



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BORİK ASİTİN POTANSİYEL GENOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN IN-VITRO HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI

Büşra AKINCI

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ**

ANKARA

2021

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BORİK ASİTİN POTANSİYEL GENOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN IN-VITRO HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI**

Büşra AKINCI

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ

ANKARA

2021

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum “Borik asitin potansiyel genotoksik ve apoptotik etkilerinin in-vitro hücre kültüründe araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra AKINCI

Tarih: 26.07.2021

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Büşra AKINCI tarafından hazırlanan

“Borik Asitin Potansiyel Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin İn-Vitro Hücre
Kültüründe Araştırılması” adlı tez çalışması

aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY

BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul/~~ret~~ edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08.07.2021

İmza

Prof. Dr. Yalçın Duydu

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Sevtap Aydın Dilsiz

Hacettepe Üniversitesi

Üye

İmza

Doç. Dr. Aylin Üstündağ

Ankara Üniversitesi

Üye (Danışman)

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	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	v
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Bor, Borik Asit ve Önemi	1
1.1.1. Bor Elementinin Tarihçesi	1
1.1.2. Bor'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	4
1.1.3. Bor Rezervleri	10
1.1.4. Bor'un kullanım alanları	12
1.1.5. Bor'un canlılar üzerindeki etkisi	15
1.2. Sitotoksiste, Nötral Kırmızı Gerialma (Neutral Red Uptake, NRU) Testi	18
1.3. Genotoksiste, Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	20
1.3.1. Komet Testi'nin Önemi	20
1.3.2. Komet Testi'nin Prensibi	21
1.3.3. Komet Testi'nin Kullanım Alanları	25
1.4. Apoptozis, Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini	26
1.4.1. Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini Prensibi	29
1.5. Hücre Kültürü	30
1.6. Tezin Amacı ve Hedefi	35
2. GEREÇ VE YÖNTEM	38
2.1. Gereç	38
2.1.1. Kullanılan gereçler	38
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	39
2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	39
2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması	42
2.4. Borik Asit Maruziyeti	45
2.5. Kırmızı Nötral Gerialma (NRU) Testinin Yapılışı	45
2.6. Komet Testinin Yapılışı	48
2.7. Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini Yönteminin Yapılışı	52
2.8. İstatistiksel Değerlendirme	53
3. BULGULAR	54
3.1. Sitotoksiste, Nötral Kırmızı Gerialma Testi Sonuçları	54
3.2. Genotoksiste, Komet Testi Sonuçları	56
3.3. Apoptoz, Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti İle Apoptoz Tayini Testinin Sonuçları	58
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	67
ÖZET	69
SUMMARY	70



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında borik asitin in vitro yöntemlerle insan Sertoli (HSeC) hücre kültürleri üzerinde toksikolojik analizlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Kullanılacak hücre tipinin bor maruziyetinin hedef aldığı insan üreme sistemine ait bir hücre olması sebebiyle tezimiz önem kazanmaktadır. Ayrıca elde edeceğimiz veriler dünya bor rezervlerinin büyük bir kısmına sahip olan ve yüksek kapasiteli bor işletmeleri bulunan Türkiye için bor ihracaatının değerli olması; borik asit ile ilgili yasal düzenlemelerin hazırlanmasında sağlık ve çevre otoritelerine yardımcı olması nedeniyle tez çalışmasının önemi daha da artmaktadır.

Tez çalışmamda planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ’a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli annem Esma AKINCI, babam Yaşar AKINCI ve ağabeyim Yusuf AKINCI’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Büşra AKINCI

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Bor rezervlerinin dünyadaki dağılımı	11
Şekil 1.2.	Dünya fiili bor üretiminin bölgesel bazda dağılımı	11
Şekil 1.3.	Floresan mikroskop altında farklı derecelerdeki DNA hasarının görüntüsü	22
Şekil 1.4.	Komet analiz yöntemi ile agaroz jel üzerinde elektroforetik ortamda göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri	24
Şekil 1.5.	Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişimler	28
Şekil.1.6.	Seminifer tübül epiteli: Sertoli ve spermatogenik seri hücreleri ve spermatogenez	34
Şekil 2.1.	İnsan sertoli hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü	43
Şekil 2.2.	TC 20 cihazı, kullanılan sayım lamları ve tripan mavisi	44
Şekil 2.3.	TC20 sayım cihazında 1 mL süspansiyondaki canlı hücrelerin sayısı ve görünüşleri	44
Şekil 2.4.	NRU yöntemiyle sitotoksosite tayininde 96 kuyucukulu plaka şablonu	46
Şekil 2.5.	Multiplaka okuyucu	48
Şekil 2.6.	Kırmızı Nötral Gerilme (NRU) testinin basamakları	48
Şekil 2.7.	Komet testinin basamakları	50
Şekil 2.8.	Fluoresan mikroskop (Komet testi yazılım programı-Comet Assay IV)	51
Şekil 2.9.	Hücrenin floresan mikroskop altında Comet assay IV programındaki görüntüsü	51
Şekil 2.10.	Muse®Annexin&Dead Cell Assay kiti ile apoptoz tayini yönteminin basamakları	53
Şekil 3.1.	Sertoli hücrelerine borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi sonucu	55

Şekil 3.2.	Sertoli hücrelerine 2. tekrar olarak borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi sonucu	56
Şekil 3.3.	Borik asidin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda sertoli hücrelerine uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	57
Şekil 3.4.	Borik asidin Sertoli hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri	60



ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Borun fiziksel özellikleri	5
Çizelge 1.2.	Ticari anlamda önem taşıyan bor mineralleri	7
Çizelge 1.3.	Bor elementinin kimyasal özellikleri	8
Çizelge 1.4.	Bor ve bazı önemli bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	9
Çizelge 1.5.	Sıkça olarak tüketilen bazı besinlerin bor içerikleri	17
Çizelge 1.6.	Komet yöntemi ile farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri	24
Çizelge 1.7.	Apoptoz ve Nektroz Karşılaştırması	28
Çizelge 1.8.	Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları	31
Çizelge 3.1.	Sertoli hücrelerine borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi değerleri	54
Çizelge 3.2.	Sertoli hücrelerine 2. tekrar olarak borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi değerleri	55
Çizelge 3.3.	Borik asidin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda sertoli hücrelerine uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları	57
Çizelge 3.4.	Borik asidin Sertoli hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri	60

1. GİRİŞ

1.1. Bor, Borik Asit ve Önemi

1.1.1. Bor Elementinin Tarihçesi

Bor elementini içeren doğal minerallere genellikle boratlar denilmektedir. Boratların insanlar tarafından kullanımı binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. "Baurach" sözcüğüne (Arapça: Boraks) 2000 yıllık eski İran ve Arabistan'daki yazmalarında rastlanılmaktadır. Bir başka bor bileşiği olan boraks dekahidrat'ın doğal formu olan tinkalin adı ise yine boraks anlamına gelen Sanskritçe tincana'dan gelmektedir. Boratların, M.Ö. 300 yılları zamanından günümüze gelmiş Çin seramiklerinde ve Babil Uygarlığı'ndan önceki zamanlarda altın dökümünde kullanıldığı bilinmektedir (Özkan ve ark., 1997).

Bor mineralleri yüzyıllardır çeşitli alanlarda kullanım olanağı bulmuştur. Nitekim 8. yüzyılda bor bileşikleri, altın ve gümüşün rafine edilmesinde eritici madde olarak kullanılmıştır. Bor ve minerallerinin değerli nitelikleri ve ender olmaları, global ticareti üzerinde de etkisi olmuş, Marco Polo 13. yüzyılda Çin boratlarını Avrupa'ya götürmüş, ardından Avrupa'da lehimlemede ve sırlamada bor minerali kullanılmaya başlanmıştır. Türkiye'deki bor mineralleri ise, 13. yüzyıldan itibaren bilinmesine karşın yakın zamana kadar minimal miktarda kullanılmıştır. 18. Yüzyılda İtalya'nın Toskana bölgesinde doğal borik asit türevi olan sasolit minerali bulunmuştur. Orta çağın tamamında, Venedik bor ticaretinde önemli bir nokta haline gelmiş, ana liman

özelliği taşıymıştır. 19. yüzyılın sonlarına kadar bor, yüksek maliyetli ve sadece özel durumlarda kullanılmıştır. Bu zamanlarda bor mineralleri temel olarak; ilaç yapımı, yiyeceklerin muhafaza edilmesi, seramik sırlaması gibi nedenler için kullanılmıştır. (Kistler ve Helvacı, 1994). 1836 yılına gelindiğinde ise, Şili ve Arjantin bölgesindeki bor mineralleri keşfedilmiş ve bu yataklar 19. yüzyılın tamamında borun elde edilmesinde kullanılan en büyük kaynaklar haline gelmiştir. 1864'te Clear Gölü'nde ve daha da mühimi ABD'de Batı Nevada Playa bölgesinde bor madeni yatakları keşfedilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde, bor minerallerinin kısıtlı ve yüksek maliyetli kullanımından, bugün tonlarla şeklinde ifade ettiğimiz, birçok alanda ve daha uygun fiyatlı kullanımına geçilmiştir (Ediz ve Özdağ, 2001 ve Özkan, 1997).

19. yüzyılın ilk yarısında, Fransız Joseph Louis Gay-Lussac ve Louis Jacques Thenand ile İngiliz Sir Humphrey Davy, yaklaşık olarak aynı dönemde bor elementini ayrıştırabilmiş, bir diğer deyişle bor elementini keşfetmişlerdir. Ancak yüksek saflıktaki (%99) ilk kristalize borun elde edilmesi, 1909 yılında gerçekleşmiştir (Pehlivan, 2014).

Ülkemizdeki bor madenlerinin bilinirliği çok eski zamanlara Doğu Roma İmparatorluğu zamanına dayanmaktadır ve bu zamandan itibaren kullanımının olduğu düşünölmektedir. Balıkesir'in Susurluk ilçesinde Türkiye'deki ilk bor yatağına rastlanmıştır.

Osmanlı döneminde, 1861'de ilk kez Maadin Nizamnamesi çıkarılmıştır. Bu hükümlerde Fransız Camille Desmazes'e ortağıyla beraber işletme hakkı verilmiştir. Ortaklar, nizamnameden 4 yıl sonra Osmanlı'dan yetkiyi almasıyla beraber, Desmazes şirketini kurarak bor çıkarmaya başlamıştır. Fransızlar, bölgedeki borun

üretimini 1885 yılına kadar yapıp Avrupa'daki alıcılara satmışlardır. Bahsedilen dönemlerde Osmanlı İmparatorluğu'nun bor üretimi yapabilecek kapasitesi yoktu ve bu konuda girişim yapılamamıştır.

1887'de bir İngiliz şirketi olan Boraks Consolidated şirketi de Anadolu'da bor üretmek için girişimlerde bulunmuş ve imtiyazla beraber üretimlerini 1958 yılına kadar gerçekleştirmiştir. 1927'ye kadar toplamda 600'ün üzerinde yabancı şirkete imtiyaz verilmiş ardından 1944'te bu şirketlerin çoğunluğu millileştirilmiş ve yabancı sermayeye yeni imtiyazlar verilmemiştir.

1935'te 2804 ve 2805 Sayılı kanunların çıkarılmasıyla beraber arama ruhsatlarını almış olan yerli sermaye MTA ve Etibank, II. Dünya Savaşı'nın ardından arama faaliyetlerine hız vermişlerdir. İleriki yıllarda yabancı sermayelere verilen imtiyazlarının birer birer devlete geçirilmesiyle beraber yerli sermayelere işletme hakları tanınmış, Etibank ve bir kısım yerli şirket tarafından işletilmeye başlanmıştır.

1950'de Balıkesir Bigadiç'te, bundan iki yıl sonra Mustafa Kemal Paşa civarlarında kolemanit yataklarına keşfedilmiş, 1956'ta da Emet civarında MTA tarafından, Hisarcık ve Hamamköy yakınlarında kolemanit yataklarına rastlanmıştır. Bu yatakların keşfinden 2 sene sonra, yatakların işletilmesi Etibank'a tarafından yapılmıştır (Enerji Portalı, 2019 ve Yiğitbaşıoğlu, 2014).

Bor maden yataklarının devlet tarafından işletilmesi kararıyla birlikte de tüm aktiviteler (madencilik, üretim, yatırım ve pazarlama) Etibank (günümüzdeki adı ile Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü) aracılığı ile yürütülmektedir.

Devlet tarafından işletme kararının alınmasından bugüne kadar geçen zaman içinde de, madencilik ve rafine bor ürünleri imalatında ciddi ilerlemeler gösterildiği aşıkardır.

Bugün ülkemizin bor rezervlerinin 3 milyar ton civarında olduğu tespit edilmiştir. Eti Maden/MTA işbirliği ile rezerv çalışmaları halen yapılmaktadır (Enerji Portalı, 2019 ve Yiğitbaşıoğlu, 2014).

1.1.2. Bor'un Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Yer kabuğunda yaygınlığında 51. sırada olan bor elementi, genellikle boratlar ve borosilikatlar halinde bulunmaktadır. Konsantrasyonu yaklaşık 3 mg/kg civarındadır. Bor'un rengi değişkenlik göstermektedir. Rengi koyu kahverengi ve çok gevrek olduğunda amorf toz halindedir. Sert yapılı monoklinik kristal halinde ise sarımsı kahverengi renktedir (Tombal ve ark., 2016).

Periyodik cetvelde IIIA grubunda yer alır. Karbon (^{6}C) ve Silisyum (^{14}Si) elementlerine benzerliği yüksektir. İki adet kararlı izotopu vardır. Bunlar; ^{10}B ve ^{11}B şeklindedir. Bor izotoplarının yer kabuğunda yayılımı farklıdır. Bolluk miktarları değişkenlik göstermektedir. Buna bir örnek olarak günümüzdeki verilere göre; ^{10}B miktarı ABD Kaliforniya eyaletindeki yataklarda düşük, Türkiye’de ise yüksek seviyelerdedir (Tombal ve ark., 2016).

Borun metal veya ametal elementlerle yaptığı bileşikler farklı özellik göstermektedir. Bu nedenle bor bileşikleri farklı endüstrilerde farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bor, bileşiklerinde metal dışı bileşikler gibi davranmaktadır. Fakat farklı olarak saf haldeki bor elektriği iletme özelliğine sahiptir. Kristalize hali, görünüm ve optik açısından incelendiğinde elmasa benzediği bulunmuştur ve neredeyse elmas kadar serttir (Enerji Portalı, 2019).

Bor elementinin fiziksel özelliklerinin detayı Çizelge 1.1’de verilmiştir (Tombal ve ark., 2016).

Çizelge 1.1. Borun fiziksel özellikleri

Atom kütlesi	10,811 (g/mol)
Kaynama noktası	3727 ($^{\circ}\text{C}$)
Termal genleşme katsayısı	8,3 $\mu\text{m}/(\text{m.K})$, (0 $^{\circ}\text{C}$ ’ de)
Elektriksel iletkenlik	1,0 E-12 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Isıl iletkenlik	0,274 W/cm.K
Yoğunluğu	2,34 g/cm ³ , (25 $^{\circ}\text{C}$ ’de)
Görünüşü	Sarı-Kahverengi ametal kristal
Elastik modülü	Kütle: 320/GPa
Atomizasyon entalpisi	573,2 kJ/mol, (25 $^{\circ}\text{C}$ ’de)
Füzyon entalpisi	22,18 kJ/mol

Buharlaşma entalpisi	480 kJ/mol
Sertliği	Mohs: 9,3 Vickers: 49 000 MN.m-2
Buharlaşma ısısı	489,7 kJ/mol
Ergime noktası	2075 °C
Molar hacmi	4,68 cm ³ /mol
Fiziksel durumu	Katı, (20 °C ve 1 atm'de)
Spesifik ısısı	1,02 J/g.K
Buhar basıncı	0,348 Pa (300 °C'de)

Oksijene yüksek affinitesinin olan bor, bu özelliğinden ötürü tabiatta serbest halde bulunmamaktadır ve yer kabuğunun yapısında %0,001 oranında bulunur. En sık rastlanan bor bileşikleri; borik asit ve borun sodyum ve kalsiyum ile oluşturduğu bileşikleridir. Tabiattaki yaklaşık 150 mineralin bor elementi içerdii bilinmektedir. Ancak, ticari açıdan önemli olan bor mineralleri sınırlıdır. Bunlar; tinkal, kernit, probertit, üleksit, szaibelyite ve kolemanittir (Bilimsel Madencilik Dergisi, 2021 ve Özkan ve ark., 1997).

Ticari önem arz eden bor minerallerinin en ileri gelenlerinden tinkal, tabiatta bulunma şekli genellikle renksiz ve saydamdır. Fakat bileşiiindeki diğer maddelere göre renkleri değişebilmekte, pembe veya sarımsı gri olabilmektedir. Sertlik derecesi 2 ila 2,5 ve özgül ağırlığı 1,72'dir. Suda kolaylıkla çözünmesi en önem arz eden özelliğidir (Özkan ve ark., 1997).

Ticari anlamda öneme sahip bor minerallerinin detayı Çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Ticari anlamda öneme sahip bor mineralleri (Özkan, 1994 ve Tomal ve ark., 2016)

Mineral Adı	Kimyasal Formül	%B ₂ O ₃	Bulunduğu Yerler
Sasolit	H ₃ BO ₃	56,3	Doğal borik asittir ve ilk kez İtalya'da üretilmiştir.
Tinkal	Na ₂ B ₄ O ₇ •10H ₂ O	36,5	Kırka, ABD, Arjantin, Bolivya, Hindistan
Kernit (Razorit)	Na ₂ B ₄ O ₇ •4H ₂ O	51,0	Kernit yatakları Arjantin'in Tincalayu ve Blanca bölgelerinde bulunmaktadır. Ayrıca Türkiye, ABD ve Çin'de de vardır
Kolemanit	Ca ₂ B ₆ O ₁₁ •5H ₂ O	50,8	En büyük rezerv Türkiye'dedir.
Üleksit	NaCaB ₅ O ₉ •8H ₂ O	43,0	Üleksit yatakları, Şili, ABD, Peru, Sırbistan, Bolivya, Çin ve Türkiye'de bulunmaktadır.
Probertit	NaCaB ₃ O ₉ •5H ₂ O	49,6	ABD'de Death Valley bor yataklarında bulunmaktadır.
Inyoit	Ca ₂ B ₆ O ₁₁ •13H ₂ O	37,6	ABD., Türkiye
Hidroborsit	CaMgB ₆ O ₁₁ •6H ₂ O	50,5	Arjantin'de kolemanit ile birlikte hidroborsit oluşumu da bulunmakta ve ağırlıklı olarak seramik sanayinde kullanılmaktadır. Ayrıca Kazakistan ve Türkiye'de vardır.
Borasit	Mg ₃ B ₇ O ₁₃ Cl	62,2	Türkiye'de Emet, Kırka, Bigadiç borat yataklarında oldukça sık görülür.
Szaibelyite	MgB ₂ (OH)	41,4	Kazakistan, Çin
Datolit	CaBSiO ₄ OH	24,9	Datolit yatakları esas olarak Rusya'nın Doğu

			bölgelerinde ve Kazakistan'da bulunmaktadır.
--	--	--	--

Bor elementinin kimyasal özelliklerinin detayı ise Çizelge 1.3'te verilmiştir.

Çizelge 1.3. Bor elementinin kimyasal özellikleri (Tombal ve ark., 2016)

Elektrokimyasal Eşdeğer	0,1344 g/amp-hr
Elektronegativite	2,04 Pauling
Füzyon Isısı	50,2 kJ/mol
İyonlaşma potansiyelleri	
Birinci potansiyeli:	8,298 eV
İkinci potansiyeli:	25,154 eV
Üçüncü potansiyeli:	37,93 eV
Değerlik elektron potansiyeli	190 eV

Borun kimyasal özellikleri değişiklik göstermektedir. Örneğin; amorf halinin (mikron boyutunda) tepkimeye girermesi daha kolay olmasına karşın kristalize hali daha karardır ve kolaylıkla tepkime vermez.

Borun indirgeyici özelliği yüksektir. Bu özelliği sayesinde, tüm ametal oksitleri, metal oksitlerin de çoğunluğunu elementel hale indirgeyebilmektedir. Bileşikleri çok karardır olduğundan, boru elementel hale dönüştürmek zordur. (Çalık, 2002 ve Jeogenc, 2021).

Bor madenlerinin değerini belirlemede içindeki B₂O₃ (boroksit) oranı önem taşımaktadır. Bileşikte B₂O₃ oranı yükseldikçe o bileşik daha değerli kabul edilmektedir. Bor ve bazı önemli bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine Çizelge 1.4’de yer verilmiştir.

Çizelge 1.4. Bor ve bazı önemli bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri (ATSDR, 1992; U.S. EPA, 1987; ECETOC, 1994 ve 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 renksiz veya kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz 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	4.72 @ 20°C 27.53 @100°C	4.71 @ 20°C 65.63 @ 100°C	Hızla suyla birleşme

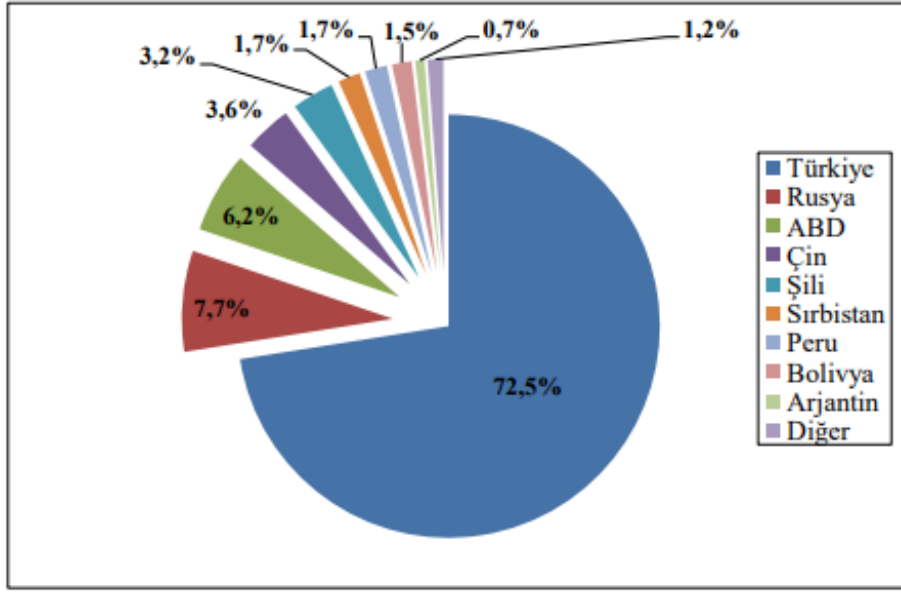
1.1.3. Bor Rezervleri

Dünyadaki en önemli bor yataklarına sahip ülkeler Türkiye, Rusya ve ABD'dir. Dünya ticari bor rezervleri ise 4 farklı bölgede, Mojave Çölü, And Kemer, Güney ve Orta Asya Orojenik Kemer ve Doğu Rusya'da toplanmaktadır. Türkiye bu bölgelerden Güney ve Orta Asya Orojenik Kemer içerisinde bulunmaktadır (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2016).

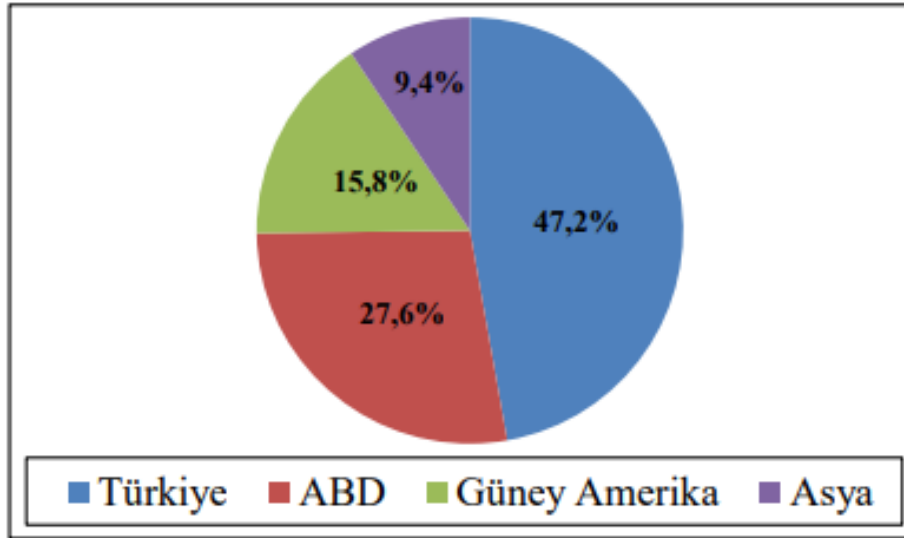
Dünya bor madeni üretimine yıllar bazında daha yakından bakıldığında, üretimin büyük bir kısmının iki ülke tarafından gerçekleştirildiği görülmektedir. Örneğin; 1970 yılında dünya bor madeni üretiminin ABD yaklaşık %66'sını ve Türkiye yaklaşık %16'sını sahipken, diğer ülkelerin üretimi ise yaklaşık %17 civarındadır.

2012 yılındaysa dünyadaki fiili bor madeni üretimi yaklaşık olarak 4 milyon ton (B_2O_3 eşdeğeri cinsinden 1,9 milyon ton) düzeylerindedir. Fiili bor üretiminin B_2O_3 bazında bölgesel dağılımını incelediğimizde; birinci sırada Türkiye yaklaşık olarak %47 pay ile yer almıştır. Bunu ABD, Güney Amerika ve Asya takip etmiştir.

Dünya bor rezervlerinin dağılımı Şekil 1.1'de, dünya fiili bor üretiminin bölgesel bazda dağılımı ise Şekil 1.2'de detaylı bir şekilde gösterilmiştir (Tombal ve ark., 2016).



Şekil 1.1. Bor rezervlerinin dünyadaki dağılımı



Şekil 1.2. Dünya fiili bor üretiminin bölgesel bazda dağılımı

1.1.4. Bor'un kullanım alanları

Kullanım alanları günden güne artan bor mineralleri ve ürünlerinin ticari önemleri geniş ve çeşitli alanlarda karşımıza çıkmaktadır. Bor doğrudan mineral olarak sadece %10'a yakın bir bölümü kullanılmakta, diğer kısmından bor ürünleri elde etmede yararlanılmaktadır (Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü, 2021).

Türkiye'de hava ve askeri araçlar, nanoteknolojiler, uzay araçları, polimerik malzemeler, iletişim sektörü, nükleer uygulamalar, enerji sektörü, yakıtlar, metalürji gibi birçok sektörde bor ürünlerinin kullanımının artırılması istenmektedir ve buna yönelik çalışmalar planlanmaktadır.

Borun inşaat sektöründeki kullanımına bakarsak; bor ürünleri ülkemizde tekstil cam elyafı üretiminde kullanılmakta ve ayrıca selülozik izolasyon malzemeleri, çatı kaplama malzemeleri olarak da kullanılmaktadır. Atık gazete kağıtları, pamuk ve benzeri maddelerin basit yöntemler kullanılarak bor ürünleri ile işlenmesiyle elde edilen selülozik izolasyon malzemelerinin ABD ve özellikle Kuzey Avrupa'daki İskandinav ülkelerinde kullanımına sıkça rastlanmaktadır.

Tarım alanında ise bor bitkiler için mikro besleyici özelliğe sahiptir. Bor takviyesi, meyve ve sebzelerde bitkilerin gelişimi, optimum kalitede ve miktardaki ürün için önem arz etmektedir. Bu amaçla kullanılacak farklı boyutlardaki bor kristallerinin suda çözünürlüğü yüksek ve bor içeriği bakımından zengin olmalıdır. (Üstündağ ve ark., 2014 ve Yakıncı ve Kök, 2016)

Bunların yanı sıra bor, ahşap malzemenin emprenye edilmesi ile hem ahşabın böceklenme vb. etkenleri önleyerek ahşabın ömrünü uzatmakta, hem de tutuşma sıcaklığı geciktirilebilmektedir. Çeşitli suda çözünen veya çözünmeyen bor bileşikleri ve karışımlarını bu amaç doğrultusunda kullanmak mümkün olmakla beraber, ülkemizde bu ürünlerin imalatı için uygun koşullar henüz yoktur.

Bor kullanımının en yaygın olduğu endüstrilerden birisi de cam sanayiidir. Dünya çapında toplam bor kullanım yüzdesinin yaklaşık %42'si cam endüstrisi tarafından yapılmaktadır. Boroksit; borosilikat camlar, tekstil ve yalıtım cam elyafının önemli bir bileşenidir. Cam endüstrisinde bor bileşiklerinin temel tüketimi bu üç ürün tarafından yapılmaktadır. Ayrıca çok kuvvetli bir cam yapıcı özellik gösteren boroksit kristallenmeyi önler. Genleşmeyi düşürmesi sayesinde ısıl şoklara dayanım gücünü artırır.

Borun kullanıldığı bir başka endüstri ise temizletme ve beyazlatma endüstrisidir. Son dönemde kullandığımız deterjanlar birçok farklı maddenin bir araya gelmesinden oluşur. Genel olarak bor, güçlü bir beyazlatıcı özellik göstermektedir. Lekeleri uzaklaştırır, suyu yumuşatır, pH'ı dengeler, yağları parçalar, aktif oksijeni dengeler. Ayrıca bor, antibakteriyel özelliğe sahiptir (Ediz ve Özdağ, 2001 ve Yakıncı ve Kök, 2016).

Tekstil endüstrisinde bor, cam elyaf şeklinde yanmayı geciktirici özelliğinden nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, kumaş boyalarında ve apreleme

işleminde kullanılabilir. Tekstil cam elyafının en önemli özelliği dayanıklılık gücünün yüksek olmasıdır. Darbeler, kimyasallar ve gerilmeler gibi koşullarda yüksek dayanıklılık sağlar ve hafiftir. Bu özellikleri sebebiyle, kuvvetlendirici madde olarak kompozit ve plastiklere eklenir. Kolemanit minerali alkali içermemektedir. Bu özellik sayesinde düşük alkali borosilikat cam (E-glass) yapımında tercih sebebi olmaktadır. Boroksit camın kararlılığını arttırmaktadır. Borik asit daha maliyetli olduğundan, sodyum içermeyen kolemanit mineralinin kullanımı daha fazladır. E-glass uçak, otomobil gibi farklı endüstrilerce sıkça tercih edilmektedir.

Metalürji endüstrisinde bor ve minerallerinden, erime sıcaklığının azaltılması, fırın tuğlalarının daha az aşınmasının sağlanması ve çeliği sertleştirmede gibi sebeplerde yararlanılmaktadır. Bor, kaplama sanayinde lehimleme işlemlerinde ve kullanılan elektrolitlerin oluşturulmasında yer almaktadır (Yakıncı ve Kök, 2016).

Nükleer endüstrisinde ise B^{10} ve B^{11} izotopların nötron absorblama tesir kesiti yükselmesi özelliği nedeniyle Bor izotopları nükleer reaksiyonların denetlenmesine yardımcı olmaktadır. Bazı tip reaktörlerde fazla reaktiviteyi önlemek amacıyla soğutma suyuna borik asit ilave edilir (Ediz ve Özdağ, 2001 ve Yakıncı ve Kök, 2016).

Ayrıca bor; antibakteriyel ve dezenfektan özelliği sayesinde tıpta; ayrıca diş macunlarından şampuanlara, parfümlerden lens solüsyonlarına kadar geniş bir aralıkta borun kullanımına rastlanmaktadır. Borun, Bor Nötron Yakalama Terapisi'nde (BNTC) kanser tedavisinde de kullanımı vardır. Kimya sanayinde de kullanımına

rastladığımız bor ve mineralleri, çeşitli boyalarda, elektrolitik işlemlerde ve korozyon önleyicilerin üretiminde karşımıza çıkmaktadır (Yakıncı ve Kök, 2016).

1.1.5. Bor'un canlılar üzerindeki etkisi

Borik asidin hayvanlardaki letal dozu 1,2 ila 3,45 g/kg arasındadır. Bu doz hayvanın cinsine göre değişmektedir. İçme suyunda 2500 mg/L oranında borik asit bulunması hayvanların büyümesinde problemlere neden olduğu için zararlıdır. Alabalıklar üzerinde gerçekleştirilen bir araştırma, 2000 mg/L kontastrasyonundaki borik asit balık üzerinde herhangi bir zararı olmadığını, ancak bu oranın 5000 mg/L seviyesine çıktığında ise balığın derisinde kararmaya sebep olduğu göstermiştir.

Oral yol ile yüksek doz (3000-4000 mg/kg), sıçanlarda kısa süre içerisinde depresyon ve titremeler yaratmaktadır ve ardından hayvanın ölümü gerçekleşmektedir. Ayrıca; köpeklerde kusma, farelerde ishal gibi belirtilere rastlanmaktadır.

Bor ve bileşiklerinin vücuda giriş yolları, solunum sistemi, sindirim sistemi veya mukoz membranlar şeklinde olmaktadır. Ancak borun vücuda girdiği yoldan bağımsız olarak, vücuttaki borun yaklaşık olarak %85 ila 90'lık kısmı ilk 24 saat içerisinde herhangi bir değişikliğe uğramadan idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırılır. Çözünen bor bileşikleri vücuda alınmasının ardından, beyin omurilik sıvısının (BOS) konsantrasyonu artmakta ve en yüksek konsantrasyonları beyin, karaciğer ve yağ

dokularında görülmektedir. Borun vücuttaki birikimi en fazla kemiklerde olmaktadır. Atılımı ise çoğunlukla üre, süt, ter ve dışkı ile olur.

Elimizdeki çalışmalar, günlük beslenmede normal seviyelerdeki maruziyet koşullarında, bor ve minerallerinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkisi olmadığını göstermekle beraber bu alanda yapılan çalışmaların sayısı görece azdır (Yakıncı ve Kök, 2016).

Çalışmalar borin toksik etkisinin çok düşük olduğunu göstermiştir. Akut etki ancak 2-5 gram borik asit veya 15-30 gram boraksın doğrudan alınımıyla ortaya çıkmaktadır. Kronik etki bakımından, günde 5 gram boraks veya 3 gram borik asit maruziyetinin herhangi bir etkisinin olmadığı, 5-10 gram boraks maruziyetinin sadece protein metabolizmasında bir etki oluşturduğu bulunmuştur. Borun toksik etkisi yetişkinlerdeki belirtileri genellikle baş ağrısı, ishal, kusma, depresyon veya heyecan, çocuklardaki belirtileriyse çoğunlukla beyin zarı tahribatıyla ortaya çıkan havale, koma gibi belirtiler şeklinde görülmektedir. Bor ile zehirlenmeye akla getiren karakteristik özellik, parmak uçlarında görülen pembe renktir. Bazı kaynaklar işçilerin bor tozlarına maruz kalmasıyla beraber, sperm sayısında azalma ve cinsel hayatlarında düşme olduğu öne sürmüştür. Bu kaynaklarda borun testis üzerindeki bahsedilen etkisinin mekanizması açıklığa kavuşamamıştır. Fakat bunlar haricinde dünyada ve ülkemizde gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada borun kısırlığa neden olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (Demirtaş, 2010).

İnsanlar için borun ana kaynağı bitkisel ürünlerdir. Bor, hormonal metabolizmada, enzim reaksiyonlarında ve hücre zarı fonksiyonunda önemli rol alan eser bir elementtir. Ayrıca kalp rahatsızlığı, osteoporoz, felç, yaşlılığı ve diyabeti de

etkilediği bilinmektedir. Bor kalsiyum ve kemik metabolizmasında rol alır. Deneysel çalışmalar, prostat kanserine karşı borun koruyucu özelliklere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Aydın ve ark., 2018; Demirtaş, 2010 ve Üstündağ ve ark., 2014).

Sıkça tüketilen bazı besinlerdeki bor miktarları Çizelge 1.5’te verilmiştir (Hunt ve ark., 1991).

Çizelge 1.5. Sıkça olarak tüketilen bazı besinlerin bor içerikleri

Besinler	Bor Konsantrasyonu (µg/g)
Elma	2,73
Kiraz	1,47
Şeftali	1,87
Armut	1,22
Elma suyu	1,88
Üzüm suyu	2,02
Portakal suyu	0,41
Kuru erik	27
Kuru üzüm	25
Taze fasulye	0,46
Brokoli	1,85
Salatalık	0,0015
Havuç	0,75
Fındık	16
Fıstık	18

Canlıların yaşamlarında esansiyel bir element olan bor yapılmaya devam edilen bilimsel araştırmalar neticesinde; insan sağlığına sağladığı katkılarla beraber sağlık sektöründe artan bir öneme sahiptir. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) yaptığı

açıklamada beslenme yolu ile yetişkin sağlıklı bireylerin 1-13 mg bor tüketebileceğini söylemiştir. Bor bileşiklerinin benzersiz özellikleri sayesinde yerinin doldurulması neredeyse imkansızdır (Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, 2021).

1.2. Sitotoksisite, Nötral Kırmızı Gerilme (Neutral Red Uptake, NRU) Testi

Sitotoksik anlam olarak, hücre ölümüne sebebiyet veren demektir. Herhangi bir maddenin, sitotoksik olup olmadığını anlamak yani potansiyelinin olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla sitotoksisite araştırmaları yapılır. Hücre temelli sitotoksisite çalışmaları, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuştur. Uygulamasının kolay olması, in vivo çalışmalardan çıkan verilerle uyumlu sonuçlar alınması sebebiyle laboratuvarlarda sıkça seçilir bir konuma gelmiştir.

Araştırılan maddenin maruziyet süresine ve dozuna bağlı olarak hücrelerdeki sitotoksik hasarın dereceleri farklılaşmaktadır. Bir hücrenin sitotoksik bir maddeyle maruz kalması sonrasında apoptoz, nekroz ve otofaji gibi sonuçlar doğabilmektedir. Bunların ardından hücre ölümü gözlemlenebilmekte ya da sitostazis nedeniyle çoğalma özelliklerini yitirebilmektedir. Deneysel olarak hücrelerin etkenlere maruziyetleri, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının oranlarının belirlenmesi çalışmalarda önem arz eden noktadır. Sitotoksisite belirleme metotları farklılık göstermekle birlikte genel olarak lüminesans, kolorimetrik ve enzimatik tekniklerdir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Nötral Kırmızısı Gerialımı sitotoksisite deneyi kolorometrik bir yöntemdir. Katyonik süpravital bir boya olan nötral kırmızısının, kimyasal adıyla 3-amino-7-dimetilamino-2metil fenozin hidroklorid, lizozomlarda birikir, elektrostatik olarak lizozomal matriskteki anyonik bölgelere afinite gösterir ve testin prensibi canlı hücrelerce alımından ileri gelmektedir. Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızısının alımını ve bağlanmasını azalmasına neden olarak sağlam veya canlı hücrelerle hasarlı veya ölü hücreleri birbirinden ayrılmasını sağlamaktadır. Nötral kırmızısı boyası lizozomlarda biriktiği zaman hücreler canlı, hasar görmemiş demektir. Nötral kırmızısı alımı sitotoksisite deneyi, oldukça güvenilir bir test yöntemidir (Erkekoğlu ve Baydar, 2021).

NRU yöntemi, belirli bir maddenin varlığında bir boyanın hücresel alımını değerlendiren hücre tabanlı bir yaklaşımdır. Yöntem, bazal sitotoksisiteyi değerlendirmek için kullanılır. Bu tür toksisiteyi değerlendiren analizler, kimyasalların tüm hücreler için evrensel olan yapıları ve işlevleri (örneğin; hücre zarı bütünlüğü, enerji üretimi ve metabolizması, moleküllerin taşınması, moleküllerin salgılanması) bozarak nasıl etki gösterdiğine bakar. Bu, kimyasalların spesifik moleküler hedefler (reseptörler, iyon kanalları vb. gibi) üzerindeki etkilerini değerlendiren analizlere karşılık gelir.

NRU yöntemi spesifik olarak bazal sitotoksisiteyi hedefler çünkü fibroblast hücreleri bu spesifik moleküler hedeflerle ilgili herhangi bir mekanizması bulunmamaktadır ve ayrıca faz I ve II metabolizması açısından herhangi bir metabolik kapasitesi yoktur bir diğer deyişle yani ana bileşikleri metabolize edemezler.

Bazal sitotoksisite deneyleri, IC50 değerleri aracılığıyla sitotoksisiteyi ölçer - hücre kültüründe hücre canlılığını %50 azaltan test kimyasalının konsantrasyonunu bulmayı sağlar. Bu, spektrofotometre ile değerlendirilen boya alımının değerlendirilmesiyle ölçölür (Eu Science Hub, 2021).

1.3. Genotoksisite, Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

1.3.1. Komet Testi'nin Önemi

Nesilden nesile genetik bilgiyi taşıyarak bilgi aktarılmasını sağlayan DNA, kolaylıkla hasar alabilen bir moleküldür. Hasar, normal DNA'nın yapısındaki kimyasal ve fiziksel değişimlerdir. DNA üzerinde oluşan bu hasarların başlıcaları; oksidatif DNA baz hasarı, tek ve çift sarmal kırıkları, DNA-DNA, ı DNA-protein ve DNA-ilaç çaprazlaşmaları ve DNA'da oluşan mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır. Oluşan her hasar DNA üzerinde kalıcı bir etki oluşturmaz, DNA onarım sistemleri tarafından onarılabilmektedir. Ancak onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı veya hasarın fazla olduğu durumlarda DNA'daki hasar hücreyi ölüme kadar götürebilen etkilere neden olur (Fidan, 2008).

Bugüne kadar DNA'da oluşan hasarın belirlenmesi ile ilgili çok sayıda yöntemler kullanılmıştır. Bu tekniklerinin çoğunun çalışma süreleri uzun ve pahalı yöntemlerdir. Zaman zaman da bazı üniversitelerin veya laboratuvarın sahip olmadığı radyoaktif çalışmaları içermektedir ve hatta çalışmaların neticesinde istenilen başarıya

ulaşılamaması bu alanda çalışma yapılmasını güç bir durum haline getirmiştir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Yakın zamanlarda geliştirilen ve DNA sarmal kırıklarının tespitinde kullanılan “Single Cell Gel Electrophoresis” (SCGE) tekniği ucuz, hassas ve hızlı bir yöntemdir. SCGE tekniği farklı isimlerle anılmaktadır, bunlar “Comet Assay” ya da “Microgel Electrophoretic Technique” şeklindedir (Fidan, 2008).

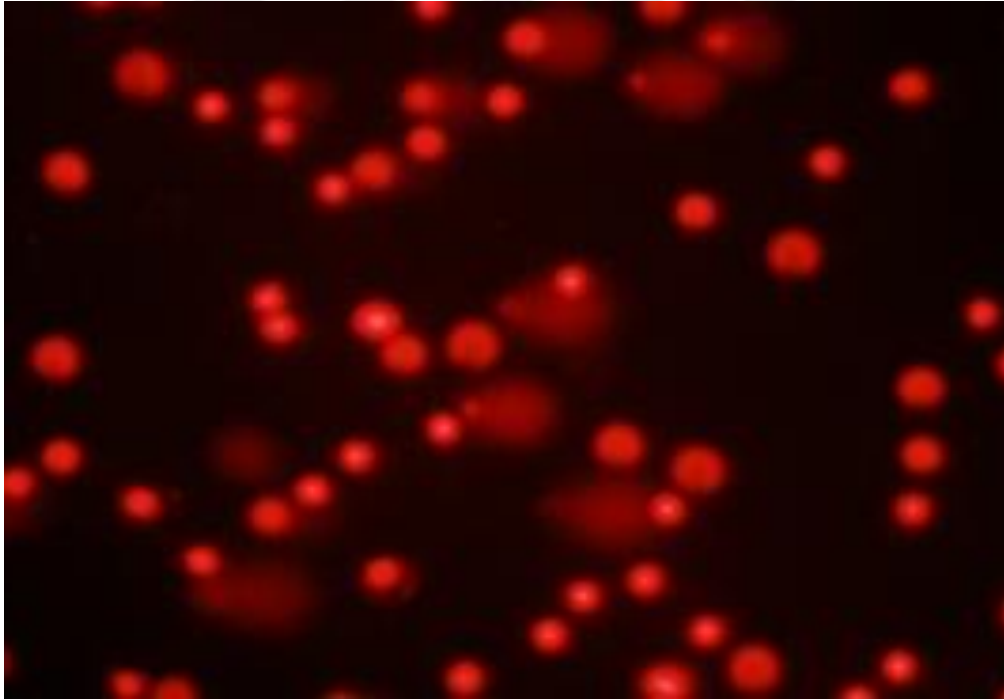
Komet yöntemi, Japonya Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi (JaCVAM) ve Avrupa Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi (ECVAM) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, in vitro memeli hücrelerinde OECD tarafından 2014 yılında valida bir yöntem (test no:489) olarak kabul edilmiştir (Organisation For Economic Co-Operation and Development, 2016)

1.3.2. Komet Testi’nin Prensibi

Komet testinin prensibi ana hatlarıyla, canlı dokulardan izolasyonu sağlanan çekirdek içindeki DNA, agaroz jel içine yerleştirilir ve elektroforetik ortamda yürütülmesi sağlanır. Eğer DNA’da tek veya çift zincir kırılmaları mevcut ise ve tamir mekanizmaları ile tamir edilememişse, kırılmış DNA molekülleri farklı elektrik yüküne ve molekül ağırlığına sahip olurlar. Bu nedenle, DNA molekülleri elektroforetik ortamda girdiğinde göç etmeleri farklı derecelerde olur. Ethidium bromide gibi spesifik boyalarla boyanan DNA, floresan mikroskop ile incelenir.

DNA'daki hasarın boyutuna göre değişen görüntüler oluşmaktadır. Bunlar, dairesel form olabileceği gibi kuyruklu yıldıza benzer bir form da olabilmektedir. Bu nedenle yöntem için İngilizce'de kuyruklu yıldıız anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir.

Komet testi veya SCGE tekniği 1984 yılında stling ve Johansson tarafından temelleri atılmıştır. Ardından farklı araştırmacıların dokunuşlarıyla günümüze kadar modifikasyonlar geçirmiş ve yeni teknikler ile birlikte sunulmuştur (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).



şekil 1.3. Floresan mikroskop altında farklı derecelerdeki DNA hasarınının görüntüsü

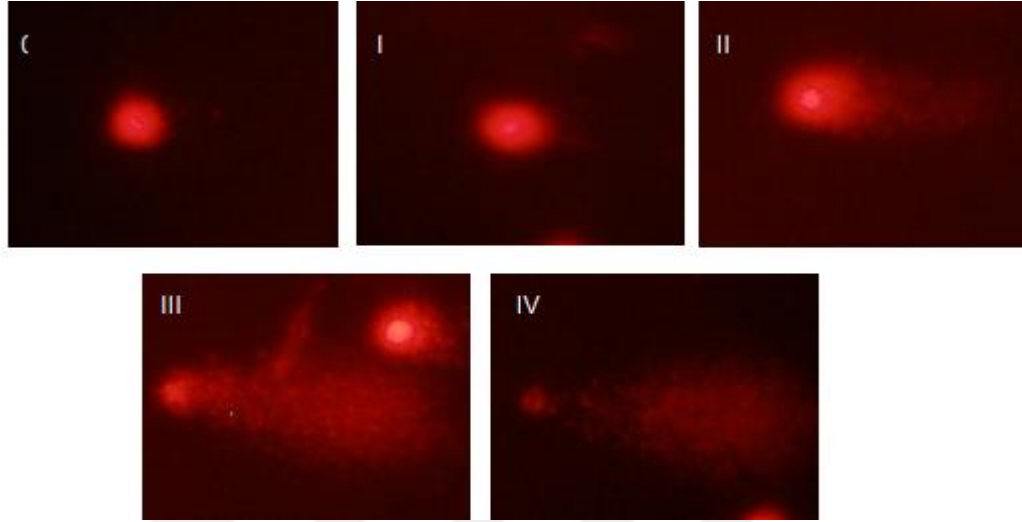
DNA’da oluşan kırılmaları aynı şartlar altında incelemek mümkün değildir. Çift sarmal kırılmaların belirlenmesi için nötral koşullar gerekirken, tek sarmal kırılmaların tespitinde bu koşullar kullanılamamaktadır. Halbuki DNA’da hasar oluşturan ajanların çoğu, DNA üzerinde tek sarmalda hasar oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra nötral koşullarda proteinleri uzaklaştırmak tam olarak mümkün olmamaktadır. Saydığımız bu nedenlerden dolayı, Singh ve arkadaşları 1988’de pH’nın 13 üzeri olduğu ortamda yani alkali koşullar altında, DNA’daki tek sarmal kırılmalarının belirlenmesini mümkün kılan komet tekniği oluşturulmuştur. Bu teknikte, proteinlerin %95’inden fazlasını yok edilmesini sağlayan daha güçlü lizis şartları vardır. Alkali elektroforez uygulaması ile tek zincir kırıklarının ve alkali hareketli bölgelerin duyarlı ve basit bir şekilde tespiti sağlanmıştır. Genotoksik ajanların birçoğunun, alkali hareketli bölgeler ve/veya çift zincir kırıklarından çok tek zincir kırıkları oluşturması sebebiyle metodun bu yeni versiyonun kullanımı daha çok önerilir duruma gelmiştir (Fidan, 2008).

Yapılan araştırmalar neticesinde, nötral deney koşullarının denatürasyonu hızlandırmadığı ve bu koşulların sadece çift sarmal hasarının belirlenmesine neden olduğu gözlenmiştir. Bu durum genotoksisite hakkında elde edilen sonuçlarda daha hassas verilere ulaşılmasına yol açmıştır (Başaran, 2002).

Diğer araştırmacıların da yaptığı katkılar sayesinde komet kuyruk mesafeleri ve komet uzunluğu gibi ek parametrelerde ve görüntü analizlerinde iyileşme sağlanmıştır.

Öncelikle bu metot alkali şartlarda uygulandığı için alkali tek hücre jel elektroforez ya da alkali komet analizi şeklinde anılmıştır. Ancak son zamanlarda, Nötr gevşeme/Nötr elektroforez ve Alkali gevşeme/Nötr elektroforez şeklinde de uygulama yapılmaya başlanmıştır. Sadece mutajenik veya genotoksik maddelerin

oluşturduğu hasara yönelik değil, aynı zamanda DNA üzerinde oksidatif stresin de hasar oluşturmamasından nedeniyle, oksidatif stres alanında da yer alabilecek önemli bir yöntemdir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).



Şekil 1.4. Komet analiz yöntemi ile elektroforetik ortamda agaroz jel üzerinde göç eden farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri. 0- Hasarsız DNA; I- Çok az hasarlanmış DNA; II-Az hasarlanmış DNA; III-hasarlanmış DNA; IV-tümüyle hasarlanmış DNA.

Komet yöntemi ile farklı pH derecelerinde tespit edilebilen DNA hasar tipleri Çizelge 1.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 1.6. Komet yöntemi ile farklı pH'larda tayin edilebilen DNA hasar tipleri

pH: 7-8	pH: 10-12	pH>13
Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları	Çift sarmal kırıkları
Çapraz bağlar	Tek sarmal kırıkları	Tek sarmal kırıkları
	Eksizyon tamir bölgeleri	Eksizyon tamir bölgeleri
	Çapraz bağlar	Çapraz bağlar
		Alkali ortamda açığa çıkan hasarlar

1.3.3. Komet Testi'nin Kullanım Alanları

Canlılardaki genetik bilgilerin tamamını taşıyan DNA'da oluşan negatif değişiklikler, sonraki nesillere aktarılan genetik bilginin değişmesine neden olabilmektedir. Komet testi başlıca, çevre sağlığını tespitinde kullanılmaktadır. Özellikle, kimyasal atıklar, trafik, zehirli gazlar, fabrika artıkları vb. gibi pek çok konunun DNA üzerine hasar verdiği bilinmektedir. Fakat, bu etkilerin moleküler boyuttaki etkilerinin ve sebep oldukları hasar derecelerinin daha iyi analiz edilmesi gerekmektedir.

Bir diğer kullanım alanı ise pestisit çalışmalarıdır. Birçok konuda fayda sağlayan pestisitler, bilinçsiz veya aşırı kullanımı yüzünden çevre, insan ve hedef dahilinde olmayan organizmalar üzerindeki istenmeyen olumsuz etkileri dikkatimizi çekmektedir. Ek olarak, pestisitlerin uygun kullanım periyotlarında ve doğru miktar sınırlarında kullanıldığında zarar oluşturmadığı bilinmektedir. Buna rağmen pestisitlerin uzun süreli kullanımlarında canlı organizmada DNA hasarına neden olduğu ve bunun sonucunda metabolizmada değişikliklere sebep olduğu düşünülmektedir. Bu gibi durumlar komet testi ile hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilebilmektedir (Fidan, 2008).

Komet ölçümü insan çalışmalarında kullanılabilecek en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir (Collins ve ark., 1997).

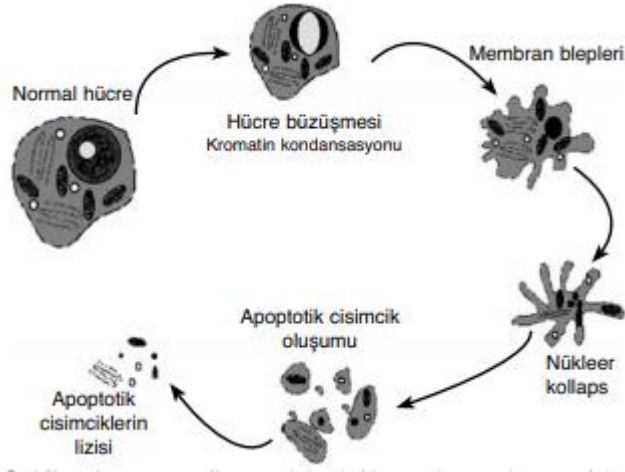
Bunların dışında; ekotoksikoloji, beslenme, genotoksisite biyoizlemesi, hipoksi tayini, insan epidemiyolojisi alanında klinik, çevresel ve mesleki maruziyetlerde DNA hasarının belirlenmesi veya kontrol ile maruziyeti olan gruplar arasındaki DNA onarım farklılığının değerlendirilmesi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Göney, 2016; Turna ve Yavuz, 2016 ve Üzen ve ark., 2019).

1.4. Apoptozis, Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini

Çok hücreli canlılarda, hücre ölümlerinin dengelenmesi için hücre bölünmesiyle beraber hücre sayısı artırılır. Şayet canlı organizmada bir hücreye artık gereksinim yoksa, hücre içindeki ulak sistemlerin aktif edilmesiyle beraber o hücrenin intihar süreci başlatılmış olmaktadır. Programlı hücre ölümleriyle gerçekleşen bu süreç olaya Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz denmektedir. Embriyonik gelişme döneminde gerçekleşen hücre ölümleri, canlılarda başarılı bir organ gelişiminin sağlanabilmesi açısından önemlidir. Apoptoz fizyolojik bir süreçtir ve dokularda hücre sayısının korunması, gelişim ve yaşlanma gibi homeostatik mekanizmaların sağlanmasında görevlidir. Bunun yanı sıra hücreler, zararlı ajanlar tarafından veya hastalık nedeniyle hasarlandığında veya immün sistem reaksiyonlarında koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır (Güleş ve Eren, 2018).

Apoptoz instrinsik veya ekstrinsik olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Ekstrinsik yol, direkt veya dolaylı mekanizma şeklinde kendi içinde iki yola ayrılmaktadır. Apoptoz sürecini harekete geçiren farklı hücre içi sinyaller vardır; pH azalışı, hücre içindeki Ca^{2+} seviyelerinin artışı, DNA hasarı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksidir. Hücre dışı sinyallerse; üreme ve büyüme faktörlerinin az olması, ölüm reseptörlerinin aktive olması (FAS – FAS ligand veya TNF aracılı apoptoz), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (Toksinler, UV, iskemi, kemoterapötik maddeler, radyasyon) olarak sayılmaktadır. Kaspazlar, her iki sinyal yolağında da görev almaktadır. Hücre içi sinyaller instrinsik apoptoz yolağının devreye sokulmasını sağlarken, hücre dışı sinyaller ekstrinsik yolak üzerinden apoptozu indükler (Coşkun ve Özgür, 2011).

Apoptotik hücre sayısının, yaşayabilir hücre sayısına bölünmesiyle apoptotik indeks belirlenmektedir. Bunun için öncelikli olarak apoptozun hücrelerde görünür hale getirilip belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaç doğrultusunda çeşitli biyokimyasal ve morfolojik teknikler geliştirilmiştir (Güleş ve Eren, 2018).



Şekil 1.5. Apoptoza uğrayacak hedef hücrede görülen morfolojik değişimler

Nekroz da hücre ölüm şekli olmaklar beraber apoptoza alternatiftir. Akut doku hasarı ve iskemiye karşı bir mekanizma olarak ortaya çıkabilmektedir. Hücrede iyon pompası yetersizliği ve hücre içerisindeki enerji kaybı, hücreye osmozla su girmesine neden olur ve hücre patlar. Hücre membranının bütünlüğü bozulur ve DNA'nın parçalanması rastgele, düzensiz bir şekilde olur, hücrenin mitokondrisi şişer. Apoptoz görülmeyen ancak nekrozda görülen bir özellik olarak inflamasyon belirteçlerinin pozitifleşerek yükselmesiyle hücre tarafından şiddetli inflamatuvar yanıt verilmektedir (Gültekin ve ark, 2008).

Apoptoz ve nekrozun karşılaştırması Çizelge 1.7'de detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 1.7. Apoptoz ve nektroz karşılaştırması (Coşkun ve Özgür, 2011)

	Apoptoz	Nekroz
Yol Açan Nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması , HIV, Kanser ilaçları,	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Litik viral enfeksiyon,

	Radyasyon, Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, Sitotoksik T lenfositler	Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stress
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. Erken evrede fosfatidil serin translokasyonu gözlenir	Hücre membranı bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organellerin parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. Fosfatidilserin Translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	Programlıdır. ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır (jel elektroforezinde ladder).	İyon dengesi bozulur. ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır (Jel elektroforezinde smear).
Diğer özellikleri	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür. Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.	Hücreler gruplar halinde ölür. Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. İnflamasyona neden olur.

Bu çalışmada apoptoz tayini için Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti kullanılmıştır.

1.4.1. Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini Prensipleri

Sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmaya bakan tarafında membran lipidi fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Bir hücre apoptoza yolağına girerse, normal koşullarda iç yüzeyde lokalize olan fosfatidilserinler hücre zarının dış yüzeyine geçiş yaparlar. Bu yer değişim hareketi, apoptotik yolağın erken dönemlerinde gerçekleşmektedir ve hücre membran bütünlüğünü sabit kalmaktadır. Anneksin V proteini dış yüzeydeki fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir ve floresan maddeler (örneğin; FITC) sayesinde işaretlenerek apoptozis süreçleri başlayan hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre zarının yüzeyindeki

fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri cihazı ile tespit edilebilmektedir. Apoptotik hücrelerin yanı sıra nekrotik hücrelerde de Anneksin-V bağlanması oluşabilmektedir. Bunun ayrımını sağlamak için ikinci boya propidium iyodür katılmaktadır. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya propidium iodide (red fluorescence) ile aynı anda boyanan hücreler; canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler (FITC+PI+) şeklinde birbirinden ayırt edilmesine olanak tanır (Güleş ve Eren, 2008).

1.5. Hücre Kültürü

Harisson tarafından 1907 yılında hayvan hücrelerinin canlı vücudunun dışındaki ortamda incelenebilmesi amacıyla hücre kültürü keşfedilmiştir (Koçaklı ve ark., 2015). Çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında nem, besin, ısı gibi ortam parametrelerinin kontrol edilerek kontaminasyondan uzak bir şekilde yaşatılmasına hücre kültürü denmektedir. Hücre kültürü çalışmalarının tercihinde birçok faktör vardır. Bu faktörlerden bazıları; insan dahil herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin yapay bir ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir organdan yada dokudan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve çoğu etik kaygıyı gidermesidir (Tokur ve Aksoy, 2017). Vücut dışındaki bir ortamda hücrenin kültüre edilmesi vücudun homeostazisi sebebiyle ortaya çıkacak sistemik değişikliklere neden olmasından ve bunların çalışma üzerinde olumsuz etkilerin olması hücre kültürünün negatif yönü olarak nitelendirilebilir (Koçaklı ve ark., 2015).

Bu amaçla insan, maymun, fare tavşan gibi çeşitli canlıların; böbrek, tümör, amniyon zarları, akciğer gibi türlü dokuları kullanılmaktadır. önce parçalanarak tek

tek hücrelerine ayrılırlar. Ayrılan bu hücreler çeşitli tampon maddeleri, aminoasitler, tuzlar, vitaminler, at veya dana serumu içeren besleyici sıvılarda süspansiyonu sonucunda steril kaplara koyulur. 36 °C’de bekletilen hücre süspansiyondaki hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Bu olayın sonucunda hücre kültürü oluşmaktadır (Candan, 2006 ve Freshney, 2015).

Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda iki tür hücre kullanılmaktadır. Bunlar primer hücre ve devamlı hücre hatlarıdır. Doku ve organlardan elde edilen hücrelerin 24 saatten daha fazla süre kültür edilmesi sonucu primer hücre kültürleri elde edilir. Örnek olarak vasküler düz kas hücreleri ve diş eti ve pulpa fibroblastları verilebilir. Primer hücrelerin transformasyona uğraması sonucunda süresiz çoğalabilme özelliğine sahip olmalarıyla beraber devamlı hücre hatları oluşmaktadır. Çalışmalarda çoğunlukla tercih edilen devamlı hücre hatlarına örnek olarak fare fibroblastları (L-929, 3T3) veya insan epitelyal hücreleri (HeLa) verilebilir (Tuncer ve Demirci, 2011). Aşağıdaki tabloda primer hücre kültürü ile devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları verilmiştir.

Çizelge 1.8. Primer hücre kültürü ve devamlı hücre hattının avantaj ve dezavantajları (Tuncer ve Demirci, 2011)

	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ	Süresiz çoğalabilme özelliğine sahiptir. Başka kültürlerle ekilip çoğaltılabilir.	İnsandan izole edilmesi ve kültürünün yapılması zordur. Stabil fenotipe sahip değildir.

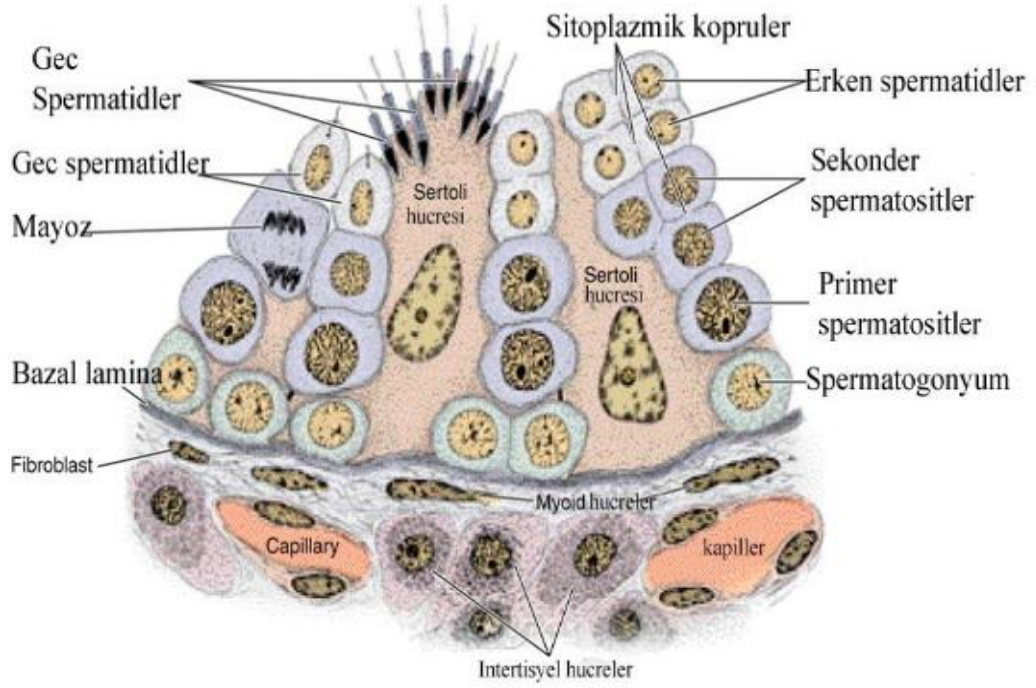
DEVAMLI HÜCRE HATTI	Kolaylıkla çoğaltılabilirler. Daha stabil bir fenotipe sahiptir.	İn vivo özelliklerinin tümünü koruyamazlar.
--------------------------------	---	---

Hücre kültürü çalışmalarının sık sık tercih edildiği alanlar aşı çalışmaları, kanser araştırmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksite çalışmalarıdır (Gilbert ve Boutros, 2016).

Memelilerin erkek üreme organları testis, epididimis, vas deferens, aksesuar bezler (seminal veziküller ve prostat) ve penistir. Testislerin başlıca görevi spermatozoon üretmek, beslemek ve geçici olarak depolamaktır. Testislerde testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölme vardır. Her bölmede gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül bulunur. Bu bağ dokusu bol miktarda lenf ve kan damarı, sinirlerden ve steroid yapıda bir hormon olan testesteron salgılanmasından sorumlu olan Leydig hücrelerinden oluşur (Jangueria ve ark, 1998 ve Jiang ve ark, 2014). Seminifer tübüllerin görevi erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretmektir. Testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur (Ross ve ark, 2006). Seminifer tübül epiteli iki hücre tipinden meydana gelir. Bunlar Sertoli hücreleri ve spermatogenik seriyi oluşturan hücreler olan spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidlerdir. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu boyunca bölünme geçirmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, radyasyon gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler.

Sertoli hücrelerinin, gelişen spermatozooların desteklenmesi, korunması (kan-testis bariyeri) ve beslenmesinin ayarlanması, spermiyogenez sırasında oluşan artık cisimlerin fagositozunun sağlanması, seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgılanması, seminifer tübüller içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanması, FSH sentez ve salınmasını engelleyen inhibin adı verilen bir peptit salgınması, embriyojenik gelişme sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan Anti-Müllerien hormon yapımının sağlanması gibi çok önemli fonsiyonları vardır. Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların oluşturduğu kan-testis bariyeri, gelişen sperm ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyondan korumuş olur. Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini sağlar. Bu durum erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynar (Pelletier ve ark, 1997).

Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir, detaylı gösterim Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil.1.6. Seminifer tübül epiteli: Sertoli ve spermatogenik seri hücreleri ve spermatogenez (Jangueria ve ark., 1998).

Sertoli hücreleri ‘gap junction’ denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da seminifer epitelyum döngüsünün koordinasyonunda önemlidir (Jangueria ve ark., 1998 ve Ross ve ark., 2006). Yapılan çalışmalar germinal hücrelerle sıkı bir ilişki içerisinde olan Sertoli hücrelerini hedef alan kemoteröpatik ajanlar, gossipol, ftalatlar, alkilfenoller, pestisitler, ağır metaller gibi toksikanların spermatogenezi ve germinal hücreleri olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle borik asitin genotoksik ve apoptotik etkilerinin araştırılması için Sertoli hücreleri tercih edilmiştir (Alves ve ark., 2013 ve Bizzaro ve ark., 2003).

Borik asitin HSeC hücre kültürleri üzerindeki genotoksik etkilerinin ve apoptoz/nekroz araştırılması bor bileşiklerinin üreme sistemi üzerine toksik etkilerinin belirlenmesinde son derece önem arz etmektedir. Elde edeceğimiz veriler borik asit ile

ilgili yasal düzenlemelerin hazırlanmasında sağlık ve çevre otoritelerine yardımcı olacaktır.

1.6. Tezin Amacı ve Hedefi

Borik asit ve sodyum boratlar hayvan deneylerinde yüksek dozlarda ortaya çıkan üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkileri nedeniyle Avrupa Birliği, “General classification and labeling requirements for dangerous substances and preparations (67/548/EEC)” kapsamında Kategori 2 altında sınıflandırmıştır. Avrupa Birliğinin bu konudaki yönetmelikleri uyumlaştırma kapsamında CLP (Classification, Labeling and Packaging) Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması yönetmeliğine göre Kategori 1B altında “Presumed human reproductive toxicant” olarak sınıflandırılmaktadır. Kategori 1A ve 1B altında sınıflanmış olan kimyasal maddelerin kullanımının izne tabi olması dünyadaki bor rezervlerinin %75’ine sahip olan ülkemizin borik asit ve sodyum borat ihracatında önemli kurallar ve kısıtlamalar ile karşılaşmasına neden olmaktadır.

Yapacağımız çalışmada borik asitin farklı (hem düşük hem de yüksek) konsantrasyonlarının (0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M) erkek üreme sisteminde sperm üretiminden sorumlu başlıca organ olan testislerin Sertoli hücreleri üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının gösterilmesi amaçlanmıştır. Tezimizden elde edilecek veriler, borik asit ve sodyum boratların kullanımının kısıtlanması sürecine olumlu bilimsel destek sağlayacaktır. Türkiye ve Çin’de yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda insanların günlük olarak maruz kalabilecekleri bor

konsantrasyonlarının üreme sistemi üzerine olumsuz bir etki oluşturmayaçağı gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak hücre hattının bor maruziyetinin hedef aldığı sistemlerden biri olduğı düşünölen üreme sisteminin başlıca organlarından biri olan testislerin Sertoli hücreleridir.

İnsanların bora maruz kalabileceğı en yüksek kan konsantrasyonu 10 μM olarak bulunmuştur (Yılmaz ve ark., 2016). Hücre kültürü ile çalışmanın bir avantajı olarak insanların günlük maruz kalabileceğı konsantrasyonların üzerine çıkılarak borik asit etkileri incelenebilecek ve toksik etkilerin başladığı dozlar tespit edilecektir.

Bu amaçla borik asitin HSeC hücrelerinde hem düşük hem de yüksek konsantrasyonlarda genotoksisite, sitotoksisite ve apoptoz/nekroz tayini yapılacaktır.

Öncelikle, Sertoli hücrelerinde, Nötral Kırmızı Gerialma testi yöntemi kullanılarak Borik asidin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında sitotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmektedir.

İnsan Sertoli hücrelerinin borik asitin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında (hem düşük hem de yüksek dozlarda) hücre ölümünün şekli Flow Sitometri yöntemi kullanılarak apoptik veya nekrotik olarak ayrılacaktır. Bu sayede borik asitin insanların maruz kalabileceğı konsantrasyonlarda ve bundan daha yüksek düzeylerde hücre ölümüne neden olup olmadığının gösterilebilmesi hedeflenmektedir.

Ayrıca, Borik asitin düşük ve yüksek konsantrasyonlarda (0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M) insan Sertoli hücrelerindeki genotoksik etkilerinin komet testi kullanılarak araştırılması hedeflenmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan gereçler

- Fötal Calf Serum (Sigma, ABD)
- L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin (Sigma, ABD)
- DMEM (Sigma, ABD)
- Tripsin-EDTA (Sigma, ABD)
- Metanol (Merck, Almanya)
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi) (Sigma, ABD)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
- Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
- Hidroklorik asit (Merck, Almanya)
- Sodyum klorür (Amresco, ABD)
- Na₂EDTA (Amresco, ABD)
- Tris.HCl (Amresco, ABD)
- Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)
- Triton x-100 (Amresco, ABD)
- Etidium bromür (Sigma, ABD)
- Hidrojen peroksit (Riedel-de Haen, ABD)
- Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma, ABD)
- Normal erime noktalı agar (NMA) (Amresco, ABD)
- Annexin V Kiti (Luminex Corporation, ABD).
- Nötral Kırmızısı (Sigma, ABD)

- Glasiyal asetik asit çözeltisi (MERCK, ABD)
- Etanol (MERCK, ABD)

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

- Karbondioksit 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)
- Floresan Mikroskop (komet testi yazılım programı-Comet Assay IV ile)
- Multiplaka okuyucu (Thermo Scienific 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)
- Buz makinası (Hoshizaki, Avrupa)
- Sıvı azot tankı (International Cryogenics, ABD)
- Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)
- Muse Cell Analyser (Flow Cytometry, Akış Sitometrisi) (ABD)

2.2. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Lizing çözeltisi: 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA steril suda çözülerek NaOH ile pH:10'a ayarlanır. %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün karıştırılır. Deney gününde %1 triton ve %10 DMSO ilave edilerek +4 °C'de soğutularak kullanılır.

Nötralizasyon çözeltisi: 0,4 M Tris tartılır ve steril suda çözülerek pH:10'a ayarlanır.

Alkali elektroforez çözeltisi: 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH steril suda çözülerek pH>13'e ayarlanır, deney gününe kadar +4 °C'de saklanır.

Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/mL stok çözeltisi steril suda hazırlanır. Bu stok çözeltiden boyama sırasında 20 µg/mL hazırlanır, lam üzerine 60 µL damlatılıp üzerine lamel kapatılarak kullanılır.

Agar, düşük erime noktalı (LMA): PBS içerisinde %0,75'lik çözeltisi hazırlanır. Deney günü 37 °C'ye getirilerek kullanılır.

Agar, Normal erime noktalı (NMA): PBS içerisinde %1'lik çözeltisi hazırlanır. Agar içerisine (sıcak halde iken) lamalar daldırılıp, arka yüzeyi silinerek kaplanır ve kurutulur.

DMEM besi yeri: DMEM içerisine %10 FCS, %1 Penisilin-streptomisin ilave edilir. +4 °C’de saklanır. Deney esnasında 37 °C’ye getirilerek kullanılır.

Annexin V: Kit şeklinde alınacak ve protokol uygulanacaktır.

Nötral Red Stok Çözeltisi: 0,4 g nötral red boyası 100 mL steril su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Nötral Red Medyum: 1 mL NR stok çözeltisi 79 mL DMEM (Streptomisin / Penisilin çözeltisi ve fetal sıgır serumu içermeyen) içerisinde çözüldü, 37’de 1 gün bekletildi. Oluşan NR kristallerini uzaklaştırmak için 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.

Etanol / AsetikAsit Çözeltisi (NR Desorb): 1 mL glasiyal asetik asit çözeltisi, 50 mL etanol, 49 mL steril su cam mezur içerisine deneyin yapıldığı gün hazırlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Her bir kuyucukta 4000 hücre/100 µL DMEM medyum (%10’luk) olacak şekilde ayarlandı. Nötral Red Stok Çözeltisi: 0,4 g nötral red boyası 100 mL steril su içerisinde çözülerek hazırlandı.

2.3. Hücrelerin Pasajlanması ve Çoğaltılması

Sıvı azotta saklanan hücreler çıkartıldı. İnsan Sertoli hücrelerinin besi yeri ortamı olarak DMEM medyum kullanıldı.

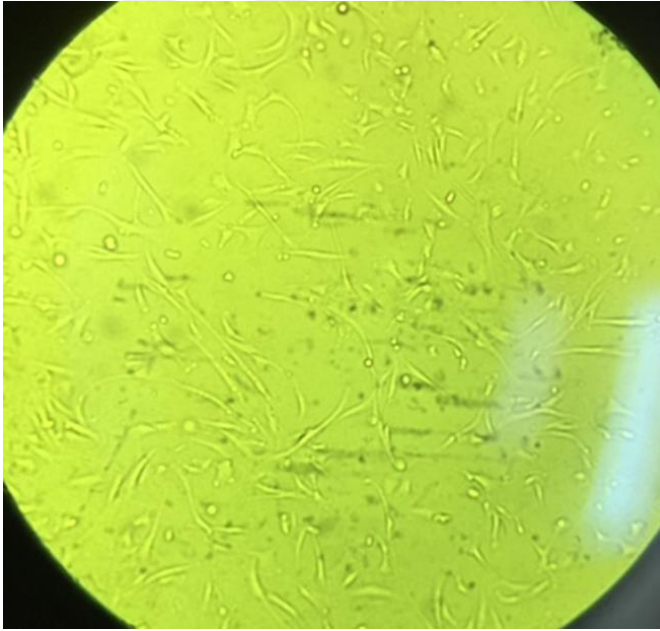
HSeC hücrelerinin çoğaltılması:

- Sıvı azottan çıkarılan hücrelerin 37 °C’de su banyosu yardımıyla 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. 3-4 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).

HSeC hücrelerinin pasajlanması:

- Flasktaki DMEM medyum aspire edildi.

- 2 mL steril PBS (37 °C) ile yıkandıktan sonra, PBS aspire edildi
- 2 mL EDTA (versene çözeltisi) ilave edildi.
- 2 mL tripsin/EDTA (37°C) konulduktan sonra ve 37°C’de 4 dakika bekletildi
- 2 mL TNS (Tripsin nötralizasyon çözeltisi) ilave edildi ve hafifçe çalkalandı (tripsinin çalışmasını durdurmak için).
- Bu 4 mL’lik hücre suspansiyonu pastör pipet ile 15 mL’lik tüpe aktarıldı.
- 1000 rpm oda sıcaklığında 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 5 mL DMEM medyum içerisinde 300 000 hücre olacak şekilde flaska konuldu.



Şekil 2.1. İnsan sertoli hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü

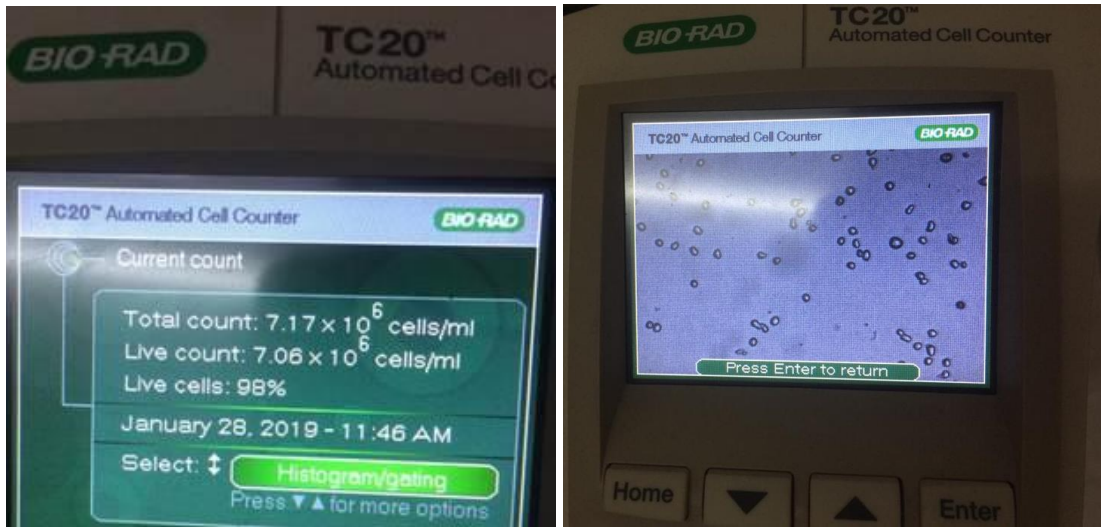
Hücrelerin sayılması:

Tezimizde kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya atılım yöntemi kullanılarak belirlendi.



Şekil 2.2. TC 20 cihazı, kullanılan sayım lamaları ve tripan mavisi

Bu yöntemde; hücre süspansiyonu %0,4'lük tripan mavisiile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, sayım lamı üzerine yüklenerek TC-20 cihazı ile hücre sayımı yapıldı.



Şekil 2.3. TC20 sayım cihazında 1 mL süspansiyondaki canlı hücrelerin sayısı ve görünümleri

2.4. Borik Asit Maruziyeti

İnsan sertoli hücresine (HSeC) borik asitin hem düşük hem yüksek konsantrasyonlarını içeren 6 farklı konsantrasyonu uygulandı. HSeC hücrelerinde test ettiğimiz borik asit konsantrasyonları, insanların maruz kalabileceği en yüksek kan konsantrasyonu 10 μM göz önüne alınarak, insanların günlük maruz kalabileceği konsantrasyonların üzerine çıkmıştır ve bu konsantrasyonlarda borik asitin etkileri incelenebilecek ve toksik etkilerin başladığı dozlar tespit edilecektir.

Borik asit için: 1000 μM 'lık stok çözeltisi steril suda çözülerek hazırlandı. 0,22 μM filtreden geçirilerek sterilize edildi ve tüm testler için kullanılacak konsantrasyonlar için uygun miktarda seyreltme yapılarak 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlardaki Borik asit çözeltisi elde edildi.

2.5. Kırmızı Nötral Gerilme (NRU) Testinin Yapılışı

Hazırlanan borik asit 1000 μM 'lık stok çözeltisinden, insan Sertoli hücreleri 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında maruz bırakıldı. Solvan kontrol olarak % 0,1 steril su kullanıldı.

1. Gün:

- 4000 hücre/100 μ L DMEM medyum olacak şekilde hücreler plakalara ekildi.
- Ertesi gün kullanılacak olan test kimyasallarının hesaplamaları yapılarak %5 DMEM medyum ile tüm konsantrasyonlar elde edildi.
- Bu hazırlanan %5 DMEM medyum içerisindeki konsantrasyonlar maruziyetin yapılacağı (sitotoksitenin 2. Günü) gün 37 °C'ye getirilerek kullanıldı.

2. Gün:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
B	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
C	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
D	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
E	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
F	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
G	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM
H	boş DMEM	boş DMEM	SK	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M	10 μ M	50 μ M	100 μ M	500 μ M	1000 μ M	Hücre+DMEM

Şekil 2.4. NRU yöntemiyle sitotoksosite tayininde 96 kuyucukulu plaka şablonu. (SK: Solvan kontrol- Steril su)

Borik asit steril su içerisinde çözülerek hazırlandığı için solvan kontrol (SK) olarak %0,1 steril su kullanıldı. Borik asit 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarda 96'lık plakanın 4-11. sütunlarına uygulandı.

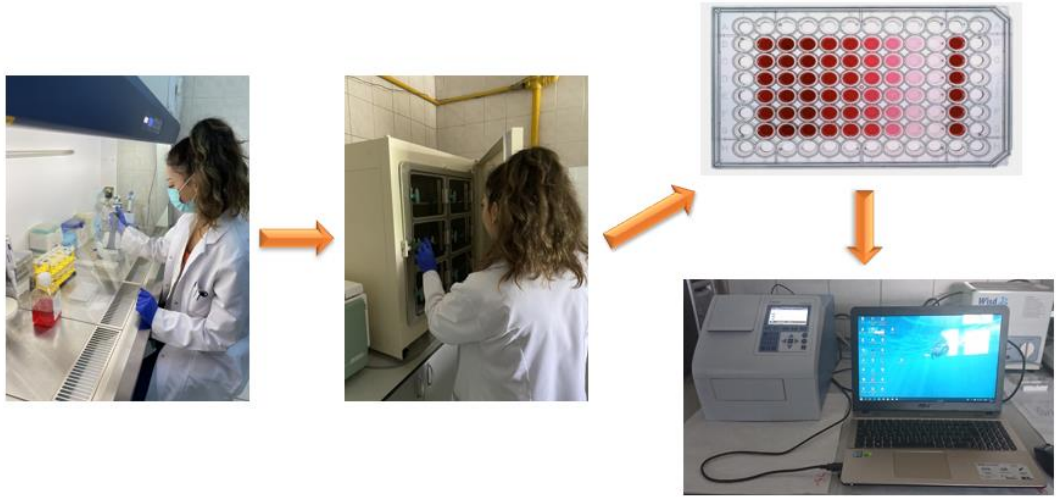
- Kuyucuklar içerisindeki %10 DMEM medyumları aspire edildi. Plakanın 1. ve 12. sütunlarına %5 protein içeren medyumdan 100 μL eklendi. Plakanın diğer sütunlarına SK ve Borik asit artan konsantrasyonlarda eklendi. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

3. Gün

- Buzdolabında saklanmakta olan PBS su banyosunda 37 °C'ye getirildi.
- Kuyucuklar içerisindeki %5 protein içeren medyum aspire edildi.
- Santrifüjleyerek kristalleri uzaklaştırılmış olan NR medyumdan 100 μL ilave edildi ve 37°C'lik CO₂ inkübatöründe 3 saat inkübe edildi.
- Plakaların CO₂ inkübatöründen çıkarılmasına 1 saatten az bir süre kala ethanol/asetik asit çözeltisi (NR desorb) hazırlandı.
- Belirtilen saatin sonunda CO₂ inkübatöründen çıkartılan plakalar içerisindeki NR medyum aspire edilip kuyucuklar 150 μL PBS ile 2 kez yıkandı.
- Bekletmeksizin 150 μL NR desorb ilave edildi. Bu aşamada renklenme gözlemlendi.
- Homojenliği sağlamak amacıyla plakalar 10 dakika boyunca mikrolaka çalkalayıcısında çalkalandı.
- Her bir kuyucuk 540 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucuda okundu.



Şekil 2.5. Multiplaka okuyucu



Şekil 2.6. Kırmızı Nötral Gerilme (NRU) testinin basamakları (EUSAAT, 2013)

2.6. Komet Testinin Yapılışı

Komet testi 6 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başına 200 000/2 mL hücre olacak şekilde uygulandı. Bir kontrol ve bir pozitif kontrol (10 μ M H₂O₂) 2 kuyucuğa uygulandı. Borik asitin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M (sitotoksik etki oluşturmeyen) konsantrasyonları uygulandı.

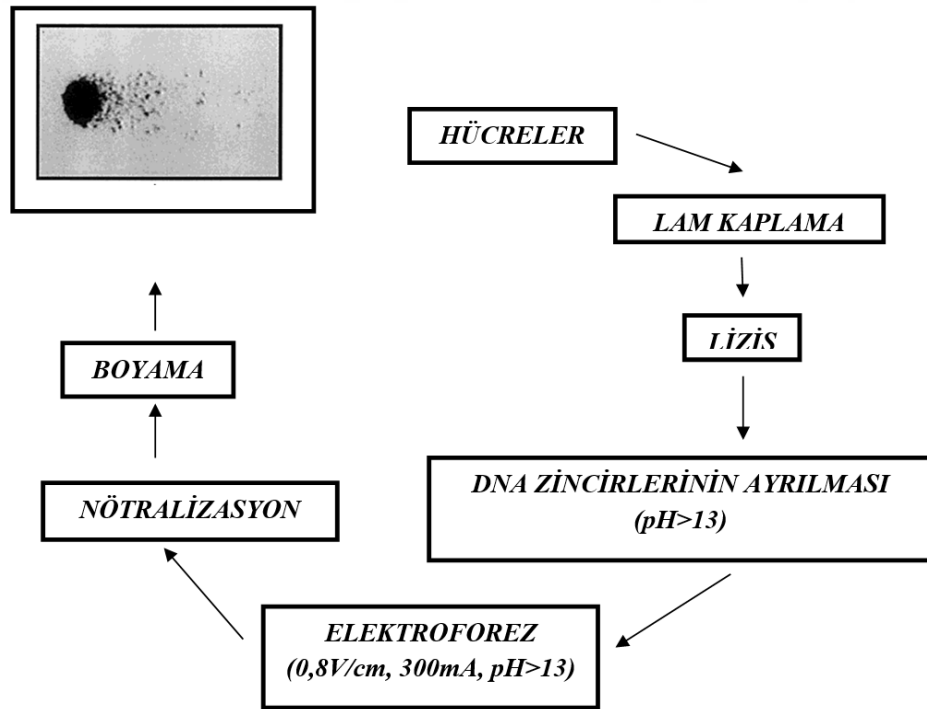
Hücreleri agara alma: Flasklarda üreyen hücreler sayıldı. Uygun hacimlerde plakalara ekildi. İnkübatörde çoğalmaları için bekletildi. Kimyasal maddeye uygun konsantrasyonlarda maruz bırakıldı. Hücreler plakalardan tüplere alındı. Her bir lamda yaklaşık 20 000 hücre olacak şekilde hesaplanarak PBS ile seyreltilti. Hücre süspansiyonundan 50 μ L alındı ve 37°C LMA'dan 100 μ L alınarak karıştırıldı. NMA ile kaplanmış olan lamlara yayıldı. Lam üzerine lamel kapatıldı ve bu şekilde lamlar altında buz kalıpları olan metal bir yüzeye konuldu, agar katılaştıktan sonra üzerlerindeki lamel çıkarıldı.

Lysing: Stok lysing çözeltisinden deney günü taze olarak hazırlanan lysing çözeltisinin buzdolabında soğuması sağlandı, sonra lamlar bir şalede bu çözeltiye daldırılarak yaklaşık 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

Alkali uygulaması (unwinding) ve elektroforez aşaması: Komet testi için özel olan elektroforez tankına soğuk elektroforez çözeltisi (lamaların üzerini 0,5-1 cm geçecek kadar) konuldu. Lamlar, şaleden alındı ve hücre bulunan yüzleri üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine aralarında boşluk kalmayacak şekilde dizildi. Bu şekilde lamlar alkali tampon çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletildi, daha sonra 20 dakika, 25 V ve 300 mA akım uygulayarak elektroforez uygulandı.

Nötralizasyon aşaması: Alkali pH'da yürütülen elektroforez tamamlandıktan sonra elektroforez tankından çıkarılan lamlar şaleye dizildi ve önce steril su ile çalkalandıktan sonra üç kez nötralizasyon çözeltisi ile (her birinde 5 dakika) yıkandı. Daha sonra fiksasyon amacıyla lamlar sırasıyla %50, %75 ve %96'lık alkol içerisinde daldırılarak beşer dakika bekletildi. En son lamlar okuma yapılincaya kadar lam saklama kutusunda saklandı.

Lamların floresan boyanması ve mikroskopta sayılması: Her bir lamın üzerine 60 µL (20 µg/mL) etidium bromür çözeltisi damlatıldı, lamel kapatıldı ve en az 10 dakika bekledikten sonra floresan mikroskopta okuma yapıldı. Her lamda 100 hücre, floresan mikroskopta değerlendirildi ve Comet assay IV programı kullanılarak hücreler sayıldı.



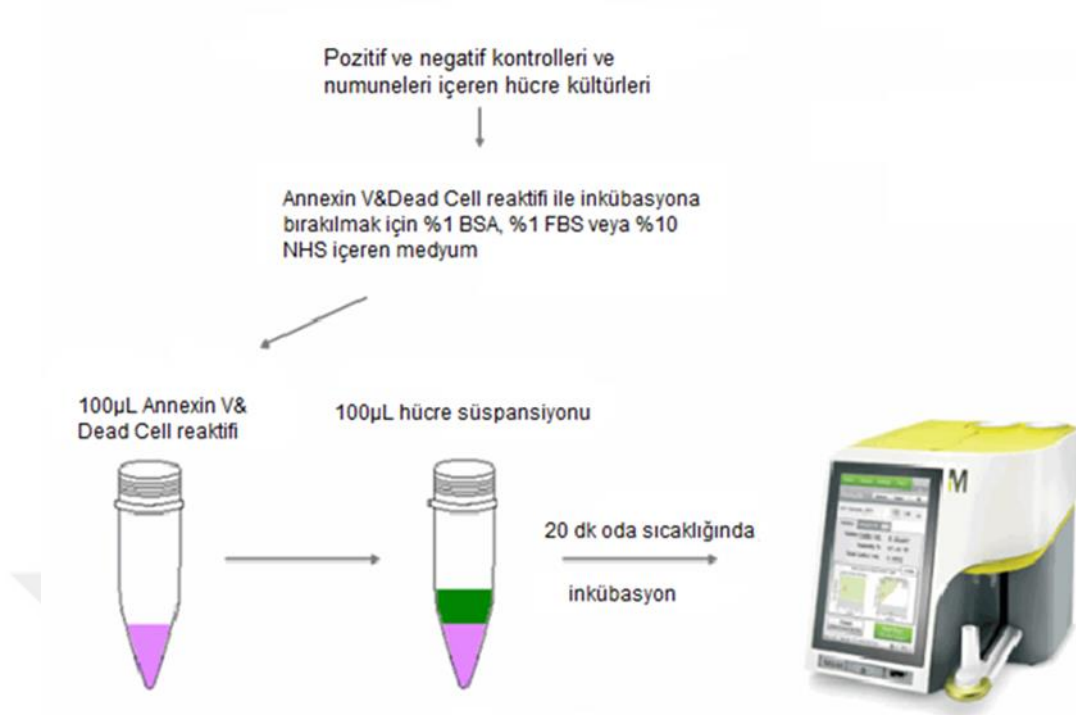
Şekil 2.7. Komet testinin basamakları



2.7. Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini Yönteminin Yapılışı

Sertoli hücreleri besi yeri içerisinde her bir kuyucukta 200 000/2 mL hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler ekildikten 24 saat sonra; Kontrol, Borik asit: 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarda uygulama yapıldı.

Hücrelerin ekiminden sonraki 48. saatte ise Annexin-V&Dead Cell reaktifi ile inkübasyona bırakılmak için besi yerinin %1 BSA, %1 FBS veya %10 NHS içermesine dikkat edilerek, herbir tüpe 100 µL Annexin-V&Dead Cell reaktifi eklendi. 100 µL hücre süspansiyonu herbir tüpün üzerine eklendi. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Muse cell Analyser (Flow Cytometry) cihazında okuma yapıldı.



Şekil 2.10. Muse®Annexin&Dead Cell Assay kiti ile apoptoz tayini yönteminin basamakları

2.8. İstatiksel Değerlendirme

Bu tez kapsamında elde edilecek sonuçlar “SPSS version 20” kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilecek ve sonuçlar yorumlanacaktır. Komet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde her bir numune için tüm 100 sayıma ait DNA kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity) değerleri kontrol ve test kimyasalları grupları olarak kullanılacaktır. Apoptozis ve komet testlerinden elde edilen sonuçlar one-way analysis of variance (Anova) One-Way ANOVA testi ile değerlendirilecektir. Post-hoc analizler (gruplar arasındaki fark) Fischer’s least significant difference (LSD) test ile yapılacaktır.

3. BULGULAR

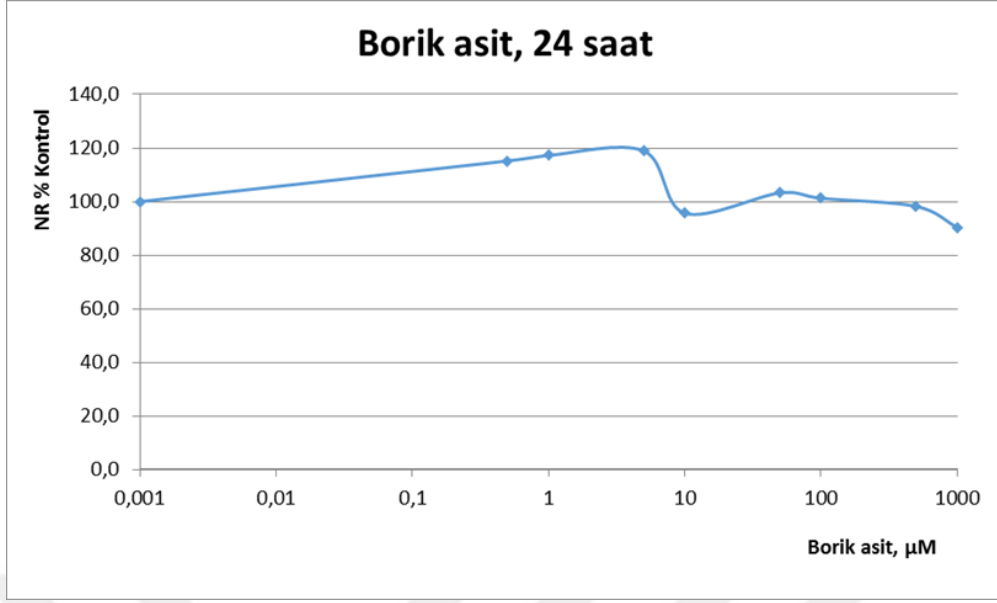
3.1. Sitotoksosite, Nötral Kırmızı Gerilme Testi Sonuçları

Borik asidin, NRU testinin sonuçlarına göre insan Sertoli hücrelerinde 1000 μ M'lik konsantrasyona kadar sitotoksik olmadığı bulunmuştur. Hücrelerin ortalama canlılığı, test edilen tüm konsantrasyon gruplarında %90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Tüm deneyler iki tekrar halinde yapılmış ve sunulan veriler en az iki bağımsız deneyden elde edilmiştir.

Borik Asit ile maruziyet ilk sonuçları:

Çizelge 3.1. Sertoli hücrelerine borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi değerleri

Konsantrasyon μ M	0,001	0,5	1	5	10	50	100	500	1000
% canlılık	100,0	115,2	117,2	118,9	95,7	103,2	101,3	98,2	90,3

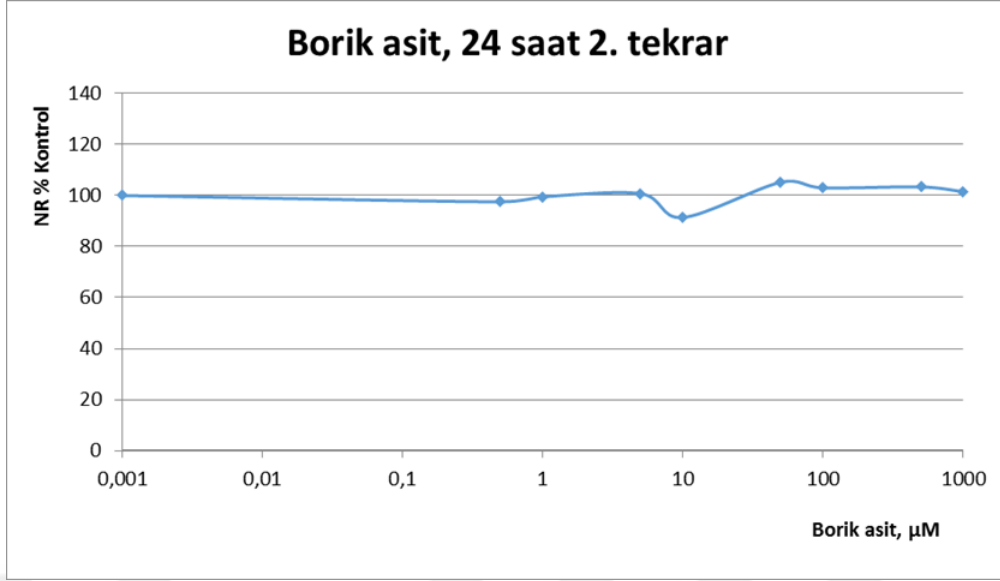


Şekil 3.1. Sertoli hücrelerine borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi sonucu

Borik Asit ile maruziyet 2. tekrar sonuçları:

Çizelge 3.2. Sertoli hücrelerine 2. tekrar olarak borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi değerleri

Konsatrasyon μM	0,001	0,5	1	5	10	50	100	500	1000
% canlılık	100,0	97,5	99,5	100,7	91,4	105,2	103,0	103,4	101,5



Şekil 3.2. Sertoli hücrelerine 2. tekrar olarak borik asit uygulaması sonucunda elde edilen NRU testi sonucu

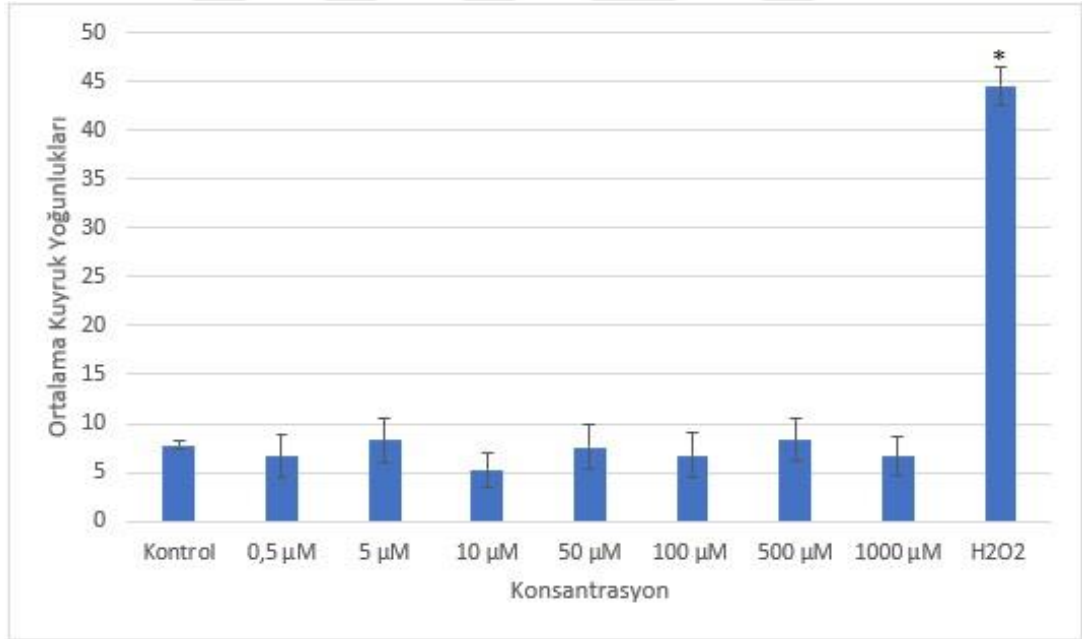
3.2. Genotoksisite, Komet Testi Sonuçları

Rastgele seçilen 100 hücre, Komet IV görüntü analiz yazılımı kullanılarak her numune için puanlanmış ve analiz edilmiştir. Ortalama % kuyruk yoğunluğu değerleri hesaplanmıştır ve bu sonuçlar Komet testinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Şekil 3.3'te detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

Tüm örneklerle ait 100 adet hücrenin Ortalama Kuyruk yoğunluğu değerleri, Standart hata (SEM) ve Minimum-maximum değerleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Borik asidin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarda sertoli hücrelerine uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (BA: Borik asit)

Konsantrasyon (μM)	Kuyruk Yoğunluğu Ortalaması (Ort + SEM)
BA 0,5 μM	6,68 $\pm$ 2,12
BA 5 μM	8,32 $\pm$ 2,29
BA 10 μM	5,27 $\pm$ 1,75
BA 50 μM	7,59 $\pm$ 2,27
BA 100 μM	6,79 $\pm$ 2,30
BA 500 μM	8,35 $\pm$ 2,10
BA 1000 μM	6,62 $\pm$ 1,98



* $p < 0,05$, one-way ANOVA , Kontrolle kıyaslandığında

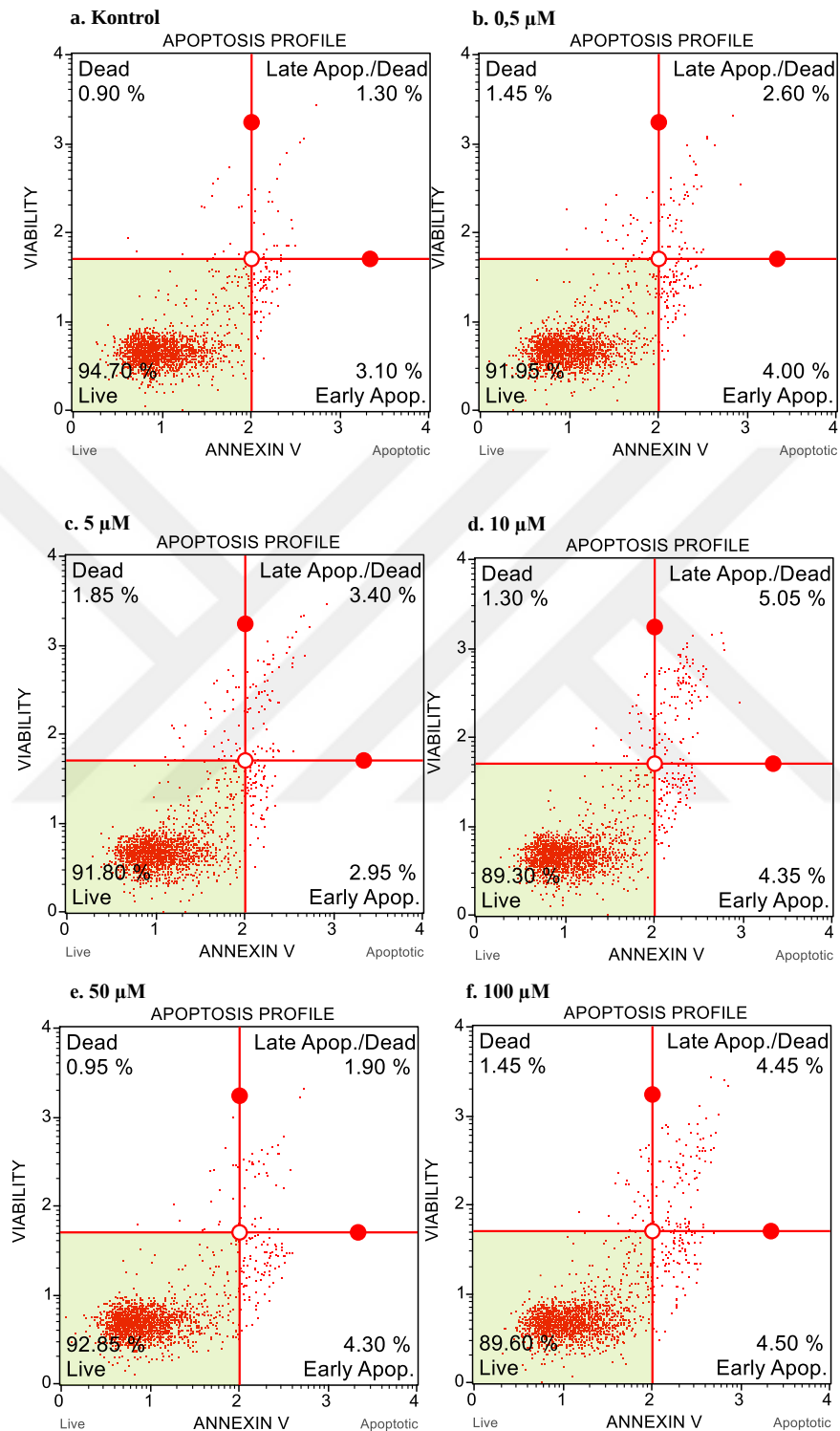
Şekil 3.3. Borik asidin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarda sertoli hücrelerine uygulanması ile elde edilen komet testi sonuçları (Pozitif kontrol olarak 50 μM H_2O_2 kullanılmıştır.)

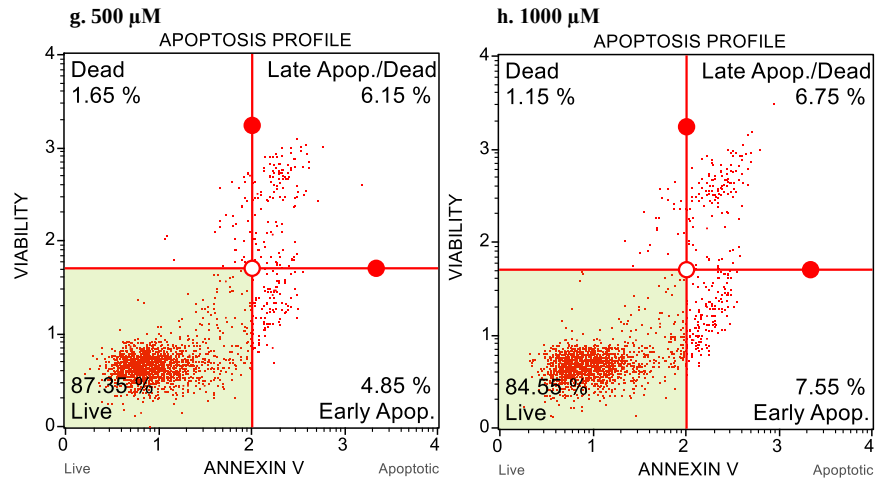
50 μM H_2O_2 , kontrol ile karşılaştırıldığında % kuyruk yoğunluğunu önemli ölçüde arttırmıştır ($p<0,001$). Borik asit, test edilen konsantrasyonların (0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM) hiçbirinde insan Sertoli hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığı görülmüştür. Tüm konsantrasyonlardaki DNA hasarı kuyruk yoğunluğu sonuçlarına göre, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

3.3. Apoptoz, Muse®Annexin&Dead Cell Assay Kiti ile Apoptoz Tayini Testinin Sonuçları

Artan konsantrasyonlarda (0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM) borik asitle maruziyetten sonra apoptoza giren Sertoli hücrelerinin yüzdesi, Muse® Annexin-V ve Ölü Hücre Tahlili kiti kullanılarak tahlil edilmiştir. Borik asit tedavisinin hücrelerin apoptozu üzerindeki etkileri Şekil 3.4'te görülmektedir.

Apoptozun erken ve geç evrelerindeki hücrelerin yüzdeleri ile canlı ve ölü hücreler incelenmiştir. Borik asit hücrelerde apoptozu ve ölümü uyarmamıştır. Erken ve geç apoptoz geçiren hücrelerin yüzdesi Şekil 3.4'te gösterildiği gibi 0,5 ila 1000 μM borik asit maruziyeti ile birlikte değişmediği gözlemlenmiştir.





Şekil 3.4. Borik asidin Sertoli hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri (a. Kontrol; b. 0,5 µM BA; c. 5 µM BA; d.10 µM BA; e. 50 µM BA; f.100 µM BA; g. 500 µM BA; h. 1000 µM BA) (kontrol: solvent, BA: borik asit)

Çizelge 3.4. Borik asidin Sertoli hücrelerinin apoptozu üzerindeki etkileri

Konsantrasyon (µM)	Canlı	Erken apoptotik	Geç apoptotik/Ölü	Ölü	Total apoptotik
Kontrol	94,70	3,10	1,30	0,90	4,40
0,5 µM Borik asit	91,95	4,00	2,60	1,45	6,60
5 µM Borik asit	91,80	2,95	3,40	1,85	6,35
10 µM Borik asit	90,30	4,35	5,05	1,30	8,40
50 µM Borik asit	92,85	4,30	1,90	0,95	6,20
100 µM Borik asit	89,60	4,50	4,45	1,45	8,95
500 µM Borik asit	87,35	4,85	6,15	1,65	9,00
1000 µM Borik asit	84,55	7,55	6,75	1,15	14,30

4. TARTIŞMA

Bor; okyanuslarda, kayalarda, toprakta ve bitkilerde ağırlıklı olarak borik asit veya boratlar şeklinde yaygın olarak bulunur. İnsanlar için günlük yaşamda bor maruziyetinin en yaygın yolu ağızdan yoldur. İnsanlar genellikle içme suyu ve gıdalardan bora esas olarak borik asit veya boratlar şeklinde maruz kalmaktadır. Borik asit ve boratlar da bu sektörlerde çalışan işçiler için ek bor maruziyetine neden olan çok çeşitli endüstriyel kullanımlara sahiptir. Ancak mesleki ortamlarda, bor maruziyetinin ana yolu inhalasyondur (Duydu ve ark., 2012; Dünya Sağlık Örgütü, 1998 ve Kuru ve ark., 2019). Buna göre günlük hayatta her insan belirli bir miktarda bora maruz kalmaktadır. Bu açıdan sertoli hücrelerinde borik asitin güvenli düzeylerinin araştırılması, günlük güvenli bor alım düzeyleri hakkında mutlaka yararlı bilgiler sağlayacaktır.

Dünyadaki bor rezervlerinin %75'ine sahip olan ülkemiz için borik asit ve sodyum boratlar en önemli madencilik ihracat ürünlerindendir. Borun bitkiler için esansiyel olduğu bilinirken; insanlar için de esansiyel olabileceğini destekleyen çalışmalar olmasına rağmen henüz tartışmalıdır. Hayvan çalışmalarında borik asit ve sodyum boratların yüksek dozlarda üreme ve gelişim üzerinde olumsuz etkileri gösterilmiştir. Buna karşılık günümüzde insanlarda bor maruziyeti ile ilişkili üreme sistemi ile ilgili veriler son derecede kısıtlıdır. Borik asit ve sodyum boratlar hayvan deneylerinde yüksek dozlarda ortaya çıkan üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkileri nedeniyle Avrupa Birliği, “General classification and labeling requirements for dangerous substances and preparations (67/548/EEC)” kapsamında Kategori 2 altında sınıflandırmıştır. Avrupa Birliğinin bu konudaki yönetmelikleri uyumlaştırma kapsamında CLP (Classification, Labeling and Packaging) Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması yönetmeliğine göre

Kategori 1B altında “Presumed human reproductive toxicant” olarak sınıflandırılmaktadır. Kategori 1A ve 1B altında sınıflanmış olan kimyasal maddelerin kullanımının izne tabi olması ülkemizin borik asit ve sodyum borat ihracatında önemli kurallar ve kısıtlamalar ile karşılaşmasına neden olmaktadır.

Türkiye ve Çin’de yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda insanların günlük olarak maruz kalabilecekleri bor konsantrasyonlarının üreme sistemi üzerine olumsuz bir etki oluşturmayacağı gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak hücre hattının bor maruziyetinin hedef aldığı sistemlerden biri olduğu düşünülen üreme sistemine ait bir hücre olması sebebiyle tezimiz önem kazanmaktadır.

Seminifer tübüllerde yer alan sertoli hücreleri, spermatogenez, testis oluşumu ve farklılaşmanın düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. Bu özelliklerle ilgili olarak, Sertoli hücreleri son zamanlarda üreme toksikolojisi çalışmaları için bir model olarak kullanılmıştır (Reis ve ark., 2015). Bu çalışmada, borik asit maruziyetinin insan Sertoli hücrelerindeki sitotoksisite, genotoksisite ve apoptozu incelenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, insan Sertoli hücrelerinde borik asidin geniş bir konsantrasyon aralığında (0,5 ila 1000 μM) doz yanıt ilişkisini ortaya koymuştur.

Tezimizde, test ettiğimiz borik asit konsantrasyonları, hem sıçanlardaki gelişim toksisitesi testlerinde fetüsteki kilo kaybını temsil eden NOAEL değerine (9,6 mg/kg/gün) karşılık gelen kan bor konsantrasyonu (1270 ppb), hem de epidemiyolojik çalışmalarda tespit edilmiş olan kan bor (22,1 – 499,2 ppb) konsantrasyonlarını kapsamaktadır. Tezimizde çalışılan 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μM Borik Asit konsantrasyonlarının kan bor ekivalanları sırasıyla 5,4, 54, 108, 540, 1080, 5400 ve 10800 ng/mL’dir. Bu anlamda tezimiz, günlük bor maruziyetinin insanlarda

oluşabilecek kan bor konsantrasyonunun çok üzerindeki konsantrasyonlar da eklenerek planlanmıştır. Tezimiz, tüm bu yönleri ile düşünüldüğünde, ülkemiz açısından ticari değeri büyük olan borik asitin, REACH kapsamında tehlikeli kimyasal maddeler (reprotoxic) listesinden çıkartılması yönünde yapılan çalışmalara katkı sağlayabilecektir.

İnsanlardaki günlük bor maruziyetiyle ilgili olarak Duydu ve ark. (2011) yaptıkları epidemiyolojik çalışmada kan Bor konsantrasyonunu yüksek maruziyette ortalama 223,89 ng/g ve Duydu ve ark. (2019) yaptıkları başka bir çalışmada kan Bor konsantrasyonunu yüksek maruziyette 247,37 ng/g ve aşırı maruziyette 553,83 ng/g olarak bulmuştur. Ayrıca, Xing ve ark. 2008 yılında yaptıkları epidemiyolojik çalışmada ise kan Bor konsantrasyonunun yüksek maruziyette 2003 yılında topladıkları örneklerde 204,8 ng/g, 2004 yılında topladıkları örneklerde 499,2 ng/g olarak bulmuştur.

En çok kullanılan sitotoksikite testlerinden biri olan NRU testi, bir hücre kültüründeki canlı hücre sayısını ölçmek için kullanılır. Borik asidin, 1000 μ M'ye konsantrasyona kadar, Sertoli hücre serisinde sitotoksik olmadığı görülmüştür.

Muse Cell Analyser cihazı ile ve bu markaya ait Muse Annexin V&Dead Cell kitini kullanarak apoptoz-nekroz tayini deneylerimizden elde edilen sonuçlara göre, Borik asit 1000 μ M'a kadar sertoli hücrelerinde apoptozise ve ölüme neden olmamaktadır, bir diğer deyişle borik asitin hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamıştır.

Borik asitin 0,5, 5, 10, 50, 100, 500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda sertoli hücrelerine uygulanması ile elde edilen komet testi kuyruk yoğunluğu sonuçlarına göre borik asit test edilen konsantrasyonlarda DNA hasarına neden olmamaktadır.

Türkez ve ark. (2010) insan kan örneklerinde mikroçekirdek ve kardeş kromatid değişimi (SCE) testlerini kullanarak paklitakselin genotoksik etkilerine karşı borik asitin koruyucu etkisi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca Üstündağ ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada borik asidin V79 hücrelerinde 300 μ M'a kadar sitotoksik olmadığı ve DNA hasarını indüklemediği gösterilmiştir.

Yalçın ve Abudayyak (2020) yaptıkları çalışmada borik asit maruziyetinin fare TM3 Leydig hücreleri kullanılarak erkek reproduktif sistemine etkilerini in vitro incelenmiştir. MTT ve NRU yöntemiyle yapılan sitotoksisite testlerinin sonuçlarına göre borik asidin fare TM3 hücreleri üzerinde 1000 μ M'a kadar sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. Ayroca kaspas-3 kolorimetrik kiti ile hücre ölüm yolağını araştırmışlar ve 1000 μ M'a kadar konsantrasyonda borik asidin hücrelerin ölümüne neden olmadığı bulunmuştur.

Gülsoy ve ark. (2015) bor bileşiklerinin, borik asit (BA) ve boraksın (BX) zebra balığının (Danio rerio) 24, 48, 72 ve 96 saatlik maruziyetlerle (seviye:1, 4, 16, 64 mg/L BA ve BX), kaudal venden periferik eritrositler almış ve genotoksisiteyi değerlendirmek için Komet testi uygulamıştır. Akut (96 saat) maruz kalma ve borik asit ve boraksın yüksek konsantrasyonları, % kuyruk DNA ve kuyruk momentini arttırmıştır. Konsantrasyona bağlı olarak borik asit ve konsantrasyona ve zamana bağlı

olarak boraks için genotoksik etki bulunmuştur. D. rerio'nun periferik kanında borik asit için 24 saatlik maruziyet ve 64 mg/L konsantrasyonda en yüksek DNA hasarı bulunurken; boraksın 96 saatlik maruziyette 1 mg/L, 4 mg/L ve 16 mg/L konsantrasyonlarında DNA hasarını arttırdığı, 64 mg/L konsantrasyonda ise DNA hasarının en yüksek olduğu bulunmuştur.

Hacıoğlu ve ark. (2020) çalışmalarında, 24 saat boyunca DU-145 insan prostat kanseri hücreleri üzerinde diyet alımı ile kanda elde edilebilecek orandan daha yüksek konsantrasyonlarda borik asidin etkilerini değerlendirmiştir. İlk olarak, 3-(4, 5-dimetiltiazol, 2-il)-2, 5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) kullanarak DU-145 insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki borik asidin (0 ila 12,5 mM) sitotoksik aktivitesini belirlemişlerdir. Daha sonra MTT'de bulunan dozlar kullanılarak antioksidan-oksidan moleküllerin ve apoptotik proteinlerin seviyeleri ölçülmüş ve morfolojik değişiklikler değerlendirilmiştir. 6,25 ve 12,5 mM (%45,8 canlılık) konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı bir düşüş olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca, 10,77 mM'ye kadar borik asit konsantrasyonları, DU-145 hücrelerinde kaspaz 3 ve sitokrom C somatik (CASP3 ve CYCS) seviyelerinde konsantrasyona bağlı bir artışa yol açmıştır. Borik asidin DU-145 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve morfolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir.

Barranco ve ark. (2004) yılında prostat kanser hücreleri (DU-145, LNCaP ve PC-3) üzerinde yaptıkları çalışmada 100-1000 µM arasındaki borik asit maruziyetinin, kontrol hücrelerine kıyasla DU-145 hücrelerinde CASP3 aktivitesinde bir artışa neden olmadığını göstermiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmaları desteklemekte ve ayrıca sertoli hücrelerinde benzer konsantrasyonlarda da borik asitin sitotoksik ve genotoksik etkili olmadığını göstermektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tezimizde hedeflediğimiz şekilde borik asitin Sertoli hücreleri (HseC) üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır.

Dünya bor rezervlerinin büyük bir kısmının Türkiye’de olması sebebiyle ülkemiz açısından oldukça önemli bir noktada olan borun, maruziyeti sonucu insan üreme sistemine etkileri konusundaki veriler oldukça sınırlıdır.

Sonuç olarak tezimiz; borik asitin Sertoli hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda dahi sitotoksik ve genotoksik etkili olmadığını göstermektedir. Tezimizde test edilen konsantrasyonlar, epidemiyolojik çalışmalarda bildirilen kan ve meni bor düzeylerinden (Sıçanlardaki gelişim toksisitesi testlerinde fetüsteki kilo kaybını temsil eden NOAEL değerine (9,6 mg/kg/gün) karşılık gelen kan bor konsantrasyonu 1270 ppb, epidemiyolojik çalışmalarda tespit edilmiş olan kan bor 22,1 – 499,2 ppb konsantrasyonları) oldukça yüksektir ve borik asitin toksisite profillerinin aydınlatılmasında kullandığımız hücre tipi nedeniyle bir ilk özelliğindedir.

Ayrıca Türkiye, dünyadaki en geniş bor yataklarına sahip olan ve yüksek kapasiteli bor işletmeleri bulunan bir ülke olduğu için bor ihracatı da ülkemiz için oldukça önem arz ettiği bilinmektedir. Bu yüzden, elde ettiğimiz veriler borik asit ile ilgili yasal düzenlemelerin hazırlanmasında aydınlatıcı nitelikte olacak ve taşıdığı

özgün değerden dolayı sağlık ve çevre otoritelerine bilimsel destek sağlayacaktır. Ayrıca sonuçlarımız, insanlar için güvenli günlük bor alım seviyelerinin belirlenmesinde kullanılabilecek faydalı bilgiler sağlamaktadır.

Bor bileşiklerinin üreme sistemindeki etki biçimini anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



ÖZET

Borik Asitin Potansiyel Genotoksik ve Apoptotik Etkilerinin In-Vitro Hücre Kültüründe Araştırılması

Bor, dünya çapında çeşitli endüstrilerde kullanılmaktadır. Bor, bitkiler için esansiyel bir mikro besindir ve insanlar için “muhtemelen esansiyeldir”. Birçok çalışmada borik asit ve diğer bor bileşiklerinin in vitro hücre kültürü çalışmalarında ve hayvan modellerinde sitotoksik, mutajenik ve genotoksik etkileri olmadığı belirtilirken, bazı çalışmalarda ise aksi yönde sonuçlar öne sürülmüştür. Ayrıca borik asit ve sodyum boratlar, Avrupa Birliği - Sınıflandırma, Etiketleme ve Paketleme Yönetmeliği'nde (EU-CLP Yönetmeliği) gelişme ve üreme için toksik olarak sınıflandırılmaktadır.

Tez çalışmamızın amacı, insan Sertoli hücre kültürlerinde borik asidin sitotoksik, genotoksik etkilere ve apoptoz profillerine neden olup olmadığını in vitro yöntemlerle araştırmaktır. Amacımıza ulaşmak için hücresel canlılık ve DNA hasarı sırasıyla NRU ve alkali Komet analiz yöntemi ile incelenmiştir. Apoptoz profili, akış sitometrisi ile analiz edilmiştir.

Çalışmamız, borik asidin insan Sertoli hücreleri üzerindeki etkilerine dair yeni bilgiler sunmaktadır. Borik asit, üreme toksisitesi modeli olarak kullanılan insan Sertoli hücrelerinde geniş bir borik asit konsantrasyon aralığında (0,5 ila 1000 μ M) hem sitotoksik hem de genotoksik olmadığı bulunmuştur. Borik asit, test edilen konsantrasyonlar dahilinde hücre döngüsü durmasını ve apoptozu uyarmamıştır. Çalışmamızda test edilen konsantrasyonlar, epidemiyolojik çalışmalarda bildirilen kan ve meni bor düzeylerinden oldukça yüksektir.

Anahtar sözcükler: apoptoz, borik asit, komet testi, insan sertoli hücresi, sitotoksisite

SUMMARY

In-Vitro Investigation of Potential Genotoxic and Apoptotic Effects of Boric Acid in Cell Culture

Boron is used in a range of industries around the world. Boron is an essential micronutrient for plants and “probably essential” for humans. Several studies have indicated that boric acid and other boron compounds have no cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects in *in vitro* cell culture studies and animal models, while some studies suggested contrary findings. Moreover, boric acid and sodium borates are classified as toxic to development and reproduction in the European Union - Classification, Labelling and Packaging Regulation (EU-CLP Regulation).

The scope of our study was to ascertain whether boric acid caused the cytotoxic, genotoxic effects, and apoptosis profiles on human Sertoli cell cultures by *in vitro* methods. To reach our goal, the cellular viability and DNA damage was examined by *NRU* and alkaline comet assay, respectively. Apoptosis profile were analyzed by flow cytometry.

Our study provides novel insights into the influences of boric acid on human Sertoli cells. Boric acid was neither cytotoxic nor genotoxic in a wide concentration range of boric acid (0.5 to 1000 μM) in the human Sertoli cells which are used as a model of reproductive toxicity. Boric acid did not stimulate cell cycle arrest, apoptosis within the tested concentrations. The concentrations tested in our study were extremely higher than the blood and semen boron levels reported in epidemiological studies.

Keywords: apoptosis, boric acid, cytotoxicity, comet assay, human Sertoli cells

KAYNAKLAR

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (2005). Erişim Adresi: [https://www.atsdr.cdc.gov/hac/phamanual/pdfs/phagm_final1-27-05.pdf]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.
- ALVES MG, NEUHAUS-OLİVEİRA A, MOREİRA PL, SOCORRO S, OLİVEİRA PF (2013). Exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid alters glucose metabolism in immature rat sertoli cells. *Reprod. Toxicol.* **38**: 81-88.
- AYDIN T, GÖNEN B, ESECELİ H (2018). Bor'un İnsan Sağlığı ve Beslenme Üzerine Etkisi. *SDU Journal of Health Science Institute/SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **9.2**: 119-122.
- BAŞARAN AA (2004). Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiriler, Eskişehir, 4 s.
- BARRANCO WT, ECKHERT CD (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer letters*, **216.1**: 21-29.
- BIZZARO P, ACEVEDO S, NINO-CABRERA G, MUSSALI-GALANTE P, PASOS F, AVILACOSTA MR, FORTOUL TL (2003). Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reprod. Toxicol.* **17**: 561-566.
- CANDAN Ç (2006). Klinik viroloji laboratuvarında uzmanlık öğrencisine verilen hücre kültürü eğitim programı. *İnfeksiyon Dergisi*, **20.3**: 231-241.
- COLLINS A, DUŠİNSKÁ, M, FRANKLIN M, SOMOROVSKÁ M, PETROVSKÁ H, DUTHIE S, ... & VAUGHAN N. (1997). Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and molecular mutagenesis*, **30.2**: 139-146.
- COŞKUN G, ÖZGÜR H (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, **20.3**: 145-158.
- ÇALIK A (2002). Türkiye'nin bor madenleri ve özellikleri. *Mühendis ve Makine Dergisi*, **508**: 36-41.
- DEMİRTAŞ A (2010). Bor'un insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **41.1**: 75-80.
- DİKİLİTAŞ M, KOÇYİĞİT A (2010). Canlılarda "tek hücre jel elektroforez" yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, **14.2**: 77-89.

DUYDU Y, BAŞARAN N, ÜSTÜNDAĞ A, AYDIN S, ÜNDEĞER Ü, ATAMAN OY, AYDOS K, DÜKER Y, ICKSTADT K, WALTRUP BS, GOLKA K, BOLT HM (2011). Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Archives of toxicology*, **85.6**: 589-600.

DUYDU Y, BAŞARAN N, BOLT HM (2012). Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **26.2-3**: 161-164.

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

DUYDU Y, BAŞARAN N, YALÇIN CÖ, ÜSTÜNDAĞ A, AYDIN S, ANLAR HG, BACANLI B, 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. *Archives of toxicology*, **93.3**:743-751.

ENERJİ PORTALI (2019). Erişim Adresi: [<https://www.enerjiportali.com/bor-nedir-nerelerde-kullanilir/#:~:text=Periyodik%20cetvelin%203A%20grubunun%20ilk,Davy%20taraf%C4%B1ndan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir>]. Erişim Tarihi: 15/03/2021.

ENERJİ PORTALI (2019). Erişim Adresi: [<https://www.enerjiportali.com/bor-nedir-nerelerde-kullanilir/#:~:text=Periyodik%20cetvelin%203A%20grubunun%20ilk,Davy%20taraf%C4%B1ndan%20elde%20edilmi%C5%9Ftir>]. Erişim Tarihi: 15/03/2021.

ERKEKOĞLU P, BAYDAR T (2021). Current in vitro cytotoxicity tests Güncel In Vitro Sitotoksiste Testleri, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, **41.1**: 45-63.

ERTÜRK Ş (2001). Sevofluranın DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin Bening Ve Maling Olgularda Comet Assay Yöntemi İle Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji Ve Reanimasyon Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi.

ETİ MADEN İŞLETMELERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2016). Erişim Adresi: [https://www.etimaden.gov.tr/storage/uploads/2018/05/TURKCERAPOR_pdf.pdf]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.

ETİ MADEN İŞLETMELERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2021). Erişim Adresi: [<https://www.etimaden.gov.tr/saglik#:~:text=Bor%20%C3%BCr%C3%BCnlerinin%20kullan%C4%B1ld%C4%B1%C4%9F%C4%B1%20sa%C4%9Fl%C4%B1k%20sekt%C3%B6r%C3%BCnde,kemik%20yap%C4%B1s%C4%B1n%C4%B1n%20g%C3%BC%C3%A7lenmesine%20yard%C4%B1mc%C4%B1%20olmaktad%C4%B1r>]. Erişim Tarihi: 22/03/2021.

EU SCIENCE HUB (2021). Erişim Adresi: [<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/acute-toxicity/3t3-nru-aot>]. Erişim Tarihi: 5/5/2021.

EUROPEAN CENTER FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICALS (2014). Erişim Adresi: [<https://www.ecetoc.org/wp-content/uploads/2014/08/ECETOC-TR-058.pdf>]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.

- EUROPEAN SOCIETY FOR ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING (2013). Erişim Adresi: [https://www.eusaat-congress.eu/images/2013/presentations/spielmann_horst_eusaat_linz_2013_esnats_ros_assay_validation_study_jacvam.pdf]. Erişim Tarihi: 20/07/2021.
- FİDAN AF (2008). DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **8.1**: 41-52.
- FRESHNEY RI (2015). Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. *John Wiley & Sons*.
- GILBERT DF, BOUTROS M (2016). A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. In: High-Throughput RNAi Screening. *Humana Press*, New York, NY, **1470**: 75-84.
- GÖNEY G (2016). Çevre Kirliliğinin Biyoizlenmesinde Balıklarda Genotoksisite Testleri. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **9.1**: 43-49.
- GÜLEŞ Ö, ÜLKER E (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **19.2**: 73-78.
- GÜLSOY N, YAVAŞ C, MUTLU Ö (2015). Genotoxic effects of boric acid and borax in zebrafish, *Danio rerio* using alkaline comet assay. *EXCLI journal*, **14**: 890.
- GÜLTEKİN N, KARAOĞLU K, KÜÇÜKATEŞ E (2008). Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi veyeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneğİ Arşivi*, **36.2**: 120-130.
- HACIOĞLU C, KAR F, KAÇAR S, ŞAHİNTÜRK V, KANBAK G (2020). High concentrations of boric acid trigger concentration-dependent oxidative stress, apoptotic pathways and morphological alterations in DU-145 human prostate cancer cell line. *Biological trace element research*, **193.2**: 400-409.
- JANGUERIA LC, CARNEIRO J, KELLEY OR (1998). Temel histoloji (Çeviri: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışhalı B.), Barış kitabevi, 407-422.
- JEONGENC (2020). Erişim Adresi: [https://www.jeongenc.net/bor-mineralleri-borun-kimyasal-ve-fiziksel-ozellikleri.html]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.
- JIANG MH, CAI B, TUO Y, WANG J, ZANG ZJ TX (2014). Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction, *Cell Research*, **24**:1466-1485.
- KISTLER RB, HELVACI C (1994). Boron and borates. *Industrial minerals and rocks*, **6**: 171-186.
- KURU R, YILMAZ S, TASLI PN, YARAT A, SAHIN F (2019). Boron content of some foods consumed in İstanbul, Turkey. *Biological trace element research*, **187.1**: 1-8.

- MADEN TETKİK VE ARAMA GENEL MÜDÜRLÜĞÜ (2021). Erişim Adresi: [https://www.mta.gov.tr/v3.0/bilgi-merkezi/maden-kullanım-alanlari]. Erişim Tarihi: 22/03/2021.
- NEZAHAT E, ÖZDAĞ H (2001). Bor mineralleri ve ekonomisi. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **002**: 133-151.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (2016). Erişim Adresi: [https://www.oecd.org/env/test-no-489-in-vivo-mammalian-alkaline-comet-assay-9789264264885-en.htm]. Erişim Tarihi: 25/04/2021.
- OSTLING O, JOHANSON KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **123.1**: 291-298.
- OZKAN SG (1994). Flotation studies of colemanite ores from the Emet deposits of Türkiye. PhD Thesis. University of Birmingham.
- ÖZKAN ŞG, ÇEBİ H., DELİCE S, DOĞAN M (1997). Bor minerallerinin özellikleri ve madenciligi, 2. *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu İzmir*, 224-228.
- PEHLIVAN Y (2014). Geleceğin Elementi Bor. *Aydınlanma 1923*, **47.47**: 28-39.
- PELLETIER RM, OKAWARA Y, VITALE ML, ANDERSON JM (1997). Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms a+ and a-in Guinea Pig Sertoli Cells: A Possible Association with F-Actin and G-Actin. *Biol Reprod*, **57**:367-376.
- PENLAND JG (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental health perspectives*, **102(suppl 7)**: 65-72.
- REIS MM, MOREIRA AC, SOUSA M, MATHUR PP, OLIVEIRA PF, ALVES MG (2015). Sertoli cell as a model in male reproductive toxicology: advantages and disadvantages. *Journal of Applied Toxicology*, **35.8**: 870-883.
- ROSS HM, ROMRELL JL (2006). Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd Ed., 603-62.
- TOKUR O, AKSOY A (2017). In vitro sitotoksites testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **6.1**: 112-118.
- TOMBAL TD, ÖZKAN ŞG, ÜNVER İK, OSMANLIOĞLU AE (2016). Bor bileşiklerinin özellikleri, üretimi, kullanımı ve nükleer reaktör teknolojisinde önemi. *Bor Dergisi*, **1.2**: 86-95.
- TUNCER S, DEMİRCİ M (2011). Dental Materyallerde Biyouyumluluk Değerlendirmeleri. *Atatürk Üni. Diş. Hek. Fak. Derg.*; **21**: 141-149.
- TURNA F, YAVUZ M (2016). Ağır Metal Kirliliği Olan Alanlarda Genotoksitesite Tayini ve Biyoizlem Çalışmalarında Bazı Kemirgenlerin Kullanılması. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, **9.1**: 56-64.

TÜRKEZ H, TATAR A, HACİMÜFTÜOĞLU A, ÖZDEMİR E (2010). Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta Biochimica Polonica*, **57.1**: 95-7.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1987). Erişim Adresi: [<https://www.epa.gov/epcra/1987-final-rule-emergency-and-hazardous-chemical-inventory-forms-and-community-right-know>]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.

ÜSTÜNDAĞ A, BEHM C, FÖLLMANN W, DUYDU Y, DEGEN GH. (2014). Protective effect of boric acid on lead-and cadmium-induced genotoxicity in V79 cells. *Archives of toxicology*, **88.6**: 1281-1289.

ÜZEN R, TOMATIR A, CÜCER N, ALTUNTAŞ H. (2019). Comet assay and applications. *International Journal of Scientific and Technological Research*, **5.5**: 9-16.

YAKINCI ZD, KÖK M (2016). Borun sağlık alanında kullanımı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, **4**: 36-44.

YALÇIN CO, ABUDAYYAK M (2020). Effects of boric acid on cell death and oxidative stress of mouse TM3 Leydig cells in vitro. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **61**: 126506.

YENİ D, FİDAN AF, GÜNDÖĞAN M (2010). Spermatozoon'da Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) ile DNA Hasarı Tespiti. *FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg*, **24**: 167-173.

YILMAZ S, ÜSTÜNDAĞ A, ÜLKER OC, DUYDU Y (2016). Protective Effect of Boric Acid on Oxidative DNA Damage In Chinese Hamster Lung Fibroblast V79 Cell Lines. *Cell Journal (Yakhteh)* **17.4**: 748-754.

YİĞİTBAŞIOĞLU H (2014). Türkiye için önemli bir maden: Bor. *Coğrafi Bilimler Dergisi*, **2.2**: 13-25.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998). Erişim Adresi: [https://www.who.int/whr/1998/en/whr98_en.pdf]. Erişim Tarihi: 20/03/2021.