



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**



**BORİK ASİTİN UV RADYASYONUN GENOTOKSİK VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNE KARŞI KORUYUCU
ETKİNLİĞİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Tamer GÜNAY

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BORİK ASİTİN UV RADYASYONUN GENOTOKSİK VE
SİTOTOKSİK ETKİLERİNE KARŞI KORUYUCU
ETKİNLİĞİNİN İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI**

Tamer GÜNAY

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Bu araştırma TUBİTAK' ın 114S311 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Borik asitin UV radyasyonun genotoksik ve sitotoksik etkilerine karşı koruyucu etkinliğinin in-vitro araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususun doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Tamer GÜNAY tarafından hazırlanan

“Borik asitin UV radyasyonun genotoksik ve sitotoksik etkilerine karşı koruyucu etkinliğinin in-vitro araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak OY BİRLİĞİ/ OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/07/2019

Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

(Jüri Başkanı)

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

Ankara Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

(Danışman)

Doç. Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	iii
Kabul ve Onay	iv
İçindekiler	v
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
Çizelgeler	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1. Bor, Borik Asit ve Önemi	1
1.1.1. Bor Elementinin Tarihçesi	1
1.1.2. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
1.1.3. Borun Kullanım Alanları	6
1.1.4. Borun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	10
1.2. Komet Analizleri	12
1.2.1. Komet Analizinin Önemi	12
1.2.2. Komet Testinin Prensibi	13
1.2.3. Komet Analizlerinin Uygulama Sahaları	15
1.2.4. Komet Analizlerinin Avantajlı Yönleri	15
1.3. Sitotoksisite Testi (MTT testi)	16
1.3.1. Sitotoksisite Testi (MTT) Prensibi	16
1.4. Hücre Kültürü	17
1.5. UV Maruziyeti	20
1.5.1. Ultraviyole (UV) Işınları ve Çeşitleri	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	27
2.1. Gereç	27
2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri	27
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	27
2.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	28
2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması	29
2.4. Borik Asit Maruziyeti	32
2.5. UV Maruziyeti	33
2.6. Sitotoksisite Testi (MTT) Yapılışı	34
2.7. Komet Testinin Yapılışı	35
2.8. İstatistiksel Değerlendirme	39
3.BULGULAR	41
3.1. Sitotoksisite, MTT Testi Sonuçları	41
3.1.1. UV Maruziyeti ile Elde Edilen MTT Testi Sonuçları	41
3.1.2. HaCaT Hücre Kültüründe UV ve Borik Asit Uygulamasıyla Elde Edilen Sitotoksisite (MTT) Sonuçları	43

3.2. Genotoksisite (Komet) Testi Sonuçları	46
3.2.1. UV Maruziyeti İle Elde Edilen Komet Testi Sonuçları	46
3.2.2. UV ve Borik Asit Maruziyeti İle Elde Edilen Komet Testi Sonuçları	47
4. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZET	63
SUMMARY	64
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	71



ÖNSÖZ

Tezimizde UV radyasyon varlığında insan keratinosit hücreleri (HaCaT) üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması ve bu etkiler üzerinde borik asitin koruyucu bir etkinliğinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Borik asitin genotoksik etkileri önlemesi ya da azaltması durumunda borik asidin güneş kremlerinin formülasyonlarında kullanılması tavsiye edilebilecektir. Ülkemizin bor rezervleri açısından Dünya'daki toplam bor rezervlerinin yaklaşık %75'ine sahip olduğu ve bu konuda Dünya lideri olduğu düşünülürse, borik asidin kullanım alanlarını arttırmaya yönelik olan çalışmaların önemi daha iyi anlaşılabilmektedir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez çalışması süresince bilgi ve deneyimleri ile bana her zaman yardımcı olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a, tüm birikimleriyle eğitim dönemim boyunca bana destek olan Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı'nın saygıdeğer hocalarına ve beni manevi anlamda her zaman motive eden sonsuz sabır ve destekleri ile her zaman yanımda olan çok kıymetli eşim Ecz. Özgül COŞKUN GÜNAY'a ve canım kızım Betül GÜNAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

B	Bor elementi
BA	Borik asit
CIR	Cosmetic Ingredient Review
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EU	Avrupa Birliği
g	Gram
HaCaT hücresi	İnsan keratinosit hücresi
Komet	Tek Hücre Jel Elektroforezi
kJ	Kilo Joule
kw	Kilo Watt
M	Molar
m ²	Metrekare
mg	Mili gram
µg	Mikro gram
µl	Mikro litre
ml	Mili litre

μM	Mikro molar
Mm	Mili molar
nm	Nano metre
MTA	Maden Teknik Arama
MTT	Tetrazolyum tuz redüksiyon
MN	Mikronükleus testi
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
REACH	Avrupa Kimyasal Maddeler Yönetmeliği
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye
Tail % Intensity	Ortalama kuyruk yoğunluğu (%)
UV	Ultraviyole ışını
UVA	Ultraviyole A Işını
UVB	Ultraviyole B Işını
V	Volt
V79	Çin hamstırı akciğer hücreleri (Chinese hamster lung cells)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Etidyum bromür kullanılarak floresan mikroskop altında elde edilen kometler	14
Şekil 1.2. Tetrazolyum bileşiğinin redüksiyon sonucunda Formazan bileşiğine dönüşmesi	17
Şekil 1.3. UV spektrumu	21
Şekil 1.4. UV ışınlarının deriden geçişi	22
Şekil 2.1. HaCaT hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü	31
Şekil 2.2. Sayım cihazında hücrelerin sayısı ve görünüşleri	32
Şekil 2.3. Osram güneş ışığı simülatör lambası ile UV maruziyeti	34
Şekil 2.4. Multiplaka okuyucu	35
Şekil 2.5. Hücrelerin lamlara yayılma aşaması	36
Şekil 2.6. Hücrelerin lising solusyonunda bekletilmesi	37
Şekil 2.7. Hücrelerin elektroforez çözeltisi içerisinde bekletilmesi	38
Şekil 2.8. Komet testi aşamaları	38
Şekil 2.9. Floresan Mikroskop (komet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)	39
Şekil 3.1. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile	

elde edilen MTT sonuçları	41
Şekil 3.2. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 2.5 µM borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu	43
Şekil 3.3. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 5 µM borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu	44
Şekil 3.4. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 10 µM borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu	44
Şekil 3.5. Fluoresan mikroskopta hasarsız, az hasarlı ve hasarlı DNA görüntüleri	48
Şekil 3.6. HaCaT hücrelerine 1 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	50
Şekil 3.7. HaCaT hücrelerine 5 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	50
Şekil 3.8. HaCaT hücrelerine 10 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	51
Şekil 3.9. HaCaT hücrelerine 15 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	52
Şekil 3.10. HaCaT hücrelerine 30 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	53
Şekil 3.11. HaCaT hücrelerine 45 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	54

Şekil 3.12. HaCaT hücrelerine 60 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları

55



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Borun atomik yapısı	4
Çizelge 1.2. Bor ve seçilen bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
Çizelge 1.3. Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları	19
Çizelge 1.4. Hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları	19
Çizelge 1.5. Fitzpatrick deri tipleri	23
Çizelge 3.1. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile elde edilen MTT sonuçları	42
Çizelge 3.2. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 60 cm) maruziyeti ile elde edilen MTT sonuçları	42
Çizelge 3.3. Borik asit ve UV maruziyetleri ile elde edilen % canlılık değerleri	45
Çizelge 3.4. Borik asit ve UV maruziyetleri ile hesaplanan IC50 değerleri, * $p < 0.05$, student t -test	45
Çizelge 3.5. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile elde edilen komet testi kuyruk yoğunluğu sonuçları	46
Çizelge 3.6. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 60 cm) maruziyeti ile elde edilen komet testi kuyruk yoğunluğu sonuçları	47
Çizelge 3.7. UV ile birlikte 2.5 μM borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları	48

Çizelge 3.8. UV ile birlikte 5 μ M borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi
ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları 49

Çizelge 3.9. UV ile birlikte 10 μ M borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi
ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları 49



1. GİRİŞ

1.1. Bor, Borik Asit ve Önemi

1.1.1. Bor Elementinin Tarihçesi

Bor kelimesinin kökenleri; Arapça buraq, baurach ve Farsça burah kelimelerinden gelmektedir. Tarihte ilk defa Babiller tarafından M.Ö. 2000 yıllarında metallerin eritilmesi işlemlerinde kullandığı yönünde verilere rastlanmaktadır. Bunun yanı sıra bor Mısır, Mezopotamya ve Arap Yarımadasında birçok uygarlık tarafından tedavi, mumyalama, ilaç ham maddesi ve temizlik maddesi olarak kullanılmıştır. Yakın tarihte bor element olarak ilk defa 1808'de Fransız bilim adamı Baron Louis Thenard ve Joseph Gay-Lussac tarafından bilim tarihine kazandırılmıştır. Bor ve bileşiklerinin endüstriyel amaçlarla Avrupa Kıtasında kullanılmaya başlaması ise daha eski dönemlere, yaklaşık 13. yüzyıla uzanmaktadır (Woods, 1994).

Ülkemiz topraklarında ise bor madeni ilk defa 18. yüzyıl ortalarında tespit edilmiş ve işlenmeye başlamıştır. Cumhuriyet dönemiyle birlikte yapılan yatırımlar sonucunda günümüzde Türkiye, Dünya bor üretiminde önemli bir pozisyona ulaşmıştır (Sizmaz, 2013). Ülkemiz dünya ülkeleri arasında, sahip olduğu bor yatakları açısından %72 oran ile birinci sıradadır. Başlıca bor yatakları, Batı Anadolu ve Marmara Denizi güney kesimlerinde, özellikle Eskişehir ve Kütahya yörelerinde bulunmaktadır (Yenmez, 2009).

Doğu Roma İmparatorluğu devrinden beri Türkiye'deki bor madenlerinin bulunduğu ve aynı zamanda kullanıldığı tahmin edilmektedir. Balıkesir İli-Susurluk ilçesinin Sultançayırı bölgesi ilk bor minerali yataklarının görüldüğü yerdir. Pandermit

diye adlandırılan Cevher, yabancı şirketler tarafından uzun süre kalsiyum tuzu olarak işletilmiştir.

1865 yılında Fransız "Desmazures" şirketine Boraks Madeni İşletme imtiyazı, 1861 yılında çıkarılan "Maadin Nizamnamesi" hükümlerine uygun bir şekilde verilmiştir. Bir İngiliz kuruluşu olan Boraks Consolidated Ltd. bu alana 1887'de yerleşmiş ve işletme imtiyazı olarak da 1958'e kadar faaliyetine devam etmiştir. 624 yabancı şirkete 1927 yılına kadar imtiyaz verilmiş, yabancı sermayeye yeni imtiyaz verilmesi 1944 yılında son bulmuş olup bu şirketlerin büyük kısmı millileştirilmiştir.

2804 ve 2805 Sayılı Kanunlar kapsamında MTA ve Etibank gibi milli kuruluşlar arama ruhsatlarını 1935 yılında almış olup, arama faaliyetlerini II. Dünya Savaşı'ndan sonra hem hızlandırıp hem de yaygınlaştırmışlardır. Kolemanit yataklarına çok farklı bölgelerde rastlanılmış olup bunlar; 1950 yılının başlarında Bigadiç yakınlarında, 1952 yılında Mustafa Kemal Paşa civarında, 1956 yılında ise linyit etütleri yapılırken MTA Enstitüsü Emet-Kütahya sınırları içerisinde yer alan Hisarcık ve Hamamköy bölgesinde kolemanit yataklarına rastlanmıştır. Etibank, 1958 yılında bu yatakların işletme imtiyazını almıştır.

Balıkesir civarında Boraks yataklarının işletmesini yapan bir İngiliz kuruluşu olan Boraks Consolidated Ltd. Şirketi, İngiliz Boraks cevherlerinde kayda değer bir atış görünce Kırka-Sodyum tuzu yataklarının da işletmesine sahip olmak için 1965 yılından itibaren girişimlerde bulunarak özel madencilerin işlettiği yatakları devralmaya başlamış ve daha sonra Türk Boraks ismi bünyesinde bu yatakları işletmiştir. Ancak bu sahanın devir işlemlerinde kanuna aykırı birtakım eksiklikler olması nedeniyle Türk Boraks'ın imtiyazı alınmış olup 1968 yılı başlarında bu yatakların işletme görevi Etibank'a geçmiştir. Böylece 1970 yılından itibaren hazırlıklara başlanmış ve yeni tesisler kurulmuştur.

Ülkemizde yer alan bor madenlerimizin işletmesi ilk etapta yabancı şirketler tarafından yürütülürken 1968 yılı itibariyle yerli olmayan firmaların imtiyazlarının devlete geçmesi ile Etibank başta olmak üzere bir takım küçük ölçekli yerli firma tarafından bor yataklarının işletilmesi yabancı şirketlerden alınmıştır. Bu süreçle birlikte bor yataklarının devlet bünyesinde işletilmesi ilk kez 1978 yılında başlamış olup bu karardan itibaren de üretim, yatırım, madencilik ve pazarlama gibi konulardaki tüm faaliyetler Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü altında ifa edilmektedir (Bor Araştırma Enstitüsü, Boren; www.boren.gov.tr).

1.1.2. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Geçiş metali olarak da bilinen Bor, periyodik tabloda “B” simgesi ile gösterilir. Atom numarası 5, yoğunluğu 2,84 gr/cm³, atom ağırlığı 10,81, kaynama noktası 2.250 C ve erime noktası 2.200 C, yarı iletken özelliğine sahip olan siyah renkli, ametal ile metal arası bir elementtir. (Bor Araştırma Enstitüsü, Boren; www.boren.gov.tr). Diğer özelliklere Çizelge 1.1’ de yer verilmiştir.

Çizelge 1.1. Borun atomik yapısı

Atomik Çapı	1.17 Å
Atomik Hacmi	4.6 cm ³ /mol
Kristal Yapısı	Rhombohedral
Elektron Konfigürasyonu	1s ² 2s ² p ¹
İyonik Çapı	0.23 Å
Elektron Sayısı (yüksüz)	5
Nötron Sayısı	6
Proton Sayısı	5
Valans Elektronları	2s ² p ¹

Tabiatta tek başına çok sıklıkla rastlanılmayan bor, diğer elementlerle bileşik halinde olarak görülür. Doğada aşağı yukarı 230 çeşit Bor minerali vardır. Borun oksijene olan ilgisi ve bağ yapmaya elverişli olması nedeniyle birçok değişik Boroksijen bileşimi bulunmaktadır. Boroksijen bileşiklerinin genel adı borat olarak bilinir (Col ve Col, 2003).

Bor doğada en sık borat formunda bulunur. Boratlar arasında özellikle kalsiyum ve sodyum boratlar önemli yer tutar. Boratların diğer önemli bir formu ise borik asittir ve borun insanlarda ve hayvanlarda en sık gözlenen formudur (Boncukçuoğlu ve ark., 2004). Borun çözünür formları arasında en yaygın olarak görüleni borik asittir. Borik asit (H₃BO₃); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıda ya da beyaz granüllü toz halinde bulunan bir Lewis asittir ve özgül ağırlığı 1.43 gr/cm³ tür (Barranco, 2004). Borik asitin bilinen üç formu vardır. Bunlar orto, tetra ve meta borik asitlerdir. Borik asit olarak bilinen ve en yaygın görülen formu ortoborik asittir. Bu formlar ısıнын etkisiyle oluşmaktadır. Örneğin ortoborik asit 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda önce metaborik asite, 160°C'nin üzerinde ise tetraborik asite dönüşmektedir (Kalaçay, 2013).

Endüstride bir çok türde bor bileşiğinin kullanılmasına imkan sağlayan durum borun farklı türde metal ve ametal elementlerle oluşturduğu bileşiklerin gösterdiği değişik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Endüstride kullanılan bor bileşiklerinden önemlileri başlıca; kolemanit (kalsiyum kökenli bor bileşikleri), boraks (tinkal, sodyum kökenli bor bileşikleri), üleksit (sodyum kalsiyum kökenli bor bileşikleri) olarak sınıflandırılabilir. Bunlara ek olarak probertit, kernit, szyabelit, sasolit, datolit, tüvenan, boraks pentahidrat, boraks dekahidrat, susuz boraks, sodyum per borat, borik asit, hidroborasit, susuz borik asit sayılabilir. Bir bor madeninin içinde oran olarak ne kadar yüksek B₂O₃ (boroksit) varsa, o maden diğerlerine göre daha fazla değerli olduğu öngörülmektedir. Bor ve seçilen bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.2’de yer almaktadır.

Çizelge 1.2. Bor ve seçilen bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (ATSDR(1992); U.S. EPA(1987); ECETOC(1994); WHO(1998)).

	Bor	Borik Asit	Boraks	Bor Oksit
CAS Kayıt Numarası	7440-42-8	10043-35-3	1303-96-4	1303
Molekül Formülü	B	H ₃ BO ₃	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	B ₂ O ₃
Molekül Ağırlığı	10.81	61.83	381.43	69.62
Bor İçeriği (%)	100	17.48	11.34	31.06
Fiziksel Formu	Siyah kristal veya sarı-kahverengi amorf toz	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz camsı granüller

Spesifik Yoğunluk ((20°C)	2.34	1.51	1.73	2.46
Erime Noktası (°C) Kapalı alanda	2300	171	>62	Bilgi yok
Suda Çözünürlük	Çözünmez	20°C – 4,72 100°C -27,53	20°C – 4,71 100°C -65,63	Hızla suyla birleşme

Boratlar, çevrede en sık olarak kolemanit, uleksit ve trikal şeklinde bulunur. Ancak bu bor bileşikleri doğada su ile çözünerek borik asit formuna dönüşür. Aynı zamanda bor bileşiklerinin oral yolla alımında da fizyolojik sıvılarda (kan, idrar, vb) borik asit bulunur. Bu nedenle borik asitin antioksidan özelliğinin araştırılması, aynı zamanda tüm boratların antioksidan özelliklerinin araştırılması anlamına gelecektir. Borik asit genellikle endüstride, tarımda ve kozmetik ve sağlık alanında yaygın olarak kullanılmaktadır (Hunt, 1996; Devirian ve Volpe, 2003).

Borik asit vücuda alındıktan sonra hızla absorbe edilir ve pasif difüzyon aracılığı ile tüm vücut sıvılarına dağılır. Bazı çalışmalar hem insan hem de sıçanlarda borik asitin kan doku dağılım oranının 1:1 olduğunu göstermektedir. Borik asit vücutta metabolize edilmez ve idrar yoluyla atılır. Vücuttaki yarı ömrü yaklaşık bir gün kadardır ve yumuşak dokularda birikim göstermediği tespit edilmiştir. Ancak buna karşılık borik asitin özellikle kemik dokuya karşı artmış affinitesi bulunmakta olup burada birikim gösterebilmektedir (Qureshi ve ark., 2001).

1.1.3. Borun Kullanım Alanları

Bor bileşikleri günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Tıpta (çeşitli ilaçların üretiminde, vitamin takviyesinde, kanser tedavisi gibi alanlarda), sterilizasyon ve temizlik alanında (çeşitli fungusit, insektisit ve antiseptik maddelerin üretiminde), tarımda (zirai mücadele ilaçlarında, gübre yapımında) ve çeşitli endüstriyel alanlarda (cam, seramik, metal, kozmetik gibi) kullanılmaktadır (Ayrancı, 2005).

Sektör olarak bor minerallerinin büyük bir kısmının kullanıldığı alanların başında cam sanayi gelir. Bor, oluşan nihai ürünün dayanıklılığını ve yüzey sertliğini arttırmakla birlikte cam ara mamulüne ergimiş halde koyulduğunda onun viskozitesini arttırmaktadır. İzolasyon tipi ve tekstil tipi cam elyaflarında, borosilikat camlarda özellikle bor oksit yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bor; tekstil tipi ve izalasyon tipi cam elyaflarında, borosilikat cam, sıvı kristal göstergelerinde, arabaların far ve sinyal camlarında, özel fırın kaplarında, laboratuvar malzemelerinde, LCD (Liquid Crystal Display) ekranlar ve CRT cam ürünlerinde ve cam yününde kullanılmakla birlikte ayrıca elektronik endüstrisinde, uzay sanayinde ve nükleer reaktörlerde borlu bir takım özel camlar kullanılarak geniş bir yelpazede borun araştırılmasına imkan sağlamaktadır.

Seramik sanayinde ise borun kullanım alanlarını büyük oranda sır ve fritler oluşturmaktadır. Ağırlıkça %8-24 arasında seramik sırlarında kullanılan bor oksit oranı değişiklik gösterir. Seramik sırlarda bor oksitin ana görevi, sırrın ısısal genleşme kat sayısını düzenlemek ve malzeme ile cam arasında ısı bakımından uyumu sağlamaktır. Ergimenin ilk safhasında cam oluşumunu sağlamak amacıyla sırlara bor eklenmesi bir diğer neden olarak görülmektedir. Ayrıca boratlar, sırçaların refrakter endeksini yükselterek görünümde kayda değer bir iyileşme sağlamaktadır. Çizilme direnci ve sır'ın mekanik gücü bor varlığında artar. Ayrıca bor, suyun ve kimyasalların etkisine karşı savaşarak gerekli direnci sağlar. Bunun yanı sıra borlar renklendiricilerin katılımına zemin oluştururlar. Bor oksit %20 sınırına kadar emayelerin doyumlaşma ısısını ve viskozitesini azaltmada etkin olarak kullanılabilir. Genelde sulu

boraks formu tercih edilen ve emaye içeriğinde yer alan hammaddelerin özellikle %17-32'sini bor oksit oluşturur. %3-24 aralığında ve kolemanit formunda sırlara katılan bor, seramik malzemesinin çizilmelere ve diğer fiziksel etkilere karşı dayanıklı olmasını sağlar.

Temizlik maddelerinde %10 oranında kullanılan boraks dekahidrat deterjanlar ve sabunlarda antimikrobiyal amaçlı, sodyum perboratın ise suyu yumuşatma etkisi ve ağartıcı etkisi olduğundan %10-20 oranında toz deterjanlarda genellikle kullanılmaktadır. Kimyasal formülü $\text{NaBO}_2\text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ olan sodyum perborat etkin oksijen içeriği olduğundan beyazlatmada etkilidir.

Bor elementinin bitkilerin büyümesinde etkin bir rol oynadığı bundan 82 yıl öncesinde bile bilinmesine rağmen hala bitkilerde borun nasıl bir fonksiyonu olduğu anlaşılamamıştır. Borun hücrelerin gelişimi ve bölünmesini, fotosentez reaksiyonlarını, hücreler arası şeker geçişlerini düzenlemektedir. Buna karşın yeterli miktarlarda bor olmasa da bitkiler yaprak açabilir ve gelişebilirler ancak borun yokluğunda tohum ve meyve üretiminde azalmalar kaçınılmaz olacaktır.

Sebzelerin fizyolojisi ve beslenmesi üzerine yapılan araştırmalar, borun sebzelerin kalitesini ve büyümesini önemli derecede iyileştirdiğini göstermiştir. Borun kullanılması ile sebzelerdeki gelişim ve büyüme başlangıç noktaları, bitkilerin hücre içi dolaşımındaki besleyici maddeler, hücre içi nişasta ve şeker transferi, büyüme üzerine etkili hormon oluşumu, tomurcuk ve çiçek oluşumu, kök gelişimi gibi unsurlarda kayda değer bir artış olduğu gözlemlenmektedir.

Meyve veren ağaçlar için meyve verme,  i ek açma ve meyve kalitesi yönünden bor elementi önemli bir mikro besleyicidir. Eğer meyve veren bir a a  gerekli miktarda bor içeriyorsa; meyve kapasitesinde artış,  i ek açma ve meyvenin kabuğunda ve içinde görülen   r melerde ve hasarda azalma, gerekli besleyici maddelerin ve  ekerin yapraklardan meyveye doğru iletilmesinde hız artı ı, b y memi  a a  dallarının miktarında azalma ve bununla ilişkili olarak daldan d  meden a a ta kalan meyve sayısında artış görülmektedir.

Besinlerden başka günlük hayatımızda önemli bir yeri olan kozmetik ürünler ve kullandığımız deterjanlarda da bor karşımıza çıkmaktadır. Farklı bor bileşenleri (sodyum perborat vs.)  eklinde deterjanlarda kullanılan bor, aynı zamanda kişisel bakım ürünlerinde, ev temizlik malzemelerinde ve endüstri alanında beyazlatıcı, a artıcı ve anti mikrobiyal olarak kullanılmaktadır. Kozmetik sanayisinde ise bitmiş ürünlere sağladığı yapışkanlık, yumuşaklık ve dayanıklılık gibi özellikler bakımından bor elementi tercih edilmektedir.

Bor kullanım alanının havacılık ve uçak ve endüstrisinde gün geçtikçe arttığı görülmektedir. Havacılık ve uzay sanayinde bor; kompozit bir malzeme olarak kullanımı, yüksek hız kanat uygulamalarında, aerodinamikteki yenilikler, yüksek ısıya dayanıklı gövde, yüksek kapasite düşük ağırlık ve benzeri uygulamalar üzerinde yürütülen tasarım ve geliştirme çalışmaları oldukça yaygınla tırmı tır. Borun yanıcı ancak tutu ma sıcaklığının fazla olması, yanma sonucunda çevreye zarar verecek emisyon gazlarının açığa çıkmaması ve rahatlıkla aktarılabilecek katı ürün oluşması ulaşımda kullanılan araçlarda cazip bir durum olarak kabul görmektedir. Ayrıca füze yakıtı bakımından bor ve bor bileşikleri kullanılabilmekte olup B_5H_9 (hidrojen pentaboran) ve B_2H_6 (hidrojen diboran) gibi bor hidrürlerinin potansiyel yüksek performanslı yakıt olarak uçaklarda kullanımı konusunda yapılan çalışmalar mevcuttur (Eti Maden   letmeleri Genel Müdürlüğü; <http://www.etimaden.gov.tr/>).

1.1.4. Borun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Çok sayıda gelişmiş hayvanın, yaşam döngüsünü tamamlayabilmek için bora ihtiyaç duyduğunu gösteren yoksunluk çalışmaları bulunmaktadır. Bitki ve hayvanlar için esansiyel bir mineral olduğu kanıtlanan borun insanlar için de esansiyel olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte kesin verilere ulaşmak için bu çalışmaların artırılması gerekmektedir. İnsan ve hayvanlarda ortak yürütülen bir çalışma yapılmıştır. Elde edilen veriler, insanlar için kabul edilebilir güvenli bor alım miktarının günlük 1-13 mg olması gerektiğini göstermektedir. Ancak son zamanlarda elde edilen bulgular nüfusun büyük bir kısmının günlük 1 mg'dan daha düşük bor tükettiğini ispatlamaktadır. Bu durum klinik açıdan önemli bir endişe oluşturmaktadır (Nielsen, 1998).

Bor vücuda alındıktan sonra vücutta tutulması gibi bir durum söz konusu değildir. Bor'un % 90-95 gibi bir oranı vücutta biriktirilmeden üre ile vücut dışına atılmaktadır. Sadece tırnak, kemik ve kıllarla dalak ve karaciğer gibi organlarda çok az biriktiği söylenebilir (Sayli, 2000). Bor'un toksik etkisinin çok düşük olup akut etkisinin de 2 ile 5 g arasında borik asitin doğrudan vücuda alınması sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Bor'un kronik olarak etkisinin ise yapılan çalışmalara göre idrardaki azot miktarını arttırdığı ve yalnız protein metabolizmasını etkilediği görülmüştür (Moseman, 1994). Bor'un toksik etkisi çocuklarda genelde koma, havale gibi beyin zarının tahrip edici etkileri şeklinde yetişkinlerde ise kusma, baş ağrısı, ishal, depresyon yada heyecan olarak görülmektedir. Bor ile zehirlenme belirtisi parmak uçlarında oluşan pembemsi bir renk olarak görülmektedir (Mc Kee ve Wolf, 1963). Bazı çalışmalarda ve kaynaklarda bor tozlarıyla temas eden işçilerin cinsel hayatlarında gerileme ve sperm sayılarında düşüklük olduğu iddia edilmiştir. Fakat dünyada ve ülkemizde yapılan birçok araştırmada iddia edilenin aksine bor elementinin kısırlığa neden olmadığı sonucu görülmektedir (Sayli, 2000).

Her ne kadar insan vücudu için borun düşük miktarlarına ihtiyaç duyulsa da, bor vücudumuzda sentezlenemediği için besinler yoluyla dışarıdan alınmasına gerek

duyulan elzem bir besleyici elementtir. 1981 yılı ve öncesinde insanlar üzerinde borun bir etkisinin olmadığı öngörülmekteydi. Ancak bu yıldan sonra yapılan çalışmalarda düşünülenin tam aksine borun, insanın büyüme ve gelişiminde önemli olduğu, pek çok hastalık tedavisi için ise yeri doldurulamayan bir element olduğu ortaya çıkmıştır. Bor metabolizmada, magnezyum, kalsiyum ve fosfor dengesini ayarlayarak kasların güçlenmesine, beyin fonksiyonlarının gelişimine ve sağlıklı kemiklerin oluşumuna yardımcı olur.

Bor özellikle immün sistem, üreme sistemi, iskelet ve kas sistemi, sinir sistemi, ve enerji metabolizmasına olan etkileri açısından önemli bir mineraldir. Bor alımının düşük dozda olması bu sistemlerde bozukluklara neden olabileceği bulunmuştur. Dolayısıyla günlük diyetle bora yer verilmelidir. Genel olarak meyve, sebze, baklagil, kuruyemiş açısından zengin bir diyetle bor alınabilir. Özellikle fındık, badem, hurma, elma, erik, üzüm, brokoli, domates, patates bol miktarda bor içeren besin maddeleridir (Nielsen, 2008).

Bor etkin olarak alerjik hastalıklarda, osteoporoz tedavilerinde, psikiyatride, kemik gelişiminde, menopoz ve artiritte, tedavisinde kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca sağlıklı hücrelere herhangi bir hasar vermeden ispatı kesin olmayan bir tedavi olmakla birlikte kanserli hücrelerin yok edilmesinde BNCT (Bor Nötron Yakalama Tedavisi) de rol alan bor elementi bu bakımdan da kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı olmuştur (Boren, Bor Araştırma Enstitüsü; www.boren.gov.tr).

Borik asit oral yolla uygulamadan sonra tamamı hızla absorbe olur ve gastrointestinal yoldan kan dolaşımına geçer. Çeşitli bor bileşiklerinin hipolipidemik, antienflamatuar ve antikanser özelliklerinin olduğu Barranco ve ark. (2008) tarafından ileri sürülmüştür. Ayrıca bor bileşiklerinin bakteri ve kültürü yapılmış memeli hücrelerinde genotoksik etki potansiyelinin olmadığı gösterilmiştir (Moore, 1997).

Ayrıca meyve ve sebzelerin tüketilmesiyle alınan borun birçok faydalı etkileri olduğu da bildirilmiştir (Devirian ve Volpe, 2003). Araştırma sonuçları diyetle alınan borik asit gibi bor bileşiklerinin hayvanlarda pek çok metabolik parametreleri etkilediğini göstermektedir (Hunt, 1998). Borik asitin kalsiyum ve potasyum metabolizmasında; D vitamini (Hunt, 1996), aldehit dehidrogenaz, ksantin oksidaz, sitokrom b-5 redüktaz (Hunt, 1996; Devirian ve Volpe, 2003), insülin, östrojen, testosteron, T3, T4 (Armstrong ve ark., 2001), trigliserit, glukoz ve reaktif oksijen türleri (Turkez ve ark., 2007; İnce ve ark., 2011; Turkez ve ark., 2012) üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları 2 temel hipoteze dayandırılmaktadır. Bu hipotezlerden ilki bor bileşiklerinin hücre membran fonksiyonlarında rol oynayarak hormonlar üzerine etkisini göstermesi, ikincisi ise birçok enzimatik sistemde metabolik düzenleyici olarak rol oynaması olabilir. Ancak bunların yanında bor bileşiklerinin antioksidan savunma mekanizması üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pawa ve Ali, 2006), invitro ve invivo olarak antioksidan etkisinin olup olmadığı halen araştırılmaktadır. Reaktif oksijen türleri hücre membranı ve organelleri ile etkileşerek hücre ve dokularda hasara neden olan radikallerdir. Bu radikaller çoklu yağ asitlerine atak yaparak metilen (-CH₂) grubundan bir hidrojen atomunun kopmasına ve bu şekilde lipid peroksidasyonun başlamasına sebep olurlar. Bor, organizmadaki depo glutatyon ve türevlerinin veya diğer reaktif oksijen türlerini nötralleyici ajanların miktarında artışa sebep olarak oksidatif hasar oluşumunu baskılar (Hunt ve Idso, 1999). Birçok hastalığın tedavisinde rol oynayabilecek faydalı etkilerinin bilinmesi ancak antioksidan etkisinin tam olarak aydınlatılamamış olması, borun antioksidan özelliklerinin çalışılmasını çok önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

1.2. Komet Analizleri

1.2.1. Komet Analizinin Önemi

Komet analizleri alkali ve nötral pH'da uygulanabilir. Alkali pH'da elektroforezde kullanılan çözeltinin pH'sı 13'ten büyük olmalı, nötr şartlarda

uygulanan komet testinde ise kullanılan çözeltinin pH'sı 7-10 olarak ayarlanmalıdır. Alkali pH'da yapılan komet testi ile test edilebilen DNA hasarları; çift zincir ve tek zincir kırıkları, bazik bölgeler, DNA'daki bazlarda oksitlenmiş hasar, DNA ile DNA, protein ve ilaç arasındaki çapraz geçmeler şeklindedir. Ayrıca alkali pH'da uygulanan komet testi ile DNA'daki onarım da ölçülebilir. Nötr pH'da uygulanan komet analizlerinde ise DNA'da meydana gelen hasarlardan yalnızca çift zincirde oluşan kırılmalar tayin edilebilir. Dolayısıyla, alkali pH'da uygulanan komet analizleri nötral pH'da uygulanan komete göre daha hassastır ve DNA'daki oluşan daha farklı hasarların tayinine olanak sunar.

1.2.2. Komet Testinin Prensibi

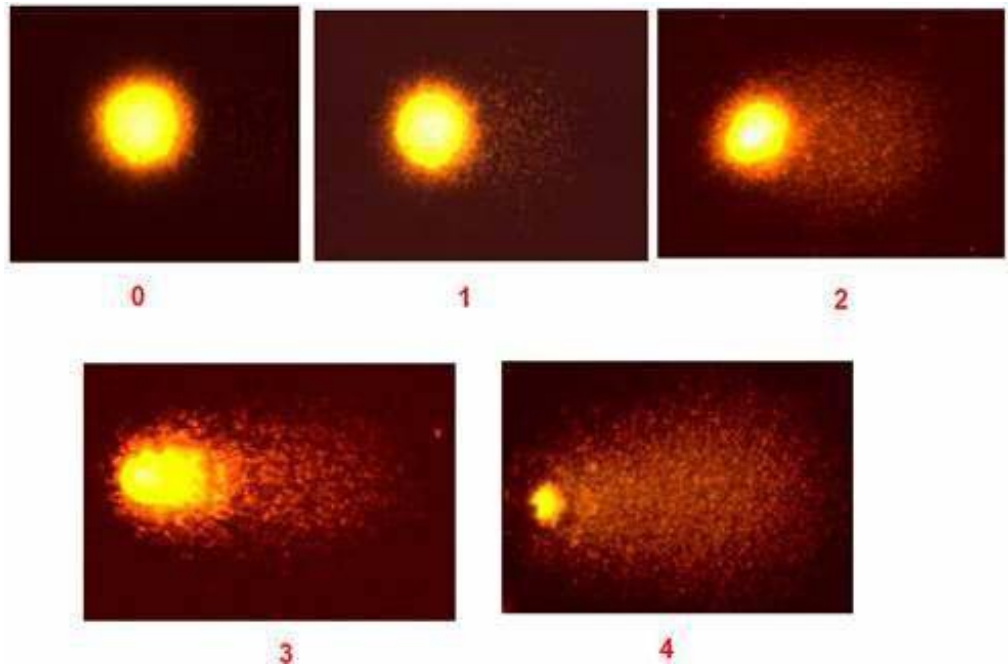
Komet testi, DNA'da meydana gelen hasarın elektroforetik yüküyle göç ederek tayin edilebilmesi esasına dayanır. DNA'da bir hasar olmadığında, DNA çekirdeğinin proteinlerle birlikte kompakt bir yapısı vardır. DNA'da hasar olduğunda ise bu kompakt yapı bütünlüğünü kaybeder DNA zincirleri gevşer; komet uygulaması sırasında kullanılan jelin içerisinde bulunan boşluklara dağılır. Komet testinde elektroforez çözeltisi içerisinde uygun akım verildiğinde, DNA sahip olduğu negatif yük nedeniyle anoda doğru göç eder. Hasar bulunmayan bir DNA, kompakt yapısı ve bütünlüğünü bozmadan kuyruksuz bir şekilde hareket ederken, hasarlı bir DNA parçalanmış küçük kısımlar nedeniyle agar üzerinde geride kalır ve mikroskop altında bu durum kuyruk şeklinde görülür. Dolayısıyla, DNA'daki hasar ne kadar büyükse agar üzerinde sürüklenen kuyruk miktarı da o kadar uzun olacaktır.

Tezimizde uyguladığımız genotoksisite testi, DNA hasarına neden olan kimyasal maddelere maruziyetin biyogöstergesi olarak kullanılır. Alkali ortamda DNA elektroforezinin yapıldığı Komet yöntemi oldukça sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu testlerden elde edilen sonuçlar ile sağlık riskleri (kanser gibi) arasında bugüne kadar bir ilişki kurulamamış olmasına rağmen, maruz kalınan kimyasal maddenin genetik materyali etkileyebildiğini göstermeleri açısından biyoizleme çalışmalarında oldukça sık olarak kullanılmaktadır.

Komet yöntemi, farklı türdeki hücre tiplerinde in vitro ve in vivo uygulanabilen DNA'daki hasarın yanı sıra DNA onarımını da tayin etmek için oldukça gelişmiş ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Analizlerin başlandığı gün sonuç verebilmesi nedeniyle diğer testlere göre hızlı, oldukça hassas, mikroskop altında daha kolay tespit edilebilen ve daha ucuz bir yöntemdir. Günümüzde genetik çalışmaların artması ile daha yaygınlaşmış ve insan epidemiyolojik çalışmalarında yer kazanmıştır.

Komet yöntemini ilk 1978 yılında bulunmuş ve kullanılmaya başlanmıştır (Rydberg ve Johanson, 1978). İlk zamanlarda komet testi DNA sarmalındaki kırılmaların tayininde kullanılmıştır. 1984 yılında ise Östling ve Johanson adlı araştırmacılar bu yöntemi geliştirmiş ve nötr pH'da elektroforez sistemini de uygulamışlardır.

Komet testi ile elde edilen hücrelerin flüoresan bir boya ile boyandıktan sonra mikroskop altında değerlendirilirken görülen kuyruk şeklinin kuyruklu yıldızı andırması sebebiyle komet ismini almıştır.



Şekil 1.1. Etidyum bromür kullanılarak floresan mikroskop altında elde edilen kometler. (0: hasarsız bir DNA'yı, 1: az hasarlı bir DNA'yı, 2: orta hasarlı bir DNA'yı, 3: hasarlı bir DNA'yı, 4: ise çok hasarlı bir DNA'ya örnektir (Collins, 2004)).

1.2.3. Komet Analizlerinin Uygulama Sahaları

Pek çok alanda yaygın olarak kullanılan komet testinin başlıca uygulama alanları;

- ❖ Ekotoksikoloji alanı
- ❖ Genotoksik etkili kimyasal maddelerin değerlendirilmesinde, Genetik Toksikoloji
- ❖ Beslenme alanı
- ❖ DNA’da meydana gelen pek çok hasarın ve onarımın belirlenmesi
- ❖ Gen üzerine toksik etkisi bulunan kimyasalların veya ilaçların etkilerinin izlenmesi
- ❖ Çevrede uygulanan izleme çalışmaları
- ❖ Oksijen yetmezliğine bağlı hastalıkların tayini
- ❖ İnsanlarda uygulanan epidemiyolojik çalışmalar

1.2.4. Komet Analizlerinin Avantajlı Yönleri

Bölüm 1.2.2’de de anlatıldığı şekilde komet yönteminin diğer DNA hasarını test eden yöntemlerle kıyaslandığında birçok üstünlüğü bulunmaktadır. Bu avantajları;

- Çok fazla girişime ihtiyaç duyulmaması,
- Her bir numune için yaklaşık 10.000 gibi az bir sayıda hücrenin çalışma için yeterli olması
- Testi uyguladıktan sonra, değerlendirme aşamasında, her bir numune için 100 kadar hücre sayımının yeterli olması (bu sayı, bilgisayarda yazılım programı kullanıldığında yeterlidir)
- Oldukça hassas bir şekilde DNA’da meydana gelen hasarın ve ayrıca onarımın tayinine olanak vermesi,
- Pek çok hücre çeşidi ile çalışılabilmesi,
- Yöntemin uygulandığı gün içerisinde tamamlanabilir olması

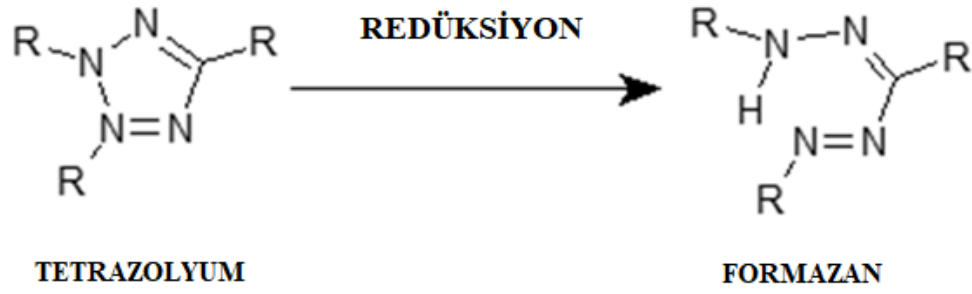
- DNA'daki pek çok hasar türünü tayin edebilmesi
- Çok az miktarda (yaklaşık 10 µl) kan veya diğer biyolojik materyallerde çalışmaya olanak vermesi.

1.3. Sitotoksisite Testi (MTT testi)

1.3.1. Sitotoksisite Testi (MTT) Prensibi

MTT yöntemi; vital bir boya olan tetrazolium bileşiği olan MTT'nin, canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından çözünmez mavi renkli formazan ürününe dönüştürülmesi esasına dayanan kolorimetrik bir yöntemdir. Oluşan mavi renk direkt canlı hücre oranını verir (Karaaslan ve ark., 2019).

MTT yöntemi in vitro olarak, metabolizmanın canlılığını değerlendirmek için kullanılan kantitatif kolorimetrik bir yöntemdir. Diğer test yöntemlerine göre daha kolay uygulanabilen, daha hızlı sonuç veren ve doğruluğu fazla olan bir yöntemdir. MTT sarı renkli bir toz olup, bir tetrazolyum tuzudur. Canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat dehidrojenaz enzimi bulunur. MTT, seçici olarak bu enzime bağlanır. Bunun sonucunda koyu mavi renkli formazan kristalleri oluşur, oluşan bu kristaller suda çözünmemektedir. Ancak izopropanol veya DMSO gibi bir organik çözücü kullanılarak çözünürler ve mor-viyole bir renk verirler. Bu rengin şiddeti konsantrasyona bağlı olarak artar ve spektrofotometrik olarak görünür dalga boylarında ölçüm yapılabilen bir absorbans verir. Bu şekilde, yaşayan hücrelerin metabolik aktivitesi ve dolayısıyla canlı hücre sayısı indirekt yolla ölçülmüş olur. (Karaaslan ve ark., 2019).



Şekil 1.2. Tetrazolyum bileşiğinin redüksiyon sonucunda Formazan bileşiğine Dönüşmesi (Karaaslan ve ark., 2019).

1.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları, ilk olarak Harisson adlı bir araştırmacı tarafından 1907 yılında keşfedilmiştir. O dönemde hücre kültürünün amacı vücutlarının dışarısında hayvan hücrelerinin incelenebilmesidir (Koçaklı ve ark., 2015). Bu sayede, invivo olarak organizmada deneyleri olumsuz etkileyebilecek faktörler ortadan kaldırılarak hücreler incelenmiştir.

Harrison tarafından yapılan bu çalışmadan sonra hücre kültürü çalışmaları farklı araştırma grupları tarafından sürdürülmüş ve 1943 yılında fare tümör hücrelerini Earle ve arkadaşları (1943) izole edebilmişlerdir. Leonard Hayflick ise 1961’de, canlı dokulardan izole edilerek kullanılan hücre kültürlerinin invitro şartlarda yaşama sürelerinin sınırlı olduğunu bulmuşlardır (Koçaklı ve ark., 2015). Bu tarihten sonra, hücre kültürlerinde in vitro şartlarda hücrelerin canlılıklarının sürdürülebilmesi ve çoğaltılması sağlanarak çalışmalar devam etmiştir (Tuncer ve Demirci, 2011).

Hücre kültürleri canlı dokular olup, flask, petri, tüp gibi uygun bir malzeme içerisinde ve üremeleri için gerekli besi yeri çözeltilisi içinde üretilerek kullanılırlar. Canlı dokular olarak insandan alınabileceği gibi; fare sıçan, tavşan gibi canlılardan da alınabilmektedir. Bu canlıların karaciğer, böbrek, beyin, akciğer, serviks gibi (sağlıklı veya kanserli) hedef organlarından alınan dokular önce parçalanır ve uygun

yöntemlerle hücrelere ayrılır. Daha sonra hücreler uygun bir tampon çözelti veya tuz çözeltisi içerisinde aminoasit, vitamin ve hayvan serumu içeren besi yeri ile karıştırılarak steril flask veya petrilere konulur. Elde edilen hücre süspansiyonu 37°C ve %5 CO₂ olan ortamda inkübe edilerek, bulundukları kabın yüzeyine tutunarak çoğalmaları sağlanır. Sonuçta elde edilen bu hücreler, in vitro çalışmalara uygun hale gelir (Haboken ve ark., 2015; Candan, 2006).

İn vitro olarak hücre ile yapılan çalışmalarda kullanılan iki tip hücre şekli vardır. Bu hücrelerden birisi primer hücre hatları, diğeri ise devamlı hücrelerdir. Primer hücreler sınırsız olarak çoğalma özelliği gösteremeyen; dış eti fibroblastları, düz kas hücreleri gibi doku ve organlardan izole edilen hücrelerin 1 günden daha uzun bir süre çoğaltılmasıyla oluşturulan hücrelerdir.

Primer hücrelerden farklı olarak, devamlı hücre hatları sınırsız olarak üreyebilme özelliğinde değişim göstermiş hücrelerdir.

İn vitro çalışmalarda yaygın olarak tercih edilen devamlı hücre hatlarına örnek olarak fare fibroblast hücreleri (L-929), embriyonik fibroblastlar (3T3), insan serviks epitelyal kanser hücreleri (HeLa), fare akciğer fibroblast hücreleri (V79) gibi hücreler verilebilir (Tuncer ve Demirci, 2011). Bu hücre hatları dışında, insan ve hayvan kaynaklı pulpa hücreleri, monositleri ve odontoblast hücre hatları da sıklıkla tercih edilen hücrelerdendir (Schmalz ve Bindeslev, 2009; Haboken, John Wiley ve Sons, 2005; Helgason ve Miller, 2005).

Aşağıdaki tabloda primer hücre kültürü ile devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.3. Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları (Tuncer ve Demirci, 2011)

	<u>AVANTAJ</u>	<u>DEZAVANTAJ</u>
PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ	• Süresiz çoğalabilme özelliğine sahiptir. • Başka kültürlerle ekilip çoğaltılabilir.	• İnsandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması zordur. • Stabil fenotipe sahip değildir.
DEVAMLİ HÜCRE HATTI	• Kolaylıkla çoğaltılabilirler. • Daha stabil bir fenotipe sahiptir.	• İn vivo özelliklerinin tümünü koruyamazlar.

Birçok araştırmaya olanak sağlayan hücre kültürünün, çeşitli avantajları ile birlikte dezavantajları da mevcuttur (Koçaklı ve ark., 2015). Aşağıdaki tabloda hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.4. Hücre kültürünün avantaj ve dezavantajları (Koçaklı ve ark., 2015)

<u>AVANTAJ</u>	<u>DEZAVANTAJ</u>
• Fizikokimyasal koşulların kültür ortamında kontrolünün sağlanabilmesi (Sıcaklık, osmotik basınç, pH, O₂, CO₂ yoğunluğu...) • Fizyolojik koşulların sabit tutulabilmesi • Araştırmacının özel bir hücre tipi üzerinde çalışmasına olanak sağlaması	• Kültür çalışmalarında kontaminasyon riskinin bulunması • Kültür ortamında mantar ve bakteri bulunması • Uzun süre pasajlama işlemi durumunda hücrelerin farklılaşma kapasiteleri ve • heterojenite oranlarında artış meydana gelmesi

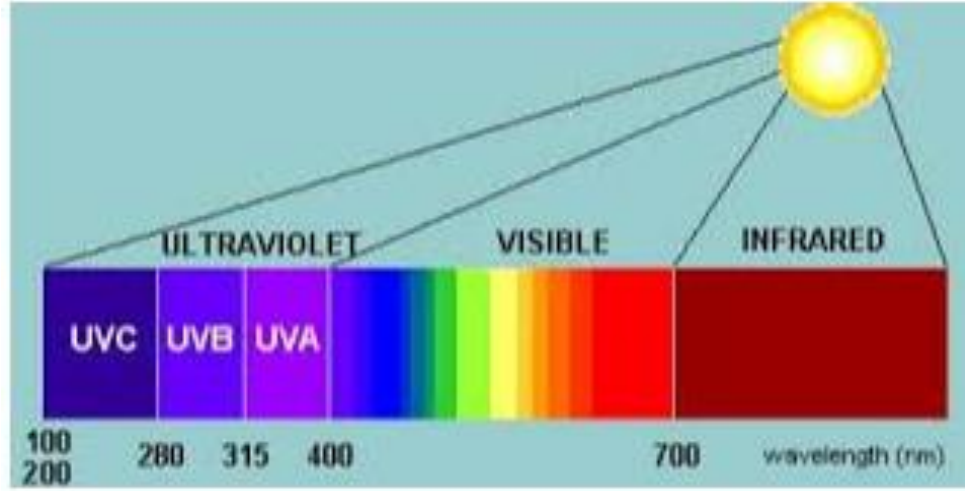
• Pasajlama işlemi ile istenilen asıl homejen hücrenin elde edilebilmesi • Başka araştırmalarda ve tekrarlı deneylerde kullanmak üzere, hücrelerin uygun şartlar altında uzun yıllar saklanabilmesi	• Uygun steril koşulların sağlanmasındaki zorluklar
--	---

Tez çalışmamızda, UV radyasyonun hedef aldığı cilt hücresi hücre hattı olarak HaCaT hücresi kullanılmıştır. HaCaT hücreleri, sağlıklı insan cilt keratinosit hücreleri olup, düzgün çoğalma özellikleri ile toksikolojik araştırmalar için uygun hücrelerdir.

1.5. UV Maruziyeti

1.5.1. Ultraviyole (UV) Işınları ve Çeşitleri

Güneş ışığının insan sağlığı üzerinde, özellikle kemikler ve kas gelişiminde D vitamini oluşumunu artırması gibi oldukça faydalı etkilerinin yanı sıra zararlı etkileri de mevcuttur. Ultraviyole radyasyon (UVR), üç tipte gruplandırılır; Ultraviyole A (UVA) (315- 400 nm) , Ultraviyole B (UVB) (280-315 nm) ve Ultraviyole C (UVC) (200-280 nm) (McGregor JM, 1996). Şekil 1.3’de UV ışınlarının dalga boyu aralıkları gösterilmiştir.



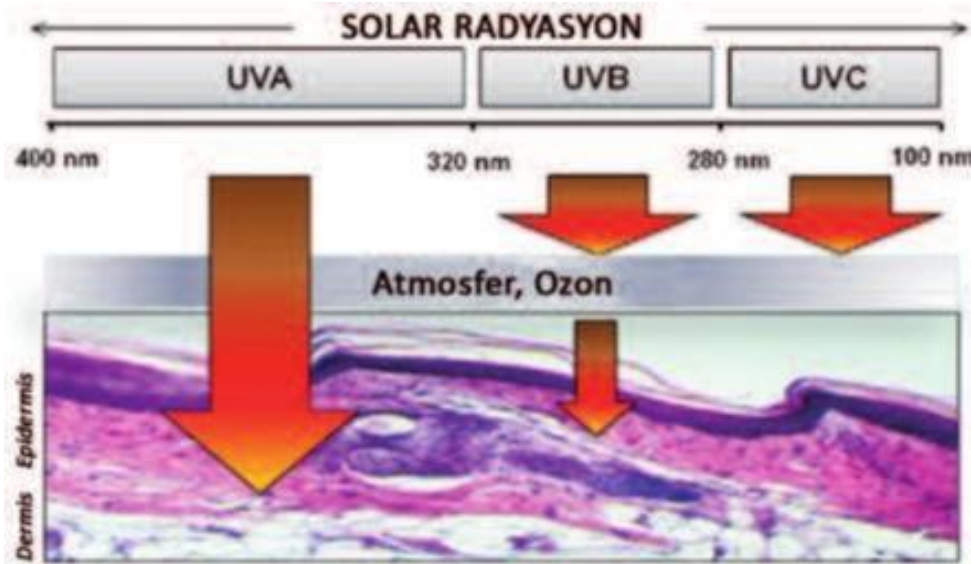
Şekil 1.3. UV spektrumu (<http://www.yenibiyoloji.com/ultraviyole-uv-isinlari-ve-cesitleri-4982/>)

UV-A uzun bir dalga boyuna sahiptir (315-400 nm) ve dünyaya her zaman ulaşır. Dünya yüzeyine ulaşan UV radyasyonunun yaklaşık % 95'ini oluşturur. Canlılar için D vitamini üretmeye yardımcı olur. Son çalışmalarda, uzun süreli maruziyetlerin UV-A'nın cilt kanseri gelişimini arttırdığı bilinmektedir.

UV-B, UV-A (280-315 nm) kadar uzun değildir. Daha kısa olduğu için, insan ve bitki hücrelerine daha çok zarar verir. Bazıları ozon tabakası tarafından filtrelendiğinden, tüm UVB dünyaya ulaşmaz. Dünyaya ulaşan az miktardaki güneş yanıklarına neden olur ve hücrelerimize ve DNA'larımıza da zarar verebilir (DNA, hücrelerimizin temel yapı taşlarıdır). Bu yüzden gözlerimizde cilt kanseri ve kataraktlara neden olabilir. Yeryüzünde bize ulaşan UV-B miktarı, günün saati, yılın zamanı ve onu bloke etmek için mevcut stratosferik ozon miktarı gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca rakım, hava koşulları ve kum, kar ve su gibi yansıtıcı yüzeylerin UV ışınlarının bir kısmını yansıttığı ve gölgeli alanların daha yüksek UV etkisine sahip olabildiği de bilinmektedir.

UV-C en kısa dalga boyuna sahiptir (200-280 nm). En tehlikeli olanıdır, ancak hepsi ozon tabakası tarafından emilir (<http://www.yenibiyoloji.com/ultraviyole-uv-isinlari-ve-cesitleri-4982/>).

Melanin UV'nin zararlı etkilerine karşı bizi koruyan doğal savunma mekanizmasıdır. Ayrıca melanin bir pigment olarak epidermal keratinositlerde yer alır. Melanozomlarla melanositlerden keratinositlere transfer edilen melanin, melanositlerde sentez edilir. UV hassasiyetinin ve deri renginin belirleyicisi epidermal melanin miktarıdır. Pheomelanin ve eumelanin olmak üzere melanin iki temel kimyasal bileşen olarak bulunur. Kahverengi ile siyah arasında bir pigment olan eumelanin, pheomelanine göre UV ışınlarının zararlı etkilerini engellemede daha etkin rol oynamaktadır. Epidermal eumelanin miktarı, UV hassasiyetini, deri rengini ve kanser riskini belirler (D'Orazio J. ve ark., 2013).



Şekil 1.4. UV ışınlarının deriden geçişi

UV ışınlarına karşı insan derisinde oluşan hassasiyet, kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Saç rengi, deri rengi, çillenme, göz rengi gibi fenotipik özelliklerimiz bu farklılıkların bir göstergesidir. Fitzpatrick, bireylerin UV maruziyeti sonrasında deride gerçekleşen reaksiyonları ve bu fenotipik özellikleri değerlendirerek bir “Deri Tipi Sınıflandırma Sistemi” geliştirmiş ve bu sisteme kendi adını vermiştir (Fitzpatrick, 1975; Fitzpatrick, 1988). Çizelge 1.5’te deri tiplerine göre UV ışınlarına deri yanıtı detaylı olarak yer almaktadır.

Çizelge 1.5. Fitzpatrick deri tipleri (Fitzpatrick TB., 1975; Fitzpatrick TB., 1988)

Fitzpatrick deri tipi	Deri rengi	Ultraviyole ışınına deri yanıtı	Kanser Riski
I	Çok açık beyaz	Her zaman yanık gelişimi Hiçbir zaman bronzlaşmaz	++++
II	Beyaz	Kolay yanık gelişimi Minimal bronzlaşma	+++
III	Beyaz-açık kumral arası	Bazen orta derecede yanık Orta derecede bronzlaşma	+++
IV	Açık kumral	Minimal yanık gelişimi Kolay bronzlaşma	++
V	Kumral	Nadir yanık gelişimi Kolay ve fazla bronzlaşma	+
VI	Siyah	Yanık gelişmez Kolay ve şiddetli bronzlaşma	+

UV ışığının zararlı etkileri, kısa dalga boyuna sahip UVB (280-315 nm) ve uzun dalga boyuna sahip UVA (315-400 nm)'dan kaynaklanmaktadır. Son zamanlarda UV radyasyona maruziyetle ilgili olarak yapılan deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar UVB ile birlikte UVA'nın da cilt kaserine neden olduğunu göstermiştir (Matsumura ve ark., 2002; Dahle ve Kvam, 2003). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, UV radyasyonu (UVA ve UVB) Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırmıştır (El Ghissassi ve ark., 2009). UVB'nin neden olduğu mutajenik etkiler yıllardır araştırılmış ve mekanizması tam olarak ortaya konmuştur. UVB mutajenitesi, siklobütan pirimidin dimeri (CPD) ve pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoürünü (6-4 PP) şeklinde oluşan iki temel pre-mutajenik DNA lezyonu ile açıklanmaktadır. Onarılamayan UVB lezyonları dipirimidin sekanslarında mutasyonlar ile (CC-TT şeklinde) UV'ye bağlı cilt kanserine neden olurlar. Buna karşılık, UVA'nın neden olduğu DNA hasarının

mekanizması henüz yapılan çalışmalar ile açıklanamamıştır. UVA DNA tarafından direkt olarak adsorbe edilmez ve hasara neden olması için endojen fotosensitizanalara (photosensitizers, PS) ihtiyaç duyar. UV'nın DNA hasarına neden olabilmesi için ihtiyaç duyduğu kabul edilen (henüz ispatlanmamıştır) fotosensitizanalara, Tip I ve Tip II fotoreaksiyonlarla $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 veya $^1\text{O}_2$ gibi reaktif oksijen radikallerinin (reactive oxygen species, ROS) oluşmasına neden olurlar (Cadet ve ark., 1997; Cadet ve ark., 2003; Cadet ve ark., 2009; Cadet ve Douki 2011). UVA maruziyeti sonucunda oksitlenmiş bazlar (8-oxo-dG, timidin-glisol gibi), abazik bölgeler ve tek zincir kırıkları gibi DNA lezyonları oluşmaktadır. UVA'nın çift zincir kırıklarına neden olduğu bazı çalışmalarda gösterilse de henüz ispatlanmamıştır (Rünger ve ark., 2012; Greinert ve ark., 2012).

Günlük yaşantımızda her gün maruz kaldığımız ve güvenli olarak düşündüğümüz her kimyasal maddenin aslında yüksek dozlarda toksik olabileceği, toksikoloji biliminin her zaman göz önünde bulundurduğu en temel prensiptir. Bu noktadan hareketle, tehlikeli kimyasal maddelerin sınıflanması ve etiketlenmesi esnasında, özellikle kimyasal maddelerin oluşturabileceği toksik etkiler değerlendirilirken, insanların iş yerlerinde veya günlük yaşam koşulları içinde maruz kaldıkları maksimum konsantrasyonların belirlenmesi ve özellikle bu konsantrasyonların toksik etki oluşturup oluşturmadığının bilinmesi büyük önem kazanmıştır. Avrupa Birliği'nin CLP (Classification, Labeling and Packaging) yönetmeliği çerçevesinde borik asit ve sodyum boratlar, üreme üzerinde toksik (reprotoxic) olan kimyasal maddeler sınıfında "Kategori 1B H360FD" altında sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama ülkemizi uzun vadede, üretilmekte olan bor ürünlerinin pazarlanmasında önemli sıkıntılarla karşı karşıya getirebilecektir. Bor maruziyetinde meydana gelebileceği iddia edilen "üreme sistemi" üzerine toksik etkiler hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. İnsanların, hayvanlarda test edilen dozlarda bora maruz kalması pratikte mümkün değildir. Bu nedenle bu güne kadar insanlarda borun üreme üzerine toksik etkilerinin olduğu gösterilememiştir.

Bununla birlikte son yıllarda UVA'nın neden olduğu dimerlerin UVB'nin neden olduğu dimerlerden daha mutajenik olduğunu, çünkü UVA maruziyetinde hücrenin daha az koruyuculu olduğu (DNA onarımı, hücre döngüsü ve apoptozis basamaklarında) ve antimutajenik hücresel cevabın oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Rünger ve ark., 2012). UVA maruziyetiyle antimutajenik hücresel cevabın UVB maruziyetiyle oluşan cevaptan daha az etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, antimutajenik hücresel DNA hasarına karşı oluşan cevapta merkez regülatör özellik taşıyan p53'ün, aynı dozlarda UVB maruziyetiyle karşılaştırıldığında, UVA maruziyetinde daha az aktif olduğu görülmüştür.

Tezimizde, borik asitin UV radyasyonun neden olduğu genotoksik etkiler üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarla birlikte bu tez, borik asitin antioksidan etkinliğini ve güneş kremi formülasyonlarında kullanılabilirliğini gösterecek nitelikte olup, bor rezervi yönünden zengin ülkemiz açısından oldukça önemli bir çalışmadır.

Bu amaçla tezimizde;

UV maruziyeti ile insan keratinosit hücrelerinde meydana gelebilecek DNA hasarının ve kromozomlarda meydana gelebilecek değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Güneş ışığının insan cildinde neden olabileceği DNA ve kromozom hasarını saptayabilmek amacıyla HaCaT hücreleri UV'ye maruz bırakılmıştır. Borik asitin koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amacıyla, HaCaT hücreleri önceden (16 saat) borik asit ile maruz bırakılmış ve sonra UV uygulaması yapılmıştır. DNA hasarını ölçmek ve değerlendirmek amacıyla laboratuvarımızda rutin olarak uygulanan komet testi kullanılmıştır. HaCaT hücreleri önceden borik asit ile maruz bırakıldıktan sonra 1.ve 2. maddelerde belirtilen şekilde UV uygulaması yapılmıştır. Bu basamakta ise insan cildinde güneş ışığı altında oluşabilecek hasar üzerinde borik asitin antioksidan etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Borik asitin, UV maruziyeti ile oluşabilecek DNA ve kromozomlarda meydana gelebilecek hasarlar üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığı Komet testleri ile araştırılmıştır.

Borik asitin UV radyasyonun neden olduğu genotoksik etkiler üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı henüz çalışılmamış bir konudur. Özellikle güneş ışığına maruziyetle UVA radyasyonun cilt kanseri üzerinde etiyolojisinde borik asitin antioksidan etkinliğinin gösterilmesi tezimiz ile elde edeceğimiz önemli bir sonuç olacaktır.

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlarla borik asidin güneş kremi formulasyonlarında kullanılmasınn faydalı olup olmayacağını göstermek tezin amaçları arasındadır. Bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlara göre borik asidin güneş kremi formulasyonlarında kullanılması nerilebilecektir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Sarf Malzemeleri

- Agar, erime noktası küçük- LMA (Sigma, ABD)
- Agar, erime noktası noktalı- NMA (Sigma, ABD)
- Fötal Bovin Serum (Gibco, Finlandiya)
- Streptomisin/Penisilin çözeltisi (Biological Industries, İsrail)
- Yüksek glukoz DMEM (Gibco, Finlandiya)
- Tripsin-EDTA çözeltisi (Biological Industries, İsrail)
- PBS tabletleri (Sigma, ABD)
- DMSO (Serva, ABD)
- Sodyum klorür (Amresco, ABD)
- Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
- Tris (Sigma, ABD)
- Sodyum lauril sarkosinat (Sigma, ABD)
- Triton x-100 (Sigma, ABD)
- Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
- Etidium bromür (Sigma, ABD)
- Hidrojen peroksit (Sigma, ABD)
- Na₂EDTA (Amresco, ABD)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

- Radyometre (Lutron YK-35UV, spectrum 290 nm-390nm, ABD)
- Karbondiyoksit inkübatörü (Heal Force HF240, Çin)
- Santrifuj cihazı (Hettich Rotina 90, Almanya)

- pH metre cihazı (WTW pH 330i, Almanya)
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad TC20, Singapur)
- İnverted Mikroskop (Micros MCX 7600, Avusturya)
- Fluoresan Mikroskop (komet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)
- Multiplaka okuyucu (Thermo Scientific Mutiskan Co., Finlandiya)
- Plaka çalkalayıcı (Heidolph Titramax 101, Almanya)
- Su banyosu (Boeco, Ultraterm BWT-U, Almanya)
- Derin Dondurucu (-20°C) –(-80°C), (Scancool, Almanya)
- Steril çalışma kabini (Esco, Class II Biological Safety Cabinet, Singapur)
- Sterilizatör (Sanyo MAC 235EX, Japonya)
- Hassas terazi (Sartorius CP225D, Türkiye)
- Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)
- Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
- Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Stop medyum çözeltisi: %60 DMEM ve %40 FCS karıştırılarak hazırlanır. +4°C’de kullanılıncaya kadar saklanır.

Stok MTT Çözeltisi: MTT boyası 5 mg tartılarak, 1 ml distile su içerisinde çözülür. +4 °C’de saklanır.

Hücreleri lize eden lising stok çözeltisi: 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris ve 2,5 M NaCl hesaplanarak tartılır ve distile su ile çözülerek pH’sı NaOH ile 10’a ayarlanır. pH ayarlandıktan sonra içerisine %1 oranında sodyum lauril sarkosinat tartılarak katılır. Bu çözelti en az 1 gün boyunca karıştırılır. Bu stok çözeltiye %1 triton ve %10 DMSO taze olarak deneyin yapılacağı gün ilave edilir ve 1-2 saat +4 °C’de soğutularak kullanılır.

Agar- Erime noktası düşük özellikte (LMA): PBS tabletlerinden hazırlanan çözelti içerisinde %0,75'lik agar tartılıp ısıtılarak çözülür. Deneyin yapılacağı gün donmuş olan agar çözülerek 37 °C'de kullanılır.

Agar- Erime noktası normal özellikte (NMA): PBS tabletlerinden hazırlanan çözelti içerisinde %1'lik agar tartılıp ısıtılarak çözülür. Hazırlanan çözelti sıcak olarak kullanılır, lamalar bu sıcak agar çözeltisinin içerisine daldırılır, agar ile kaplanmış olur, oda sıcaklığında lamaların kuruması sağlanır. Deney yapılacağında en az 2 gün kuruması beklenmiş bu lamalar kullanılır.

Nötralizasyon tamponu: 0,4 M Tris tartılır, distile suda çözüldükten sonra pH'sı NaOH yardımıyla 10'a ayarlanır.

Alkali elektroforez tamponu: Ayrı ayrı 300 mM stok NaOH ve 1 mM Na₂EDTA hazırlanır ve deney günü taze olarak pH:13'ten büyük olacak şekilde karıştırılarak hazırlanır.

Etidyum bromür çözeltisi: Stok olarak 200 µg/ml etidyum bromür çözeltisi distile suda çözülerek hazırlanır. Bu çözeltiden deneyin mikroskopta değerlendirme aşamasında 20 µg/ml seyreltilerek hazırlanır ve her bir örnek için lamalara 3-5 damla ilave edilip lamel kapatılarak kullanılır.

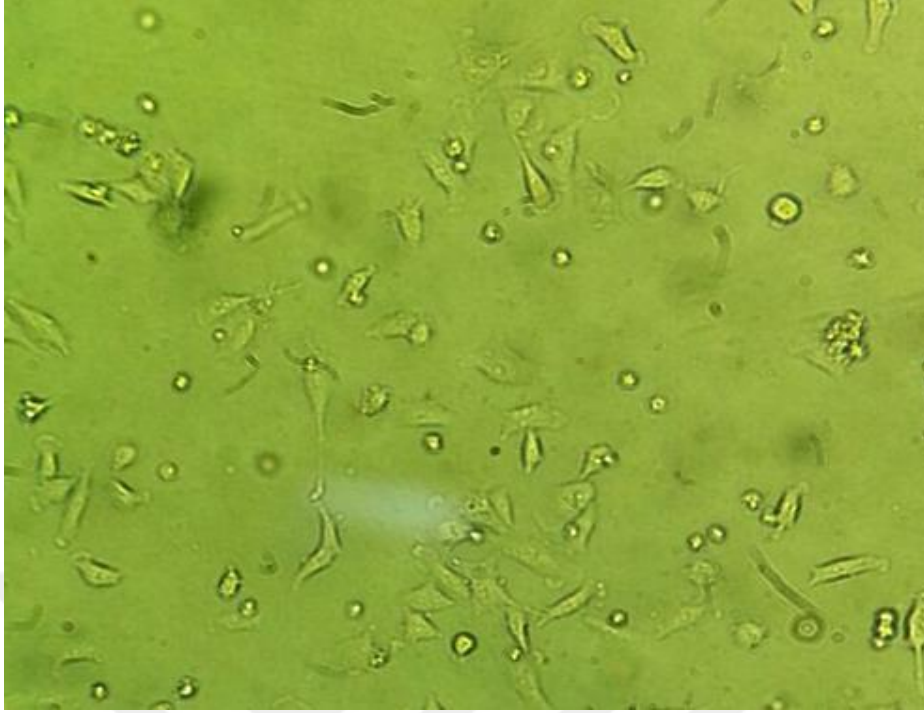
Yüksek glukoz içeren besi yeri ortamı, DMEM: Uygun DMEM hazır olarak alınır, içerisine %10 FCS, %1 Penisilin-streptomisin çözeltisi eklenir. +4 °C'de saklanarak kullanılır. Deney esnasında ise 37 °C'lik su banyosunda ısıtılır ve besi yeri olarak kullanılır.

2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması

Sıvı azotta saklanan hücreler çıkarıldı.

HaCaT hücrelerinin çoğaltılması:

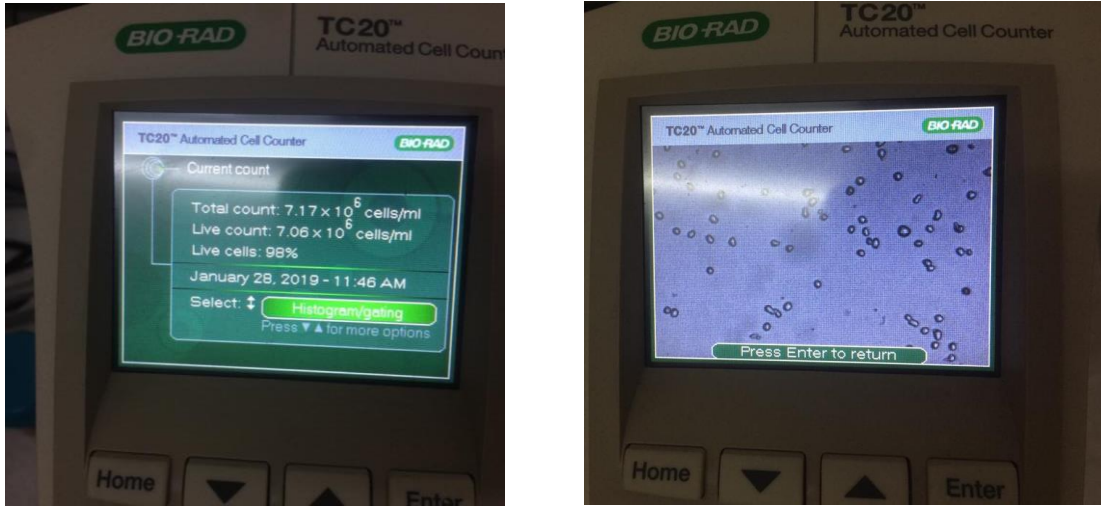
- Sıvı azottan çıkarılan hücrelerin 37 °C’de hızlıca çözünmesi sağlandı.
- Hood (Laminar Air Flow) altında 15 ml’lik steril santrifüj tüpünde 10 ml (37 °C) DMEM medyum içerisine aktarıldı. 1300 rpm’de, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz pastör pipeti yardımıyla steril koşullarda vakumla atıldıktan sonra alt fazdaki hücrelerin üzerine 10 ml DMEM medyum ilave edildi. Hücreler medyum içerisine pipetle çek-bırak yöntemi kullanılarak homojen olarak dağıtıldı. Hücrelerin hepsi alınıp 25 cm²’lik flaskla inkübatöre kaldırıldı (37°C, % 5 CO₂). Azottan çıkan hücrelerin ürememe, çoğalmama olasılığına karşı pasajlama işlemini birkaç kez tekrarladıktan sonra hücrelerin düzenli çoğalıp çoğalmadığı kontrol edildi. 3 günde bir hücreler tripsinlenerek yeni besiyeri ortamına ilave edilerek pasajlandı. Hücrelerin düzenli üredikleri kontrol edildikten sonra, analizler yapıldı (analizler sırasında da bu pasaj işlemi tüm analizler bitene kadar devam etmektedir).



Şekil 2.1. HaCaT hücrelerinin mikroskop altında görüntüsü

HaCaT hücrelerinin pasaj işlemi:

- Flasktaki DMEM medyum aspire edildi.
- 2 ml steril PBS (37°C) ile yıkandıktan sonra, PBS aspire edildi.
- 2 ml tripsin (37°C) konulduktan sonra ve 37°C’de 6-8 dakika bekletildi.
- 2 ml STOP medyum ilave edildi ve hafifçe çalkalandı (tripsinin çalışmasını durdurmak için).
- Bu 4 ml’lik hücre suspansiyonu pastör pipet ile 15ml’lik tüpe aktarıldı.
- 1000rpm oda sıc. 6-7 dakika santrifüj edildi.
- Tüpün dibinde görünen pellete dokunmadan üst fazı pastör pipet ile atıldı.
- Pelletin üzerine bir miktar (yaklaşık 2 ml) DMEM medyum ilave edildi.
- Pastör pipet ile çek-bırak şeklinde karıştırıldı ve hücre sayımı yapıldı.
- Yeni pasaj için 5ml DMEM medyum içerisinde 300.000 hücre olacak şekilde flaska konuldu.



Şekil 2.2. Sayım cihazında hücrelerin sayısı ve görünüşleri

2.4. Borik Asit Maruziyeti

İnsan keratinosit hücrelerine (HaCaT) borik asitin 3 farklı konsantrasyonu uygulandı. HaCaT hücrelerinde test ettiğimiz borik asit konsantrasyonları, insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda tespit edilmiş olan kan bor (22.1 – 499.2 ppb) konsantrasyonlarını kapsayacak şekilde planlanmıştır. Dolayısıyla günlük bor maruziyeti neticesinde insanlarda oluşabilecek kan bor konsantrasyonunun deneylerde test edilmesine dikkat edilmiştir.

Borik asit için: 10 μ M'lık stok çözeltisi distile suda çözülerek hazırlandı ve seyreltmelerle aşağıdaki konsantrasyonlar elde edilerek hücrelere uygulandı. Borik asit konsantrasyonları hücrelere 16 saatlik ön maruziyet olacak şekilde ayarlandı. 16 saatin sonunda hücreler UV ile maruz bırakıldı.

HaCaT hücrelerine uygulanan borik asit konsantrasyonları: 2.5, 5, 10 μ M

Karşılık gelen bor eşdeğerleri: 27, 54, 108 ppb (ng/mL)

2.5. UV Maruziyeti

UV maruziyeti OSRAM ULTRA-VITALUX 300W - 230V (280-400 nm) güneş ışığı simülasyon lambası (sun light simulation lamp) (Şekil 2.3) kullanılarak araştırılmıştır.

96 kuyucuklu plakanın etrafı boş olacak şekilde HaCaT 3000 hücre/kuyucuk ekim yapıldı. Plaka 24 saat 37C inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra güneş ışığı simülatör lambasının 40 cm altına gelecek şekilde 96 kuyucuklu plaka yerleştirildi. Radyometre yardımıyla ışınlanacak bölge içerisinde doz hızı homojen olmasına gayret gösterilerek 2,25 mW/cm² olacak şekilde ayarlandı. Işınlama süresi boyunca hücrelerin lambanın ısısından etkilenmemesi için vantilatör ve buz aküleri kullanılarak soğuk hava akımı sağlandı. Sıcaklık termometre ile monitörize edilerek 37 C' den fazla yükselmesi engellendi. Plakanın ışınlanmayacak olan kısmı siyah ışık geçirmeyen kapak ile örtüldü. En yüksek sürede ışığa maruz kalacak hücre grubu açık bırakıldı ve 60 dakika geri sayım süresi başlatıldı. Bu süre zarfında lamba ve plakanın yerinden hareket etmemesi için işaretlendi. Geri sayımda süre 40 dakikaya geldiğinde siyah ışık geçirmeyen kapak yana kaydırılarak 40 dakika ışınlanacak grup açıldı. Bu şekilde hücrelere 60-45-30-15-10-5-1 dakika UV maruziyeti gerçekleştirildi. Süre sıfır olduğunda plaka ile ışık maruziyeti kesildi. Negatif kontrol grubu da aynı plaka içerisinde olacak şekilde ışık ile temas etmemiş oldu. Medyum, MTT içeren medyum ile değiştirildi. MTT yöntemi uygulandı.

Hücrelerin maruz kaldığı UV doz oranı, radyometre kullanılarak hesaplandı.

Doz oranı: 1 mW/cm² = 0.1 kW/m² UVR 280-400 nm (UVA-UVB) Doz: kW/m²
X sn = kJ/m² Kaynak mesafesi: 40 cm

Bölüm 3.2.2'de verilen sonuçlara göre kaynak mesafesi 40 cm olarak ayarlandığında 21 dakikalık UV uygulaması ile hücrelerin %50'si ölmektedir (IC50=21 dk). Komet testinden elde ettiğimiz sonuçlarda da 40 dakikalık UV

uygulaması hücrelerin tamamen dağılmasına sebep olmuştur. 15 dakikalık UV maruziyetinde ise hücreler çok hasarlı bulunmuştur.

Bu nedenle aynı OSRAM UV lambası kullanılarak bu kez 60 cm kaynak mesafesiyle ayarlanarak testler tekrarlanmıştır.



Şekil 2.3. Osram güneş ışığı simülatör lambası ile UV maruziyeti

UV maruziyetinden sonra hücrelere verilen radyasyonun şiddeti radyometre (UV Light meter, Lutron YK-35UV, spectrum 290 nm-390nm) ile ölçülmüş ve doz oranı hesaplanmıştır.

2.6. Sitotoksisite Testi (MTT) Yapılışı

Kültürü yapılan hücrelerin ml'deki sayısı belirlendi. Hücre süspansiyonundan 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 200 µl konulacak şekilde hücre sayısı ayarlandı. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lık CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Test edilecek olan kimyasal maddeler ve pozitif kontrol hazırlandı. 24 saat sonra hazırlanan test kimyasal maddelerinin konsantrasyonları ayarlandı. Kuyucuklar içerisindeki medium aspire edilerek test kimyasal maddelerinin ve pozitif kontrolün medyumları ilave edildi. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lık CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. 3. gün

kuyucuklar içerisindeki medyum aspire edildi. MTT stok çözeltisinden 20 µl ilave edildi ve 37 °C’lik CO2 inkübatöründe 2-3 saat inkübe edildi (formazon kristallerinin oluşabilmesi için en az 2 saat bekletilmelidir). 3 saatin sonunda plakalar alınarak aspire edildi. Sonra 200 µl DMSO ilave edilerek 10 dakika homojenliği sağlamak amacıyla çalkalandı. Multiplaka okuyucuda dalga boyu 540 nm olarak ayarlandı ve absorbanlar okundu. Elde edilen değerlere göre canlılık değerleri belirlendi ve IC50 değerleri hesaplandı.



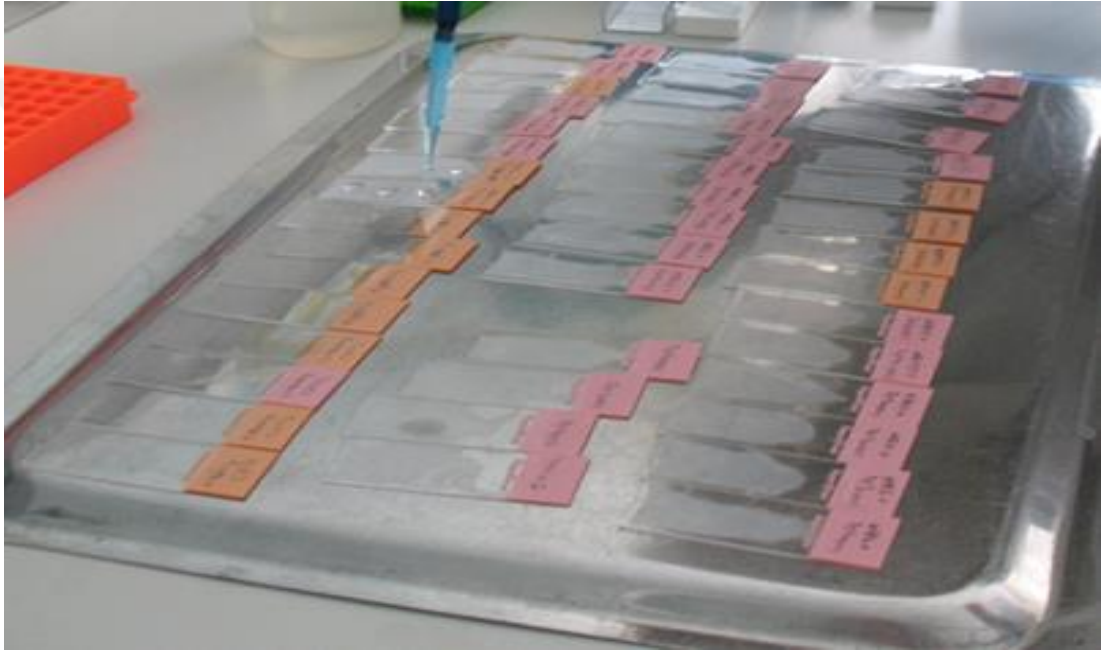
Şekil 2.4. Multiplaka okuyucu

2.7. Komet Testinin Yapılışı

DNA hasarını indüklediği bilinen H₂O₂, pozitif kontrol olarak 50 µM konsantrasyonda kullanılmıştır.

Mikroskop altında her bir numune için yaklaşık 20.000 hücre elde edebilmek amacıyla her bir flaska 500.000 hücre/2mL besi yeri olacak şekilde HaCaT hücreleri 6 kuyucuklu plakalara ilave edildi.

Hücreleri agara alma: Plakalarda üreyen hücreler sayıldı. İnkübatörde çoğalmaları için bekletildi. Kimyasal maddeye uygun konsantrasyonlarda maruz bırakıldı. Hücreler plakalardan pasajlanarak tüplere alındı. Her bir hücre için süspansiyondan 50 µl alınarak 100 µl LMPA ile karıştırıldı. NMPA ile önceden kaplanmış lamların üzerlerine damlatıldı ve katılaşmadan lamel ile üzeri kapatıldı. Lamalar soğuğu iletecek şekilde buz üzerinde yerleştirilmiş metal bir yüz üzerine dizilerek 5 dakika katılaşması için bekletildi.



Şekil 2.5. Hücrelerin lamlara yayılma aşaması

Lysing: Lysing stok çözeltisinden taze olarak hazırlanıp soğutulan lysing çözeltileri şalelere alındı, lam üzerindeki agar içerisine sabitlenen hücreler bu çözeltiye maruz bırakıldı. Şalelerdeki lamalar +4°'de 1 saat karanlıkta bekletildi.



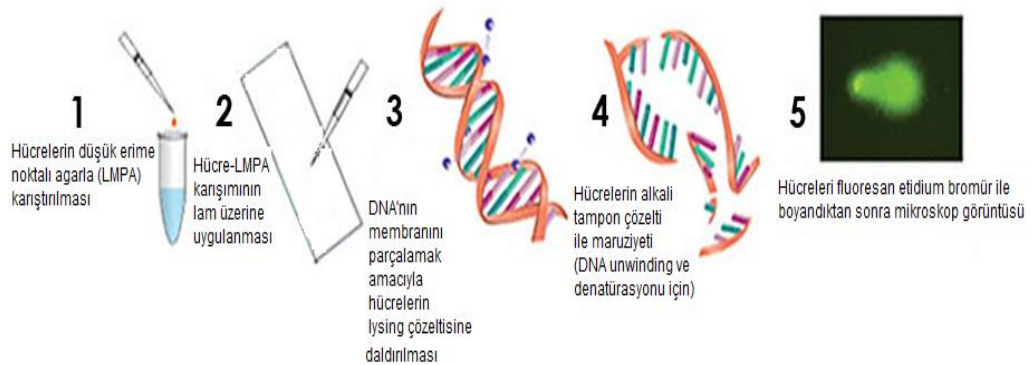
Şekil 2.6. Hücrelerin lysing solusyonunda bekletilmesi

Alkali pH'da maruziyet ve elektroforez uygulaması: Komet yöntemi için özel olarak alınmış koyu renk materyalden üretilen tanklara, taze olarak hazırlanıp soğutulmuş elektroforez tampon çözeltisi uygun miktar ayarlanarak dolduruldu. Bu miktar, tankın uzunluğu dikkate alınarak verilen akımın 0.7 V/cm olacak şekilde hesaplandı. Lamlar, lysing çözeltisi içeren şalelerden çıkarıldıktan sonra agarlı taraflarının üst kısma gelmesine dikkat edilerek tankın iç kısmına yan yana hiç boşluk kalmayacak şekilde dizildi. DNA zincirinin açılıp, alkali bölgeler, tek zincir kırıkları ve çapraz geçişlerin çift zincir kırıklarına dönüşebilmesi için akım uygulanmaksızın bu çözeltide 20 dakika bekletildi. 20 dakikanın sonunda; 25 V ve 300 mA 20 dakika elektroforezde akım uygulanarak hücrelerin göç etmesi sağlandı.



Şekil 2.7. Hücrelerin elektroforez çözeltisi içerisinde bekletilmesi

Alkali pH'nın Nötralizasyon işlemi: Alkali şartlarda yürütülen elektroforez basamağından sonra lamlar tanktan dikkatlice çıkarıldı ve tekrar şalelere dizildi. pH'yı nötralize edebilmek amacıyla 3x5 dakika nötr pH'daki nötralizasyon çözeltisi kullanılarak yıkandı. Son aşama olarak lam üzerine hücrelerin sabitlenmesi amacıyla sırasıyla %50, %75 ve %96'lık alkol içerisinde lamlar 5'er dakika bekletildi. Sonuçlar mikroskop altında değerlendirilinceye kadar bu şekilde lamlar kutulara dizilerek saklandı.



Şekil 2.8. Komet testi aşamaları

Lamların floresan boya ile boyanarak mikroskopta okunma aşaması: Her bir örnek için lam üzerine 20 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür çözeltisi 60 µl olacak şekilde damlatıldı ve üzerlerine lamel kapatıldı. Floresan mikroskop kullanılarak, her örnek için 100 hücre işaretlendi ve Comet assay IV yazılım programı ile sayıldı. Sonuçlar excell formatında bilgisayara kaydedildi.



Şekil 2.9. Fluoresan Mikroskop (komet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)

2.8. İstatistiksel Değerlendirme

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar “SPSS version 22.0” kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve sonuçlar yorumlanmıştır. MTT test sonuçlarından elde edilen IC50 değerleri student *t*-test kullanılarak değerlendirilmiştir. Komet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde ise her bir numune için tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanılmış ve one-way Anova testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar

arasındaki fark Fischer's least significant difference (LSD) test ile yapılmıştır. Anlamlılık $p<0.05$ şeklinde alınmıştır.



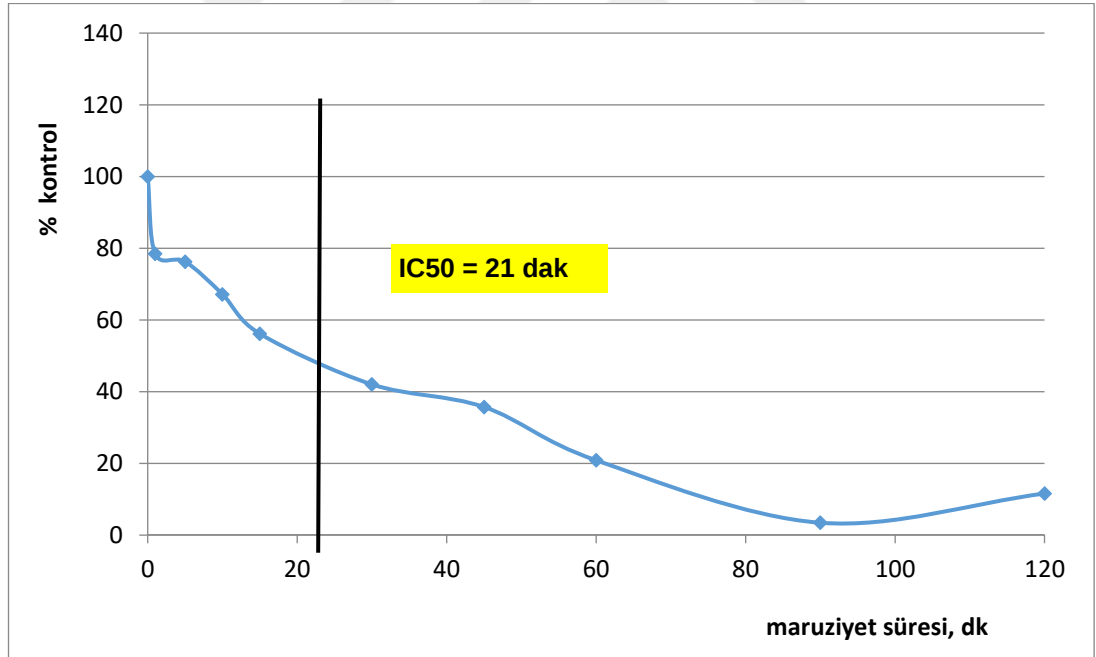
3. BULGULAR

3.1. Sitotoksosite, MTT Testi Sonuçları

3.1.1. UV Maruziyeti ile Elde Edilen MTT Testi Sonuçları

UV maruziyeti için Osram markalı güneş ışığı simülatör lambası 40 cm kaynak mesafesi kullanılarak sitotoksosite testi uygulanmıştır. Radyometre ile ölçülen doz oranı hesaplanmıştır.

Doz oranı: $1 \text{ mW/cm}^2 = 0.1 \text{ kW/m}^2$ UVR 280-400 nm (UVA-UVB) Doz:
 $\text{kW/m}^2 \times \text{sn} = \text{kJ/m}^2$ Kaynak mesafesi: 40 cm



Şekil 3.1. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile elde edilen MTT sonuçları

Çizelge 3.1. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile elde edilen MTT sonuçları

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	0,6 kJ/m ²	3 kJ/m ²	6 kJ/m ²	9 kJ/m ²	18 kJ/m ²	27 kJ/m ²	36 kJ/m ²
% canlılık	100,0	78,5	76,3	67,2	56,2	42,0	35,7	20,8

Şekil 3.1 ve Çizelge 3.1’de görüldüğü gibi kaynak mesafesi 40 cm olarak ayarlandığında 30 dakikalık UV uygulaması ile hücrelerin %50’si ölmektedir. Bu nedenle aynı UV lambası, bu kez 60 cm kaynak mesafesiyle ayarlanarak ve en fazla 60 dakika maruziyetle sitotoksisite testleri tekrarlanmıştır. Radyometre ile ölçülen radyasyon miktarına göre doz oranı hesaplanmıştır.

Doz oranı: $1 \text{ mW/cm}^2 = 0.1 \text{ kW/m}^2$ UVR 280-400 nm (UVA-UVB) Doz:
 $\text{kW/m}^2 \times \text{sn} = \text{kJ/m}^2$ Kaynak mesafesi: 60 cm

Elde edilen bulgular Çizelge 3.2’de verilmiştir.

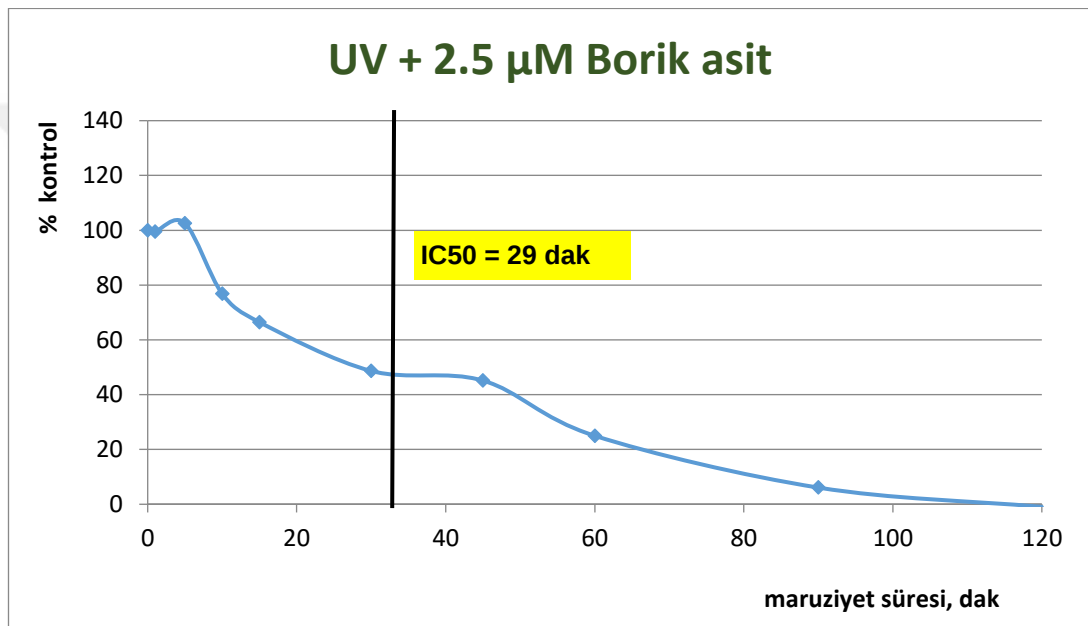
Çizelge 3.2. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 60 cm) maruziyeti ile elde edilen MTT sonuçları

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	0,6 kJ/m ²	3 kJ/m ²	6 kJ/m ²	9 kJ/m ²	18 kJ/m ²	27 kJ/m ²	36 kJ/m ²
% canlılık	100,0	98,5	96,3	97,2	96,2	80,0	60,7	55,9

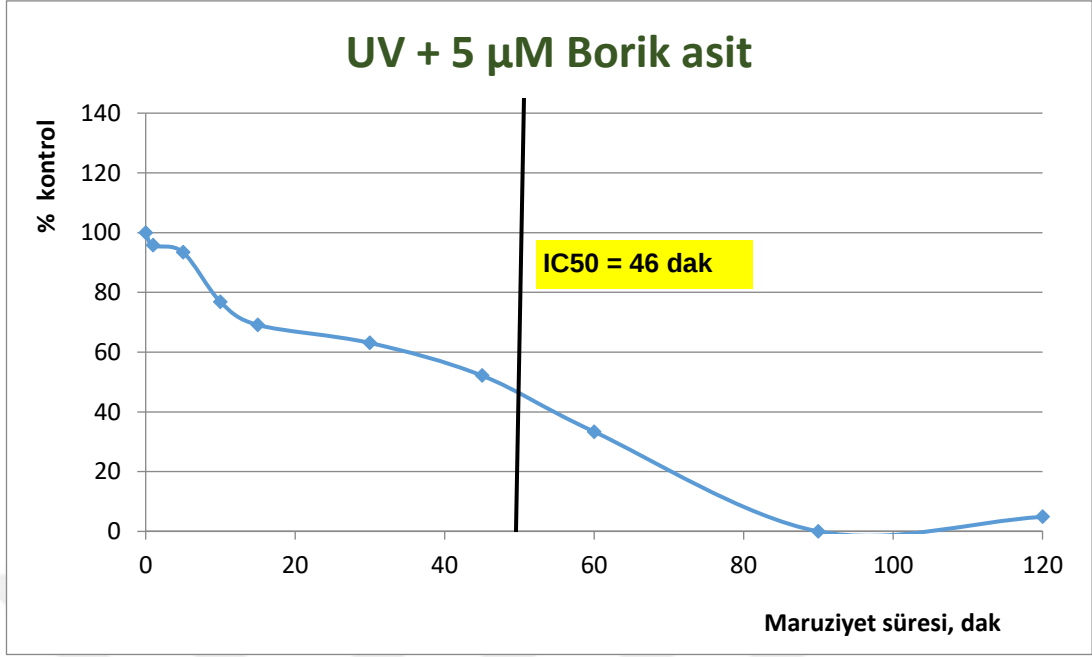
Elde ettiğimiz canlılık değerlerine göre, 40 cm kaynak mesafesi ile UV maruziyetinde daha yüksek sitotoksisite görüldüğünden; borik asit maruziyetleri UV lambanın 40cm kaynak mesafesi ile uygulanmıştır.

Bölüm 2.4 ve 2.5’te anlatılan şekilde HaCaT hücrelerine borik asitin 2.5, 5 ve 10 μM ’lık konsantrasyonlarının ön maruziyeti ve 40 cm’lik UV kaynak mesafesi ile maruziyet sonucu elde edilen MTT testi sonuçları ve IC değerleri Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4’te verilmiştir.

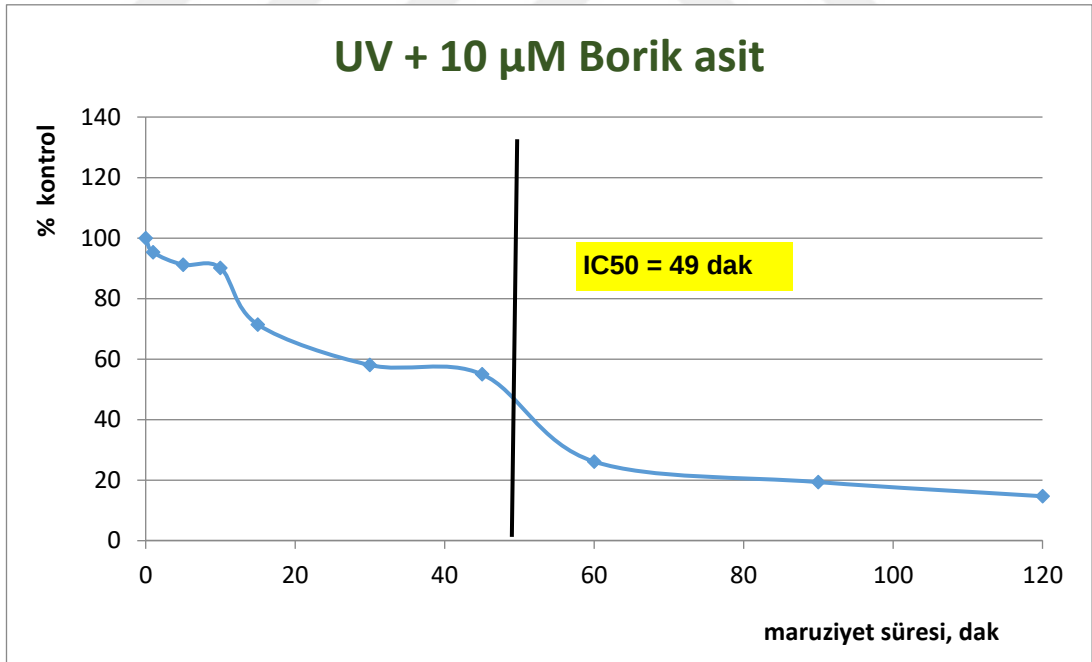
3.1.2. HaCaT Hücre Kültüründe UV ve Borik Asit Uygulanmasıyla Elde Edilen Sitotoksosite (MTT) Sonuçları



Şekil 3.2. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 2.5 μM borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu



Şekil 3.3. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 5 μ M borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu



Şekil 3.4. HaCaT hücrelerine UV ile birlikte 10 μ M borik asit uygulanmasıyla elde edilen sitotoksosite sonucu

HaCaT hücrelerine 40 cm'lik UV kaynak mesafesi ile UV maruziyetinden elde edilen IC50 değeri ile; borik asitin 2.5, 5 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarının ön maruziyeti ve 40 cm'lik UV kaynak mesafesi ile maruziyet sonucu elde edilen IC50 değerleri karşılaştırılmış ve borik asitin test edilen her üç konsantrasyonda UV radyasyonun sitotoksitesini azalttığı, 5 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarda bu etkinin anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$, student *t*-test). Elde edilen % canlılık değerleri Çizelge 3.3'te, IC50 değerleri ise Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Borik asit ve UV maruziyetleri ile elde edilen % canlılık değerleri

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
UV % canlılık	100	78,5	76,3	67,2	56,2	42	35,7	20,8
UV + 2.5 µM BA % canlılık	100	82,1	76	65,2	60	49,1	40	30,3
UV + 5 µM BA % canlılık	100	88,9	80	73,2	65,8	60	51,3	41,1
UV + 10 µM BA % canlılık	100	90	82,5	74,1	68,7	62,1	54	40

Çizelge 3.4. Borik asit ve UV maruziyetleri ile hesaplanan IC50 değerleri, * $p<0.05$, student *t*-test

	IC50 değerleri
UV maruziyeti	21 dak.
UV + 2.5 µM borik asit	29 dak.
UV + 5 µM borik asit	46 dak.*
UV + 10 µM borik asit	49 dak.*

3.2. Genotoksisite (Komet) Testi Sonuçları

3.2.1. UV Maruziyeti İle Elde Edilen Komet Testi Sonuçları

UV maruziyeti ike komet testi Osram markalı güneş ışığı simülatör lambası 40 ve 60 cm kaynak mesafeleri kullanılarak uygulanmıştır.

Doz oranı: $5 \text{ mW/cm}^2 = 0.5 \text{ kW/m}^2$ UVR 280-400 nm (UVA-UVB) Kaynak mesafesi: 40 cm

Çizelge 3.5. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 40 cm) maruziyeti ile elde edilen komet testi kuyruk yoğunluğu sonuçları

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	3 kJ/m ²	15 kJ/m ²	30 kJ/m ²	45 kJ/m ²	90 kJ/m ²
Komet Kuyruk Yoğunluğu	2,90	14,25	28,97	49,11	84,11	x

Çizelge 3.5’de görüldüğü gibi Kaynak mesafesi 40 cm olarak ayarlandığında 30 dakikalık UV uygulaması ile hücrelerin %50’si ölmektedir. Bu nedenle komet testinde 30 dakikalık maruziyetin üzerine çıkılmamıştır. Komet testinden elde ettiğimiz sonuçlarda 30 dakikalık UV uygulaması hücrelerin tamamen dağılmasına sebep olmuştur. 15 dakikalık UV maruziyetinde ise hücreler çok hasarlı bulunmuştur. Bu nedenle aynı UV lambası, bu kez 60 cm kaynak mesafesiyle ayarlanarak ve en fazla 60 dakika maruziyetle komet testi tekrarlanmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Doz oranı: $1 \text{ mW/cm}^2 = 0.1 \text{ kW/m}^2$ UVR 280-400 nm (UVA-UVB) Doz: kW/m^2
X sn = kJ/m^2 Kaynak mesafesi: 60 cm

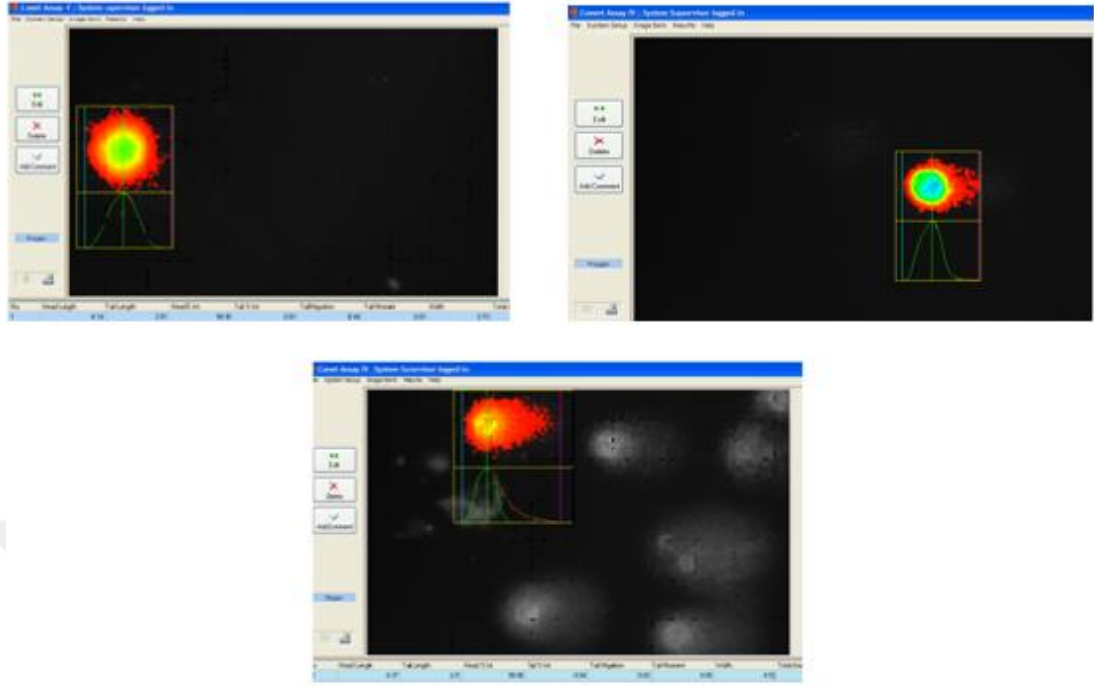
Çizelge 3.6. Osram UV lambası kullanılarak UV (kaynak mesafesi 60 cm) maruziyeti ile elde edilen komet testi kuyruk yoğunluğu sonuçları

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	0,6 kJ/m ²	3 kJ/m ²	6 kJ/m ²	9 kJ/m ²	18 kJ/m ²	27 kJ/m ²	36 kJ/m ²
Komet Kuyruk Yoğunluğu	5,38	4,59	6,15	8,16	20,07	25,05	35,76	44,44

UV maruziyeti ile elde ettiğimiz komet testi sonuçlarına göre borik asit maruziyetleri 60 cm kaynak mesafesi ile uygulanmıştır.

3.2.2. UV ve Borik Asit Maruziyeti İle Elde Edilen Komet Testi Sonuçları

Bölüm 3.1.1’de anlatıldığı şekilde uygulanan komet testi ile elde edilen mikroskop görüntüleri ve kuyruk yoğunluğu (tail intensity) sonuçları aşağıda sunulmuştur.



Şekil 3.5. Fluoresan mikroskopta hasarsız, az hasarlı ve hasarlı DNA görüntüleri

Borik asitin 2.5, 5 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarına ön maruziyet ile birlikte UV uygulaması ile elde edilen komet sonuçlarına ait ortalama kuyruk yoğunlukları Çizelge 3.7-3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.7. UV ile birlikte 2.5 μM borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları (UV+ 2.5 μM BA)

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m^2	0,6 kJ/m^2	3 kJ/m^2	6 kJ/m^2	9 kJ/m^2	18 kJ/m^2	27 kJ/m^2	36 kJ/m^2
Komet Kuyruk Yoğunluğu	5,4	4,35	6,1	8,05	19,06	25,05	34,4	44,5

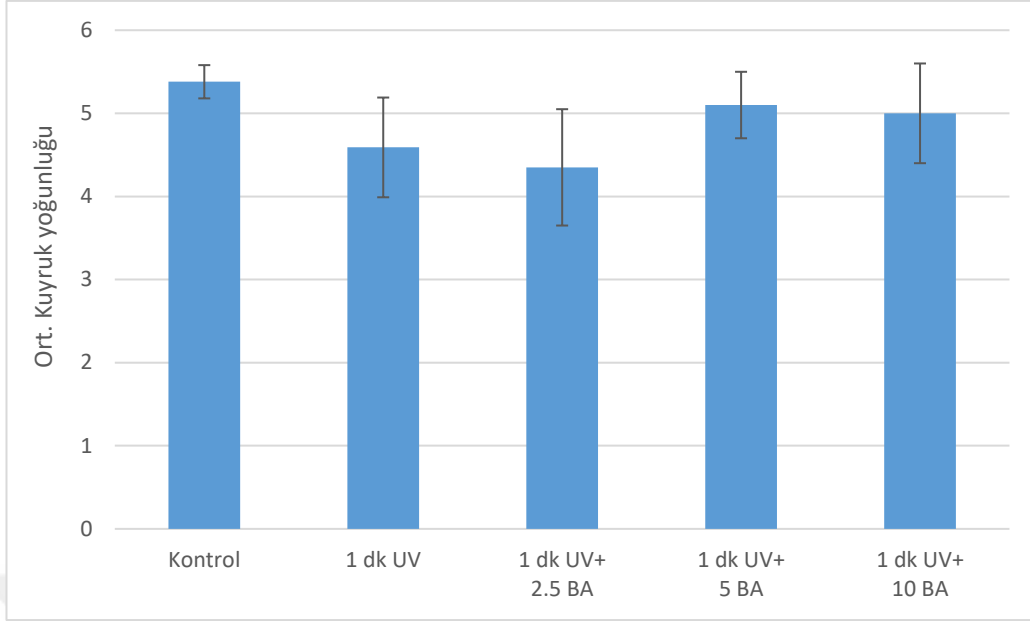
Çizelge 3.8. UV ile birlikte 5 µM borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları (UV+ 5 µM BA)

Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	0,6 kJ/m ²	3 kJ/m ²	6 kJ/m ²	9 kJ/m ²	18 kJ/m ²	27 kJ/m ²	36 kJ/m ²
Komet Kuyruk Yoğunluğu	5,3	5,1	6,02	7,5	15,22	22,3	32,44	43,8

Çizelge 3.9. UV ile birlikte 10 µM borik asit maruziyeti ile elde edilen komet testi ortalama kuyruk yoğunluğu sonuçları (UV+ 10 µM BA)

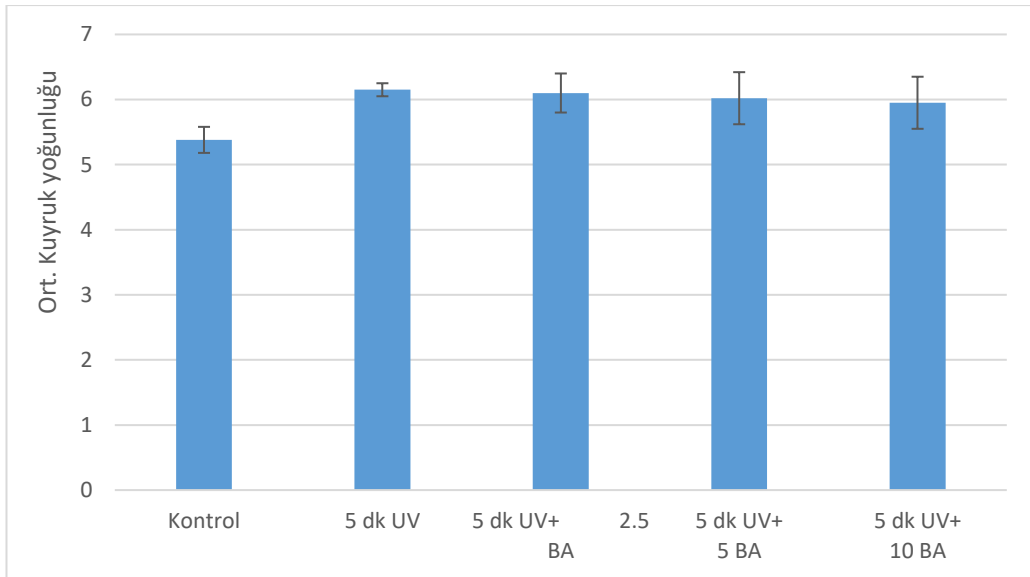
Maruziyet süresi	0 dk	1 dk	5 dk	10 dk	15 dk	30 dk	45 dk	60 dk
Maruziyet Dozu	0 kJ/m ²	0,6 kJ/m ²	3 kJ/m ²	6 kJ/m ²	9 kJ/m ²	18 kJ/m ²	27 kJ/m ²	36 kJ/m ²
Komet Kuyruk Yoğunluğu	5,8	5	5,95	6,03	15,12	18,1	25,46	42,4

Elde ettiğimiz komet testi sonuçlarına göre, borik asitin özellikle 10 µM konsantrasyonda 45 dakikaya kadarlık UV maruziyeti ile oluşan DNA hasarına karşı, koruyucu etkisi olabileceğini göstermiştir. 1, 5, 10, 30, 45 ve 60 dakikalık UV maruziyetleri üzerinde borik asitin etkileri ayrı ayrı incelenerek Şekil 3.6-3.12 de verilmiştir.



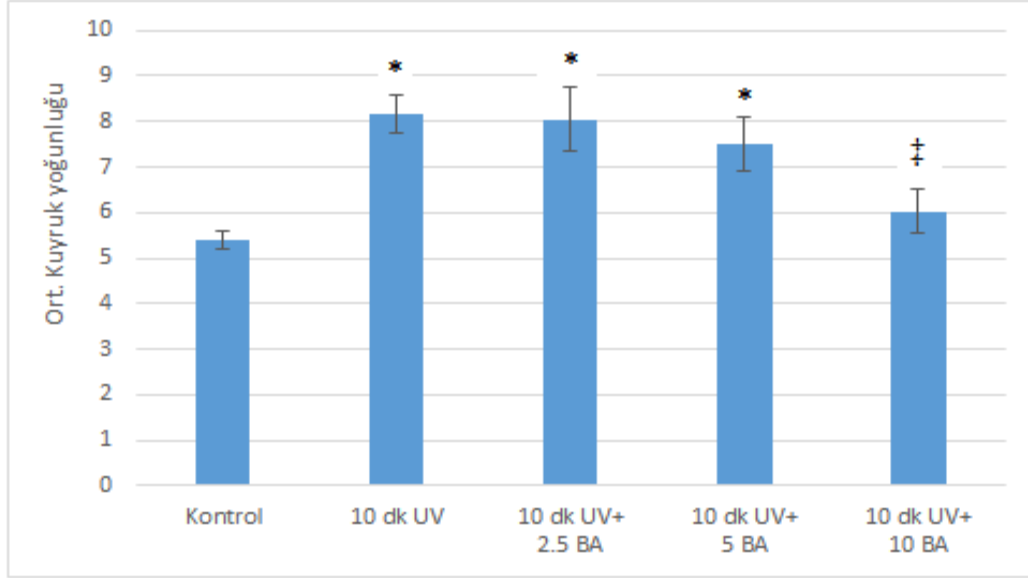
Şekil 3.6. HaCaT hücrelerine 1 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μ M borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları, $p>0.05$, one-way Anova.

1 (bir) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olmadığı bulunmuştur. Borik asitin her üç konsantrasyondaki DNA hasarı üzerindeki etkileri de kontrol ile farklı değildir (one-way Anova, $p>0.05$) (Şekil 3.6).



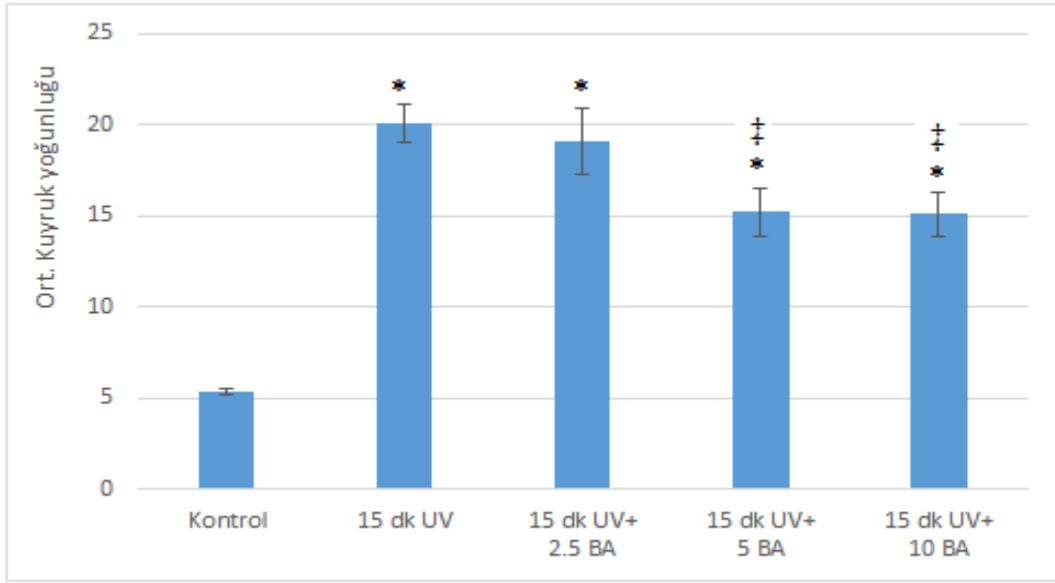
Şekil 3.7. HaCaT hücrelerine 5 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μ M borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları, $p>0.05$, one-way Anova.

5 (beş) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olmadığı bulunmuştur. Borik asitin her üç konsantrasyondaki DNA hasarı üzerindeki etkileri de kontrol ile farklı değildir (one-way Anova, $p>0.05$) (Şekil 3.7).



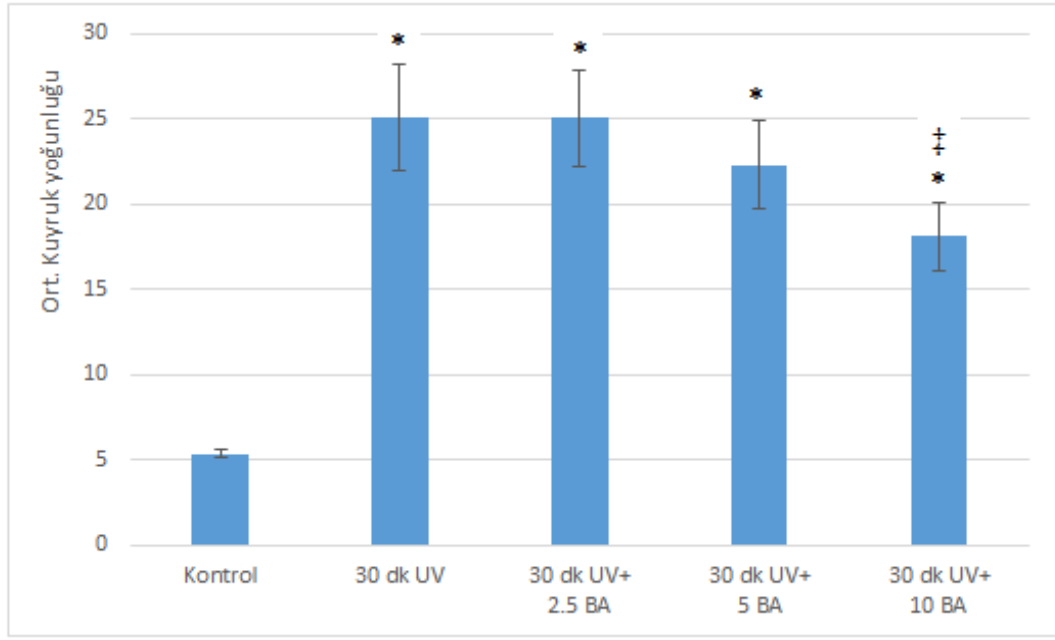
Şekil 3.8. HaCaT hücrelerine 10 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (*kontrol ile karşılaştırıldığında, ‡10 dakikalık UV maruziyeti ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$, one-way Anova).

Komet sonuçlarına göre, 10 (on) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur ($p<0.05$, one-way Anova). Borik asitin ise 10 μM konsantrasyonda UV'nin neden olduğu DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Şekil 3.8).



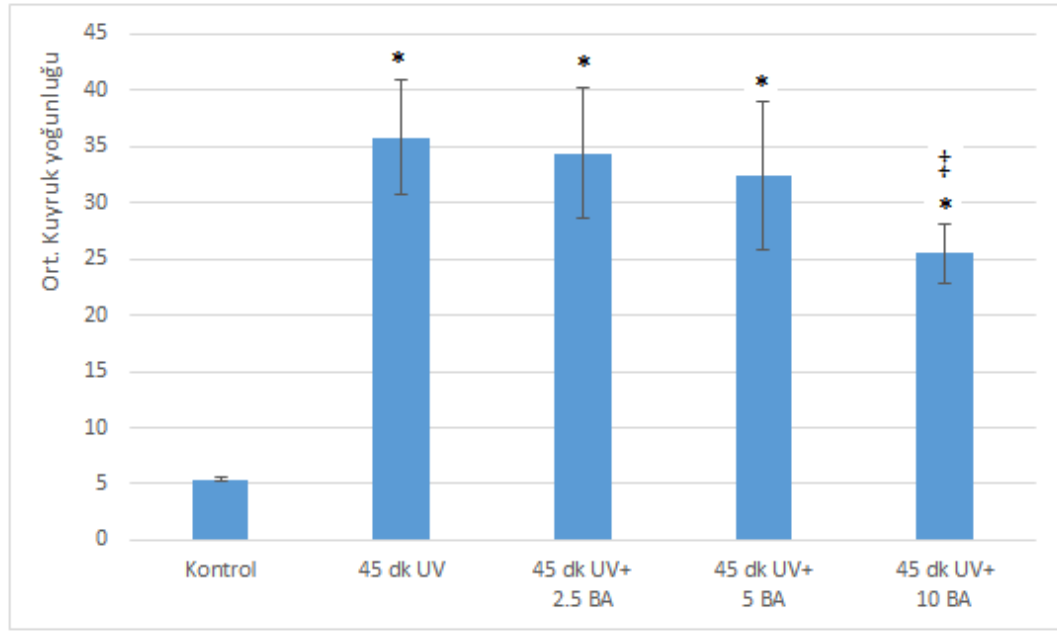
Şekil 3.9. HaCaT hücrelerine 15 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μ M borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (*kontrol ile karşılaştırıldığında, ‡15 dakikalık UV maruziyeti ile karşılaştırıldığında, $p < 0.05$, one-way Anova).

Komet sonuçlarına göre, 15 (onbeş) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur (one-way Anova, $p < 0.05$). Borik asitin ise 5 ve 10 μ M konsantrasyonlarda UV'nin neden olduğu DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Şekil 3.9).



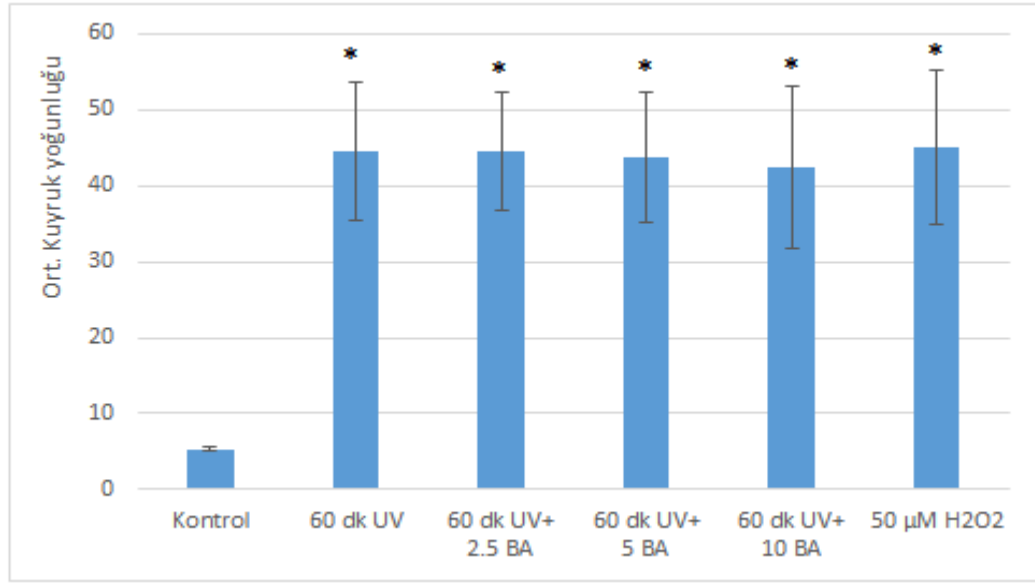
Şekil 3.10. HaCaT hücrelerine 30 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μ M borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (*kontrol ile karşılaştırıldığında, †30 dakikalık UV maruziyeti ile karşılaştırıldığında, $p < 0.05$, one-way Anova).

30 (otuz) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$, one-way Anova). Borik asitin ise 10 μ M konsantrasyonda UV'nin neden olduğu DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Şekil 3.10).



Şekil 3.11. HaCaT hücrelerine 45 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 μM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (*kontrol ile karşılaştırıldığında, ‡45 dakikalık UV maruziyeti ile karşılaştırıldığında, $p < 0.05$, one-way Anova).

45 (kırkbeş) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$, one-way Anova). Borik asitin ise 10 μM konsantrasyonda UV'nin neden olduğu DNA hasarını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur (Şekil 3.11).



Şekil 3.12. HaCaT hücrelerine 60 dakika UV ve 2.5, 5 ve 10 µM borik asit uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (*kontrol ile karşılaştırıldığında, $p<0.05$, one-way Anova).

60 (altmış) dakikalık UV maruziyetinin DNA hasarında kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu, bu DNA hasarının pozitif kontrol olarak kullanılan 50 µM H_2O_2 ile benzer olduğu bulunmuştur ($p<0.05$, one-way Anova). Borik asitin ise test edilen her üç konsantrasyonunun UV'nin 60 dakikada neden olduğu DNA hasarını azaltmada etkili olmadığı bulunmuştur (Şekil 3.12).

4. TARTIŞMA

Son zamanlarda özellikle kozmetik alanında ve güneş preparatlarında borik asitin yaygın kullanılması nedeniyle, borik asitin UV toksisitesini önleme potansiyeli araştırılması önemli bir konu haline gelmiştir.

Avrupa Birliği'nde tüm kimyasal maddeler REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) adı verilen büyük bir kimyasal madde yönetmeliği altında insan sağlığına olan etkileri baz alınarak yeniden sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama kapsamında borik asit ve sodyum boratlar üreme üzerine toksik (reprotoxic) olan kimyasal maddeler grubunda (Repr 1B, H360FD) sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma, Dünya'daki bor rezervlerinin %75 ine sahip olan ülkemizin borik asit ve sodyum borat ihracatında önemli kısıtlamalar ile karşılaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle borik asit ve sodyum boratların insan sağlığı açısından faydalı ürünlerde kullanılmasının önünü açacak çalışmalar, borik asit ve sodyum boratlar ile ilgili olarak ortaya çıkan yukarıdaki olumsuzlukların giderilmesi konusunda zaman içinde faydalı olacaktır. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın sonuçlarının da ülkemiz için bu açıdan uzun vade de fayda sağlayacağını düşünmekteyiz.

Ayrıca, kozmetiklerde güvenli kullanım ile ilgili olarak CIR (Cosmetic Ingredient Review) uzman panelinde sodyum borat ve borik asitin maksimum %5 oranında kullanılmasının güvenli olduğuna karar verilmiştir. Avrupa Birliği Kozmetik Regülasyonu listelerinde (EU Cosmetic Regulation), borik asit, boratlar ve tetraboratların talklarda en fazla %5, hijyen için kullanılan ürünlerde en fazla %0.1 ve kozmetikte kullanılan diğer ürünlerde (banyo ve saç şekillendirme dışında) en fazla %3 oranında kullanılabileceği açıklanmıştır. Bunun dışında, yapılan regülasyonlarla sodyum borat ve borik asit içeren kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin peeling yaptırılmış veya tahriş olmuş ciltte ve 3 yaşın altındaki çocuklarda kullanılmamasının ürünün etiketinde yazılması gerekmektedir.

Tezimizde UV maruziyeti ile birlikte borik asitin sitotoksik ve genotoksik cevaplarında özellikle düşük (günlük olarak maruz kalınabilecek) konsantrasyonlarda koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılması henüz çalışılmamış bir konudur. Tezimizde HaCaT (insan keratinosit hücresi) hücrelerinde test ettiğimiz borik asit konsantrasyonları, insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda tespit edilmiş olan kan bor (22.1 – 499.2 ppb) konsantrasyonlarını kapsayacak şekilde planlanmıştır. Dolayısıyla günlük olarak normal seviyede maruz kalınan bor ile insanlarda oluşabilecek kan bor konsantrasyonunun deneylerde test edilmesine dikkat edilmiştir.

UV ışığının zararlı etkileri, kısa dalga boyuna sahip UVB (280-315 nm) ve uzun dalga boyuna sahip UVA (315-400 nm)'dan kaynaklanmaktadır. Son zamanlarda UV radyasyona maruziyetle ilgili olarak yapılan deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar UVB ile birlikte UVA'nın da cilt kanserine neden olduğunu göstermiştir (Matsumura ve ark., 2002; Dahle ve Kvam, 2003). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, UV radyasyonu (UVA ve UVB) Grup 1 karsinojen olarak sınıflandırmıştır (El Ghissassi ve ark., 2009). UVB'nin neden olduğu mutajenik etkiler yıllardır araştırılmış ve mekanizması tam olarak ortaya konmuştur. UVB mutajenitesi, siklobütan pirimidin dimeri (CPD) ve pirimidin-(6-4)-pirimidon fotoürünü (6-4 PP) şeklinde oluşan iki temel pre-mutajenik DNA lezyonu ile açıklanmaktadır. Onarılamayan UVB lezyonları dipirimidin sekanslarında mutasyonlar ile (CC-TT şeklinde) UV'ye bağlı cilt kanserine neden olurlar. Buna karşılık, UVA'nın neden olduğu DNA hasarının mekanizması henüz yapılan çalışmalar ile açıklanamamıştır. UVA DNA tarafından direkt olarak adsorbe edilmez ve hasara neden olması için endojen fotosensitizantlara (photosensitizers, PS) ihtiyaç duyar. UV'nin DNA hasarına neden olabilmesi için ihtiyaç duyduğu kabul edilen (henüz ispatlanmamıştır) fotosensitizantlar, Tip I ve Tip II fotoreaksiyonlarla $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 veya $^1\text{O}_2$ gibi reaktif oksijen radikallerinin (reactive oxygen species, ROS) oluşmasına neden olurlar (Cadet ve ark., 1997; Cadet ve ark., 2003; Cadet ve ark., 2009; Cadet ve Douki 2011). UVA maruziyeti sonucunda oksitlenmiş bazlar (8-oxo-dG, timidin-glisol gibi), abazık bölgeler ve tek zincir kırıkları gibi DNA lezyonları oluşmaktadır. UVA'nın çift zincir kırıklarına neden olduğu bazı çalışmalarda gösterilse de henüz ispatlanmamıştır (Rünger ve ark., 2012; Greinert ve ark., 2012). Hatta son yıllarda UVA'nın neden olduğu dimerlerin UVB'nin

neden olduğu dimerlerden daha mutajenik olduğunu, çünkü UVA maruziyetinde hücrenin daha az koruyuculu olduğu (DNA onarımı, hücre döngüsü ve apoptozis basamaklarında) ve antimutajenik hücresel cevabın oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Rünger ve ark., 2012). UVA maruziyetiyle antimutajenik hücresel cevabın UVB maruziyetiyle oluşan cevaptan daha az etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, antimutajenik hücresel DNA hasarına karşı oluşan cevapta merkez regülatör özellik taşıyan p53'ün, aynı dozlarda UVB maruziyetiyle karşılaştırıldığında, UVA maruziyetinde daha az aktif olduğu görülmüştür.

Tezimizde, borik asitin UV radyasyonun neden olduğu genotoksik etkiler üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlarla birlikte bu tez, borik asitin antioksidan etkinliğini ve güneş kremi formülasyonlarında kullanılabilirliğini gösterecek nitelikte olup, bor rezervi yönünden zengin ülkemiz açısından oldukça önemli bir çalışmadır.

Usuda ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada borik asitin oral yolla uygulamadan sonra tamamının hızla absorbe olup gastrointestinal yoldan kan dolaşımına geçtiğini bulmuşlardır. Bu özelliğinden dolayı borik asitin organizmaya faydalı olup olmadığı araştırma konusu haline gelmiştir. Hunt (1998) tarafından deney hayvanlarında yapılan çalışmada ise, diyetle alınan borik asitin pek çok metabolik parametreleri etkilediğı gösterilmiştir. Borik asitin kalsiyum ve potasyum metabolizmasında; D vitamini (Hunt, 1996), aldehit dehidrogenaz, ksantin oksidaz, sitokrom b-5 redüktaz (Hunt, 1996; Devirian ve Volpe, 2003), insülin, östrojen, testosteron, T3, T4 (Armstrong ve ark., 2001), trigliserit, glukoz ve reaktif oksijen türleri (Turkez ve ark., 2007; İnce ve ark., 2011; Turkez ve ark., 2012) üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Ayrıca meyve ve sebzelerin tüketilmesiyle alınan borun birçok faydalı etkileri olduğu da bildirilmiştir (Devirian ve Volpe, 2003). Barranco ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada çeşitli bor bileşiklerinin hipolipidemik, antienflamatuar ve antikanser özelliklerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bor bileşiklerinin bakteri ve kültürü yapılmış memeli hücrelerinde genotoksik etki potansiyelinin olmadığı gösterilmiştir. Turkez ve ark. (2012), insan kan kültürü kullanarak yaptıkları bir çalışmada, ağır metal (arsenik trioksit, kolloidal bizmut subsitrat, kadmium, civa ve kurşun)

genotoksisitesinde bazı bor bileşiklerinin (borik asit, boraks, kolemanit ve üleksit) antioksidan etkili olup olmadığını araştırmışlardır. Test edilen bor bileşiklerinin düşük dozlardaki ağır metal genotoksisitesini azalttığını tespit etmişlerdir. İnce ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada ise, oral yolla alınan bor bileşiklerinin (100mg/kg) kandaki glutatyon konsantrasyonunu ve plazma C vitamini düzeyini artırdığını bulmuşlardır.

Bunun yanında son yıllarda borun üreme sistemi üzerine toksik olup olmadığını araştıran çalışmalar da yapılmaktadır. Bunların bir tanesi Amerikalı bir grup tarafından Çin'deki bor madeni çalışanlarında gerçekleştirilmiştir (Xing ve ark., 2008; Robbins ve ark., 2010). Diğeri ise Türkiye'de, Bandırma ve Bigadiç Borik asit fabrikası çalışanlarında gerçekleştirilmiştir (Duydu ve ark., 2011; Duydu ve ark., 2012; Duydu ve ark., 2019; Duydu ve ark., 2018; Basaran ve ark., 2019;). Her iki çalışma grubunun sonuçları da birbirini desteklemekte ve bor maruziyetine bağlı üreme toksisitesinin bora yüksek düzeyde maruz kalan işçilerde gözlenmediği vurgulanmaktadır.

Rünger ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında, UVA ve UVB'nin neden oldukları DNA hasarının mekanizma farklılıklarını açıklamak amacıyla UVA ve UVB maruziyetinden sonra insan fibroblast hücrelerinde hücre döngüsü regülasyonu, DNA onarımı ve apoptozis durumunu karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlar UVB maruziyeti ile oluşan p53 ve p95 aktivasyonunun UVA'ya göre daha belirgin ve daha uzun süre devam ettiğini göstermektedir. Bunun dışındaki antimutajenik cevaplarda (DNA onarımı ve apoptozis) bir farklılık bulamamışlardır. Nair-Shalliker ve ark. (2012), insan kan lenfositlerinde UV'nin neden olduğu DNA hasarını MN test kullanarak araştırmışlardır. D vitamini eksikliğinde UV kaynaklı DNA hasarının arttığını bulmuşlardır. Greinert ve ark. (2012) ise insan keratinosit hücreleri ve insan deri keratinositlerinde komet testi ve γ H2AX kullanarak UV kaynaklı çift zincir kırıklarını araştırmışlar ve UVA'nın çift zincir kırıklarının oluşumuna yol açtığını bulmuşlardır.

Tezimizin sonuçları, borik asitin antioksidan etkinliğini ve güneş kremi formülasyonlarında kullanılabilirliğini gösterecek nitelikte olup, bor rezervi yönünden zengin ülkemiz açısından oldukça önemlidir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tezimizde hedeflediğimiz şekilde borik asit ile birlikte UV radyasyonun sitotoksik ve genotoksik etkileri MTT ve komet testleri kullanılarak araştırılmıştır.

HaCaT hücrelerine 40 cm'lik UV kaynak mesafesi ile UV maruziyetinden elde edilen IC50 değeri ile; borik asitin 2.5, 5 ve 10 μ M'lık konsantrasyonlarının ön maruziyeti ve 40 cm'lik UV kaynak mesafesi ile maruziyet sonucu elde edilen IC50 değerleri karşılaştırılmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, borik asitin test edilen her üç konsantrasyonda UV radyasyonun sitotoksitesini azalttığı, 5 ve 10 μ M'lık konsantrasyonlarda bu etkinin anlamlı olduğu bulunmuştur.

Daha önceden yapılan çalışmalar ile, UVB'nin, siklobütan pirimidin dimeri ve pirimidin-(6-4)-pirimidin foto ürünü oluşturduğu bulunmuştur. UVA maruziyeti sonucunda ise oksitlenmiş bazlar (8-oxo-dG, timidin-glisol gibi), abazik bölgeler ve tek zincir kırıkları gibi DNA lezyonları oluşmaktadır. UVA'nın çift zincir kırıklarına neden olduğu bazı çalışmalarda gösterilse de henüz ispatlanmamıştır. Tezimizde UV radyasyonun 10 dakikalık maruziyetten sonra DNA hasarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur.

Sonuç olarak; Tezimizden elde etmiş olduğumuz bulgulara göre UV etkisi ile (yani güneş ışığı altında) cilt hücrelerinde ortaya çıkabilecek DNA hasarının borik asidin uygun konsantrasyonu kullanılarak önlenebileceği söylenebilir. Tez çalışmamız bu açıdan güneş kremi kullanımından oluşabilecek insan sağlığı problemlerine (cilt hücrelerinde DNA hasarı) bir çözüm olarak formülasyonlarda borik asidin kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Borik asitin UV radyasyonun neden olduğu genotoksik etkiler üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığı henüz çalışılmamış bir konudur. Özellikle güneş ışığına maruziyetle UVA radyasyonun cilt kanseri üzerinde etiyolojisinde borik asitin antioksidan etkinliğinin gösterilmesi tezimiz ile elde ettiğimiz önemli bir sonuç olmuştur.



ÖZET

Borik Asitin UV Radyasyonun Genotoksik ve Sitotoksik Etkilerine Karşı Koruyucu Etkinliğinin İn-Vitro Araştırılması

Hergün maruz kaldığımız güneş ışınlarının insan sağlığı üzerinde yararlı etkilerinin yanında toksik etkileri de bulunmaktadır. UV radyasyonun indirekt veya direkt mekanizmalarla insanlarda DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Güneşe maruziyet genellikle güneş koruyucu kremlerle birlikte gerçekleşmektedir. Güneş kremlerinin formülasyonlarında UV radyasyonun bu etkilerinden korunmak amacıyla antioksidan özellikli maddelerin kullanılması önemlidir.

Bor mineralleri ülkemizin madencilik alanında en önemli ihracat maddelerindendir. Son yıllarda borik asitin antioksidan özelliği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olsa da bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Tezimizde, HaCaT (insan keratinosit) hücreleri UV radyasyona artan sürelerde maruz bırakılarak oluşabilecek sitotoksik ve genotoksik etkilerin önlenmesinde borik asit uygulamasının faydalı olup olmadığı araştırılmıştır. Tezimizde sitotoksisite testi olarak MTT yöntemi ve genotoksisite testi olarak komet yöntemi uygulanmıştır.

Tezimizden elde ettiğimiz sonuçlara göre, borik asit özellikle 5 ve 10 μM konsantrasyonda UV radyasyonun sitotoksik etkisini azalttığı, 45 dakikaya kadar UV maruziyetinin neden olduğu DNA hasarını 10 μM konsantrasyonda borik asidin azalttığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak, borik asitin güneş kremi formülasyonlarında kullanılmasının faydalı olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Borik asit, HaCaT, Komet testi, MTT, UV radyasyon.

SUMMARY

In Vitro Investigation of the Protective Effect of Boric Acid Against the Genotoxic and Cytotoxic Effects of UV Radiation

In addition to beneficial effects on the human health of the sun rays we are exposed to daily, there are also toxic effects. It is known that UV radiation causes DNA damage in humans through indirect or direct mechanisms. Exposure to the sun is usually accompanied by sunscreen creams. In sunscreen formulations, it is important to use antioxidant substances to protect against these effects of UV radiation.

Boron minerals are the most important export items in the mining field of our country. Although the antioxidant properties of boric acid have been shown in various studies in recent years, it is necessary to work more on this subject.

In this thesis, we investigated whether boric acid treatment is beneficial in preventing cytotoxic and genotoxic effects of UV radiation on HaCaT (human keratinocyte) cells exposed to for extended periods of time.

MTT method was used as cytotoxicity test and comet assay was performed as genotoxicity test in our protocol.

According to the results obtained from our thesis, boric acid decreased the cytotoxic effect of UV radiation especially at 5 and 10 μM concentration, and boric acid at 10 μM concentration, decreased the UV damage caused by UV exposure up to 45 minutes. It may be said that boric acid may be useful for the application of sunscreen formulations.

Keywords: Boric acid, Comet assay, HaCaT, MTT, UV radiation.

KAYNAKLAR

- ARMSTRONG, T.A., SPEARS, J.W., LLOYD, K.E. (2001). "Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by longterm boron supplementation in gilts", *Journal of Animal Science*, 79, 1549–1556.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1992). Toxicological profile for boron and compounds; TP-91/05. Available from ATSDR, Atlanta, GA.
- AYRANCI DFE. (2005). Akut Borik Asit Uygulanan Sıçanlarda Testis, Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokuları Üzerinde Gözlenen Histopatolojik Değişimler. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir, (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ünal Özelmas); 4-12.
- BARRANCO WT, ECKHERT CD. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer letters*; 216(1):21-9.
- BARRANCO, W.T., HUDAK, P.F., ECKHERT, C.D. (2007). Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes & Control - Springer*. 18(1): 71-7.
- BARRANCO, W.T., KİM, D.H., STELLA, S.L. JR, ECKHERT, C.D. (2009). "Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells", *Cell Biology And Toxicology*, 25, 309-20.
- BAŞARAN N., DUYDU Y, ÜSTÜNDAĞ A, TANER G., DİLSİZ SA, ANLAR HG, YALÇIN CÖ, BACANLI M, GOLKA K, SCHWERDTLE T, BOLT HM. (2019). Environmental boron exposure does not induce DNA damage in lymphocytes and buccal cells of females: DNA damage in lymphocytes and buccal cells of boron exposed females. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 53: 150-153.
- BONCUKÇUOĞLU R, KOCAKERİM M, YILMAZ E, YILMAZ T. (2004). Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi. Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyum Bildiri Kitabı; s.83-89.
- BOREN, Bor Araştırma Enstitüsü; Erişim Adresi: [www.boren.gov.tr.]. Erişim Tarihi:19/6/2019.

CANDAN, Ç., BİLGİÇ, A., (2006). Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model. *Turkish Journal of Infection*; 20 (3): 231-241.

DAHLE, J., KVAM, E. (2003). "Induction of delayed mutations and chromosomal instability in fibroblasts after UVA-, UVB-and X-radiation", *Cancer Research*, 63, 1464–1469.

DEVİRİAN, T.A, VOLPE, S.L. (2003). "The physiological effects of dietary boron", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 219-31.

DUYDU, Y., BAŞARAN, N., ÜSTÜNDAĞ, A., AYDIN, S., ÜNDEĞER, Ü., ATAMAN, O.Y., AYDOS, K., DÜKER, Y., ICKSTADT, K., WALTRUP, B.S., GOLKA, K., BOLT, H.M. (2011). Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Archives of Toxicology*. 85: 589-600.

DUYDU, Y., BAŞARAN, N., ÜSTÜNDAĞ, A., AYDIN, S., ÜNDEĞER, Ü., ATAMAN, O.Y., AYDOS, K., DÜKER, Y., ICKSTADT, K., WALTRUP, B.S., GOLKA, K., BOLT, H.M. (2012). Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Archives of Toxicology*. 86: 27- 35.

DUYDU, Y., BAŞARAN, N., BOLT, H.M. (2012). Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 26: 161-164.

DUYDU Y, BAŞARAN N, AYDIN S, ÜSTÜNDAĞ A, YALÇIN CÖ, ANLAR HG, BACANLI M, AYDOS K, ATABEKOĞLU CS, GOLKA K, ICKSTADT K, SCHWERDTLE T, WERNER M, MEYER S, BOLT HM. (2018). Evaluation of FSH, LH, testosterone levels and semen parameters in male boron workers under extreme exposure conditions. *Arch Toxicol*. Oct;92(10):3051-3059.

DUYDU Y, BAŞARAN N., YALÇIN CÖ, ÜSTÜNDAĞ A, AYDIN S, ANLAR HG, BACANLI M, AYDOS K, ATABEKOĞLU CS, GOLKA K, ICKSTADT K, SCHWERDTLE T, WERNER M, BOLT HM. (2019). Boron-exposed male workers in Turkey: no change in sperm Y:X chromosome ratio and in offspring's sex ratio. *Arch Toxicol*. 93(3):743-751.

D'ORAZIO J, JARRETT S, AMARO-ORTIZ A, SCOTT T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*;14(6):12222-48.

ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals). (1994). Reproductive and general toxicology of some inorganic borates and risk assessment for

human beings. Technical Report No. 65. Brussels: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.

EL GHİSSASSİ, F., BAAN, R., STRAİF, K., GROSSE, Y., SECRETAN, B., BOUVARD, V., BENBRAHİM-TALLAA, L., GUHA, N., FREEMAN, C., GALİCHET, L. (2009). "A review of human carcinogens? Part D: radiation", *The Lancet Oncology*, 10, 751–752.

FİTZPATRİCK TB. (1975). Soleil et peau. *J Med Esthet* (2):33-4.

FİTZPATRİCK TB. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*;124(6):869-71.

HABOKEN, JOHN WILEY VE SONS (2005). R. Ian Freshney *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 15th Edition: p.1-216

[<http://www.etimaden.gov.tr/bor-kullanim-alanlari-77k.htm>]. Erişim tarihi: 22/6/2019.

[<http://www.yenibiyoloji.com/ultraviyole-uv-isinlari-ve-cesitleri-4982/>]. Erişim tarihi: 20/6/2019.

HUNT, C.D. (1996). "Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron", *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 9, 185–213.

HUNT, C.D. (1998). "Boron homeostasis in the cholecalciferol-deficient chick", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42,60.

HUNT, C.D., IDSO, J.P. (1999). "Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress", *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 12, 221–33.

İNCE, S., KELEŞ, H., ERDOĞAN, M., HAZMAN, O., KÜÇÜKKURT, I. (2011). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*. p: 15.

KALAÇAY D. (2013). Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Ratlarda Borik Asitin Total Oksidan Kapasite Total Antioksidan Kapasite Düzeyleri ve Paraoksonaz Aktivitesine Etkisi. Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kars, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Onur Atakışi). ;4-6.

KARAASLAN C, DUYDU Y, USTUNDAG A, YALCIN CO, KASKATEPE B, GOKER H. (2019). Synthesis & Anticancer Evaluation of New Substituted 2-(3,4-Dimethoxyphenyl) benzazoles. Med Chem. 15: 287-297

KOÇAKLI, Z.G., AKILLIOĞLU, K., DOĞAN, A., (2015). Vasküler Düz Kas Hücrelerinin İzolasyonu ve Kültürü. *Archives Medical Review Journal*; **24(3)**: 390-401.

MATSUMURA, Y., ANANTHASWAMY, H.N. (2002). “Molecular mechanisms of photocarcinogenesis”, *Frontiers in Bioscience*, 7765–7783.

MCGREGOR JM, YOUNG AR. (1996). Sunscreens: use and misuse. *Dermatol Clin*; 16(2):219.

MCKEE, J.E., WOLF, H.W. (1963). Quality criteria for water. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.

MOORE, J.A. (1997). “Expert Scientific Committee. An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents”, *Reproductive Toxicology*, 11, 123–60.

MOSSMA, T., (1983). “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J Immunol Methods*, 65, 55-63

NAIR-SHALLIKER, V., FENECH, M., FORDER, P.M., CLEMENTS, M.S., ARMSTRONG, B.K. (2012). “Sunlight and vitamin D affect DNA damage, cell division and cell death in human lymphocytes: a cross-sectional study in South Australia”, *Mutagenesis*, 27(5), 609-614.

NIELSEN, F.H. (1998). The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biological Trace Element Research*.

NIELSEN, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Review*. **66(4)**: 183-91.

PAWA, S., ALİ, S. (2006). “Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress”. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 89-98.

ROBBİNS, W.A., XUN, L., JIA, J., KENNEDY, N., PİNG, L. (2010). “Chronic boron exposure and human semen parameters”, *Reproductive Toxicology*, 29, 184-190.

RÜNGER, T.M., FARAHVASH, B., HATVANİ, Z., REES, A. (2012). “Comparison of DNA damage responses following equimutagenic doses of UVA and UVB: A less effective cell cycle arrest with UVA may render UVA-induced pyrimidine dimers more mutagenic than UVB-induced ones”, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11, 207-215.

RYDBERG B, JOHANSON KJ. (1978). Estimation Of Dna Strand Breaks In Single Mammalian Cells. İçinde: Dna Repair Mechanisms

SCHMALZ, G., DORTHE ARENHOLT, B., (2009). *Biocompatibility of Dental Materials*. 1st ed. Verlag Berlin Heidelberg; Springer: p.13-40.

SİZMAZ O, YİLDİZ G. (2013). Effects of dietary boric acid and ascorbic acid supplementation on performance, some blood and bone parameters in broilers. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*;20(1):65-71.

TUNCER, S., DEMİRCİ, M., (2011). Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üni. Diş. Hek. Fak. Derg.*; **21**: 141-149

TURKEZ, H., GEYİKOĞLU, F., TATAR, A., KELES, M.S., KAPLAN I. (2012). “The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood”, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64, 93-101.

TURKEZ, H., GEYİKOĞLU, F., TATAR, A., KELEŞ, S., OZKAN, A. (2007). “Effects of some boron compounds on peripheral human blood”, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62, 889-96.

U.S.EPA. (U.S. Environmental Protection Agency) (1987). Health effects assessment for boron and compounds. Prepared by the Office of health and environmental assessment, environmental criteria and assessment Office, Cincinnati, OH for the Office solid waste and emergency response, Washington, DC.

USUDA, K., KONO, K., ORITA, Y., DOTE, T., IGUCHI, K., NISHIURA, H., TOMINAGA, M., TAGAWA, T., GOTO, E., SHIRAI, Y. (1998). "Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate", Archives of Toxicology, 72, 468-74.

WHO (World Health Organization). (1998). Boron in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, Switzerland.

WOODS WG. (1994). An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. Environ Health Perspect;102 Suppl 7:5-11.

QURESHI S, AL-SHABANAH O, AL-HARBİ M, AL-BEKARİ A, RAZA M. (2001). Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice. Toxicology;165(1):1-11.

XING, X., WU, G., WEI, F., LIU, P., WEI, H., WANG, C., XU, J., JIA, J., KENNEDY, N., ELASHOFF, D., ROBBINS, W. (2008). "Biomarkers of environmental and workplace boron exposure", Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 5, 141-147.

YENMEZ N. (2009). Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi. Coğrafya Dergisi. (19):59-94.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı: Tamer

Soyadı: GÜNAY

Doğum yeri ve tarihi: Adilcevaz/01.01.1989

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Tecilli

İletişim adresi ve telefonu: gunaytamer@gmail.com/05066459695

II-Eğitimi

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 2006-2011

Adilcevaz Lisesi, 2001-2004

İnönü İlköğretim Okulu, 1997-2000

İbrahim Karaoğlanoğlu İlkokulu, 1993-1997

Yabancı Dili: İngilizce

III- Unvanları

Biyokimyager, Ürün Denetmen Yardımcısı, Ürün Denetmeni

IV- Mesleki Deneyimi

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ürün Denetmen Yardımcısı 2013-2016

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Ürün Denetmeni 2016-