu, daha kısa bir

sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca miR-224 ekspresyonu ile somatik RAS mutasyonları arasında anlamlı pozitif bir ilişki saptanmıştır (111).

Bizim çalışmamızda, borik asit (35 µM) ile muamele edilmiş TT hücre hattında, kontrol grubuna göre miR-21 4,3 kat (p=0,026) ve miR-224 8,9 kat (p=0,004) azalmış olarak bulundu. Literatürle uyumlu olacak şekilde hücrelere eklenen borik asitin, miR-21'deki azalış ile birlikte, PDCD4 inhibisyonunu azaltarak, apoptozisi indüklenmesi sonucu MTC hücrelerinde proliferasyonu ve invazyonu azaltabileceği düşünülebilir. Bazı çalışmalarda ve bazı kanser türlerinde miR-224 'ün artışı kötü prognozla ilişkilendirilirken özellikle MTC'de iyi prognoz ve düşük evre hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Yu ve arkadaşları hepatoselüler karsinomda sinerjistik olarak tümör progresyonu ile ilişkili miR-224 yükselmesi ve AKT aktivasyonu saptamıştır (197). Huang ve arkadaşları miR-224'ün meme kanserinde, kemik metastazlarının başlamasını ve ilerlemesini teşvik etmede önemli bir rolü olabileceğini öne sürmüştür (198). MiR-224 'ün kötü prognoz ve kanser agresifliği ile ilgili olduğu serviks ve akciğer kanseri ile ilgili çalışmalarda mevcuttur (199-200). MTC ile ilgili çalışmalar miR-224 'ün iyi prognoz ve düşük evre hastalık ile ilişkili olduğunu gösterse de, bizim çalışmamızda, borik asit ilave edilmiş TT hücrelerinde miR-224 ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır. Çalışma süresince yapılan testler sonucunda borik asitin TT hücrelerinde, proliferasyonu azalttığı ve apoptozisi indüklediği düşünülürse, miR-224 'ün azalmış ekspresyonunun iyi prognoz ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. MTC ve miR-224 ilişkisi ilgili daha çok hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, matrigel invazyon testi yapılarak borik asit eklenmiş doz grubu ve kontrol grubunun invazyon kapasiteleride karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu hücrelerinde ortalama invazyon yüzdesi %63,22±3,5 olarak, doz grubu hücrelerinde ise %32,44±2,5 olarak saptanmıştır. İnvazyonun borik asit ilavesi sonrası %30,7 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Barranco ve Eckhert 'in yaptığı, borik asitin DU-145 prostat kanseri üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, matrigel invazyon testi kullanılarak borik asitin invazyon kapasitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. DU-145 hücreleri, 250 µM ve 1000 µM dozlarda 8 gün süreyle, borik asite maruz bırakılmış ve sırası ile, invazyonun %82 ve %97 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada borik asit uygulanan hücre kültüründe, her ne kadar genel aktin konsantrasyonlarında azalma olmasada, 1000 µM borik asit dozunda hücre çevresindeki F-aktinlerin azaldığı tespit edilmiştir (158). Ayrıca wound healing (yara

iyileşmesi) testi ile borik asitin migrasyon üzerine etkileri de çalışmamız kapsamında değerlendirilmiş ve 0. ve 24. saatte doz grubu ve kontrol grubu fotoğraflanmıştır. Deney sonucunda borik asitin hücre göçünü kontrol grubuna oranla inhibe ettiği gösterilmiştir. Çalışmamızda, borik asitin TT hücrelerindeki invazyonu ve migrasyonu baskılamasının etki mekanizması üzerine herhangi bir deney yapılmış olmasa da, aktinlerin, malign hücrelerde invazyon ve migrasyonla ilişkili olduğu saptanan çalışmalar değerlendirildiğinde (201) borik asitin TT hücrelerindeki invazyon ve migrasyon üzerine etkisi, hücrelerin çevrelerindeki F-aktin miktarını azaltarak yaptığı düşünülebilir.

Çalışmamız kapsamında borik asitin koloni formasyonu üzerine etkileri de araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre kontrol grubu hücrelerde koloni ortalaması 412 iken, borik asit (35 µM) uygulanmış doz grubu hücrelerde koloni sayısı 134 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, borik asit maruziyeti sonrası TT hücrelerinde koloni sayısının %67,9 oranında baskılandığı saptanmıştır.

Borik asitin, TT medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki oksidan ve antioksidan etkilerini araştırmak amacıyla, total oksidan ve total anti-oksidan kitler kullanılmıştır. Kontrol grubu için 17,7 µmol/L, borik asit uygulanan grupta ise 17,2 µmol/L olarak tespit edilmiştir. Antioksidan kapasiteleri ile ilgili tespit edilen sonuçlara baktığımızda kontrol grubunun 0,21 mmol/L, doz grubunda 0,27 mmol/L olarak tespit edilmiştir. OSI=TOS/TAS*1/10_formülü kullanılarak oksidatif stress indeksi kontrol grubunda 8,05 borik asit uygulanan doz grubunda 6,25 olarak tespit edilmiştir. Borik asit uygulanan grupta oksidatif stresin azaldığı bulunmuştur. Çalışmamızı destekler nitelikte Kuru ve Çoban'ın, parasetamol ile indüklenmiş hepatotoksisite üzerine borik asitin ratlar üzerindeki anti-oksidan etkilerini inceleyen çalışmasında parasetamolün oksidan / antioksidan dengesine verdiği zararın bor takviyesi ile azaldığı ve borun farklı parametreler üzerindeki etkilerine (NADPH artırarak, yüksek protein karbonil içeriğini ve düşük protein-SH seviyelerini azaltmaya yardımcı olarak) dayanarak antioksidan özellikler gösterdiği kanıtlanmıştır (202).Turkez ve ark, bor bileşiklerinin, düşük dozlarda (15 mg / L) süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerini arttırdığını, yüksek dozlarda (500 mg / L), eritrositlerde kontrole karşı hem süperoksit dismutaz hem de katalaz aktivitelerini azalttığını bildirmiştir (203) Yine yapılan bazı çalışmalar sonucu elde edilen bazı deneysel kanıtlar, bazı bor bileşikleriyle (borik asit, boraks ve kalsiyum fruktoborat gibi) beslenmenin anti-oksidan veya / ve anti-enflamatuar sonuçları olduğunu göstermiştir (204-205). Çalışmamızda, TT hücrelerinde hücre ölümünü artıran borik

asitin aynı hücrelerde oksidatif stresi artırıcı bir etki yapması beklenirken antioksidan etkinliği artırmasının sebebi olarak, borik asitin, çalışmamızda değerlendirilmeye alınmayan süperoksit dimutaz ve katalaz enzimlerini doza bağımlı olarak düzenlemesi gösterilebilir. Borik asitin antioksidan sistemler üzerine etkilerinin daha geniş çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Borik asitin DNA üzerine yaptığı hasarı tespit etmek için comet assay testi kullanılmıştır. Test sonuçlarına göre borik asit uygulanan doz gurubunda kontrol gurubuna göre baş uzunluğu ve yoğunluğunun azaldığı, kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunun arttığı ve kuyruk momentinin arttığı saptanmıştır. Bu sonuç borik asitin TT hücrelerinde DNA hasarını artırarak hücre ölümünü indüklediğini göstermektedir.

Literatür gözden geçirildiğinde, borik asitin anti-neoplastik etkileri üzerine yapılan çalışma sayısı sınırlı sayıdadır. Cui ve arkadaşları, jeolojik kayıtlar üzerinden, yaşam verileri ve sudaki boron miktarı verilerini analiz edilerek, 95 prostat kanseri ve 8,720 sağlıklı kontrolden oluşan grubu retrospektif olarak analiz etmiş ve artmış bor alımı ile düşük prostat kanseri insidansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamışlardır (29). Yazarlar, diyet boru ve prostat kanseri insidansı arasındaki ters ilişkinin, steroid hormonların, antitümör metabolitlerin ve hücre çoğalmasının yeniden düzenlenmesinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Wade ve arkadaşlarının Teksas'ta yaptığı ekolojik bir araştırma, yeraltı sularındaki bor konsantrasyonlarının, prostat kanseri insidansı ve prostat kanserine bağlı ölüm oranlarıyla ters bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (31). Gonzalez ve arkadaşlarının yaptığı ve yaklaşık 37.000 katılımcıyı içeren prospektif çalışmada ise borik asit alımı ve prostat kanseri arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır (206). Serviks kanseri endekslerinin diğer popülasyonlara oranla düşük olduğu Türk kadınları üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, içme suyundaki yüksek bor konsantrasyonlarının serviks kanseri açısından koruyucu etkilerinin olduğu kanıtlanmıştır (34). Altta yatan etki mekanizması olarak, serviks kanseri etiyolojisinde bulunan HPV E7'nin serin proteaz inhibitörleriyle birlikte dönüşüm kapasitesinin azaldığını gösteren çalışmalar değerlendirilmiş ve kendisinde bir serin proteaz inhibitörü olan borik asitin serviks kanseri insidansı azaltmasının arkasında yatan etki mekanizmasında bu inhibisyonun yatıyor olabileceği öne sürülmüştür (150,207). Akciğer kanseri ile ilgili çalışmalarda alttaki mekanizma belirsiz kalmasına rağmen, bor alımı miktarı ile akciğer kanseri insidansı arasında negatif bir ilişki

olduğu görülmüştür (208). Bazı akciğer kanserleri ile 17-beta-estradiol arasında korelasyon olduğu ve 17-beta-estradiol içeren hormon replasman tedavilerinin akciğer kanserinde kullanılabileceği öne sürülmüştür (209). Bazı yapılan çalışmalarda BOR ile diyet desteğinin, 17-beta-estradiol konsantrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (149) Mahabir ve ark'ın, 763 akciğer kanseri ve 838 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı bir başka çalışmada ise diyetle düşük bor alımının hormon replasman tedavisinden bağımsız olarak kadınlarda akciğer kanseri riskini arttırdığı saptanmıştır. Mekanizmalar net olmamakla birlikte, borik asitin östrojen seviyelerini artırarak, östrojenin, sigara dumanında bulunan polisiklik aromatik hidrokarbon gibi östrojen dışı çeşitli substratları bağlama özelliğinden yararlandığı düşünülmektedir (152). Acerbo ve ark. tarafından, borik asitin malign melanom hücrelerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada, borik asitin muhtemel pre-mRNA eklemesinin ikinci aşamasını inhibe ederek proliferasyonu yavaşlattığı ve inhibe ettiği ve apoptozisi arttırdığı tespit edilmiştir (153,210). Borik asit (12.5-50 µM)'in yüksek dozlarda, hücre çoğalmasını yavaşlattığı ve MDA 231 meme kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (154). Kanser hücrelerinin borik asit tarafından inhibe edilmesinin, doğrudan enzimatik inhibisyon, apoptoz, reseptör bağlama ve mRNA ekleme gibi çeşitli hücresel hedefleri içerdiği düşünülebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, 1 µM borik asitin ZR-75-1 (metastatik olmayan meme kanseri hücre hattı) meme kanseri hücre çizgisini inhibe ettiği, ancak MCF-7(metastatik meme kanseri hücre hattı) hücre çizgisini inhibe etmediği gösterilmiştir.MCF-7 hücrelerinde bulunan NA-boron ko transporter proteininin inhibisyonu engellediği düşünülmüştür (211-212).

Bortezomib (PS-341) (213), kanser tedavisinde kullanılan proteazom inhibitörü bir boronik asit türevidir. Bu bileşik hücre döngüsü regülasyonunu bozar ve apoptozu indükler. PS-341'in güçlü sitotoksik etkileri, prostat kanseri hücrelerinde ve MCF-7 ve EMT-6 meme karsinom hücrelerinde de görülmüştür. Ayrıca Bortezomibin, miyelom, mantle hücreli lenfoma, akciğer kanseri, over kanseri, pankreas kanseri, prostat kanseri, meme kanseri ve baş boyun kanserlerini içeren hematolojik ve solid tümör malignitelerinde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (214-216). Ayrıca günlük diyetle bor alımının, hücrelerdeki kalsitriol seviyelerini artırarak, başta meme kanseri olmak üzere kolorektal, akciğer ve prostat kanserlerinde koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir (217).

Sonuç olarak, karsinogenez süreci, hücre döngüsü kontrol noktaları, apoptozisde görevli genlerin ve proteinlerin işleyişleri, enzimatik reaksiyonlar ve bu reaksiyondaki görevli kofaktörler düşünüldüğünde oldukça kompleks bir süreçtir. Kanser gelişim mekanizmalarını içeren bu sürecin her bir noktası, bu mekanizmaları durdurmaya yönelik geliştirilen tedaviler açısından oldukça önemlidir. Çalışmamızda, borik asitin TT medüller tiroid kanseri hücrelerinde, proliferasyonu azalttığı, hücre döngüsünü durdurup apoptozu indüklediği, invazyonu ve koloni oluşumunu azalttığı mekanizmalarıyla birlikte in vitro olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmanın, borik asit ile ilgili daha önce yapılan ve borik asitin çeşitli özellikleri ve özellikle anti-neoplastik özelliklerini ortaya çıkaran çalışmalara katkı sağladığını düşünmekteyiz.

6.SONUÇ

Kanser, insidansı giderek artan ve karsinogenez mekanizmaları ile ilgili daha çok çalışma yapıldıkça daha fazla hedefe yönelik ve alternatif tedavilerin ortaya çıktığı bir hastalıktır. Mevcut kemoterapitiklerin, hedefe yönelik olmaması, yetersiz etkinlikte olmaları ve ciddi yan etkileri bulunması nedeniyle, başarılı çalışmaların sayıları ve kanıtlar arttıkça, bu ilaçların kullanım alanlarının giderek azalması beklenmektedir. Borun hayvan hücrelerinde önemli bir mikro element olduğunu gösteren birçok bilimsel veri bulunmaktadır. Diyetteki bor eksikliği, bazı kanser türleri, osteoporoz ve osteoartrit dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Bor ve bor temelli bileşikler ile yapılan ve borun, karsinogenez sürecini çeşitli etki mekanizmaları ile engellediğini ortaya koyan yeni çalışmalar, borik asiti, yeni biyolojik ve kimyasal ajanların anti-kanser etkileri ile ilgili çalışma yapan bilim insanları açısından popüler bir hale getirmiştir. Borik asit ile ilgili çalışmalar her geçen gün artmaya devam etmektedir. Biz de çalışmamızda, daha önce tetkik edilmemiş olan medüller tiroid kanseri hücrelerinde borik asitin etkilerini inceledik. Yaptığımız tetkikler sonucunda, borik asitin TT hücrelerinde Siklin D1 /CDK4/CDK6 yolağındaki genlerin ekspresyonları azaltarak hücre proliferasyonunu engellediği, kaspaz-3, kaspaz-9, Bax, NOXA ve APAF-1 gibi apoptozisi indükleyen genlerin ekspresyonlarının arttırarak ve Bcl-2 ve Bcl-x gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarının azaltarak, apoptotik etkinliği arttırdığı saptanmıştır. MicroRNA 'ların medüller tiroid kanseri içinde ekspresyonları ve kanserin agresifliği ve prognozu ile ilgili yapılan çalışmalar ışığında, Real Time PCR ile izole edilen ve kötü

prognozla ilişkili olan miR-21'de anlamlı azalma saptanmıştır. Tunel testi ile IC50 dozunda borik asit ilavesi sonrası apoptotik hücre oranının arttığı, komet testi ile DNA kırıklarının çoğaldığı, matrigel invazyon ve koloni oluşum testleri ile invazyon ve koloni oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir.

Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde borik asitin hem medüller tiroid kanserinde hemde diğer kanser türlerinde muhtemel bir teröpatik ajan olarak kullanılabilceği düşüncesi ortaya çıkmaktadır. İn vitro çalışmaların hızlandırılması ve genişletilmesi ve devamında deney hayvanlarının kullanıldığı, faz II çalışmaların başlatılması, bu açıdan önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- 1) World Health Organization (WHO).
<https://www.who.int/cancer/PRGlobocanFinal.pdf> Erişim tarihi: 10 Ocak 2019.
- 2) Lauren M.F Merlo, John W. Pepper. Cancer as an evolutionary and ecological process. Nature Reviews Cancer (2006); volume 6 pages 924–935 .
- 3) Franziska Michor, Yoh Iwasa . Dynamics of cancer progression. Nature Reviews Cancer (2004); volume 4, pages 197–205
- 4) Crespi B., Summers K. Evolutionary Biology Of Cancer 2005; volume 20, issue 10 ,pages 545-552.
- 5) Gabriella Pellegriti, Francesco Frasca, Concetto Regalbuto, Sebastiano Squatrito and Riccardo Vigneri. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk .Journal of Cancer Epidemiology 2013; Article ID 965212, 10 pages.
- 6) World Health Organization (WHO). Globocan 2018 Graph production: Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr> .Erişim tarihi 15 Ocak 2019.
- 7) Leboulleux S, Baudin E, Travagli J, Schlumberger M Medullary thyroid carcinoma Clin Endocrinol 2004; 61:299–310.

- 8) Kouvaraki MA, Shapiro SE, Perrier ND, Cote GJ, Gagel RF, Hoff AO et al. RET proto-oncogene: a review and update of genotype-phenotype correlations in hereditary medullary thyroid cancer and associated endocrine tumors. *Thyroid*. 2005; 15(6):531-44.
- 9) Hubner RA, Houlston RS. Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnostics. *Clinica chimica acta*. 2006; 370:2-8.
- 10) Samuel A. Wells, Jr., Sylvia L. Asa, Henning Dralle, Rossella Elisei, Douglas B. Evans, Robert F. Gagel et al. Revised American Thyroid Association Guidelines for the Management of Medullary Thyroid Carcinoma. *THYROID* 2015;25:567.
- 11) Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Schlumberger M. Medullary thyroid Carcinoma. *Clinical Oncology* 2010; 475-85.
- 12) Cabanillas ME, Hu MI, Jimenez C. Medullary thyroid cancer in the era of tyrosine kinase inhibitors: to treat or not to treat—and with which drug— those are the questions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99:4390–6
- 13) Santarpia L & Bottai G Inhibition of RET activated pathways: novel strategies for therapeutic intervention in human cancers. *Current Pharmaceutical Design* 2013; 5 864–882.
- 14) Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 2010 ; 79, 351–379 .
- 15) Rigoutsos, I. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res.* 2009 ; 69, 3245–3248
- 16) Lujambio A , Lowe SW The microcosmos of cancer. *Nature* 2012 ;482 ,347–355.
- 17) Jinsong Zhang , Li Ma .MicroRNA control of epithelial–mesenchymal transition and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2012 ;volume 31,issue 3-4,pp 653-662.

- 18) Pierlorenzo Pallante, Sabrina Battista, Giovanna Maria Pierantoni and Alfredo Fusco
Pallante, P. et al. Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. *Nature Reviews Endocrinology* 2014; 10, 88—101.
- 19) Libero Santarpia, George A Calin . A miRNA signature associated with human metastatic medullary thyroid carcinoma . *Endocrine-Related Cancer* (2013) 20, 809–823.
- 20) Ying-Hsia Chu , Ricardo V. Lloyd. Medullary Thyroid Carcinoma: Recent Advances Including MicroRNA Expression. *Endocr Pathol* 2016 ;312-324.
- 21) Romeo P Colombo , Granata R, Calareso G, Gualeni AV, Dugo M, De Cecco L. et al. Circulating miR-375 as a novel prognostic marker for metastatic medullary thyroid cancer patients. *Endocrinology Related Cancer*. 2018 ;217-231.
- 22) Ying-Hsia Chua, Heather Hardina, David F. Schneiderb, Herbert Chenc, Ricardo V. Lloyd, MicroRNA-21 and long non-coding RNA MALAT1 are overexpressed markers in medullary thyroid carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology* 2017; 103(2):229-236
- 23) Mian C, Pennelli G, Fassan M, Balistreri M, Barollo S, Cavedon E, et al. MicroRNA profiles in familial and sporadic medullary thyroid carcinoma: preliminary relationships with RET status and outcome. *Thyroid* 2012; 22 (9):890–896.)
- 24) Marilena Celano, Francesca Rosignolo, Valentina Maggisano, Valeria Pecce, Michelangelo Iannone, Diego Russo et al. MicroRNAs as Biomarkers in Thyroid Carcinoma. *International Journal of Genomics* 2017 ; Volume 2017, Article ID 6496570, 11 pages.
- 25) Daniel A. Goldstein, Jonathon Clark, Yifan Tu, Jie Zhang, Fenqi Fang, Robert Goldstein et al. A global comparison of the cost of patented cancer drugs in relation to global differences in wealth. *Oncotarget*, 2017; Vol. 8, (No. 42), pp: 71548-71555.

- 26) Forrest H, Nielsen. Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2014; 383-7.
- 27) Price CJ, Strong PL, Murray FJ, Goldberg MM Blood boron concentrations in pregnant rats fed boric acid throughout gestation. *Reprod Toxicol* (1997) ;11: 833–842.
- 28) Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczer I, Bassler BL et al. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* (2002) ; 415: 545–549.
- 29) Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB, et al. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 2004;11:887–92.
- 30) Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 2004; 216:21–6.
- 31) Barranco WT, Hudak PF, Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risks (United States). *Cancer Causes Cont* 2007;18:71–7.
- 32) Elegbede AF, M.S. Boric acid inhibits cell growth and induces apoptosis in breast cancer cells. (*Retrospective Theses*) Las Vegas, NV: University of Las Vegas; 2007.
- 33) Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Moser GJ, Goldsworthy TL, Morrison JP, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-I in human prostate adenocarcinoma (LNCP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol* 2004;32:73–8.
- 34) Korkmaz M, Uzgören E, Bakirdere S, Aydin F, Ataman OY. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ Toxicol* 2007;22:17–25.

- 35) Michael Groll, * Celia R. Berkers, Hidde L. Ploegh, and Huib Ovaa . Crystal Structure of the Boronic Acid-Based Proteasome Inhibitor Bortezomib in Complex with the Yeast 20S Proteasome. *Structure* 2006; 14(3):451-6.
- 36) Bertram JS. The Molecular Biology of Cancer. *Molecular Aspects of Medicine* 2000; 21(6):167-223.
- 37) Cancer Research UK. <https://www.cancerresearchuk.org/what-is-cancer/how-cancer-starts/types-of-cancer>. Erişim Tarihi : 01 Şubat 2019
- 38) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70
- 39) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2001; 144(5):646-74.)
- 40) Esther Witsch, Michael Sela and Yosef Yarden. Roles for Growth Factors in Cancer Progression *Physiology (Bethesda)*. 2010; 25(2): 85–101.
- 41) Lemmon, M.A, and Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141(7):1117-34
- 42) Kwang Youl Lee and Suk-Chul Bae. TGF- β -dependent Cell Growth Arrest and Apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2012. Vol. 35, No. 1pp. 47-53
- 43) Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 2008; 6(10):1521-33.
- 44) Tiziana Tonini, Francesca Rossi, and Pier Paolo Claudio, Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003; 22, 6549–6556
- 45) Hanahan, D., and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-64.

- 46) Vajdic, C.M., and van Leeuwen, M.T.. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int. J. Cancer* 2009;125(8):1747-54
- 47) Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; 31(6):220-7
- 48) Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R et al. A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* 2004; 4(3):177-83
- 49) Jack T. Zilfou ve Scott W. Lowe, Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 00: a001883
- 50) Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 2008; 1(1):33
- 51) Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell*. New York 2002 ISBN-10: 0-8153-4072-9
- 52) Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease, Elsevier* 7. Ed. 2005 ISBN:0-8089-2302-1
- 53) Cosetta Bertoli, Jan M. Skotheim, and Robertus A. M. de Brui, Control of cell cycle transcription during G1 and S phase, *Nat.Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(8): 518-528
- 54) Umberto Galderisi, Francesco Paolo Jori and Antonio Giordano, Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* (2003) 22, 5208–5219
- 55) Morgan D *The cell cycle: principles of control*. Oxford: Oxford University Press. 2006

- 56) Arnaud Besson, Steven F. Dowdy, and James M. Roberts CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Development Cell* .2008 ;01.013
- 57) Sherr, C.J., and Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501-12
- 58) Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A. Et al. "Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle". *Cell Growth & Differentiation*. 1996; 7: 135–146
- 59) Kim WY, Sharpless NE "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging". *Cell*. 2006 ;127 (2): 265–75
- 60) Goodrich DW, Wang NP, Qian YW, Lee EY, Lee WH "The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle". *Cell*. 1991 ;67 (2): 293–302
- 61) Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, Harlow E, Lees JA. "In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15 (5): 2536–46
- 62) Wang Y, Ji P, Liu J, Broaddus RR, Xue F, Zhang W Centrosome-associated regulators of the G2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Molecular Cancer*. 2009; 8: 8
- 63) Löbrich M, Jeggo PA "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction". *Nature Reviews. Cancer*. 2007; 7 (11): 861–9
- 64) Peters JM . SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Current Opinion in Cell Biology* 1998 ;10 (6): 759–68
- 65) Ciosk R, Zachariae W, Michaelis C, Shevchenko A, Mann M, Nasmyth K. An ESP1/PDS1 complex regulates loss of sister chromatid cohesion at the metaphase to anaphase transition in yeast. *Cell*. 1998 ;93 (6): 1067–76

66) Green D. Means to an End: Apoptosis and other Cell Death Mechanisms. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2011; ISBN 978-0-87969-888-1

67) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. "Chapter 18 Apoptosis: Programmed Cell Death Eliminates Unwanted Cells". Molecular Biology of the Cell (textbook) (5th ed.). Garland Science. 2008: p. 1115

68) Raychaudhuri S. "A minimal model of signaling network elucidates cell-to-cell stochastic variability in apoptosis". PLOS ONE 2010; 5(8): e11930

69) Böhm I, Schild H. "Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death". Molecular Imaging and Biology. 2003; 5(1):2-14

70) Cotran RS, Kumar C Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company. 1999.

71) Uren RT, Iyer S, Kluck RM (August 2017). "Pore formation by dimeric Bak and Bax: an unusual pore?". Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 2017; 372 (1726): 20160218

72) Fesik SW, Shi Y (November 2001). "Structural biology. Controlling the caspases". Science. 2001; 294(5546):1477-8

73) Wajant H. "The Fas signaling pathway: more than a paradigm". Science. 2002; 296 (5573): 1635-6

74) Wajant H "Connection Map for Fas Signaling Pathway". Science's STKE. 2007; 380

75) Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. "Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells". Cell Death and Differentiation. 2000 ;7 (1): 102–11

76) Biyolog İpek Yaşa .Resveratrol ve Epigallokateşin kombinasyonunun sıçan c6 glioma hücrelerindeki apoptotik etkileri.(Yüksek Lisans Tezi).İstanbul.İstanbul Bilim Üniversitesi 2011

77) Mitchell, Richard Sheppard; Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson Robbins Basic Pathology. Philadelphia: Saunders. 8th edition Chapter 20 in 2007

78) Nix P, Nicolaides A, Coatesworth A P. "Thyroid cancer review 2: management of differentiated thyroid cancers". Int. J. Clin. Pract. 2005 ;59 (12): 1459–63

79) Bhattacharyya N. A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 128: 115–123

80) Negri E, Ron E, Franceschi S, et al. Risk factors for medullary thyroid carcinoma: a pooled analysis. Cancer Causes Control 2002; 13:365–372

81) Maya B. Lodish, Constantine A. Stratakis, RET oncogene in MEN2, MEN2B, MTC, and other forms of thyroid cancer: molecular genetics and therapeutic advances. Expert Rev Anticancer Ther. 2008; 8(4): 625–632

82) Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. Cancer 2000; 88:1139–1148

83) Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. Nucleic Acids Res 2015; 3 (Database issue): D805–D811

84) Agrawal N, Jiao Y, Sausen M, Leary R, Bettegowda C, Roberts NJ et al.Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98(2):364–369

- 85) Karin Frank-Raue, Susanne Rondot, Friedhelm Raue. Molecular genetics and phenomics of RET mutations: Impact on prognosis of MTC .Clinical Oncology 2010; 22(6):475-85
- 86) Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. Oncogene 1995 11(9):1737–1743
- 87) Kawai K, Iwashita T, Murakami H, Hiraiwa N, Yoshiki A, Kusakabe M et al. Tissue-specific carcinogenesis in transgenic mice expressing the RET proto-oncogene with a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. Cancer Res 2000; 60(18):5254–5260
- 88) Figlioli G, Landi S, Romei C, Elisei R, Gemignani F. Medullary thyroid carcinoma(MTC) and RET proto-oncogene: mutation spectrum in the familial cases and a meta-analysis of studies on the sporadic form. Mutat Res 2013; 752(1):36–44
- 89) Simona M. Wagner*, ShuJun Zhu*, Adrian C. Nicolescu, Lois M. Mulligan, Molecular mechanisms of RET receptor-mediated oncogenesis in multiple endocrine neoplasia 2. Clinics 2012 . 67 (1): 77–84
- 90) Borrello MG, Smith DP, Pasini B, Bongarzone I, Greco A, Lorenzo MJ, et al RET activation by germline MEN2A and MEN2B mutations. Oncogene 1995; 11(11):2419–2427
- 91) Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M et al Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. Science 1995; 267(5196):381–383
- 92) Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. J Cell Sci 2005; 118(Pt 5):843–846
- 93) Carboni JM, Yan N, Cox AD, Bustelo X, Graham SM, Lynch MJ, et al Farnesyltransferase inhibitors are inhibitors of Ras but not R-Ras2/TC21, transformation. Oncogene 1995; 10(10):1905–1913

- 94) Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 2013; 93(1):269–309
- 95) Avruch J, Khokhlatchev A, Kyriakis JM, Luo Z, Tzivion G, Vavvas D et al Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 2001; 56:127–155
- 96) McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1773(8):1263–1284
- 97) Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(5):307–318
- 98) Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11(5):329–341
- 99) Friedlheim Raue, eds. *Medullary thyroid Carcinoma. Germany 2015: 9-13.*
- 100) Flicker K, Ulz P, Hoyer H, Zeitlhofer P, Haas OA, Behmel A et al. High-resolution analysis of alterations in medullary thyroid carcinoma genomes. *Int J Cancer (Journal international du cancer)* 2012;131(2): 66–73
- 101) Ye L, Santarpia L, Cote GJ, El-Naggar AK, Gagel RF. High resolution array-comparative genomic hybridization profiling reveals deoxyribonucleic acid copy number alterations associated with medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 ;93(11):4367–4372
- 102) Barbieri RB, Bufalo NE, Secolin R, Assumpcao LV, Maciel RM, Cerutti JM, Ward LS Polymorphisms of cell cycle control genes influence the development of sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol (European Federation of Endocrine Societies)* 2014; 171 (6):761–767.)

- 103) Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. Clin Cancer Res: Official J Am Assoc Cancer Res 2010;16(4):1094–1099
- 104) Zhu L, Lu Z, Zhao H. Antitumor mechanisms when pRb and p53 are genetically inactivated. Oncogene 2014; 34(35):4547-57
- 105) D. P. Bartel, “MicroRNAs: target recognition and regulatory functions,” Cell 2009 .vol. 136, no. 2, pp. 215–233
- 106) S. Oliveto, M. Mancino, N. Manfrini, and S. Biffo, “Role of microRNAs in translation regulation and cancer,” World Journal of Biological Chemistry, 2017 ; 8(1): 45–56)
- 107) M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl, “Identification of novel genes coding for small expressed RNAs,” Science 2001 vol. 294, no. 5542, pp. 853–858
- 108) M. V. Iorio and C. M. Croce, “Causes and consequences of microRNA dysregulation,” Cancer Journal 2012, vol. 18, no. 3, pp. 215–222
- 109) Fassan M, Pizzi M, Giacomelli L, Mescoli C, Ludwig K, Pucciarelli S, Rugge M. PDCD4 nuclear loss inversely correlates with miR-21 levels in colon carcinogenesis. Virchows Arch2011; 458:413–419
- 110) Deepak Abraham, Nicole Jackson, Justin S. Gundara, JingTing Zhao, Anthony J. Gill et.al. MicroRNA Profiling of Sporadic and Hereditary Medullary Thyroid Cancer Identifies Predictors of Nodal Metastasis, Prognosis, and Potential Therapeutic Targets.Clin Cancer Res. 2011; 17(14):4772-81
- 111) Elisabetta Cavedon, Susi Barollo, Loris Bertazza, Gianmaria Pennelli, Francesca Galuppini, Sara Watutantrige-Fernando, Prognostic Impact of miR-224 and RAS Mutations in Medullary Thyroid Carcinoma. International Journal of Endocrinology 2017:4915736

- 112) Santarpia L, Calin GA, Adam L, Ye L, Fusco A, Giunti S, et al. A miRNA signature associated with human metastatic medullary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20 (6): 809–823
- 113) Pierlorenzo Pallante, Sabrina Battista, Giovanna Maria Pierantoni and Alfredo Fusco Pallante, P. et al. Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasia. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014;10, 88-101
- 114) Scollo C, Baudin E, Travagli JP et al. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2070 –2075
- 115) Orlandi F, Caraci P, Mussa A, Saggiorato E, Pancani G, Angeli A. Treatment of medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr Relat Cancer* 2001; 8:135–147
- 116) You YN, Lakhani V, Wells SA Jr et al. Medullary thyroid cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2006; 15:639–660
- 117) V. Ernani, M. Kumar, A. Y. Chen, and T. K. Owonikoko, “Systemic treatment and management approaches for medullary thyroid cancer,” *Cancer Treatment Reviews*, 2016 ;50, 89–98
- 118) Baudin E, Lumbroso J, Schlumberger M, et al. Comparison of octreotide scintigraphy and conventional imaging in medullary thyroid carcinoma. *J Nucl Med* 1996; 37:912–916
- 119) Lupoli GA, Fonderico F, Fittipaldi MR, et al. The role of somatostatin analogs in the management of medullary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(8 Suppl): 72–74
- 120) de Groot JW, Zonnenberg BA, van Ufford-Mannesse PQ et al. A phase II trial of imatinib therapy for metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3466 –3469

- 121) Hans H. G. Verbeek,* Maria M. Alves,* Jan-Willem B. de Groot, Jan Osinga, John T. M. Plukker, Thera P. Links, and Robert M. W. Hofstra. The Effects of Four Different Tyrosine Kinase Inhibitors on Medullary and Papillary Thyroid Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(6):E991–E995
- 122) Kunnimalaiyaan M, Ndiaye M, Chen H. Apoptosis-mediated medullary thyroid cancer growth suppression by the PI3K inhibitor LY294002. *Surgery* 2006;140:1009 –1014
- 123) Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA et al. Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells. *J Biol Chem* 2006;281:39819 –39830
- 124) Kunnimalaiyaan M, Vaccaro AM, Ndiaye MA et al. Inactivation of glycogen synthase kinase-3beta, a downstream target of the Raf-1 pathway, is associated with growth suppression in medullary thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6: 1151–1158
- 125) F.H. Nielsen, "Is boron nutritionally relevant?," *Nutr. Rev.* 2008; 66.183-191
- 126) F.S. Kot, "Boron sources, speciation and its potential impact on health", *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2009, vol. 8, pp. 3-28
- 127) R.Simmons, N. Ahsian and H. Raven, *The Book of Stones: Who They Are and What They Teach.* North Atlantic Books, 2007.pp. 421- 422
- 128) N. Acarkan, "Boron products and their uses", In: *Proceedings of the 1st international boron symposium, Kutahya: Turkey, 2002*
- 129) C.D. Hunt, "Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in animals and humans", *Biol. Trace Elem. Res.*, 1998 vol. 66, pp. 205-225
- 130) P.D. Howe, "A review of boron effects in the environmen", *Biol. Trace Elem. Res.*, 1998 vol. 66, pp. 153-166

- 131) U.K. Expert group on vitamins and minerals, "2002 preliminary risk assessment-boron", Tech. Report, U.K. 2002 EGVN/99/23/P. Revised Aug.
- 132) Sutherland B, Strong P, King JC Determining human dietary requirements for boron. *Biol Tr Elem Res* 1998; 66:193–204
- 133) Nielsen FH, Boron in human and animal nutrition. *Plant Soil* 1997; 193:199–208
- 134) Massie HR, Whitney SJ, Aiello VR, Sternick SM.Changes in boron concentration during development and aging of *Drosophila* and effect of dietary boron on life span. *Mech Aging Dev* 1990; 53:1–7
- 135) Grajeta H. Nutrition in prevention and treatment of osteoporosis. *Przegl Lek.*2003; 60(10):649-653
- 136) Naghii MR, Mofid M, Asgari AR, Hedayati M, Daneshpour MS. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J Trace Elem Med Biol.*2010;25(1):54-58
- 137) Devirian TA and Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.*,2003;43(2): 219-231
- 138) Nielsen FH .Studies on the relationship between boron and magnesium which possibly affects the formation and maintenance of bones. *Magnes Trace Elem* 1990; 9:61–69
- 139) Sinan Ince, Ismail Kucukkurt, Ibrahim Hakki Cigerci, A. Fatih Fidan, Abdullah Eryavuz, The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats.2010; 24(3):161-4
- 140) Hunt CD and Idso JP. 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*, 1999;12: 221–233

- 141) Bai Y, Hunt CD, Newman SM Jr. Dietary boron increases serum antibody (IgG and IgM) concentrations in rats immunized with human typhoid vaccine. *Proc ND Acad Sci.*1997;51:81
- 142) Hunt CD and Nielsen H. Dietary boron affects bone calcification in magnesium- and cholecalciferol deficient chicks. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 5th ed. New York: Academic Press, Inc.,1986;275–277
- 143) Hunt CD, Herbel JL, Idso JP. Dietary boron modifies the effects of vitamin D3 nutrition on indices of energy substrate utilization and mineral metabolism in the chick. *J. Bone Min. Res.*,1994;9:171–182
- 144) Samman S, Naghii MR, Lyons Wall PM, Verus AP. The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biol Trace Elem Res.*,1998;66(1-3):227-235
- 145) Naghii MR, Mofid M, Asgari AR, Hedayati M, Daneshpour MS. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J Trace Elem Med Biol.*,2010;25(1):54-58
- 146) G. James and J. Penland, “Dietary Boron, Brain Function, and Cognitive Performance”, *Environ. Health Perspect.*, vol. 102, p. 7, 1994
- 147) Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biol Trace Elem Res.*1998; 66(1-3):299-317
- 148) Park M, Li Q, Shcheynikov N, Zeng W, Muallem S. NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Mol Cell* 2004 16: 331–341
- 149) Yadong Wang & Yingzheng Zhao & Xiaoyu Chen, Experimental Study on the Estrogen-Like Effect of Boric Acid. *Biol Trace Elem Res* 2008 ;121:160–170

- 150) M.T. Gallardo-Williams, R.R. Maronpot, R.N. Wine, S.H. Brunssen and R.E. Chapin, "Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid", *Prostate*, vol .54, pp. 44-49, 2003
- 151) W.T. Barranco, D.H. Kim, S.L. Stella and C.D. Eckhert, "Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells", *Cell Biol. Toxicol* 2009;25(4):309-20
- 152) Mahabir, S.; Spitz, M.R.; Barrera, S.L.; Dong, Y.Q.; Eastham, C. ; Forman, M.R. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American Journal of Epidemiology*, 2008 167(9):1070-80
- 153) Acerbo, A.S. & Miller, L. Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*, 2009;134,1669-1674
- 154) Scorei, R.; Ciubar, R.; Ciofrangeanu, C.M.; Mitran, V.; Cimpean, A. & Iordachescu, D. Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological Trace Element Research*,2008; 122, 197-205
- 156) http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL_1803.aspx?geo_country=tr
Erişim tarihi: 2 şubat 2019
- 157) <https://www.sciencellonline.com/human-thyroid-fibroblasts.html> Erişim tarihi: 2 şubat 2019
- 158) WT Barranco and CD Eckhert. Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer* 2006; 94(6): 884–890
- 159) Emad S. Alnemri, David J. Livingston, Donald W. Nicholson, Guy Salvesen, Nancy A. Thornberr, Winnie W. Wong ve Junying Yuan. Human ICE/CED-3 Protease. *Cell* 1996; 87(2):171
- 160) Salvesen GS "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death and Differentiation*.2002; 9 (1): 3–5

- 161) Boatright KM, Salvesen GS "Mechanisms of caspase activation". *Current Opinion in Cell Biology*. 2003; 15 (6): 725–31
- 162) Korsmeyer, Stanley J. "Regulators of Cell Death". *Trends in Genetics*.1995; 11 (3): 101–105
- 163) Eri Oda, Rieko Ohki, Hideki Murasawa, Jiro ~emoto, Tsukasa Shibue, Toshiharu Yamashita. Noxa, a BH3-Only Member of the Bcl-2 Family and Candidate Mediator of p53-Induced Apoptosis.2000; 288(5468):1053-8
- 164) Rozita Bagheri-Yarmand, Krishna M. Sinha, Anupama E. Gururaj, Zamal Ahmed, Yasmeen Q. Rizvi, Su-Chen Huang et al. A Novel Dual Kinase Function of the RET Proto-oncogene Negatively Regulates Activating Transcription Factor 4-mediated Apoptosis, *Journal of Biology Chemistry*.2015; 290(18): 11749–11761
- 165) Fulda, S. and Debatin, K.Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25, 4798-4811
- 166) David Yu Greenblatt, Max A. Cayo, Joel T. Adler, Li Ning, MD, Megan R. Haymart, Muthusamy Kunnimalaiyaan, and Herbert Chen . Valproic Acid Activates Notch1 Signaling and Induces Apoptosis in Medullary Thyroid Cancer Cells.2008; 247(6): 1036–1040
- 167) ZENGXIA LI, SONJA STURM, BERNHARD SVEJDA, HARALD HÖGER, ELISABETH SCHRAML, ELISABETH INGOLIC et al. Anticancer Activity of Novel Extracts from *Cautleya gracilis* (Smith) Dandy: Apoptosis in Human Medullary Thyroid Carcinoma Cells *ANTICANCER RESEARCH* 2008;28: 2705-2714
- 168) Li Ning, David Yu Greenblatt, Muthusamy Kunnimalaiyaan and Herbert Chen, Suberoyl Bis-Hydroxamic Acid Activates Notch-1 Signaling and Induces Apoptosis in Medullary Thyroid Carcinoma Cells.2008; 13(2):98-104
- 169) Raoul Hinze · Oliver Gimm · Helge Taubert Gabi Bauer · Henning Dralle Hans-Jürgen Holzhausen · Friedrich-Wilhelm Rath. Regulation of proliferation and

apoptosis in sporadic and hereditary medullary thyroid carcinomas and their putative precursor lesions, *Virchows Arch* 2000; 437:256–263

170) Satyanarayana A, Kaldis P "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdk's, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms". *Oncogene* 2009; 28 (33): 2925–39

171) Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998;12:2245–2262

172) Harbour JW, Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2000;2: E65–E67

173) Stanislaw Sporny, Dorota Slowinska-Klencka, Marzena Ratynska, Cyclin D1 expression in primary thyroid carcinomas, *Neuroendocrinology Letters* 2005; 26(6):815-8

174) Watanabe T, Ichihara M, Hashimoto M, Shimono K, Shimoyama Y, Nagasaka T, et al. Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation. *Am J Pathol* 2002; 161:249–56

175) Matthias Drosten, Gero Hilken, Miriam Böckmann, Florian Rödicker, Nikica Mise, Aaron N. Cranston et al. Role of MEN2A derived RET in maintenance and proliferation of medullary thyroid cancer. *J. Natl Cancer Inst.* 2004; 96(16):1231-9

176) Fulvio Basólo, Maria A. Caligo, Aldo Pinchera, Franco Fedeli, Andrea Baldanzi, Paolo Miccoli et al. Cyclin D1 Overexpression in Thyroid Carcinomas: Relation with Clinico-Pathological Parameters, Retinoblastoma Gene Product, and Ki67 Labeling Index, *THYROID* 2000; 10(9):741-6

177) Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg LR, Lees E, Arnold A, Schmidt EV. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 (PRAD-1) transgenic mice. *Nature* 1994;369(6482):669-71

- 178) El-Hafez AA1, El Aaty Shawky A, Hasan B. Cyclin D1 overexpression associates with favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Cancer Biomark.* 2012;12(4):149-54
- 179) Oliver Gautschi, Daniel Ratschiller, Mathias Gugge, Daniel C. Betticher, Jim Heighway. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* 2007; 55, 1—14
- 180) Biswajit Dey1, Vandana Raphael , Yookarin Khonglah, Kyrshanlang GiriLynrah. Expression of Cyclin D1 and P16 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma *Middle East Journal of Digestive Diseases* 2015; 7(4): 220–225
- 190) Vishal Dhingra, Jyoti Verma, Vatsala Misra, Sapan Srivastav, Faheema Hasan. Evaluation of Cyclin D1 Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinom. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2017; 11(2): EC01–EC04
- 191) Peter Schraml, Christoph Bucher, Heidi Bissig, Antonio Nocito, Philippe Haas, Kim Wilber et al. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours, *Journal of Pathology J Pathol* 2003; 200: 375–382
- 192) Federico Tagliati, Maria Chiara Zatelli, Arianna Bottoni, Daniela Piccin, Andrea Luchin, Michael D. Culler, and Ettore C. degli Uberti .Role of Complex Cyclin D1/Cdk4 in Somatostatin Subtype 2 Receptor-Mediated Inhibition of Cell Proliferation of a Medullary Thyroid Carcinoma Cell Line in Vitro. *Endocrinology*, 2006; 147(7):3530 –3538
- 193) Yun Jae Chung, Ji In Lee, SeMin Chong, Ju Won Seok, Sung Jun Park, Hye Won Jang et al. Anti-proliferative Effect and Action Mechanism of Dexamethasone in Human Medullary Thyroid Cancer Cell Line *Endocrine Research*, 2011; 36(4): 149–157
- 194) Joanna Klubo-Gwiezdzinska, Kirk Jensen, John Costello, Aneeta Patel, Victoria Hoperia, Andrew Bauer et al. Metformin inhibits growth and decreases resistance to anoikis in medullary thyroid cancer cells , *Endocrine-Related Cancer* 2012;19(3):447-56

- 195) Gianmaria Pennelli, Francesca Galuppini, Susi Barollo, Elisabetta Cavedon, Loris Bertazza, Matteo Fassan et.al. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma, *Human Pathology*, 2014; 46(1):50-7
- 196) Fassan M, Realdon S, Pizzi M, et al. Programmed cell death 4 nuclear loss and miR-21 or activated Akt overexpression in esophageal squamous cell carcinogenesis. *Dis Esophagus* 2012; 25:263-8
- 197) L. Yu, J. Zhang, X. Guo, Z. Li, and P. Zhang, "MicroRNA-224 upregulation and AKT activation synergistically predict poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma," *Cancer Epidemiology* 2014; 38(4):408-13
- 198) Lin Huang a,b,1 , Ting Dai c,1 , Xi Lin d , Xiaohui Zhao a , Xiuting Chen a , Chanjuan Wang et al., "MicroRNA-224 targets RKIP to control cell invasion and expression of metastasis genes in human breast cancer cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 24;425(2):127-33
- 199) S. N. Shen, L. F. Wang, Y. F. Jia, Y. Q. Hao, L. Zhang, and H. Wang. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Diagnostic Pathology*.2013; 8:69
- 200) H. Wang, L. J. Zhu, Y. C. Yang, Z. X. Wang, and R. Wang, "MiR-224 promotes the chemoresistance of human lung adenocarcinoma cells to cisplatin via regulating G (1)/S transition and apoptosis by targeting p21(WAF1/CIP1)," *British Journal of Cancer* 2014; 111(2):339-54
- 201) Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(10):1890-909
- 202) Binnaz Kuru, Funda Karabağ Çoban. Effect of boron on trace element level and oxidative stress in paracetamol induced hepatotoxicity mode ,*journal of boron* 2019; BORON 4 (2), 92- 99

- 203) Turkez H, Geyikoglu F, Tatar A, Keles S, Ozkan A. Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Z Naturforsch C* 2007; 62:889–96
- 204) Scorei, R.; Cimpoiasu, V.M. & Iordachescu, D. In vitro evaluation of the antioxidant activity of calcium fructoborate. *Biological Trace Element Research* 2005; 107(2):127-34
- 205) Nielsen, F.H. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 2000; 16(7-8):512-4
- 206) Gonzalez, U. Peters, J.W. Lampe, and E. White, "Boron intake and prostate cancer risk", *Cancer Causes Control* 2007; 18(10):1131-40
- 207) Stoppler, H.; Koval, D. & Schlegel, R. The serine protease inhibitors TLCK and TPCK inhibit the in vitro immortalization of primary human keratinocytes by HPV-18 DNA. *Oncogene*.1996; 13(7):1545-8
- 208) **Xu, F., Goldbach, H., Brown, P.H., Bell, R.W., Fujiwara, T., Hunt, C.D., Goldberg, S., Shi, L.** (Eds)In: *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*, New York : Springer2007;299-306
- 209) Schabath, M.B.; Wu, X.; Vassilopoulou-Sellin, R.; Vaporciyan, A.A. & Spitz, M.R. Hormone replacement therapy and lung cancer risk. A case-control analysis clinical. *Cancer Research* 2004;10(1 Pt 1):113-23
- 210) Shomron, N. & Ast, G. Boric acid reversibly inhibits the second step of pre-mRNA splicing. *FEBS Letters*.2003; 552(2-3):219-24
- 211) Elegbede, A.F. Mechanism of boric acid analog cytotoxicity in breast cancer cells. M.S. Thesis, 2007 University of Nevada Las Vegas United States.
- 212) Meacham, S.; Karakas, S.; Wallace, A. & Altun, F. Boron in human health evidence for dietary recommendations and public policies. *The Open Mineral Processing Journal* 2010;3 36-53

- 213) Teicher, B.A.; Gulshan, A.; Herbst, R.; Palombella, V.J. & Adams, J. (1999). The proteasomes inhibitor PS-341. *Clinical Cancer Research*, Vol. 5, pp. 2638-2645
- 214) Boccadoro, M.; Morgan, G. & Cavenagh, J. Preclinical evaluation of the proteasomes inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell International*. 2005; 5(1):18
- 215) MacLaren, A.P.; Chapman, R.S.; Wyllie, A.H. & Watson, C.J. p53-dependent apoptosis induced by proteasomes inhibition in mammary epithelial cells. *Cell Death and Differentiation* 2001; 8(3):210-8.
- 216) Yang, C.H et al. Bortezomib in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. *Annals of Oncology* 2006;17 813–817
- 217) Garland, C. F.; Grant, W. B.; Mohr, S.B.; Gorham, E.D. & Garland, F.C. What is the Dose-Response Relationship between Vitamin D and Cancer Risk? *Nutrition Reviews* 2007; 65(8 Pt 2): S91-5.
- 218) Chen G, Goeddel DV. "TNF-R1 signaling: a beautiful pathway". *Science*.2002; 296 (5573): 1634-5
- 219) Chen W, Li N, Chen T, Han Y, Li C, Wang Y et al."The lysosome-associated apoptosis-inducing protein containing the pleckstrin homology (PH) and FYVE domains (LAPF), representative of a novel family of PH and FYVE domain-containing proteins, induces caspase-independent apoptosis via the lysosomal-mitochondrial pathway". *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280 (49): 40985–95.