



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



BORİK ASİTİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE ARAŞTIRILMASI

Sezen YILMAZ

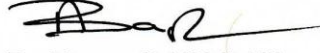
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Yalçın DUYDU

2014 – ANKARA

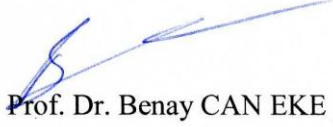
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/01/2014



Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
(Jüri Başkanı)



Prof. Dr. Benay CAN EKE
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Yalçın DUYDU
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
(Danışman)



Prof. Dr. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Tülay ÇOBAN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bor	1
1.1.1. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	1
1.1.2. Borun Doğada Bulunuşu	4
1.1.3. Borun Endüstride Kullanımı	4
1.1.4. Borun Sağlık Üzerine Yararlı Etkileri ve Tedavide Kullanımı	6
1.1.4.1. Borun Antioksidan Özelliği	7
1.1.4.2. Borun İmmün Sistem Üzerine Etkileri	9
1.1.4.3. Borun Sinir Sistemi Üzerine Etkileri	10
1.1.4.4. Borun Üreme Sistemleri Üzerine Etkileri	11
1.1.4.4.1. Borun Prostat Kanseri Üzerine Etkileri	12
1.1.4.4.2. Borun Vajinal Enfeksiyonlar Üzerine Etkileri	13
1.1.4.5. Borun İskelet ve Kas Sistemi Üzerine Etkileri	14
1.1.4.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar	15
1.1.4.6.1. Serbest Radikal Türleri	16
1.1.4.6.1.1. Hidrojen Peroksit	17
1.1.4.6.2. Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri	18
1.1.4.6.3. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları	19
1.1.4.6.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	22
1.1.4.6.5. Antioksidan Etki Mekanizmaları	22
1.1.5. Borun Toksik Etkileri	24
1.1.5.1. Borun Akut Toksik Etkileri	24

1.1.5.2.	Borun Kronik Toksik Etkileri	27
1.1.5.2.1.	Borun Karsinojenitesi	28
1.1.5.2.2.	Borun Üreme Üzerine Toksik Etkileri	28
1.2.	Hücre Kültürü	30
1.2.1.	Hücre Kültürü Teknolojisinin Tarihçesi	31
1.2.2.	Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları	32
1.2.3.	Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Avantajları	32
1.2.4.	Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Dezavantajları	33
1.2.5.	Başlıca Hücre Kültür Tipleri	33
1.2.5.1.	V79 Hücre Serisi	34
1.3.	Sitotoksisite Testleri	35
1.3.1.	Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksisite Testi	37
1.4.	DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler	37
1.4.1.	Komet Testi (SCGE: Tek Hücre Jel Elektrophorezi)	38
1.4.1.1.	Komet Testinin Kullanım Alanları	40
1.4.1.2.	Komet Testinin Avantajları	41
1.4.1.3.	Komet Testinin Dezavantajları	42
1.5.	Tezin Amacı	42
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	43
2.1.	Gereç	43
2.1.1.	Kullanılan Maddeler	43
2.1.2.	Kullanılan Aletler ve Malzemeler	44
2.2.	Yöntem	45
2.2.1.	Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	45
2.2.2.	V79 Hücrelerinin Sıvı Azottan Çıkarılmaları	47
2.2.3.	V79 Hücrelerinde Yeni Pasajın Yapılması	48
2.2.4.	Hücre Sayımı	49
2.2.5.	Sitotoksisite Testinin Uygulanması	50
2.2.5.1.	Borik Asit İçin Sitotoksisite Testleri	50
2.2.6.	Komet Testi	52

2.2.6.1.	V79 Hücrelerinde DNA Hasarı Tespiti	52
3.	BULGULAR	57
3.1.	Nötral Kırmızı Alımı Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlar	57
3.2.	Komet Testi Yöntemiyle ile Elde Edilen Sonuçlar	58
3.2.1.	Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H ₂ O ₂ ile Elde Edilen Sonuçlar	59
3.2.2.	Borik Asit ile Elde Edilen Sonuçlar	61
4.	TARTIŞMA	69
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	74
ÖZET		76
SUMMARY		77
KAYNAKLAR		78
ÖZGEÇMİŞ		88

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yürüten, yardım ve bilgilerini esirgemeyen, tecrübeleriyle beni yetiştiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yalçın DUYDU'ya,

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer hocalarına,

Tezim ve öğrenciliğim süresince yardım, hoşgörü ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili hocam Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ'a,

Araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Son olarak beni bugünlere getiren, her anımda yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALS	Alkali-kararsız bölgeler (Alkali-labile sites)
BER	Baz kesip çıkarma onarımı (Base excision repair)
CA	Komet testi (Comet Assay)
CAT	Katalaz
CO ₂	Karbondioksit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSB	DNA çift zincir kırıkları (Double strand break)
FADU	Fluorescence Analysis of DNA Unwinding
FISH	Fluorescent in situ hybridization
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HR	Homolog rekombinasyon (Homologous recombination)
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insülin-like growth faktör)
Komet (comet) testi	Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE)
LMA	Düşük erime noktalı agar (Low melting point agar)
MMT	Tetrazolyum tuz redüksiyonu (Tetrazolium Salt Assay)
MN	Mikroçekirdek (Micronucleus)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NER	Nükleotid kesip çıkarma onarımı (Nucleotide excision repair)
NHEJ	Homolog olmayan şekilde bağlanma (Non homologous end joining)
NMA	Normal erime noktalı agar (Normal melting point agar)
NR	Nötral kırmızı (Neutral red)
NR desorb	Etanol / asetik asit çözeltisi
NRU	Nötral kırmızı alımı (Neutral red uptake)

PBS	Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PSA	Prostat spesifik antijen
RNT	Reaktif nitrojen türleri (Reactive nitrogen species)
ROT (ROS)	Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species)
SCE	Kardeş kromatit değişimi (Sister chromatit exchange)
SOD	Süperoksit dismutaz
SSB	DNA tek zincir kırıkları (Single strand break)
TAC	Total antioksidan kapasite (Total antioxidant capacity)
Tail % Intensity	Ortalama kuyruk yoğunluğu (%)
Tail Moment	Ortalama kuyruk momenti
tGSH	Total glutatyon
V79	Çin hamstırı akciğer hücreleri (Chinese hamster lung cells)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	DNA hasar çeşitleri.	19
Şekil 1.2.	BER (baz kesip çıkarma onarımı) ve NER (nükleotid kesip çıkarma onarımı) yolları. A) BER temel enzimatik basamaklarının şematik gösterimi. B) NER temel enzimatik basamaklarının şematik gösterimi. C) IR ile oluşan DNA hasar formları.	21
Şekil 1.3.	Alkali komet sınıflandırması. Normal çekirdek (Sınıf 0), çekirdeğin etrafında hale (Sınıf 1), yavaşça artan komet kuyruk uzunluğu ve buna paralel olarak hücrenin DNA içeriğinin azalması (Sınıf 2 ve Sınıf 3).	39
Şekil 1.4.	H ₂ O ₂ maruziyetinden sonra oluşan DNA hasar seviyelerinin komet testindeki görüntüleri.	40
Şekil 2.1.	Hücre sayım lamı (Improved Noubauer).	49
Şekil 2.2.	Borik asite maruz bırakılan V79 hücrelerinin nötral kırmızı alımı testi sonuçları (Resimlerde 96 kuyucuklu plakaların görüntüsü verilmiştir).	52
Şekil 2.3.	Komet testi sırasında V79 hücrelerinin agara alınması işlemi.	54
Şekil 2.4.	Şalelerin lizing işlemi için hazırlanması.	54
Şekil 2.5.	Elektroforez işlemi.	55
Şekil 2.6.	Nötralizasyon ve hücrelerin lamlara fikse edilmesi.	55
Şekil 2.7.	Mikroskop değerlendirmesi.	56
Şekil 3.1.	24 ve 48 saatlik maruziyet sonucu μ M cinsinden borik asit konsantrasyonlarına karşı nötral kırmızı alımı % kontrol grafiği.	58
Şekil 3.2.	V79 hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan H ₂ O ₂ ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.	60
Şekil 3.3.	V79 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.	62
Şekil 3.4.	V79 hücrelerine 16 saatlik ön-maruziyet ile borik asit uygulanması ve 50 μ M H ₂ O ₂ maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.	64
Şekil 3.5.	V79 hücrelerine 16 saatlik ön-maruziyet ile borik asit uygulanması ve 100 μ M H ₂ O ₂ maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.	66
Şekil 3.6.	V79 hücrelerine H ₂ O ₂ ve borik asitin farklı konsantrasyonlarda ilavesi sonucunda alkali komet test sonuçları.	68

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1.	Borun atomik yapısı.	1
Çizelge 1.2.	Bor ve seçilen bor bileşenlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri.	3
Çizelge 1.3.	Biyolojik organizmaların serbest radikal kimyasındaki ROT (Reaktif oksijen türleri), RNT (Reaktif nitrojen türleri) ve diğer türler.	17
Çizelge 3.1.	V79 hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 μM ve 100 μM H_2O_2 ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.	59
Çizelge 3.2.	V79 hücrelerine uygulanan 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarda borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.	61
Çizelge 3.3.	V79 hücre kültürlerine 16 saatlik ön-maruziyet ile 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM borik asit uygulanması ve 50 μM H_2O_2 maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.	63
Çizelge 3.4.	V79 hücre kültürlerine 16 saatlik ön-maruziyet ile 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM borik asit uygulanması ve 100 μM H_2O_2 maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.	65
Çizelge 3.5.	V79 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan H_2O_2 ve borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.	67
Çizelge 4.1.	Bugüne kadar yapılmış olan 2 önemli epidemiyolojik çalışmada tespit edilen günlük bora maruz kalma seviyeleri ve buna karşılık gelen kan bor konsantrasyonları.	72
Çizelge 4.2.	V79 hücrelerinde test edilen borik asit konsantrasyonlarının ppb ve bor eşdeğeri karşılıkları.	73

1. GİRİŞ

1.1. Bor

1.1.1. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bor; kimyasal sembolü B, atom ağırlığı 10.811 ve atom numarası 5 olan bir elementtir. Periyodik tabloda Grup IIIA'da bulunur. Grubun metal olmayan tek elementidir. Metalle ametal arası yarı metal bir element olup, yarı iletken özelliğe sahiptir. Doğadaki bor, iki kararlı izotopun karışımından oluşur; ^{10}B (%19.8) ve ^{11}B (%80.2)'dir (IPCS, 1998; WHO, 1998; U.S.EPA, 2004).

Bor elementinin çeşitli allotropları vardır. Amorf bor yoğunluğu 2.34 g/cm^3 olan kahverengi bir tozdur. Kristal formu ise siyah ve son derece sert (Mohs sertlik skalasında yaklaşık 9.5'tir.) bir yapı olup, yoğunluğu 2.33 g/cm^3 'tür. Kristal yapısı tetragonal-hekzagonaldir. Elementel borun erime noktası oldukça yüksek olup yaklaşık 2300°C , kaynama noktası ise yaklaşık 4000°C 'dir. Diğer özellikler Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Borun atomik yapısı.

Atomik Çapı	1.17Å
Atomik Hacmi	$4.6 \text{ cm}^3/\text{mol}$
Kristal yapısı	Eş kenarlı
Elektron Konfigürasyonu	$1s^2 2s^2 p^1$
İyonik Çapı	0.23Å
Elektron Sayısı (yüksüz)	5
Nötron Sayısı	6
Proton sayısı	5
Valans Elektronları	$2s^2 p^1$

Bor elementinin doğada en çok bulunan ve en çok kullanılan formları borik asit ve boratlardır. Borik asit ve sodyum boratlar, ABD Farmakopesi-Uluslararası Kodeksi ve İngiliz Farmakopesi tarafından tıbbi açıdan önemli bileşikler olarak sınıflandırılmıştır. Borik asit, pKa'sı 9.2 olan zayıf bir asittir. Fizyolojik pH'ta disosiyasyon olamayan asitin sulu çözeltisi olarak bulunur (Woods, 1994).

Bor bileşenlerinin çeşitli oksidasyon basamakları vardır. Bunların en önemli ve yaygın olanı +3'tür. +1, 0 ve 0'dan daha düşük oksidasyon basamakları da vardır. Ancak bunlar sadece yüksek oranda borat içeren bileşenlerde bulunur (Power ve ark., 1997).

Borik asit ve sodyum borat tuzları; insektisit, herbisit, fungusit, algaesit ve akarisit olarak kullanılan pestisitlerin aktif bileşenlerindendir (U.S.EPA, 2006).

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

	Bor	Borik Asit	Boraks	Boraks Pentahidrat	Susuz Boraks	Bor Oksit
CAS Kayıt Numarası	7440-42-8	10043-35-3	1303-96-4	12179-04-3	1330-43-4	1303
Molekül Formülü	B	H ₃ BO ₃	Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	Na ₂ B ₄ O ₇ .5H ₂ O	Na ₂ B ₄ O ₇	B ₂ O ₃
Molekül Ağırlığı	10.81	61.83	381.43	291.35	201.27	69.62
Bor İçeriği (%)	100	17.48	11.34	14.85	21.49	31.06
Fiziksel Formu	Siyah kristal veya sarı-kahverengi amorf toz	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz kristal granülleri veya tozu	Beyaz veya renksiz camsı granüller	Beyaz veya renksiz camsı granüller
Spesifik Yoğunluk (20°C)	2.34	1.51	1.73	1.81	2.37	2.46
Erime Noktası (°C) Kapalı alanda	2300	171	>62	<200	Bilgi yok	Bilgi yok
Erime Noktası (°C) Susuz form (kristal)	2300	450	742	742	742	450
Suda Çözünürlük	Çözünmez	4.72 @ 20°C 27.53 @ 100°C	4.71 @ 20°C 65.63 @ 100°C	3.6 @ 20°C 50.15 @ 100°C	2.48 @ 20°C 34.5 @ 100°C	Hızla suyla birleşme
Buhar basıncı	1.56 x 10 ⁻⁵ atm @ 2140°C	Bilgi yok	Bilgi yok	Bilgi yok	Bilgi yok	Bilgi yok

1.1.2. Borun Doğada Bulunuşu

Yeryüzünde doğal olarak ortaya çıkan bir element olan bor, doğada düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Woods, 1994). Buna rağmen su, taş ve toprakta yaygın olarak bulunan bir elementtir (Murray, 1995). Bor elementinin konsantrasyonu, bazı toprak ve killi taşlarda 100 ppm'e kadar yükselmekle birlikte toprağın bor içeriği ortalama 10-20 ppm'dir. Deniz sularında oran 0.5-9.6 ppm arasında değişmekle birlikte ortalama 4.6 ppm'dir. Tatlı sularda ise konsantrasyon 0.01-1.5 ppm aralığındadır.

Doğada yaklaşık 230 çeşit bor minerali vardır. Ancak elementel bor doğada tek başına bulunmaz, her zaman oksijene bağlı olarak bulunur. Bazı formlarında oksijenle birlikte başka mineraller de olabilir (U.S.EPA, 1987; IEHR, 1997). Bu minerallerin çevrede en yüksek miktarda bulunan formları borik asit ve boratlardır. Bor bileşikleri doğada su ile çözünerek borik asit formuna dönüşür. Bu bileşiklerin oral alımında fizyolojik sıvılarda (kan, idrar vb.) gözlenen formu da borik asittir. Boratların en yoğun miktarda bulunanı ise boraks olarak da bilinen sodyum boratlardır. Bu mineraller arasında en önemlileri yapısında sodyum, kalsiyum ve sodyum-kalsiyum bulunanlardır. Sodyum kökenli bor minerallerine boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), kalsiyum kökenli bor minerallerine kolemanit ($\text{CaB}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodyum-kalsiyum kökenli bor minerallerine ise üleksit ($\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) adı verilir.

1.1.3. Borun Endüstride Kullanımı

Bor; başta cam, gübre ve deterjan sanayi olmak üzere endüstrinin farklı dallarında çok sık tercih edilmektedir. Toplam tüketimin %50'sinden fazlasını cam sanayi oluşturmaktadır. Cam endüstrisinde kullanılan bor ürünleri üretilecek camın cinsine göre değişiklik göstermektedir. Üleksit ve boraks pentahidrat, yüksek kalitede yalıtım amaçlı cam yünü üretiminde; kolemanit ve borik asit ise inşaat, elektronik, otomotiv ve enerji sektörlerinde tüketilen dayanıklı plastik ve kompozit malzemelerin yapımında kullanılan tekstil tipi cam elyafı üretiminde kullanılan temel

bor ürünleridir. Borosilikat camlar ise izolasyon cam elyafları, tekstil cam elyafları, optik lifler, cam seramikler, şişeler vb. ürünlerin üretiminde kullanılmaktadır.

Bunun yanı sıra bor tarım endüstrisi için yadsınamayacak kadar önemli bir mineraldir. Tarım ve ormancılıkta yaygın olarak kullanılmakta olup özellikle gübre olarak ve istenmeyen ot, böcek vb. ile mücadelede tercih edilmektedir.

Başka bir kullanım alanı da elektrik-elektronik, bilgisayar ve haberleşme sanayidir. Cep telefonu, modem, televizyon, mikroçip, CD sürücüler, ısı-aşınmaya dayanıklı fiber optik kablolar, vakum tüpleri ve sigortaların yapımında kullanılmaktadır. Enerji sanayinde ise hidrojen taşıyıcılarında, güneş enerjisinin depolanmasında ve güneş pillerinin korunmasında kullanılmaktadır.

Bunlara ek olarak bor, kimya sanayinin de vazgeçilmez bileşenlerinden biridir. Deterjan, boya, yanmayı geciktirici ürünler ve fotoğrafçılıkta kullanılan kimyasalların üretiminde bor bileşiklerinden yararlanılmaktadır. Ayrıca elektrolitik işlemler, ahşap, kauçuk, plastik ve kağıt endüstrisinde de kullanılmaktadır.

Bor mineralinin en önemli kullanım alanlarından biri de ilaç ve kozmetik sanayidir. Dezenfekte ediciler, antiseptikler, diş macunları vb. çözeltilerin bileşimine girer. Kozmetik sektöründe özellikle ürüne kazandırdığı yumuşaklık, yapışkanlık ve dayanıklılık özellikleri sebebi ile tercih edilmektedir.

Bor ayrıca metalürjide lehimleme, briket yapımı ve döküm malzemelerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Sürtünme-aşınmaya dayanıklı ürünlerin yapımında, izolasyon malzemesi olarak, paslanmaz ve alaşımlı çelik sanayide korozyona karşı, elektro kaplama uygulamalarında temizleyici ve tampon olarak kullanılmaktadır.

Bor, nükleer kazalarda güvenlik amaçlı, nükleer atık depolayıcı ve nötron absorbanı olarak kullanılmaktadır. Yaklaşık her bir bor atomu bir nötron absorbe etmektedir. Bu nedenle, atom reaktörlerinin kontrol sistemleri ile soğutma

havuzlarında ve reaktörün alarm ile kapatılmasında kullanılmaktadır. Atom reaktörlerinde borlu çelikler, bor karbürler ve titan bor alaşımlar tercih edilmektedir. Ayrıca, nükleer atıkların depolanması için bir bor cevheri olan kolemanit kullanılmaktadır.

Otomotiv sanayide hava yastıklarının üretimi, hidrolik sistemler, araç içerisinde ısı ve ses yalıtımı sağlamak amacıyla ve antifriz karışımına katkı malzemesi olarak kullanılmaktadır.

Tüm bunların yanı sıra bor bileşiklerinin savunma ve havacılık sanayide de kullanımı vardır. Jet ve roket motorlarının iç kısımlarında, zırhlı teçhizat yapımında kullanılmaktadır. Füze ve roket yakıtı olarak; tank, tabanca, top, tüfek üretiminde; zırhlı personel taşıyıcıların zırhlarını güçlendirici seramik plaklarda, çelik yelekler ve kompozit malzemelerde kullanılmaktadır (<http://www.etimaden.gov.tr/bor-kullanim-alanlari-77k.htm>).

1.1.4. Borun Sağlık Üzerine Yararlı Etkileri ve Tedavide Kullanımı

Çeşitli deneysel modeller kullanılarak yapılan araştırmaların sonuçlarına göre bor insanlar da dahil olmak üzere tüm canlı grupları için yararlı bir biyoaktif elementtir.

Çok sayıda gelişmiş hayvanın, yaşam döngüsünü tamamlayabilmek için bora ihtiyaç duyduğunu gösteren yoksunluk çalışmaları bulunmaktadır. Bitki ve hayvanlar için esansiyel bir mineral olduğu kanıtlanan borun insanlar için de esansiyel olduğunu gösteren çalışmalar bulunmakla birlikte kesin verilere ulaşmak için bu çalışmaların artırılması gerekmektedir.

İnsan ve hayvanlarda ortak yürütülen bir çalışma yapılmıştır. Elde edilen veriler, insanlar için kabul edilebilir güvenli bor alım miktarının günlük 1-13 mg olması gerektiğini göstermektedir. Ancak son zamanlar elde edilen bulgular nüfusun

önemli bir kısmının günde 1 mg'dan daha az bor tükettiğini ispatlamaktadır. Bu durum klinik açıdan önemli bir endişe oluşturmaktadır (Nielsen, 1998).

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

Diyetle zengin bor alımı makromineral, enerji, nitrojen ve reaktif oksijen metabolizması üzerinde etkilidir. Bor, enzim sistemlerinde metabolizmayı düzenler (Nielsen, 1998). Borik asitin kalsiyum ve potasyum metabolizmasında (Meacham ve ark., 1994), D vitamini (Hunt, 1996), aldehit dehidrogenaz, ksantin oksidaz, sitokrom-b5 redüktaz (Hunt, 1996; Devirian ve Volpe, 2003), insülin, östrojen, testosteron, T3, T4 (Armstrong ve ark., 2001), trigliserit, glukoz (Eren ve ark., 2006) ve reaktif oksijen türleri (Türkez ve ark., 2007; 2012; İnce ve ark., 2011) üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir.

Borik asit, ayrıca tıpta göz ve kulak iltihaplanmalarını tedavi amacıyla kullanılan sterilizasyon preparatlarında, lens solüsyonlarında ve bazı merhemlerin yapımında kullanılmaktadır. Bor mineralleri ise çok çeşitli vitamin-mineral komplekslerinin içeriğinde bulunmaktadır.

1.1.4.1. Borun Antioksidan Özelliği

Bor bileşiklerinin biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları 2 temel hipoteze dayandırılmaktadır. Bu hipotezlerden ilki bor bileşiklerinin hücre membran fonksiyonlarında rol oynayarak hormonlar üzerine etkisini göstermesi, ikincisi ise birçok enzimatik sistemde metabolik düzenleyici olarak rol oynaması olabilir. Ancak

bunların yanında bor bileşiklerinin antioksidan savunma mekanizması üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pawa ve Ali, 2006).

Bor, dokularda oksidan/antioksidan dengenin sürdürülmesine yardım eder. Glutasyon ve türevlerinin vücuttaki stoklarını artırarak veya diğer reaktif oksijen türlerini nötralize eden ajanları indükleyerek oksidatif hasarı sınırlandırır (Hunt ve Idso, 1999).

Bor bileşikleri, NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) seviyelerinin düzenlenmesinde rol alır (Devirian ve Volpe, 2003). Bununla birlikte vücudu toksik oksijen radikallerine karşı koruyan GSH (glutasyon) seviyesinin artmasını sağlar (Hunt, 1998). Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalar bu düşüncüyü güçlendirmektedir. Yapılan sıçan deneylerinde bor maruziyeti sonucunda G6PD (glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) aktivitesinin arttığı, sonuçta NADPH oluşumunun indüklendiği ve buna bağlı olarak hücrelerde GSH miktarının da yükseldiği görülmüştür (Samman ve ark., 1998; Derivian ve Volpe, 2003).

SCE (kardeş kromatit değişimi) ve MN (mikroçekirdek) yöntemleri kullanılarak yapılan bir çalışmada belli dozlarda bora maruz kalan bireylerdeki DNA hasarları, maruz kalmayan bireylerle kıyaslanmıştır. Bora maruz kalan bireylerdeki DNA hasarının kontrolle kıyaslandığında daha düşük seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Bu ve benzeri çalışmalardan yola çıkarak borun oluşabilecek DNA hasarlarına karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Uçkun ve ark., 2009).

2007 yılında Türkez ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; sigara içmeyen 24-30 yaş aralığında, daha önce herhangi bir toksik maddeye maruz kalmadığı bilinen 10 sağlıklı erkek donörden alınan heparinize kanlar kullanılmıştır. Hücreler bor bileşenlerine (borik asit, boraks, kolemanit ve üleksit) 0.5-500 mg/L aralığında kan konsantrasyonu oluşturacak şekilde maruz bırakılmıştır. Belirli konsantrasyonlarda (0.5-20 mg/L) eritrositlerdeki antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), GSH-Px (glutasyon peroksidaz), GST

(glutasyon S-transferaz), G6PD) belirgin bir artış gözlenmiştir. tGSH (total glutasyon) ve TAC (total antioksidan kapasite) seviyeleri de artmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda (500 mg/L) ise bu enzimlerin aktivitelerinin düştüğü görülmüştür. Aynı çalışmada lenfosit kültürlerinde bor bileşenlerinin genotoksik aktivitesi de araştırılmıştır. SCE, MN ve CA (komet testi) analiz yöntemlerine göre, bu bileşenlerin genotoksik potansiyellerinin olmadığı bulunmuştur.

1.1.4.2. Borun İmmün Sistem Üzerine Etkileri

İnsan ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalar bor bileşiklerinin immün sistem üzerine etkili olduğunu göstermektedir (Hunt ve Idso, 1999).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada düşük bor içeren diyetle bor ilavesi, antijene karşı total serum antikor konsantrasyonunu artırmıştır (Bai ve ark., 1997). Yapılan bir çalışmada bor destekli diyetle (5 mg/kg) beslenen domuzlar, bor miktarı az olan (1-2 mg/kg) diyetle beslenen domuzlarla karşılaştırılmıştır. Borca zengin diyetle beslenen domuzlarda intradermal fitohemaglutinin enjeksiyonuna karşı oluşan antienflamatuvar cevabın daha fazla olduğu görülmüştür (Armstrong ve ark., 2001).

Borik asit diş hekimliğinde de kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada ligatür bağlanarak deneysel periodontitis oluşturulan sıçanlara, ağız yoluyla 11 gün boyunca günlük 3 mg sistemik borik asit verilmiştir. Sıçanlarda 11 gün sonra alveolar kemikteki değişiklikler ve doku örnekleri incelenmiştir. Kontrolle kıyaslandığında alveolar kemik kaybı, hücre kaybı ve osteoklast sayısının borik asit uygulanan grupta daha az olduğu görülmüştür. Sonuç olarak sistemik borik asit uygulamasının, periodontal hastalıklı sıçanlarda enflamasyon ve alveolar kemik kaybını azalttığı raporlanmıştır (Demirer ve ark., 2012).

1.1.4.3. Borun Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Bor insanda beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır. Hafızanın güçlendirilmesi ve psikomotor becerilerin artışı sağlar. Günlük 3.25 mg bor alımının motor aktivitelerde, tepki süresinde, kısa ve uzun süreli hafıza ve dikkat yeteneklerinde gelişme sağladığı belirlenmiştir. Daha düşük dozda alımda ise bireylerin daha zayıf psikomotor ve zihinsel performans sergiledikleri gözlenmiştir. Bu çalışmalar borun, beyin fonksiyonları ve zihinsel performans için temel elementlerden biri olduğunu göstermektedir. (Penland, 1994).

Borik asitin, nöronlar üzerinde koruyucu etkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada $AlCl_3$ (alüminyum klorür) ile suçanlarda oluşturulan beyin hasarına karşı borik asitin etkisi incelenmiştir. Sprague-Dawley sıçanları rasgele 8 gruba ayrılmıştır:

- 1. Grup: Kontrol
- 2. Grup: $AlCl_3$ (günde 5 mg/kg),
- 3. Grup: Borik asit (günde 3.25 mg/kg),
- 4. Grup: Borik asit (günde 36 mg/kg)
- 5. Grup: Borik asit (günde 58.5 mg/kg)
- 6. Grup: $AlCl_3$ (günde 5 mg/kg) + Borik asit (günde 3.25 mg/kg),
- 7. Grup: $AlCl_3$ (günde 5 mg/kg) + Borik asit (günde 36 mg/kg),
- 8. Grup: $AlCl_3$ (günde 5 mg/kg) + Borik asit (günde 58.5 mg/kg).

Sıçanlar öldürüldükten sonra, beyinleri ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiş ve toplam nöron sayısı saptanmıştır. $AlCl_3$ uygulamasını takiben beyin dokusundaki kalitatif ve kantitatif değişiklikler araştırılmıştır. Araştırmanın sonuçlarına göre, $AlCl_3$ ve $AlCl_3$ + yüksek doz borik asit (günde 36 ve 58.5 mg/kg) tedavi gruplarında, sıçanların beyin dokularında yüksek hasar görülmüştür. $AlCl_3$ + düşük doz borik asit (günde 3.25 mg/kg) grupları diğer $AlCl_3$ gruplarıyla karşılaştırıldığında ise 3.25 mg/kg borik asit uygulamasının bu sıçanların nöronlarında koruyucu etki oluşturduğu gözlenmiştir. Elde edilen verilere göre

uygun dozda uygulanan borik asitin, serebral korteks üzerinde $AlCl_3$ 'ün oluşturduğu advers etkileri azaltılabileceği sonucuna varılmıştır (Çolak ve ark., 2011).

Bor aynı zamanda beyin tümörlerinin tedavisinde de kullanılmaktadır. BNCT (bor nötron yakalama tedavisi); çeşitli tümörlerin, özellikle glioblastoma ve melanoma tipi beyin tümörlerinin, tedavisinde kullanılan iki bileşenli radyasyon tedavi yöntemidir. Birinci bileşeni tümör hücrelerinde toplanan kararlı bor izotopu (^{10}B), ikinci bileşeni ise düşük enerjili nötron kaynağıdır. Tümör hücrelerinin içindeki veya hemen bitişiğindeki bu izotop, nötron kaynağından gelen nötronları yakaladıktan sonra parçalanmakta ve açığa çıkan yüksek enerji yüklü parçacıklar (7Li ve 4He) sadece tümör hücrelerine zarar vermektedir. Çoğunlukla etraftaki normal hücreler zarar görmemektedir. BNCT üzerine yapılan araştırmalar yüksek bor içeren spesifik bileşiklerin tümör hücrelerinde seçici olarak birikebilmesini hedefleyen yeni ajanların sentezlemesi ve kanser hücreleri üzerine maksimum yoğunlukta termal nötronların ulaşması için nötron demetinin ve yoğunluğunun uygun olarak seçilmesi üzerinde yoğunlaşmaktadır (Kahraman, 2004).

1.1.4.4. Borun Üreme Sistemleri Üzerine Etkileri

Sentetik steroidler profesyonel olmayan atletler tarafından sıkça kullanılmaktadır. Vücut geliştirmede kullanılan takviyelerde çok çeşitli vitamin ve mineraller bulunmaktadır. Bor bu amaçla suistimal edilen minerallerden biridir. Bor içeren destekleyici ürünlerin plazma steroid hormonların konsantrasyonlarını arttırdığı görülmüştür. Kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak yürütülen bir çalışmada, kişilerin kanlarındaki E2 (17- β estradiol) konsantrasyonunda belirgin artışlar gözlenmiştir ($p<0.004$). Ayrıca plazma T (testosteron) seviyeleri ve E2/T oranında da artış görülmüştür. Ancak vücuttaki lipit seviyelerinde herhangi bir düzensizlik görülmemiştir. Elde edilen verilere göre bor takviyesinin, erkeklerde testosteron seviyesini artırmak suretiyle kas doku miktarında artışa neden olduğu düşünülmektedir (Nielsen, 1988).

1.1.4.4.1. Borun Prostat Kanseri Üzerine Etkileri

İnsan ve hayvanlarda yapılan epidemiyolojik araştırmalar ve hücre kültürü çalışmalarına göre bor bileşikleri, prostat kanserine karşı koruyucu etkili maddelerdir (Barranco, 2006).

Yeraltı ve içme sularının ölçümüyle yapılan bir çalışmada artan bor konsantrasyonlarının, prostat kanseri insidansı ve mortalite riskinde azalma sağladığı görülmüştür (Barranco ve ark.,2007).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise borik asitin prostat tümörünün büyümesini yavaşlattığı, IGF (insülin-like growth faktör) ve PSA (prostat spesifik antijen) düzeylerini düşürdüğü tespit edilmiştir (Gallardo-Williams ve ark., 2004).

PSA, prostat kanserinin iyi yapılanmış bir göstergesidir. NPBA (3-nitrofenil borik asit) ve borik asitin, PSA'nın enzimatik aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Western blot yöntemiyle yapılan bir analizde, NPBA varlığında PSA düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmıştır. Ayrıca borik asitin tümör ilerlemesi ve metastazını da engellediği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, PSA aktivitesinin azaltılması amacıyla bor bileşiklerinin kullanılabileceğini göstermiştir (Gallardo-Williams ve ark, 2003).

Başka bir çalışmada insan prostat kanseri hücre tiplerinden biri olan DU-145 hücreleri kullanılmıştır. Çalışma süresince borik asitle tedavi edilen DU-145 prostat kanseri hücrelerindeki değişiklikler incelenmiştir. Uygun seviyelerde uzatılmış maruziyet, hücrelerde morfolojik değişikliklere neden olmuştur. Bu morfolojik değişiklikler; granüle olma özelliği ve intraselüler vezikül içeriğinde artma, hücre volümünde azalma şeklindedir. Bu bulgular neticesinde borik asitin insanlarda prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını engelleyebileceği görülmüştür (Barranco ve Eckhert, 2004; 2006).

Henderson ve arkadaşları 2009 yılında kanserli ve kansersiz insan prostat hücrelerinde borik asitin aktivitesini araştırmışlardır. Hücre veya diğer biyolojik partiküllerin ayrıntılı olarak analizini sağlayan akım sitometri yöntemi ve mikroskop analizleriyle inceleme yapılmıştır. DU-145 hücreleri farklı konsantrasyonlarda borik asite 1 saat maruz bırakılmıştır. Hücreler için Ca^{+2} (kalsiyum) seviyesi çoğalmanın tespiti açısından uygun bir göstergedir. Bu nedenle DU-145 hücrelerinde maruziyetin ardından Ca^{+2} seviyeleri incelenmiş ve %32 oranında azalma görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, uygun konsantrasyonlarda borik asitin prostat kanseri riskini azalttığı düşünülmüştür.

1.1.4.4.2. Borun Vajinal Enfeksiyonlar Üzerine Etkileri

Borik asit; kadınlarda, azole dirençli non-albicans candida türleri için geleneksel tedavinin işe yaramadığı durumlarda vajinitin tekrarlayan kronik semptomları için güvenli ve ekonomik bir alternatiftir (Iavazzo ve ark., 2011).

Borik asitin vulvovajinal kandidiyazis enfeksiyonlarındaki tedavi kapasitesini araştırmak amacıyla; nistatin, terkonazol, flusitozin, itrakonazol, klotrimazol, ketakonazol, flukonazol, bukonazol ve mikonazol ile karşılaştırıldığı 14 çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların 7 tanesinde borik asit tekli tedavi olarak uygulanmıştır. Borik asitle tedavi edilen gruplarda, mikolojik tedavi oranları %40'dan %100'e kadar değişen bir aralıkta bulunmuştur. Gruplar arasında, tedavi sonrası dönemde nüksetme oranlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar yoktur. Bununla birlikte çalışmalarda bazı advers etkiler tespit edilmiştir. En sık görülenler; vajinal hassasiyet (<%10), vajinal yanma, vajinal eritem ve su kaybıdır (Iavazzo ve ark., 2011).

Başka bir çalışmada, ağır hipersensitivite reaksiyonları yüzünden nitroimidazolu tolere edemeyen Trichomonas vaginalis enfeksiyonuna kapılmış bir hasta incelenmiştir. Hastada hassasiyetin azaltılmasının mümkün olmadığı görülmüştür. İntravajinal klotrimazol, paromomisin, furazolidon ve oral nitazoksanid tedavisi uygulanmış; vajinal bölge povidon-iodin ile yıkanmıştır. Ancak tüm bu

uygulamalar hastanın enfeksiyonunu tedavi etmede başarısız olmuştur. Ardından 2 aylık intravajinal topikal borik asit tedavi planı uygulanmış ve hasta tedavi edilmiştir. Tedaviden 60 gün sonra yapılan kültürde *Trichomonas vaginalis* negatifliğinin devam ettiği görülmüştür (Muzny ve ark., 2012).

1.1.4.5. Borun İskelet ve Kas Sistemi Üzerine Etkileri

İnsanda kemik mineral yoğunluğu ile bor-magnezyum/bor-kalsiyum seviyeleri arasında bir ilişki saptanmıştır. Son zamanlardaki çoğu çalışma, az miktarda borla desteklenen diyet uygulayan kadınların kemik mineral yoğunluğunda artış olduğunu göstermektedir.

Borun kemik metabolizmasındaki rolü daha çok; bu mineralin kalsiyum, magnezyum ve D vitamini gibi diğer vitamin ve minerallerle etkileşimiyle ilişkilidir (Volpe ve ark., 1993). Vücuttaki kalsiyum ve magnezyum emilimini kolaylaştırır ve mineral metabolizmalarına etki ederek kemikleri güçlendirir (King ve ark., 1991).

İnsan vücudunda kortikal kemik ve trabeküler kemik olmak üzere iki ayrı kemik türü vardır. Kortikal kemik tüm vücut kemiklerinin % 80'ini oluşturur. Trabeküler kemik ise arı peteği yapısında ve yüzey alanı kortikal kemiğe oranla daha geniş bir kemik türüdür. Bu tip kemikler özellikle omurgalarda ve uzun kemiklerin uç kısımlarında yer alır. Osteoporoza bağlı kırıklara en hassas bölgeler buralardır. Yapılan bir çalışmada bor bileşiklerinin trabeküler kemiklerin yapısını düzenlemede etkili olduğu görülmüştür. Bu da bu bileşiklerin osteoporoz tedavisinde kullanılabileceği tezini desteklemektedir. Aslında bor, tek başına kemik mineral homeostazisi veya östrojen seviyesi üzerine etkili değildir. Ancak kandaki östrojen seviyesinin artmasına yardımcı olarak osteoporoz tedavisinde kullanılabilir. Menapoza giren kadınlarda diyetle bor ilavesinin serum 17β -estradiol ve testosteron konsantrasyonlarını yükselttiği, kalsiyum ve magnezyum atılımını azalttığı, ovaryum fonksiyonlarını düzenlediği ve menapozla oluşan kemik kaybını azalttığı bulunmuştur. Ayrıca overleri çıkarılmış (OVX-Ovariectomized) sıçanlarda yapılan

bir çalışmada borun trabeküler kemiklerin gelişimini indükleyerek 17 β -estradiol'ün etkisini arttırdığı bulunmuştur Bu artışın sinerjistik olarak kalsiyum ve magnezyum homeostazisi sağladığı, dolayısıyla kemik gelişiminde etkili olduğu görülmüştür (Sheng ve ark., 2001).

Başka bir çalışmada, osteoartrit olduğu radyografik olarak kabul edilen 20 hastaya, 8 hafta boyunca günde 6 mg bor ya da plasebo verilmiştir. Bor takviyesi alan artritli hastaların eklem şişliklerinin azaldığı, ağrı için daha az analjezik kullandığı ve sınırlı hareketlerinde gelişme görüldüğü bulunmuştur (Nielsen, 1994).

1.1.4.6. Serbest Radikaller ve Oksidatif Hasar

Genelde elektronlar atom veya molekülde eşleşmiş olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir (Acworth ve Bailey, 1997).

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, çok etkin, kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük moleküller olarak tanımlanır (Abdollahi ve ark., 2003; 2004). Sahip oldukları eşleşmemiş elektronlar, radikallerin temel özelliğidir ve yüksek reaktivliğe sahip olma nedenini açıklar (Greenwald, 1991; Halliwell, 1995). Yüksek reaktivliğe sahip olmaları, düşük kimyasal spesifiklik anlamına gelir. Serbest radikal en yakınındaki stabil moleküle atak yaparak onun elektronunu çalar ve kendisine atak yapılan molekül elektron kaybederek serbest radikal haline gelir. Böylece zincir reaksiyon başlar. Süreç başladıktan sonra yaşayan hücrenin bozulmasıyla sonlanır (Cheeseman ve Slater, 1993). Bu eşleşmemiş elektron serbest radikallere büyük bir aktivasyon kazandırarak; protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi yakınındaki bir çok molekülle etkileşime girmesine neden olur. Bu durum yaşlanmayı teşvik ederek kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, sinir sisteminde dejeneratif bozukluklar ve bağışıklık sisteminde zayıflık gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır (Diplock, 1998).

Serbest radikaller in-vivo ve in-vitro olarak oluşabilirler (Halliwell ve Gutteridge, 2000);

1. Kovalent bağların homolitik kırılması: Yüksek sıcaklık ve yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya *homolitik kırılma* denir. Sonuçta her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.

2. Normal molekülün tek bir elektron kaybetmesi

3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi

Oksidatif stres; reaktif oksijen ara ürünlerinin, endojen antioksidan savunma sistemlerine üstün gelmesi olarak tanımlanır (Bulger ve Helton, 1998). Bu durum; serbest radikallerin lipid, protein ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek artmasına neden olur. Sonuçta vücutta lokal hasar veya organ disfonksiyonu meydana gelir. Oluşan hasarlar arasında en önemlileri; lipid peroksidasyonu, protein ve DNA hasarıdır (Cheeseman ve Slater, 1993).

1.1.4.6.1. Serbest Radikal Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, reaktif oksijen türleridir. Bu radikaller, oksijenden oluşmaktadırlar (Gülbahar, 2007). Vücutta oluşabilecek çok sayıda serbest radikal tipi vardır. En sık görülen tipler; süperoksit radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen ve hidrojen peroksittir.

Çizelge 1.3'te oksijen ve nitrik oksitten oluşan başlıca reaktif türler verilmiştir. Kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan türler paylaşılmamış elektron içeren atom üzerine konulan nokta ile belirtilmişlerdir. Nitrojen oksit türlerinin çoğu paylaşılmamış elektron içermeseler bile çok reaktiftirler.

Çizelge 1.3. Biyolojik organizmaların serbest radikal kimyasındaki ROT (Reaktif oksijen türleri), RNT (Reaktif nitrojen türleri) ve diğer türler (Pryor, 1997).

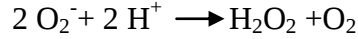
Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Nitrojen Türleri	Diğer
	Serbest Radikaller	
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Nitrik oksit ($NO^{\bullet}$)	Thiyl ($RS^{\bullet}$)
Hidroksil ($HO^{\bullet}$)	Nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$)	Hidrojen ($H^{\bullet}$)
Alkoksil ($RO^{\bullet}$)		
Peroksil ($RO_2^{\bullet}$)		
Hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$)		
	Radikal olmayanlar	
Singlet oksijen (1O_2)	Peroksinitrit (ONO_2^-)	Tiyol (RSH)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Peroksinitröz asit (ONO_2H)	
Alkil Peroksitler (RO_2H)	Nitronyum katyon (NO_2^+)	
Ozon (O_3)	Nitrozil katyon (NO^+)	
Nitrozil katyon (NO^+)	Nitrozil anyon (NO^-)	
Hipokloröz asit ($HOCl$)	Dinitrojen trioksit (N_2O_3)	
	Dinitrojen teroksit (N_2O_4)	
	Nitröz asit (HNO_2)	
	Nitrozotiyol ($RSNO$)	
	Alkil peroksinitrit (RO_2NO)	

1.1.4.6.1.1. Hidrojen Peroksit

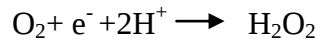
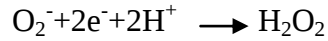
Hidrojen peroksit serbest radikal olmamasına rağmen reaktif oksijen türleri içinde sınıflandırılır (Burtis ve Ashwood, 1999).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($O_2^{\bullet-}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak peroksit ve moleküler oksijen oluştururlar. Bu reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden, dismutasyon

reaksiyonu olarak bilinir. Ayrıca reaksiyon spontan gerçekleşebildiği gibi SOD enzimi tarafından da katalizlenebilir (Cheeseman ve Slater, 1993).



Hidrojen peroksit ayrıca metal iyonlarının geçişi durumunda Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının (O_2^-) varlığında ise Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikallerinin ($OH^\bullet$) temel kaynağıdır.

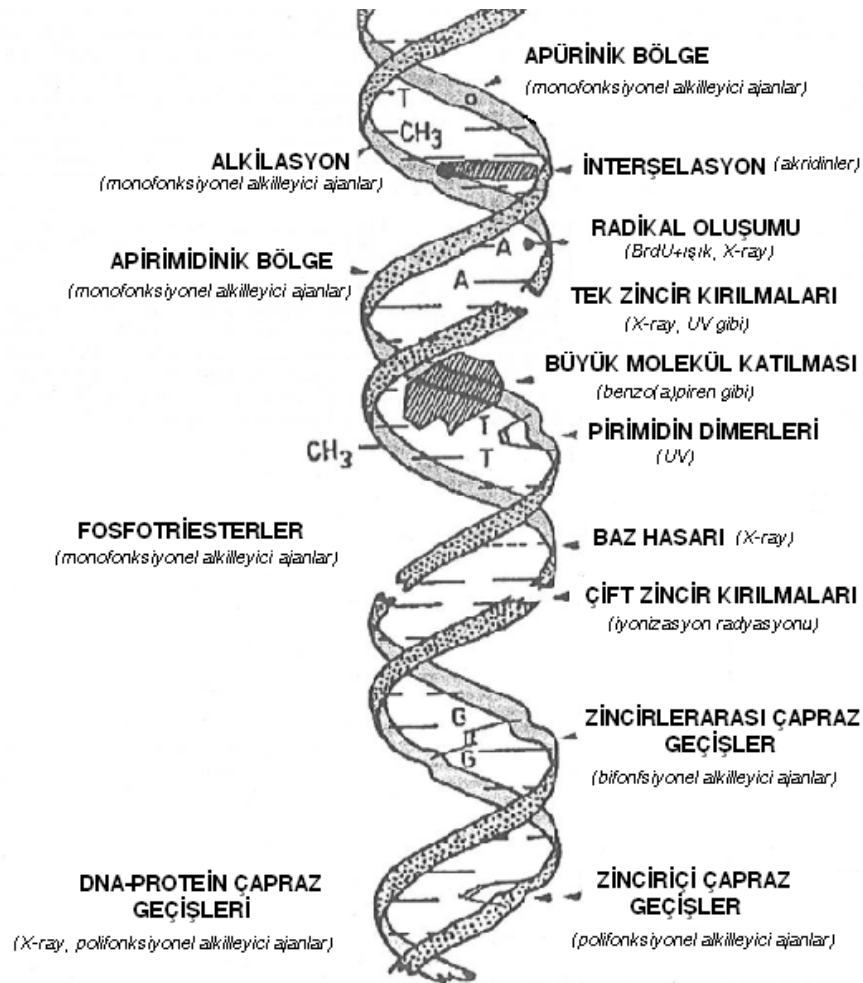


1.1.4.6.2. Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri

Maruz kalınan tüm radyasyon tipleri (UV, görünür ışık, ısı ve X ışınları vb.) hücrelerde iyonların, serbest radikallerin ve enerji kazanmış moleküllerin oluşmasına neden olur. Hidroksil radikalleri, DNA'daki heterosiklik bazlarla ve deoksiriboz-fosfatlarla reaksiyona girerler. Reaksiyon sonucu, DNA bazlarını modifiye eder ve riboz-fosfat zincirinin kırılmasına yol açarlar. İn vitro olarak sulu çözeltilerde yapılan çalışmalarda, $HO^\bullet$ radikalının, deoksi-riboz ve tetrasiklik bazlarla kolaylıkla reaksiyon verdiği gözlenmiştir. Fakat, çift zincirli DNA molekülünde, heterosiklik bazlar $HO^\bullet$ radikallerine karşı sterik (hacimsel) olarak çok iyi korunmuşlardır. Ayrıca, enzimatik radikal yakalayıcılar, öncü $HO^\bullet$ radikallerinin konsantrasyonunu düşürerek DNA'yı korurlar (Akpoyraz ve Durak, 1995).

1.1.4.6.3. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları

Organizmada antioksidan savunma sistemi tam olarak etkin çalışmadığında (oksidan/antioksidan dengesi bozulduğunda) serbest radikal oluşumu ile DNA hasarı artar. Bu duruma “oksidatif stres” adı verilir. Oksidatif DNA hasarı; zincir kırılmaları, abazik kısımlar, alkali-işaretli kısımlar ve okside bazlarda hasar şeklinde olabilmektedir (Halliwell ve Aruoma, 1991; Wiseman ve Halliwell, 1996).



Şekil 1.1. DNA hasar çeşitleri.

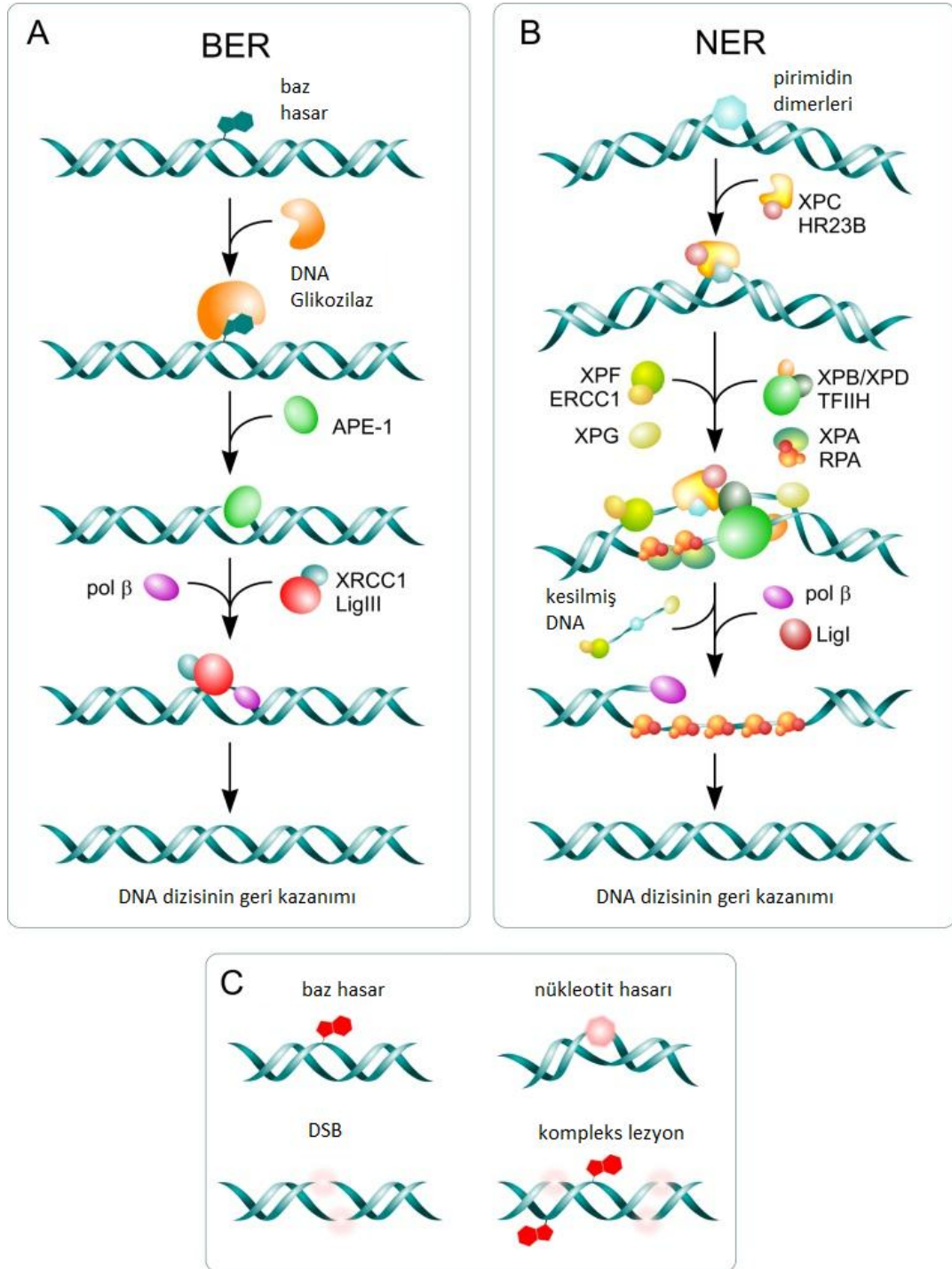
Genetik bilginin stabilitesini sağlamak amacıyla oksidatif DNA hasarı, çeşitli DNA onarım mekanizmaları (Şekil 1.1) tarafından onarılır. DNA onarımı, genomda kodlanan DNA moleküllerindeki hasarı düzeltmek ve hücreyi tanımlamak amacıyla uygulanan proseslerinin tamamı sonucunda oluşur. İnsan hücrelerinde UV ışın ve radyasyon gibi DNA hasarına neden olan çevresel faktörler ve metabolik aktiviteler sonucu günde 1 milyon hücrede moleküler lezyonlar oluşur (Lodish ve ark., 2004). DNA onarım oranı; hücre tipi, hücre yaşı ve ekstrasellüler matriksin özellikleri gibi bir çok faktöre bağlıdır.

Hücrede DNA hasarına karşı dört önemli yanıt oluşur (Sancar ve ark., 2004);

1. Hasarlı DNA çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması (DNA onarımı),
2. DNA hasarına karşı, kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesi engellenerek hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi (transkripsiyonel cevap),
4. Ciddi olarak hasarlanan hücrelerin elenmesi (apoptozis)'dir.

Bu yanıtlardan herhangi birinin işlevini yapmaması hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla; organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (De Baer ve Hoeijmakers, 2000; Sancar ve ark., 2004).

Canlı organizmalarda çeşitli DNA onarım mekanizmaları tanımlanmıştır. Bunlar; doğrudan DNA onarımı, NER (nükleotid kesip-çıkarma onarımı) ve BER (baz kesip-çıkarma onarımı), MMR (yanlış eşleşme onarımı), HR (homolog rekombinasyon) ve NHEJ (homolog olmayan şekilde bağlanma) gibi mekanizmalardır (Fleck ve Nielsen, 2004).



Şekil 1.2. BER (baz kesip çıkarma onarımı) ve NER (nükleotid kesip çıkarma onarımı) yolları. A) BER temel enzimatik basamaklarının şematik gösterimi. B) NER temel enzimatik basamaklarının şematik gösterimi. C) IR ile oluşan DNA hasar formları (Francesca, 2011).

1.1.4.6.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar; serbest radikallerle reaksiyona girerek, bu radikallerin hücrelere zarar vermelerini önlerler. Direkt ve dolaylı olarak ilaçlar ve karsinojenler de dahil olmak üzere tüm ksenobiyotiklerin oluşturduğu toksik radikal reaksiyonların istenmeyen etkilerine karşı hücreleri koruyan maddelerdir. Serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidasyon prosesini engellerler. Bu sırada kendileri okside olurlar. (Matés, 2000).

1.1.4.6.5. Antioksidan Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler (Ilizarov ve ark., 2001).

- 1) *Toplayıcı Etki*: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutar veya daha zayıf yeni moleküllere çevirerek etki ederler. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
- 2) *Bastırıcı Etki*: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktarmak suretiyle aktivitelerini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek etki ederler. Vitaminler, flavanoidler bu tip etki gösterirler.
- 3) *Zincir Kırıcı Etki*: Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek etki ederler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 4) *Onarıcı Etki*: Serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onararak etki ederler.

Antioksidanlar, endojen veya eksojen kaynaklı olabilirler.

Endojen antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzimatik olan ve enzimatik olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar (Slater, 1984).

Enzimatik olan endojen antioksidanlar şunlardır:

- 1) Süperoksit dismutaz
- 2) Glutasyon peroksidaz
- 3) Glutasyon S-Transferazlar
- 4) Katalaz
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- 6) Hidroperoksidaz

Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar şunlardır:

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferrin
- 4) Miyogloblin
- 5) Hemogloblin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutasyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar; vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler.

1.1.5. Borun Toksik Etkileri

Bor bileşiklerinin yüksek dozda alımı; insan, hayvan ve bitkilerde toksik etki gösterebilir.

Bora hassas bitkilerde 0.5-1.0 mg/L ve üzeri zararlıyken, dayanıklı bitkiler için bu değer 4 mg/L ve üzeridir. Hayvanlar için öldürücü doz ise hayvan türüne göre 1.2-3.45 g/kg arasında değişmektedir. Farelerde 3-4 g, kısa süre içinde depresyon ve titremelere yol açarak hayvanların ölümüne neden olmaktadır. Köpeklerde ise bu dozlarda mide bulantısı, kusma gibi belirtiler görülmektedir.

Bor mineralinin toksik etki gösterme ihtimali düşüktür. Çünkü hangi yolla absorbe olursa olsun, yaklaşık % 90-95'i, 1-2 gün içinde vücutta birikmeden üre ile atılmaktadır. Yalnızca kemik, tırnak ve kıllarla karaciğer ve dalak gibi organlarda bir miktar birikmektedir (Şaylı, 2000).

1.1.5.1. Borun Akut Toksik Etkileri

İnsanlar ve hayvanlar bor bileşiklerine; oral, dermal ve inhalasyon yoluyla maruz kalabilirler.

Oral

Bor bileşikleri fizyolojik pH'ta borik asit olarak bulunduklarından, bu bileşiklerin akut toksisiteyi borik asitinkine benzerlik gösterir. Borik asit ve boratlara oral yolla akut maruziyetlerde toksisite ancak yüksek dozlarda gözlenir.

Hayvanlar

Sıçanlardaki akut toksisite çalışmalarına göre oral yolla borik asite maruz bırakılan erkek sıçanlar için LD₅₀ 3450 mg/kg, dişi sıçanlar için ise 4080 mg/kg'dır.

Boraksların oral akut toksisitesi erkek sıçanlar için LD₅₀ 4550 mg/kg, dişi sıçanlar için ise 4980 mg/kg'dır (U.S.EPA, 2006).

Klinik zehirlenme belirtileri borik asit veya borat tuzlarının oral alımından sonra 2 saat içinde ortaya çıkar. Az miktar borik asit veya borat tuzlarının hayvanlar tarafından oral alımı susuzluk, ateş, salya artışı, kusma, depresyon, iştah azalması, diyare, abdominal ağrı, tüylerde dökülme, böbrek hasarı gibi klinik belirtilerle sonuçlanır. Maruz kalan hayvanların kusmuğu veya dışkısı kan veya mavi-yeşil renk içerebilir. Yüksek oranda borik asit veya borat tuzlarının oral yolla alımının ardından ise hayvanlarda ataksi, titremeler, krizler, sık idrara çıkma, kırmızımsı mor cilt rengi görülür. Krizleri depresyon, metabolik asidozis ve ölüm takip edebilir (Campbell ve Chapman, 2000; Welch, 2004).

İnsanlar

İnsanlarda borik asitin minimum oral letal dozu kazayla olan zehirlenme vakalarından yola çıkılarak tahmin edilmektedir. Dozlar yetişkinler için 5-20 g, çocuklar için 3-6 g, bebekler için ise <5 g'dır (WHO, 1998; U.S.EPA, 2006)

Borik asit ve borat tuzlarının akut oral alımı çok nadir olarak ciddi toksisite oluşturur. Genelde mide bulantısı, kusma (mavi-yeşil renk), abdominal ağrı ve diyare (kan veya mavi-yeşil renk içerebilir) semptomları raporlanmıştır. Seyrek olarak da baş ağrısı, zayıflık, huzursuzluk, letarji, titremeler, bilinç kaybı, solunum depresyonu, böbrek hasarı, şok ve ölüm görülür (Wong ve ark., 1964; Litoviz ve ark., 1988; Reigart ve Roberts, 1999).

Yüksek doz oral maruziyetten sonraki 24 saat içinde yoğun kırmızı renk isilik görülür. Bunu, 1-2 gün sonra cilt kaybı takip eder. Kızarıklıklar genelde yüz, ayak tabanı, avuç içi, kalça ve skrotumda görülür (Reigart ve Roberts, 1999). Parmak uçlarında görülen pembe renk, bor ile zehirlenmeye işaret eden karakteristik belirtilerden biridir (Mc Kee ve Wolf, 1963).

Bebeklerde oral alınan az miktarda borik asitin akut maruziyeti irritabilite, kusma, eritem, deride döküntü, diyare ve sinir sisteminde bozuklukla kendini gösterir. Kronik maruziyette ise krizler, kusma ve diyare görülür (Strong, 2001).

Bor zehirlenmesi ile ilgili birçok vaka raporu bulunmaktadır. Bir vaka raporunda 34 haftalık hamile bir bayanın kazayla 70 gr borik asidi oral yolla alması sonucu 2 saat içinde düşük yaptığı bildirilmiştir. Fetüs kalp durması ve dolaşım bozukluğu sonucu ölmüştür. Başka bir vaka raporunda ise 24 g üzerinde borik asit olarak intihar girişiminde bulunan 44 yaşındaki bir bayanda borik asit alımından sonra 2 gün boyunca eksfoliyatif dermatit ve mide bulantısı görülmüştür. Ardından hastanın sıvı desteğiyle tedavi edildiği bildirilmiştir (Fail ve ark., 1998).

Dermal

Borik asit ve borakslar için tavşan derisinde yapılan testlere göre $LD_{50} > 2000$ mg/kg'dır. Deri hassasiyeti ve dermal toksisiteleriyle ilgili herhangi bir bilgi yoktur.

Borik asitin düşük oküler toksisitesi vardır. Borakslar ise yüksek konsantrasyonda korozif etkilidir (U.S.EPA, 2006). Hayvanlarda dermal maruziyet ise ciltte kızarıklık veya inflamasyonla sonuçlanır (Campbell ve Chapman, 2000).

İnhalasyon

Hayvanlar

Borik asit ve borat tuzlarıyla ilgili inhalasyon çalışmaları çok azdır. Borik asite inhalasyonla maruziyeti belirlemek amacıyla sıçanlarda bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada sıçanlar tek doz 0.16 mg/L borik asite maruz bırakılmıştır. Hiç ölen sıçan olmadığından borik asit için LC_{50} 'nin 0.16 mg/L'den yüksek olduğu düşünülmektedir.

İnsanlar

İş yerinde boraksa maruz kalan işçilerle yapılan çalışmalarda; maruziyet sonrasında ağız, burun, boğazda kuruma; boğaz ağrısı, nefes darlığı ve burun kanaması gibi geçici solunum yolu irritasyonları görülmüştür. 5 yıldan daha uzun süreyle boraks veya borik asit tozuna 4.4 mg/m^3 veya daha yüksek konsantrasyonlarda maruz kalan işçilerde ise nazal ve solunum yolu irritasyonları görülmüştür (U.S.EPA, 2004; U.S.DHHS., 2007).

1.1.5.2. Borun Kronik Toksik Etkileri

Oral

Hayvanlar

Köpek ve sıçanlarda yapılan kronik oral maruziyet çalışmaları borik asit ve borakslar için benzer toksisite verileri ortaya çıkarmıştır. Köpeklerde bu bileşenlere uzun dönem oral maruziyet sonucu oluşan toksik etki testiküler atrofidir ve NOAEL değeri 8.8 mg/kg/gündür . Spermatojenik kayıp için LOAEL değeri ise $29.2 \text{ mg/kg/gündür}$. Bu çalışmalar sıçanlarda yapılmış ve benzer testiküler etkilerin görüldüğü NOAEL değeri 17.5 mg/kg/gün olarak bulunmuştur.

Fareler, ömürleri boyunca içme sularında günde 0.95 mg bor/kg olacak şekilde sodyum metaborata maruz bırakılmıştır. Yaşam süreleri ve vücut ağırlıkları kontrolle kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemiştir (Weir ve Fisher, 1972).

İnsanlar

Borik asite kronik oral maruziyet sonucu kusma, mide bulantısı, diyare ve mide ağrısı gibi semptomlar görülmüştür. Genelde bu semptomları baş ağrısı, ateş, titreme, seğirme, letarji, güçsüzlük ve bunlarla birlikte dermal eritem, deri soyulması ve

ülserasyon izler. Kronik maruziyetin ağır seyrettiği durumlarda koma, krizler, dolaşım yetmezliği, böbrek ve karaciğer disfonksiyonu, anemi ve ölüm görülür. Borik asite kronik maruziyet sonucu oluşan krizler ve ölümler bebeklerde yetişkinlerden daha çok görülür (Linden ve ark., 1986; Strong, 2001).

İnhalasyon

Boraks üretim alanında çalışan ve solunum yoluyla sodyum tetraborat dekahidrata maruz kalan işçilerden alınan veriler değerlendirildiğinde, 4.5 mg/m³ veya eşdeğerlerinde borun geçici solunum yolu irritasyonu yaptığı raporlanmış fakat bu dozlarda solunum üzerine herhangi bir kronik etki bulunmamıştır (WHO, 1998).

1.1.5.2.1. Borun Karsinojenitesi

Borik asit ve borat tuzları, 2005 yılı karsinojen değerlendirme yönetmeliğinde U.S.EPA tarafından “insanlarda karsinojenik olmayan” maddeler sınıfında sınıflandırılmıştır.

Yapılan hayvan deneylerinde, mesleki maruziyetlerde ve epidemiyolojik çalışmalarda bor bileşiklerinin karsinojenik etkili olduğunu gösteren herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (WHO, 1998).

1.1.5.2. Borun Üreme Üzerine Toksik Etkileri

REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) Avrupa Birliği Komisyonu tarafından 9 Haziran 2008 tarihinde alınan karar ile borik asit ve boratlar “Kategori 2” altında “üremeye olumsuz etkili toksik madde” olarak sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma sadece hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlar incelenerek yapılmıştır. Yani borik asit ve sodyum boratlar epidemiyolojik

insan çalışmaları olmaksızın yeterli bilimsel çalışma ve araştırmalar yapılmadan reprodüktif maddeler olarak sınıflandırılmıştır.

Borun insan üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu iddiasıyla AB gündemine getirilen girişimler, hayvanlar üzerinde yapılan deney sonuçlarına dayandırılmaktadır. Deneylerde; hayvanların oral yolla yüksek dozda borik asit ve soydum borat alımının, üreme sağlığı üzerinde zararlara yol açtığı tespit edilmiştir (Murray, 1995). Ancak yapılan laboratuvar deneylerinde hayvanlara oral yolla, çok yüksek miktarlarda ve uzun sürelerde bor uygulanmaktadır. Oysa insanların bora kasti ve hatalı kullanımlar dışında oral yolla bu kadar yüksek konsantrasyonlarda maruz kalmaları mümkün görülmemektedir.

İnsanlarda yüksek dozda borun oral yolla alınması durumunda aynı yan etkilere yol açacağı iddia edilmektedir. Ancak hayvanlarla yapılan bu deneylerin olumsuz sonuçlarından hareketle, insanlar üzerinde de benzer etkilere neden olabileceği değerlendirilmesi yanlıştır.

Bu konuyla ilgili olarak insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda yüksek doz kullanımına dikkat çekilmiş ve insanlarda hiçbir zaman bu dozlara ulaşamayacağı ispatlanmıştır. Son yıllarda borun insanlarda üreme üzerine toksik olup olmadığını araştıran iki önemli çalışma bulunmaktadır. Bunların bir tanesi Amerikalı bir grup tarafından Çin'deki bor madeni çalışanlarında (Xing ve ark., 2008; Robbins ve ark., 2010); diğeri ise Türkiye'de, Balıkesir/Bandırma Borik Asit Fabrikası çalışanlarında gerçekleştirilmiştir (Duydu ve ark., 2011; 2012).

Balıkesir/Bandırma Borik Asit Fabrikası'nda çalışan erkek işçilerde çeşitli deneyler yapılmıştır. Eksternal ve internal bor maruziyetini tanımlamak için biyolojik sıvılarda (kan, idrar, sperm), çalışma alanı havasında, yemeklerde ve su kaynaklarında bor miktarları belirlenmiştir. Bora günlük en yüksek düzeyde maruz kalan grup için miktar; günde 14.45 ± 6.57 mg'dır. En yüksek düzeyde maruziyetin gözlendiği bu düzey bile deney hayvanlarında üremeye olumsuz etkilerin görüleceği düzeyden çok daha azdır. Projeden elde edilen sonuçlara göre Bandırma Borik Asit

Fabrikası'nda çalışan erkek işçilerin maruz kaldıkları günlük bor miktarlarında borun üreme üzerine herhangi bir toksik etkisi tespit edilmemiştir. Kandaki LH, FSH ve total testosteron oranı; sperm konsantrasyonu, hareketliliği ve morfolojisi gibi sonuçlarda da herhangi bir toksisite bulunmamıştır. Aksine fabrikada maruz kalınan dozlarda kandaki bor konsantrasyonu arttıkça, işçilerin sperm DNA'larındaki hasarın azaldığı görülmüştür.

Sonuç olarak hayvanlarda gelişme ve üremede toksik etkiler oluşturan bu dozlara insanların oral yolla maruz kalma ihtimali yok denecek kadar azdır (Duydu ve ark, 2011; 2012).

1.2. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin uygun bir besi ortamında çoğaltılmasıdır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmaların günümüzde önemli bir yeri vardır. Çeşitli patolojik durumlarda seçilen bir maddenin etkisini belirlemek, bir hücre ya da dokuda üretilen bir maddenin işlevini saptamak amacıyla belli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde çalışmalar yapılarak in vitro sonuçlar elde edilebilir.

Son yıllarda hücre kültürü teknolojisinde büyük gelişmeler görülmüştür. Hücre kültürleri oldukça gelişmiş ve biyoteknolojinin önemli bir parçası olmuştur (Das, 2001). Bu gelişim sırasında hücre kültürü teknolojisi; hücre biyolojisi, genetik mühendisliği, protein kimyası, genomik ve kimya mühendisliğini içeren çeşitli disiplinlerle entegre olmuştur. Böylece hücre kültürü teknolojisi önemli proteinlerin üretiminde kabul görmüş bir yöntem haline gelmiştir.

Hücre kültürü teknolojisi; kanser, viral enfeksiyonlar, kalıtsal bozukluklar, çeşitli kronik hastalıkları önlemek ve tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır. Terapötik amaçlarla hücre kültürlerinin kullanımı hücrelerin aşı üretimi için kullanılmasıyla başlamıştır. Virüsleri çoğaltmak ve büyük ölçekli aşı imal etmek amacıyla sıkça tercih edilen bir yöntemdir. Oldukça güvenilir, etkili ve ekonomiktir.

İn vitro ortamda hücre ve doku davranışlarını inceleme olanağı vermektedir (Finter ve ark., 1990; Griffiths, 2000).

Hücre kültürü teknolojisinde daha sonraki büyük adım düzenleyici kurumların sürekli hücre hatlarını kabul etmesidir. Sürekli hücre hatları devamlı olarak çoğalabilmekte, büyüme faktörlerine daha az ihtiyaç duymakta ve en önemlisi süspansiyon içinde kültüre edilebilmektedirler.

Genetik mühendisliği ve rekombinant DNA teknolojisinin kullanımı hücre kültüründe birçok ürünün üretilmesini olanaklı kılmıştır. Çeşitli hücre serilerinde birçok vektör, doğal ve modifiye insan proteinlerinin üretiminde kullanılmaktadır. Hücre kültürü teknolojisindeki gelişmeler doku mühendisliği alanının gelişmesine yardımcı olmuştur (Hu, 2006).

1.2.1. Hücre Kültürü Teknolojisinin Tarihçesi

Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamakta ve kökeni 1885 yılına kadar dayanmaktadır. 1852’de Wilhelm Roux embriyonik tavuk hücrelerinin birkaç gün boyunca vücut dışında, bir tuz çözeltisinde canlılıklarını sürdürebildiğini göstermiştir. Daha sonra 1898 yılında Ljunggren insan dokusunun kullanıldığı ilk deneyi yaparak, insan derisinin in vitro ortamda asidik sıvıda canlılığını sürdürebildiğini göstermiştir. 1913’te Alexis Carol hücrelerin düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında çoğalabildiklerini belirlemiştir. Wilton Earle ve arkadaşları 1943’te L hücre serisinden izole ettikleri hücrelerin hücre kültüründe klonlar oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. 1951’de George Gay ilk sürekli insan hücre serisi olan HeLa hücre serisini geliştirmiştir. Günümüzde bu hücre serisi halen yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950’li ve 1960’lı yıllarda Eagle, Fischer, Parker, Healy, Morgan, White ve Waymounth adlı araştırmacıların da içinde olduğu birçok bilim adamı kültürde bulunan hücrelerin gelişmeleri için gerekli olan besin maddelerini belirlemişlerdir (Langdon, 2004).

1.2.2. Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

- Model Sistemler: Temel hücre biyolojisi, hastalıklara yol açan etkenler ve hücreler arasındaki ilişki, ilaçların hücreler üzerindeki etkileri, yaşlanmayı tetikleyen etkenler ve beslenmeyle ilgili çalışmalarda,
- Toksisite Testleri: İlaçlar, kozmetikler ve kimyasalların yan etkilerinin araştırılmasında,
- Kanser Araştırmaları: Normal hücreleri kanser hücrelerine çeviren virüs, radyasyon ve çeşitli kimyasalların fonksiyonlarının araştırılmasında,
- Viroloji: Aşı üretimi için virüs geliştirme ve enfeksiyöz döngü çalışmalarında,
- Genetik Mühendisliği: Ticari amaçlı protein üretimi ve aşı üretiminde kullanılan virüslerin geniş ölçüde üretiminde,
- Gen Terapisi: Fonksiyonel olmayan genlerin, fonksiyonel genlerle yer değiştirilmesi amacıyla,
- İlaç Geliştirme: Yeni ilaç geliştirme ve tarama çalışmalarında, yeni ilaçların etkili ve güvenli dozlarını tespit etmek amacıyla,
- Tüp bebek ve kısırlık tedavisinde hücre kültürleri kullanılmaktadır (Uppangala, 2010).

1.2.3. Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Avantajları

- Hızlı sonuç alınır.
- Organizmada karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmalar in vitro ortamlarda yapılabilir.
- Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar.
- Toksisite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir.

- Deneylerde hayvan kullanılmadığından, hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

1.2.4. Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Dezavantajları

- Tekli bir sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir.
- İn vitro bir yöntem olduğundan uyguladığımız kimyasal maddenin farmakokinetiği hakkında bilgi vermez.
- Kimyasal maddelerin davranışlar üzerine olan karmaşık etkileri incelenemez.
- Teknolojik alt yapı maliyeti ve deneyimi gerektirir.
- İn vitro ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır.
- Enzim stabilitesi kısıtlıdır.
- Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır.
- Ko-faktörlere gereksinim duyar (Gunaratna, 2000).

Günümüzde 2300'den fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabildiği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluşturmaları da mümkündür (Crespi ve ark., 1993; Wooster ve ark., 1993; Sun ve ark., 1995; Eaton ve ark., 1996; Saygi, 2003).

1.2.5. Başlıca Hücre Kültür Tipleri

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültür tipleri vardır. Hücre kültürleri başlıca üç bölümde incelenir (Çiçek ve Bilgiç, 2006):

- Primer (birincil) hücre kültürleri
- Sekonder veya diploid (ikincil) hücre kültürleri
- Sürekli veya heteroploid hücre kültürleri

Primer hücre kültürü: Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin in vitro ortamlarda üretilmeleri ile elde edilen kültürlerdir. İn vitro koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler. Bu amaçla tavuk, fare, maymun, koyun, sığır, hamster embriyolarının yanı sıra göbek kordonu endotel hücreleri, primer düz kas hücreleri vb. kullanılır.

Sekonder hücre kültürü: Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir. Örneğin; WI-38, MRC-5 vb.'dir.

Sürekli hücre kültürü: Teorik olarak sonsuz sayıda pasajları yapılabilir. Genellikle tümör hücrelerinden veya diploid hücrelerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir. Örneğin; insan larenks epidermoid karsinomu (Hep-2), insan nazofarenks karsinomu (KB), insan serviks karsinomu (HeLa), yeşil maymun böbreği (Vero) vb.'dir.

1.2.5.1. V79 Hücre Serisi

V79 hücre serisi, 1958 yılında Ford ve Yerganian tarafından erkek Çin hamstirinin akciğer dokusundan geliştirilmiştir. Aynı yıl Strain V. Elkind tarafından V-79 hücre serisi olarak isimlendirilmiştir.

V79 hücreleri çok hızlı ürerler, 12-14 saat içinde sayıları iki katına çıkar. Bu hücrelerde G1 fazı ya yoktur ya da çok kısadır. Dolayısıyla G1 gelişme periyodu çalışmalarında kullanılırlar. Toksikoloji çalışmalarında da çok sık tercih edilirler. Karyotipin stabilitesi ve morfolojisi bu hücrelerin gen toksisitesi çalışmalarında tercih edilme nedenlerinden biridir. Ayrıca X-ray ışınlarının indüklediği hasar ve onarım proseslerinin belirlenmesi çalışmalarında da kullanılırlar (Robbins ve Scharff, 1967).

1.3. Sitotoksosite Testleri

Geçmişten bugüne kadarki hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığı ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Bu deneylerle birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksosite deneylerinde değişik parametreler kullanılarak hücre ölümü ve çoğalımı belirlenebilir (Weyermann ve ark., 2005).

Toksik olduğu düşünülen maddenin, uygun hücre kültüründe, hücrelerin büyüme oranları ve tahribatları üzerindeki etkilerinin incelenerek değerlendirilmesiyle yapılan testlere sitotoksosite testleri denir. Bu test sistemleri;

- Morfolojik olarak hücresel hasarın gözlenmesi,
- Hücresel hasarın çeşitli ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi,
- Hücresel büyümenin belirlenmesi,
- Hücresel metabolizmada oluşan herhangi bir değişikliğin belirlenmesi amacıyla yapılmaktadır.

Sitotoksosite, kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan önemli bir belirteçtir. Sitotoksitenin karsinogenezis ve inflamasyonun da içinde bulunduğu patolojik proseslerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Ayrıca sitotoksosite; serbest radikaller, irritanlar, genotoksinler vb. etkenlerin aktivitelerinin belirlenmesinde de kullanılır (Putnam ve ark., 2002).

İn vitro testler; sitotoksiteyi değerlendirenler, metabolik veya diğer hücre fonksiyonunu değerlendirenler ve hücredeki genetik materyal üzerindeki etkiyi değerlendirenler (mutajenezis testleri) olmak üzere çeşitli alt gruplara ayrılabilirler.

İn vitro sitotoksisite testleri; hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membran seçici geçirgenliği, DNA sentezi ya da hücrel metabolizma gibi toksisitenin belirlenmesinde kullanılan parametrelerin ölçülmesine dayanır (Gad, 2000). Sitotoksisite deneyleri in vitro çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. NRU (nötral kırmızı alımı) ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri tek katmanlı kültürlerde sitotoksisite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir (Fent, 2001; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Sitotoksisitenin in vitro testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısının en aza indirilebilmesidir. Bir diğer avantajı ise, hücre ya da organın toksik etkiye karşı gösterdiği mekanizmanın belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin in vitro yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi ekonomi, zaman ve deney hayvanları açısından kazanç sağlayabilir (Putnam ve ark., 2002).

İn vivo testlerde memeli bir organizma kullanılarak, biyolojik çevre ile materyal arasında oluşan birçok karmaşık etkileşimin gerçekleşmesine imkan sağlanır. Bu nedenle, in vivo testlerden elde edilen biyolojik cevap in vitro testlerle elde edilen cevaptan daha kapsamlı ve uygundur. Fakat hayvan testleri çok karmaşık olduklarından biyolojik cevabı kantitatif olarak değerlendirmek ve değişkenleri kontrol etmek zordur. Bu tip testlerde etik endişeler ve hayvan sağlığı ile ilgili sorunlar giderek önem kazanmaktadır. Ayrıca bu testler zaman alıcı ve pahalıdır. Bununla birlikte bir hayvan türündeki cevabın; insandaki cevaba ne derece benzerlik gösterebileceği hakkında her zaman şüpheler vardır (Wataha, 2001).

İn vitro testlerin avantajlarının yanı sıra dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajların en önemlisi; in vitro testler organizmanın dışında gerçekleştirildikleri için, vücutta biyolojik cevabı oluşturan birçok etkileşim ve kinetik değişimlerin gözlenememesidir (Wataha, 2001).

1.3.1. Nötral Kırmızı Alımı Sitotoksosite Testi

Kolorometrik bir yöntem olan nötral kırmızı alımı sitotoksosite deneyi, lizozomlarda biriken, elektrostatik olarak lizozomal matriksteki anyonik bölgelere bağlanan, katyonik süpravital bir boya olan nötral kırmızının (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alımına dayanmaktadır (Bulychev ve ark., 1978; Andreoli ve ark., 2003; Weyermann ve ark., 2005).

Nötral kırmızı boyası canlı, hasar görmemiş hücrelerin lizozomlarında birirmektedir (Yano ve ark., 2005; Fotakis ve ark., 2006). Nötral kırmızı alımı sitotoksosite deneyi; oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Popiolkiewicz ve ark., 2005).

Hücre yüzeyindeki veya hassas lizozomal membrandaki hasar, nötral kırmızının alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı / sağlam hücrelerle hasarlı / ölü hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır (Barile ve ark., 1994; Komissarova ve ark., 2005).

1.4. DNA Hasarını Belirlemede Kullanılan Yöntemler

DNA'daki hasar düzeyinin ölçülmesinde kullanılan standart testlerden ilk kullanılanlar Ames Testi, Timidin Kinaz, MN, SCE ve daha sonra kullanılmaya başlanılarak önemi giderek artan FADU (fluorescence analysis of DNA unwinding), kromozomal translokasyonların gösterilmesinde FISH (fluorescent in situ hybridization), p53 mutasyon tayini, apoptozisin saptanması, anti-sentromer antikolar ile anoploidi tayini ve Komet Testi yöntemleridir (Kramer, 1998).

En yaygın ölçme yöntemlerinden biri olan komet yöntemi, hücrelerde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluklarının tayini amacıyla pek çok alanda kullanılmaktadır.

1.4.1. Komet Testi (SCGE: Tek Hücre Jel Elektrophorezi)

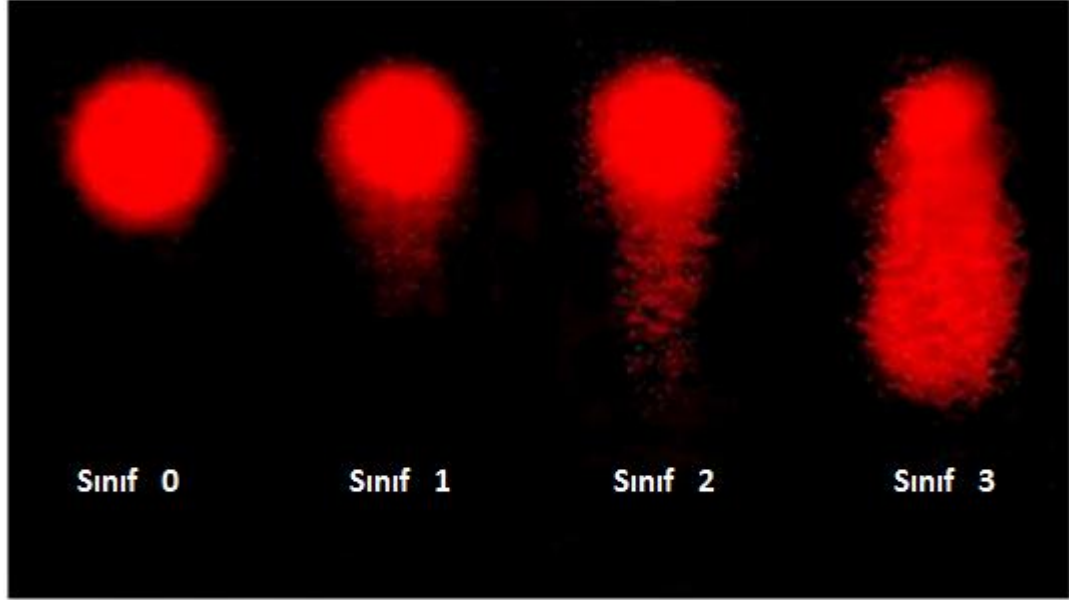
Komet testi, hücrelerde DNA hasar seviyesinin belirlenmesinde kullanılan hassas, hızlı ve basit bir floresan tekniğidir (Singh ve ark., 1988). DNA tek ve çift zincir kırıklarının, alkali-kararsız bölgelerinin, eksik kesip çıkarma onarım bölgelerinin ve zincir içi çapraz bağların tespiti için Komet Testi yönteminde değişiklikler yapılarak yeni teknikler geliştirilmiştir.

İlk kez 1984'te Ostling ve Johanson tarafından bulunmuş, 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Ostling ve Johanson mikro jel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir (Ostling ve ark., 1984). Bu teknikte mikroskopik lamalara agaroz jel içindeki hücreler gömülmekte, ardından bu lamalar yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltilerinde bekletilerek hücre membranlarının parçalanması sağlanmaktadır. Nötr pH ortamında kısa bir süre elektroforez uygulanır. Elektroforez sırasında yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA, sağlam DNA'ya göre daha hızlı olarak çekirdekten uzaklaşır ve anoda doğru göçer. Görüntü kuyruklu yıldız benzediğinden yönteme "Komet" adı verilmiştir (Tice ve ark., 2000). DNA göçünün miktarı lamaların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan floresan yoğunluğunun mikroskopta ölçülmesiyle belirlenir.

Önceleri bu işlem Nötral Faz Elektroforezi de denilen ve ancak nötral pH'ta uygulaması mümkün olan bir yöntemdi. Nötral koşullarda tek ve çift sarmal kırıkları tespit edilebilir. Singh ve arkadaşları bu yöntemi geliştirerek alkali ortamda da yöntemin geçerliliğini sağlamışlardır. Geliştirilen bu yöntemle alkali ortamda da (pH>13) DNA kırıkları saptanabilmektedir. Bu yöntem ise "Alkali Komet Assay" olarak isimlendirilir. Günümüzde daha çok bu yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntem hem tek, hem çift zincir kırıklarının, hem de alkali-kararsız bölgelerin tanımlanmasına imkan vermektedir. Ayrıca Alkali Komet yöntemi, Nötral Komet yönteminden daha hassastır (Singh ve ark., 1988).

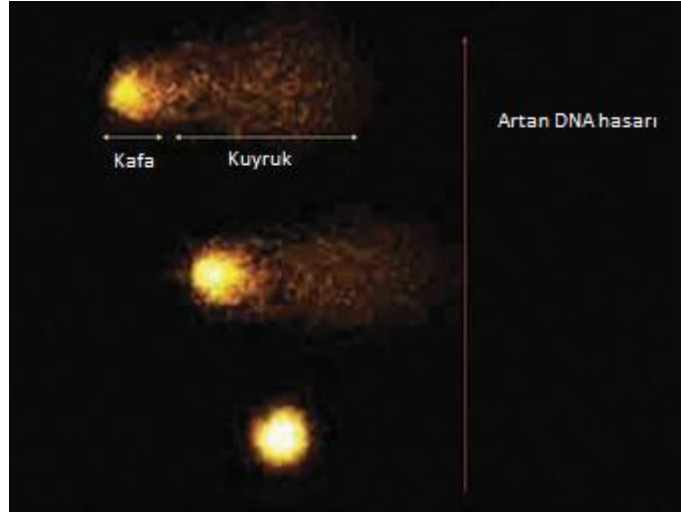
Son yıllarda Komet Testi belirli DNA dizilerine spesifik işaretli problemler kullanılarak floresanın situ hibridizasyon tekniği ile birleştirilmiştir. FISH Komet

olarak adlandırılan bu modifiye teknikle dizi veya gen spesifik hasar belirlenebilmektedir (Shaposhnikov ve ark., 2009).



Şekil 1.3. Alkali komet sınıflandırması. Normal çekirdek (Sınıf 0), çekirdeğin etrafında hale (Sınıf 1), yavaşça artan komet kuyruk uzunluğu ve buna paralel olarak hücrenin DNA içeriğinin azalması (Sınıf 2 ve Sınıf 3) (Cortés-Gutiérrez ve ark., 2012).

DNA hasarına uğramış hücre, kafa ve kuyruk olarak iki kısımdan meydana gelmiştir. “Kafa” bölgesi çekirdek dışına göç etmeyen, “kuyruk” ise parçalanmaya ve yapısal kayba bağlı olarak çekirdek dışına göç etmiş DNA’yı tanımlar. Belli bir bölgedeki DNA miktarı o bölgedeki floresan yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanılarak, dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayin yöntemleri geliştirilmiştir (Başaran ve ark., 2002).



Şekil 1.4. H_2O_2 maruziyetinden sonra oluşan DNA hasar seviyelerinin komet testindeki görüntüleri (Benhusein ve ark., 2010).

Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali komet protokolü 8 basamaktan oluşmaktadır (McKelvey-Martin ve ark., 1993; Gren ve ark., 1996; Collins ve ark., 2004).

1. Hücresel materyalin hazırlanması
2. Mikroskop lamalarının hazırlanması
3. DNA'nın açığa çıkması için lizis
4. Çift sarmal DNA yapısının açılması (Alkali unwinding) ($pH > 13$)
5. Elektroforez ($pH > 13$)
6. Nötralizasyon ($pH = 7.5$)
7. DNA'nın boyanması ve "komet"lerin görüntülenmesi
8. Komet sayımı ve DNA hasarının belirlenmesi

1.4.1.1. Komet Testinin Kullanım Alanları

Komet testi, avantajları gereği geniş bir alanda kullanım gösterir. Başlıca aşağıdaki alanlarda kullanılır;

- Genotoksisite çalışmaları (Genetik toksikoloji ve genotoksisite biyoizlemesi)
- DNA hasarı üzerine çalışmalar (Tek ve çift zincir kırıkları, DNA çapraz geçişleri, alkali-kararsız bölgelerin belirlenmesi)
- DNA onarımı üzerine çalışmalar (Zincir kırığı onarımı, baz ve nükleotid kesip-çıkarma onarımı)
- Çevresel biyoizleme ve ekotoksikoloji (Atıkların yoğun olduğu bölgelerdeki kirleticilerin değerlendirilmesi)
- Beslenme (Gıdalarda uygulama yapılması)
- Hipoksi tayini

İnsanlar üzerindeki epidemiyolojik çalışmalar özellikle maruziyet koşullarında (mesleki, çevresel ve klinik) DNA hasarının belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmalar süresince kontrol gruplarıyla maruz gruplar arasındaki DNA onarım farklılığı değerlendirilir. Veriler; sperm bankası, kan bankası ve çeşitli izlemlerle (kanser hastalarında radyoterapi ve kemoterapi izlemleri) toplanabilir. Sonrasında bu veriler in vivo ve in vitro antioksidan aktivite çalışmalarında kullanılır.

1.4.1.2. Komet Testinin Avantajları

Komet testinin pek çok avantajı vardır;

1. Az sayıda hücreyle çalışılabilir (<10.000).
2. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
3. DNA hasarı ve onarımını belirlemede hassastır.
4. Kolay uygulanabilir. Girişimsel olmayan yani müdahale gerektirmeyen bir yöntemdir.
5. Hızlıdır, birkaç saat içinde yöntem tamamlanabilir.
6. Ekonomiktir.
7. Güvenilirdir.
8. Çeşitli türlerde DNA hasarları tespit edilebilir.

9. Tek ve çift zincir kırıkları, alkali-kararsız bölgeler tayin edilebilir.
10. İnsan çalışmalarında sadece 5-10 µl kan, burun veya ağız mukoza hücreleri, epitelyum hücreleri, sperm hücreleri kullanmak yeterlidir.

1.4.1.3. Komet Testinin Dezavantajları

Bu özelliklerinin yanında önemli olarak tek bir dezavantajı bulunur. Komet testi sadece DNA onarım hızını ölçer, DNA onarım doğruluğunu ölçmez. Yanlış onarılan DNA kırıkları, komet testinde DNA göçüne neden olmaz (Üstündağ, 2010).

1.5. Tezin Amacı

Bu tezde, hücrelerde oluşabilecek oksidatif DNA hasarına karşı borik asidin belli konsantrasyonlarının koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Test edilen borik asit konsantrasyonları nötral kırmızı alımı testi sonuçlarına göre, borik asidin sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlarının altındaki konsantrasyonlardan seçilmiştir. Bu amaçla belli konsantrasyonlarda borik asit içeren ve borik asit içermeyen medyumlarda çoğaltılan V79 hücreleri iki farklı konsantrasyonda H_2O_2 'e maruz bırakılmışlardır. Test sonunda H_2O_2 ile oluşan DNA hasarı borik asit içeren ve içermeyen medyumlarda çoğaltılan hücrelerde karşılaştırılmıştır.

Bu yolla her gün içtiğimiz sulardan ve aldığımız gıdalardan maruz kaldığımız borik asidin kanda oluşturabileceği konsantrasyonlar dikkate alınarak, bu konsantrasyondaki borik asidin hücrelerdeki oksidatif DNA hasarı üzerinde koruyucu bir etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Maddeler

PBS tablet (Fosfat Tampon Çözeltisi) (Sigma, ABD)

Kalsiyum klorür (CaCl_2) (Merck, Almanya)

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Almanya)

Sodyum klorür (NaCl) (Merck, Almanya)

Potasyum klorür (KCl) (Merck, Almanya)

Na_2HPO_4 (Merck, Almanya)

KH_2PO_4 (Merck, Almanya)

$\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ambresco, ABD)

Tripsin (10 X Solusyonu T.4549) (Sigma, ABD)

DMEM (Biological Industries)

NaHCO_3 (Sigma, ABD)

Penicilin - Streptomycin Çözeltisi (Biological Industries, İsrail)

Fötal Sığır Serum (Sigma, ABD)

Nötral kırmızı boyası (Sigma, ABD)

Glasiyal asetik asit çözeltisi (Merck, Almanya)

Ethanol (Merck, Almanya)

Sodyum hidroksit (NaOH) (Ambresco, ABD)

Düşük erime dereceli agar (LMA) (Sigma, ABD)

Normal erime dereceli agar (NMA) (Ambresco, ABD)

Hidrojen peroksit (H_2O_2) (Riedel-de Haen, ABD)

Borik asit (Biological Industries, İsrail)

Tris. HCl (Ambresco, ABD)

Sodyum lauril sarkosinat (Ambresco, ABD)

Triton X-100 (Ambresco, ABD)

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
 Ethidium bromür (Sigma, ABD)
 Trypan mavisi (Biological Industries, İsrail)
 V79 Hücre Serisi

2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

Laminar hava akımlı kabin (Clean Air, Biohazard EN 12469)
 CO₂ inkübatörü (Sanyo, Japonya)
 Soğutmalı santrifüj (Sigma, ABD)
 Su banyosu (Boeco, Almanya)
 Mikroskop (CETİ, Belçika)
 Inverted mikroskop (Micros MCXL600, Avusturya)
 Floresan mikroskop (Leica DM 1000, Almanya)
 Hassas terazi (Sartorius, Türkiye)
 Otoklav (Sanyo, Japonya)
 Vorteks (Boeco, Almanya)
 Spektrofotometre (SpectraMAX, Molecular Devices Inc., ABD)
 Manyetik karıştırıcı ısıtıcılı (Heidolph MR Hei Standard, Almanya)
 pH metre (WTW pH330i / SET, Almanya)
 Vakum pompası (Neo Lab)
 Lam ve lamel (Menzel Glaser, Almanya)
 Membran filtre (0,22 µM, Corning)
 Sayım lamı (Neubauer improved) (Marienfeld, Almanya)
 Çalkalayıcı (96 kuyucuklu plakalar için) (BDECO, Almanya)
 Buz makinası (Hoshizaki, Japonya)
 Santrifüj (Rotina 38, Hettich, ABD)
 Elektroforez tankı (C.B.S., ABD)
 Güç kaynağı (Thermo EC250-90, ABD)

2.2. Yöntem

2.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Tripsin Çözeltisi: PBS / EDTA çözeltisi hazırlandı. Bunun için 584 mg NaCl, 33.5 mg KCl, 99.3 mg Na₂HPO₄, 40.8 g KH₂PO₄, 22.14 mg EDTA tartıldı ve 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. pH:7.4'e ayarlandı. pH'ı ayarlanan bu PBS / EDTA çözeltisi steril koşullarda süzüldü. Bu çözeltiden 90 ml alındı, üzerine 10 ml Tripsin steril koşullarda ilave edildi. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37°C'ye getirildi.

DMEM Medyum: 4.5 g/l D-glukoz, NaHCO₃, 0.5844 g/l L-glutamin içeren 500 ml'lik DMEM içerisine %10 FCS ve %1 Streptomisin / Penisilin ilave edildi. +4°C'de saklandı. Kullanmadan önce 37°C'ye getirildi.

Stop Medyum (Durdurucu Medyum): %60 DMEM ve %40 FCS'den oluşan çözelti +4°C'de saklandı.

PBS Çözeltisi: 1 adet PBS tablet üzerine 0.01 g CaCl₂ ve 0.01 g MgCl₂.6H₂O tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlandı, manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Steril koşullarda süzüldü. Buzdolabında +4°C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37°C'ye getirildi.

Nötral Kırmızı (NR) Stok Çözeltisi: 0.4 g nötral kırmızı boyası 100 ml distile su içerisinde çözülür. Oda sıcaklığında saklandı.

Nötral Kırmızı (NR) Medyum: 1 ml NR stok çözeltisi 79 ml medyum (Streptomisin / Penisilin çözeltisi ve fetal sıgır serumu içermeyen) içerisinde çözülür. 37°C'de 1 gün bekletildi. Oluşan NR kristallerini uzaklaştırmak için 22 µm'lik membran filtreden süzülür.

Etanol / Asetik Asit Çözeltisi (NR Desorb): 1 ml glasiyal asetik asit çözeltisi, 50 ml etanol, 49 ml distile su cam mezür içerisine alındı. Bu çözelti deneyin yapıldığı gün taze olarak hazırlandı. Bekleme süresinin 1 saatten daha fazla olmamasına dikkat edilerek oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1 N HCl: 8.3 ml konsantre HCl çözeltisi alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

1 N NaOH: 4 gr NaOH tartılıp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

10 N NaOH: 200 g NaOH tartılıp 500 ml distile suda çözüldü. 2 hafta oda sıcaklığında saklandı.

1 M H₂O₂ Stok Çözeltisi: 113.4 µl % 30'luk H₂O₂ 1000 µl'ye +4°C'deki distile su ile tamamlandı. Buzdolabında +4 °C'de saklandı.

Lizing Çözeltisi: 2.5 M NaCl, 10 mMTris, 100 mM Na₂EDTA tartıldı ve distile suda çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve %10 DMSO ilave edilerek +4°C'de soğuması sağlandı.

200 mM EDTA: 14.89 g EDTA tartıldı, 200 ml suda çözüldü. pH:10'a ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Elektroforez çözeltisi: 1 mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH distile suda çözülerek pH>13'e ayarlandı, +4°C'de saklandı.

Nötralize lysing çözeltisi: 0.4 M Tris distile suda çözülerek pH:10'a ayarlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Etidium bromür çözeltisi: 200 µg/ml stok çözeltiden 100 ml hazırlandı, oda sıcaklığında saklandı. Bu stok çözeltiden boyama esnasında 20 µg/ml hazırlandı ve her bir lama 60 µl damlatılarak kullanıldı.

Normal Erime Noktalı Agar (NMA) Çözeltisi: % 1'lik çözeltisi PBS (Na ve K içermeyen) ile çözülerek hazırlandı. Çözelti henüz sıcak iken lamalar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplandı ve kurutuldu.

Düşük Erime Noktalı Agar (LMA) Çözeltisi: % 0.75' lik çözeltisi PBS (Na ve K içermeyen) ile çözülerek hazırlanıp buzdolabında +4°C'de saklandı. Kullanılmadan önce su banyosunda 37 °C'ye getirildi.

H₂O₂ Çözeltisi: 100 µM olacak şekilde stok çözelti hazırlandı. 50 µM elde edebilmek için 100 µM'lik stok çözelti seyreltilerek kullanıldı. Dilüsyonlar ve tamamlamalar soğuk PBS ile yapıldı.

Borik Asit Çözeltisi: 1 ml'de 12 mg borik asit olacak şekilde 200 µM'lik stok çözelti hazırlandı. Gerekli dilüsyonlar yapılarak 100 µM, 50 µM, 10 µM ve 5 µM'lik çözeltiler hazırlandı.

2.2.2. V79 Hücrelerinin Sıvı Azottan Çıkarılmaları

Sıvı azot içinde saklanmakta olan V79 hücreleri alındı ve 37 °C'de çözünmesi sağlandı. Laminar hava akımlı kabinde sterilite koşullarına dikkat edilerek 15 ml'lik steril santrifüj tüpünde 10 ml (37 °C) medyum içerisine aktarıldı. Tüp 37 °C'de, 1500 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz pastör pipeti yardımıyla steril koşullarda vakumla atıldıktan sonra alt fazdaki hücreler alındı. Üzerine 10 ml medyum ilave edildi. Hücreler medyum içerisine pipetle çek-bırak yöntemi kullanılarak homojen olarak dağıtıldı. Hafifçe vortekslendi. Hücrelerin hepsi alınıp içerisinde 25 ml medyum bulunan 75 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 çoğalmadığına bakıldı.

2.2.3. V79 Hücrelerinde Yeni Pasajın Yapılması

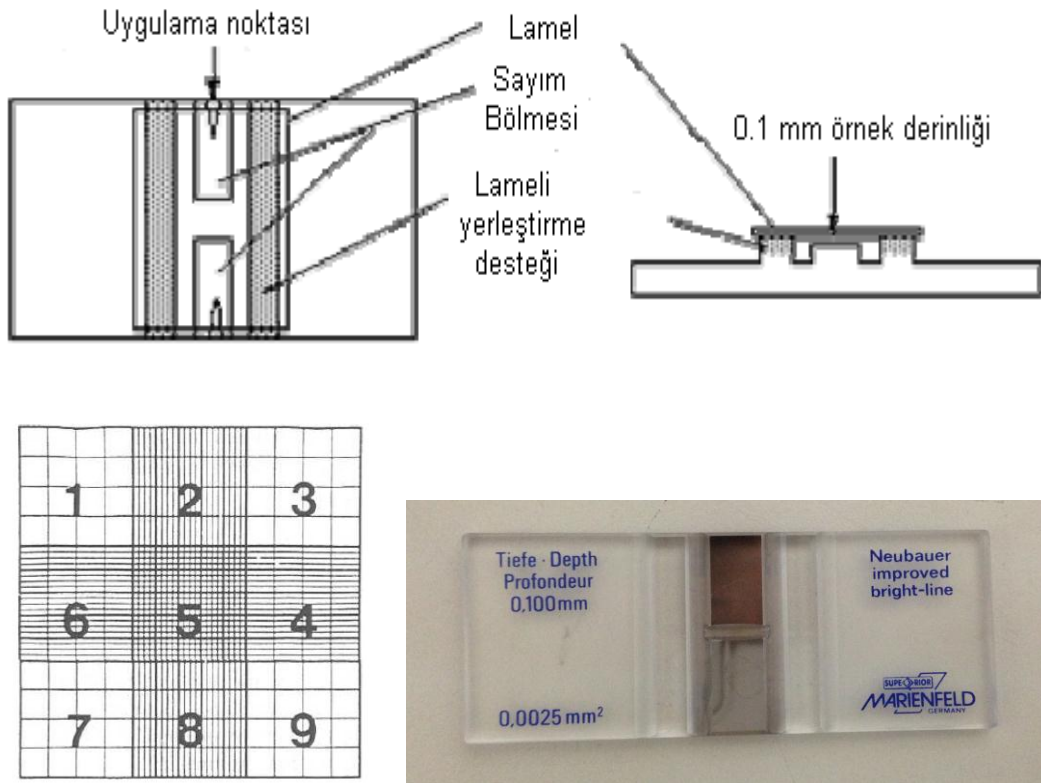
CO₂ inkübatöründe (37 °C, % 5 CO₂) flask içerisinde duran hücrelerden yaşamaya devam edenler flask yüzeyine yapışıp mekik şeklini alırken, ölmüş olan hücreler medyum içerisinde yüzerler.

CO₂ inkübatöründe flask içerisinde beklemiş olan hücrelere mikroskop altında bakıldı ve hücrelerin yaşamaya devam ettiğine karar verildikten sonra hücrelerin yeni medyum içerisine alınması için gerekli işlemlere başlandı.

Steril flask, laminar hava akımlı kabinde sterilitesi bozulmadan açıldı. Steril pastör pipeti yardımı ile flask içerisindeki medyum aspire edildi. Daha önceden su banyosunda ısıtılıp 37 °C'ye getirilmiş 3 ml tripsin çözeltisi flask içerisine konuldu. Tripsin çözeltisi hücrelerin bulunduğu flaskın kapağı kapatılıp 3 dakika 37 °C'ye ayarlı olan %5'lik CO₂ inkübatöründe bekletildi. Flask yüzeyine yapışmış olan hücreler bu şekilde yüzeyden koparıldı. Mikroskop ile bakılarak hücrelerin yüzeyden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Flaskın içerisine 37 °C'ye getirilmiş olan 3 ml stop medyum ilave edildi. Pastör pipet ile çek-bırak yöntemiyle kapatıldıktan sonra hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1000 rpm, oda sıcaklığında, 6-7 dakika santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra dipte kalan hücreler 5 ml DMEM ile karıştırılarak süspanse edildi. DMEM Medyum içerisindeki hücrelerin sayıları belirlendi. CO₂ inkübatöründe kaç gün bekletileceğine bağlı olarak uygun sayıdaki hücre, uygun miktardaki medyumla, uygun hacimdeki flask içerisine alındı. Hücrelerin homojen dağılması sağlanıp flask yüzeyine tarih, saat, hücre adı, pasaj sayısı ve hücre sayısı yazılarak 37 °C'ye ayarlı olan CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

2.2.4. Hücre Sayımı

Hücre süspansiyonundan 100 μ l eppendorf içerisine alınıp üzerine 100 μ l trypan mavisi ilave edildi (dilüsyon faktörü = 2). Trypan mavisi ile hücreler homojen olarak karıştırıldıktan sonra karışımın 100 μ l'si bekleme yapılmadan üzerine lamel kapatılmış improved Neubauer sayım lamına uygulandı. Lamın 4 köşesindeki ve ortasındaki karelerde bulunan hücreler sayıldı. Beş bölgenin ortalaması alındı ve dilüsyon faktörüyle her karenin hacminin çarpımı olan 20.000 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı bulundu.



Şekil 2.1. Hücre sayım lamı (Improved Noubauer).

1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı karelerdeki hücreler sayıldı. 1, 3, 7 ve 9 numaralı karelerin (köşe kareler) içerisinde 16 adet küçük kare, 5 numaralı karenin (merkez kare) içerisinde ise 25 adet küçük kare bulunmaktadır. 9 büyük kareden her birinin alanı 1 mm², derinliği ise 0.1 mm'dir. buna göre her karedeki hacim 0.1 mm³'tür (0.0001ml).

Sayım yapılırken soldan sağa, yukarıdan aşağıya gidildi. Aynı hücreyi iki kez saymamak amacıyla; karelerin sol ve üst çizgilerine temas eden hücreler sayıldı, alt ve sağ çizgilere temas eden hücreler sayılmadı. Sayılan 5 karedeki hücrelerin ortalaması alındı, dilüsyon faktörü ve 10^4 ile çarpılarak 1 ml'deki hücre sayısı hesaplandı.

$$\frac{\text{Toplam Hücre Sayısı}}{5} \times 10^4 \times 2 \text{ (dilüsyon faktörü)} = 1 \text{ ml'deki hücre sayısı}$$

2.2.5. Sitotoksosite Testinin Uygulanması

2.2.5.1. Borik Asit İçin Sitotoksosite Testleri

Kültürü yapılan hücreler ml'de 10000 hücre olacak şekilde % 10 protein içeren medyum içerisine alınıp her bir kuyucuğa 100 µl konuldu ve CO₂ inkübatöründe 24 saat inkübe edildi. Test edilecek borik asit distile suda çözöldü. Ardından 0.2 µm por genişliğindeki filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Bu steril çözeltiden öncelikle borik asitin 300 µM'lık stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden 0.1 µM, 0.3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM olacak şekilde seyreltilerek stok çözelti de dahil toplam 8 konsantrasyonda çözelti hazırlandı ve toksik doz belirlendi.

Testler sırasında 96 kuyucuklu plak kullanıldı. 1. ve 12. sütunlar blank, 2. sütun kontrol grubu (içerisinde sadece hücre olan % 5 lik medyum) olarak kullanıldı. 11. sütuna %1 steril su içeren medyum ilave edilerek V79 hücreleri için toksik olup olmadığını gözlemlendi. Diğer sütunlara ise borik asit azalan konsantrasyonlarda ilave edildi. Her bir konsantrasyon için sitotoksosite deneyinde 2 ayrı plaka ile paralel çalışılarak deneyin kendi içindeki tekrarlanabilirliği kontrol edildi.

Test edilen borik asitin farklı konsantrasyonlardaki sitotoksitesi test edildi.

1. Gün

- ✓ Kültürü yapılan hücrelerin ml'deki sayısı belirlenip ml'de 10000 hücre olacak şekilde % 10'luk medyum içerisinde hücre süspansiyonu hazırlandı. Homojen hale getirilen bu çözeltiden 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 100 µl ilave edildi. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.
- ✓ PBS çözeltisi hazırlanıp buzdolabında muhafaza edildi.
- ✓ Borik asit %1 steril su içerisinde çözöldü.

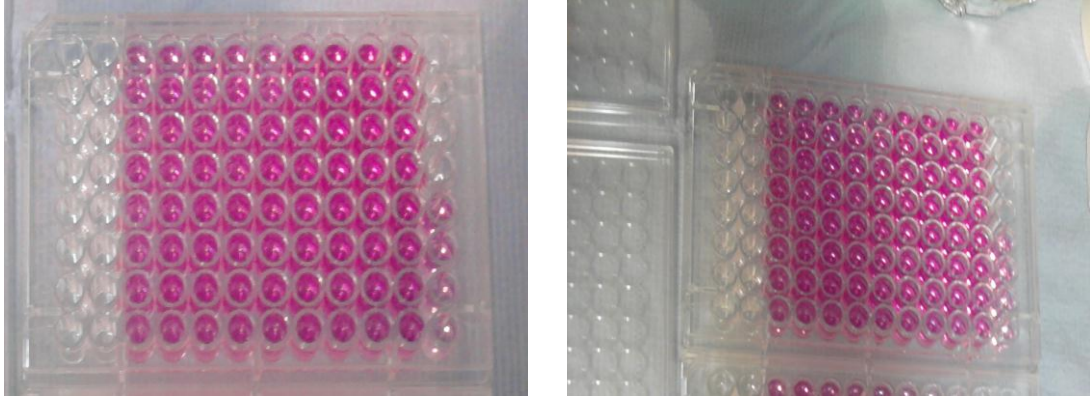
2. Gün

- ✓ Hazırlanan borik asit filtreden süzölüp steril hale getirildi ve konsantrasyonları ayarlandı.
- ✓ Kuyucuklar içerisindeki % 10 protein içeren medyum aspire edildi. Plakanın 1., 2. ve 12. sütunlarına % 5 protein içeren medyumdan 100 µl eklendi. 11. sütuna 100 µl % 1 steril su ilave edildi. Plakanın diğör sütunlarına borik asit azalan konsantrasyonlarda eklendi. Plakalar 24 saat boyunca 37 °C'lik CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.
- ✓ NR medyum hazırlandı ve 37 °C'lik CO₂ inkübatörüne kaldırıldı.

3. Gün

- ✓ Buzdolabında saklanmakta olan PBS su banyosunda 37 °C'ye getirildi.
- ✓ Kuyucuklar içerisindeki % 5 protein içeren medyum aspire edildi.
- ✓ Artıkları temizlemek için kuyucuklar 150 µl PBS ile yıkandı ve ardından PBS aspire edildi.
- ✓ Süzölerek kristalleri uzaklaştırılmış olan NR medyumdan 100 µl ilave edildi ve 37 °C'lik CO₂ inkübatöründe 3 saat inkübe edildi.
- ✓ Plakaların CO₂ inkübatöründen çıkartılmasına 1 saatten az bir süre kala etanol/asetik asit çözeltisi (NR desorb) hazırlandı.
- ✓ Belirtilen sürenin sonunda CO₂ inkübatöründen çıkartılan plakalar içerisindeki NR medyum aspire edilip kuyucuklar 150 µl PBS ile yıkandı ve ardından PBS aspire edildi. Plakalar 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek kurutuldu.

- ✓ Bekletilmeden 150 µl NR desorb ilave edildi. Bu aşamada renklenme gözlemlendi.
- ✓ Homojenliği sağlamak amacıyla plakalar 10 dakika boyunca mikropilaka çalkalayıcısında çalkalandı.
- ✓ 540 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbansları okundu.



Şekil 2.2. Borik asite maruz bırakılan V79 hücrelerinin nötral kırmızı alımı testi sonuçları (Resimlerde 96 kuyucuklu plakaların görüntüsü verilmiştir).

2.2.6. Komet Testi

2.2.6.1. V79 Hücrelerinde DNA Hasarı Tespiti

Hücelere DNA hasarı testi yani Komet Testi yöntemi uygulanmıştır. Bu test neticesinde test edilen kimyasal maddelerin DNA hasarı oluşturma potansiyeline sahip olup olmadıkları (genotoksik olup olmadıkları) tespit edilebilir.

Deneyin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla test ilk olarak H_2O_2 maruz bırakılan V79 hücreleri ile yapıldı. Genotoksisitesine bakılacak borik asitin tüm konsantrasyonları için toksisite testi yapılırken H_2O_2 ile maruz bırakılmış V79 hücreleri pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Test edilen her konsantrasyon için 2 ayrı paralel test yürütülerek yapılan testlerin doğruluğu kontrol edildi.

1. Gün

- ✓ Yapılacak olan komet testi için 25 cm²'lik flask içerisine yeterli sayıda hücre alındı (5ml'de 50000 DMEM).
- ✓ Hücreler CO₂ inkübatöründe (37 °C, % 5 CO₂) 48 saat inkübe edildi.

2. Gün

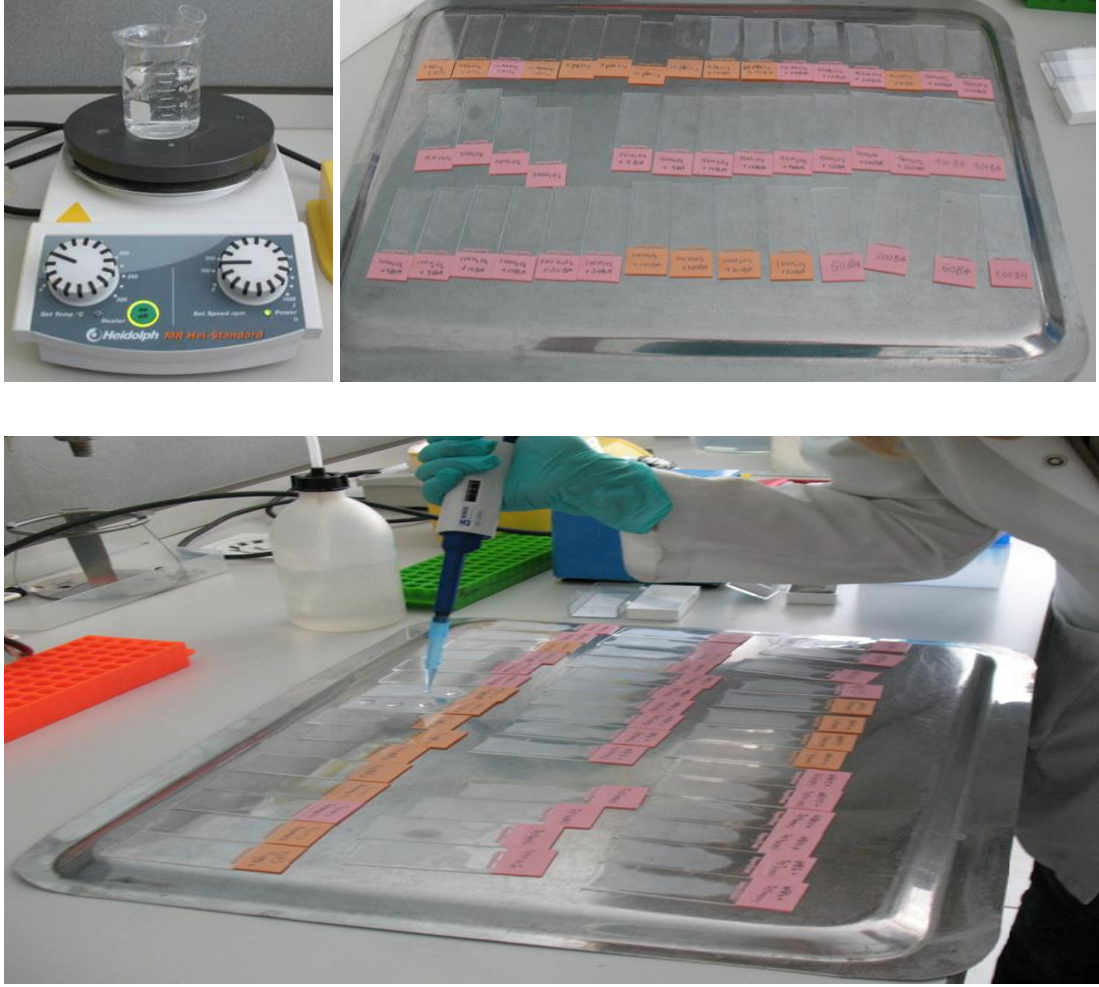
- ✓ Hücreler CO₂ inkübatöründe tutulmaya devam edildi.
- ✓ 2. günün akşamında hücrelerin besi yerleri aspire edildi.
- ✓ Hücreler 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM borik asite maruz bırakıldı (5ml'lik çözeltiler halinde).
- ✓ Borik asit ile ön-maruziyet (pre-exposure) 16 saat olacak şekilde ayarlandı.

3. Gün

- ✓ 16 saatlik borik asit ile ön-maruziyet süresi dolduktan sonra hücreler 50 µM ve 100 µM H₂O₂'e 37 °C'de 1 saat maruz bırakıldı.
- ✓ Flasklardaki çözeltiler 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1000 rpm'de 6-7 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Üst faz atıldıktan sonra 1 ml'ye PBS çözeltisi ile tamamlandı. Bu miktar her bir lamda 10000-20000 hücre olacak şekilde ayarlandı.

Hücreleri agara alma işlemi:

Yukarıda anlatıldığı şekilde soğuk PBS içerisine alınmış olan hücreler her bir lamda 10000-20000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak, 50 µl hücre süspansiyonu ile 37 °C'de eritilmiş 100 µl % 0,5'lik LMPA karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı. Lamaların üzerine lamel kapatıldıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı.



Şekil 2.3. Komet testi sırasında V79 hücrelerinin agara alınması işlemi.

Lizing:

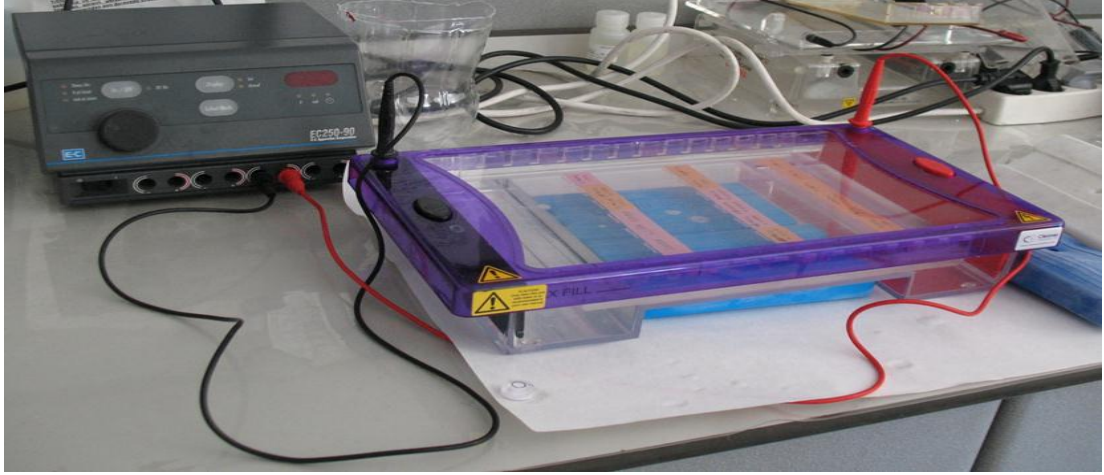
Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizing çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.



Şekil 2.4. Şalelerin lizing işlemi için hazırlanması.

Alkali uygulaması ve elektroforez:

Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile uygun miktarda dolduruldu. Lizing çözeltisinden çıkarılan lamalar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankına yerleştirildi. Lamlar, 20 dakika akım uygulamadan çözeltide bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akımda 20 dakika elektroforez uygulandı.



Şekil 2.5. Elektroforez işlemi.

Nötralizasyon ve hücrelerin fikse edilmesi:

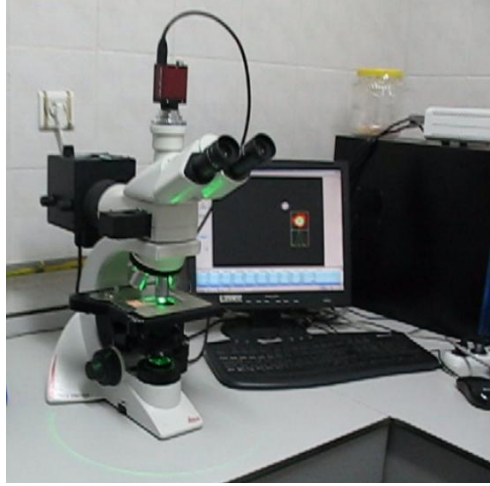
Elektroforez aşaması bittikten sonra tanktan çıkarılan lamalar nötralize lizing çözeltisi ile yıkandı. Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla şaleler içinde 3 farklı konsantrasyonda (önce %50'lik, sonra %75'lik, en son absöü alkolde 5'er dakika) alkole daldırıldı. Şaleler okuma yapılmıncaya kadar karanlık bir ortamda saklandı.



Şekil 2.6. Nötralizasyon ve hücrelerin lamlara fikse edilmesi

Boyama ve mikroskopta değerlendirme:

Değerlendirmesi yapılacak lamalar üzerine 60 μ l (20 μ g/ml) etidyum bromür zltisi ilave edildi. En az 10 dakika beklendikten sonra floresan mikroskopta okuma yapıldı. Her lamda 100 hücre okundu.



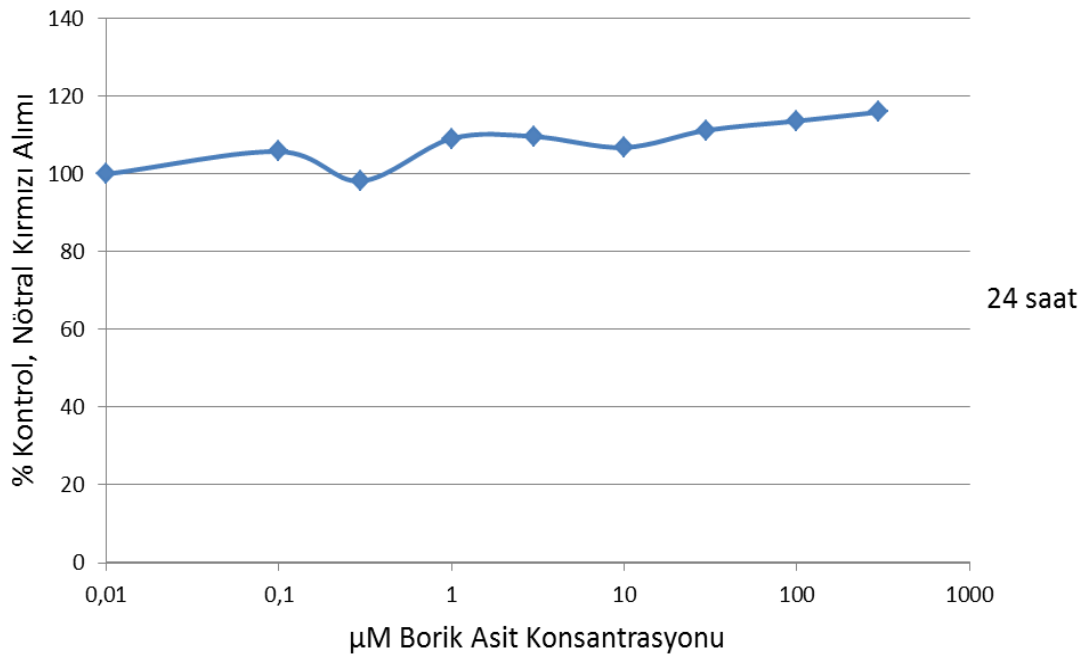
Şekil 2.7. Mikroskop değerlendirmesi.

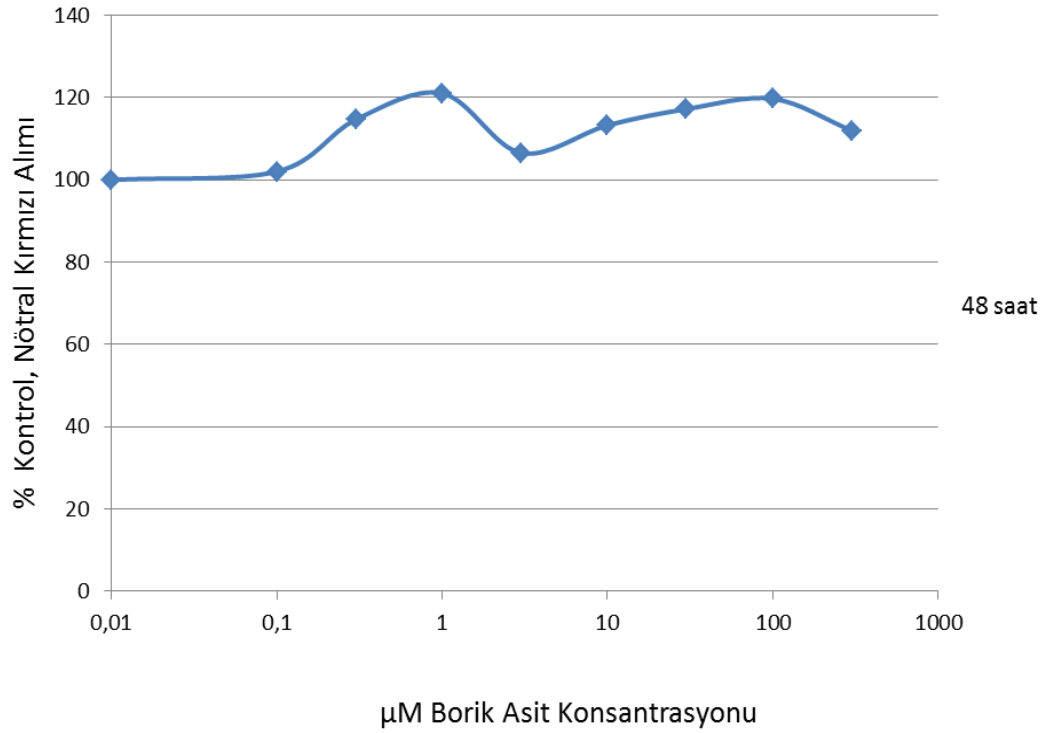
Elde edilen sonuçlarla ortalama kuyruk yoğunluğu ve ortalama kuyruk momenti kontrol grubu ile kıyaslandı.

3. BULGULAR

3.1. Nötral Kırmızı Alımı Yöntemiyle Elde Edilen Sonuçlar

Öncelikle borik asitin 300 μM 'lık stok çözeltisi hazırlandı. Daha sonra bu çözeltiden 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM olacak şekilde seyreltilerek stok çözelti de dahil toplam 8 konsantrasyonda çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerin sitotoksiteleri Bölüm 1.3'te anlatıldığı şekilde nötral kırmızı alımı yöntemiyle analiz edildi. Borik asitle 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı maruziyet süresinde testler uygulandı.





Şekil 3.1. 24 ve 48 saatlik maruziyet sonucu μM cinsinden borik asit konsantrasyonlarına karşı nötral kırmızı alımı % kontrol grafiği.

Test edilen konsantrasyonların hiçbirinde (0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM) borik asitin sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Nötral kırmızı alımı sitotoksisite testiden elde edilen sonuçlara bakılarak genotoksisite çalışmasına geçilmiştir.

3.2. Komet Testi Yöntemiyle ile Elde Edilen Sonuçlar

Borik asitin test edilen 300 μM konsantrasyonuna kadar sitotoksik etkisinin olmadığı belirlendikten sonra genotoksik etkiyi tespit etmek amacıyla komet testi uygulanmıştır. Genotoksisite testi 300 μM borik asit konsantrasyonunun altındaki konsantrasyonlar için yapılmıştır.

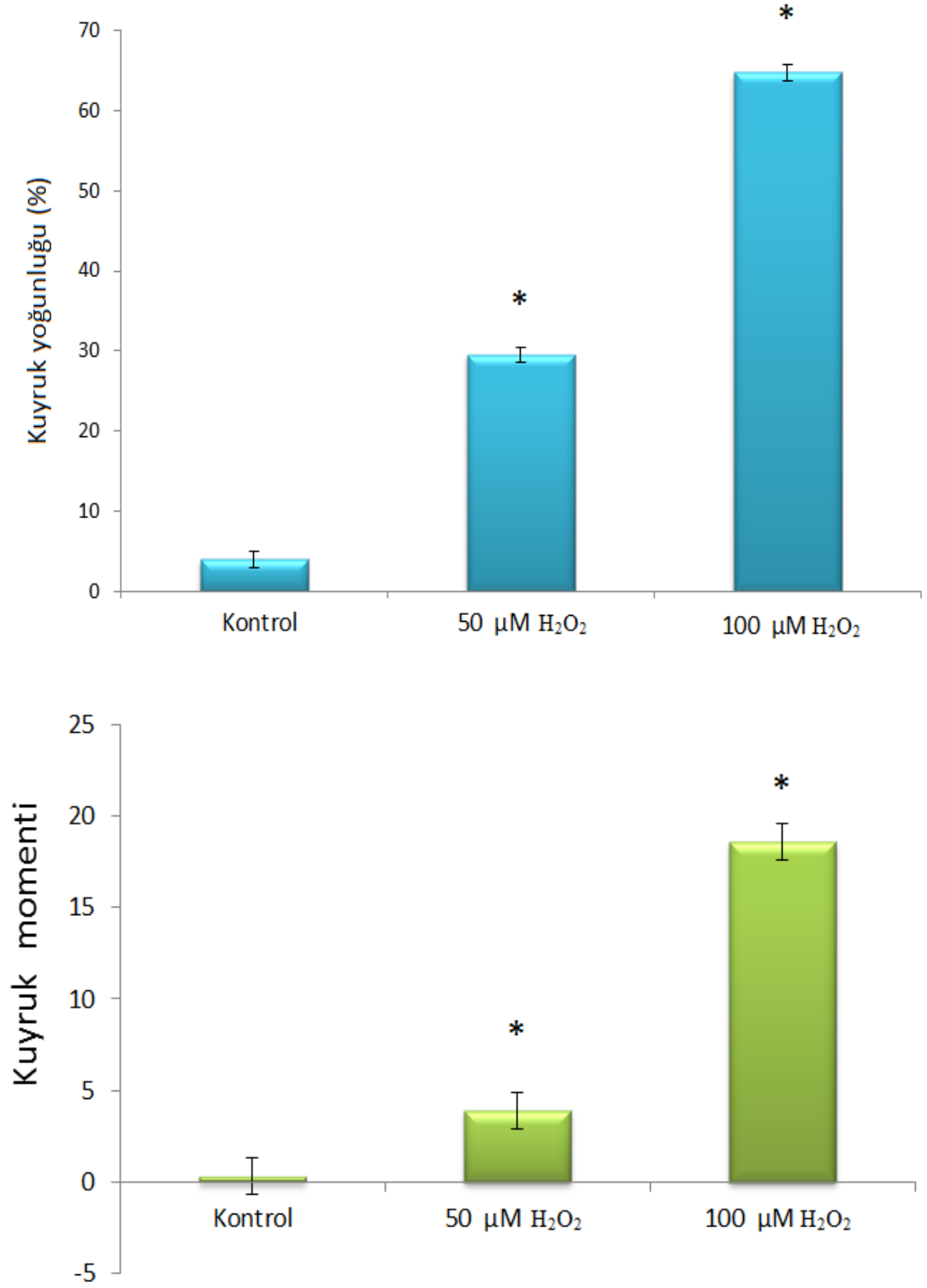
3.2.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H₂O₂ ile Elde Edilen Sonuçlar

V79 hücrelerine pozitif kontrol olarak 50 µM ve 100 µM H₂O₂ uygulanarak alkali komet testi ile analiz edilmiştir. Elde edilen verilere göre H₂O₂ uygulanması sonucunda DNA hasarının kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

Çizelge 3.1. V79 hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 µM ve 100 µM H₂O₂ ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.

H ₂ O ₂	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%) (Ort ± SS)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim) (Ort ± SS)
Kontrol	3,9505 ± 5,5302	0,3038 ± 0,4673
50 µM	29,5154 ± 23,3095*	3,8857 ± 3,7894*
100 µM	64,7769 ± 20,1186*	18,5744 ± 8,7450*

*p<0.05, one-way ANOVA,
Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



Şekil 3.2. V79 hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan H₂O₂ ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.

*Kontrolle karşılaştırıldığında yüksek DNA hasarı (p<0.05, one-way ANOVA).

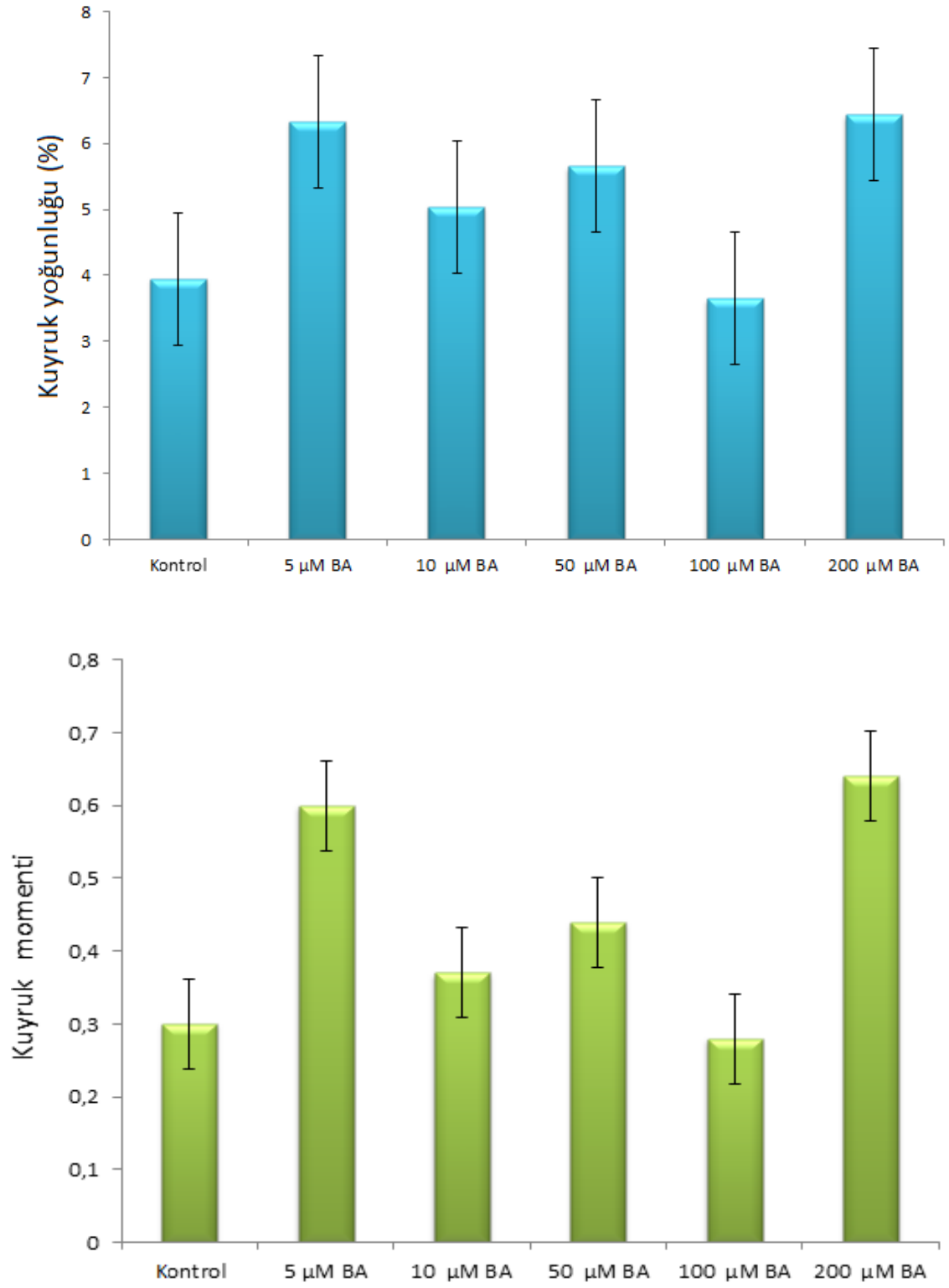
3.2.2. Borik Asit ile Elde Edilen Sonuçlar

V79 hücrelerine 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonlarında borik asit ilave edilmiştir. Alkali komet testinden elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlarda borik asit ilavesinin, hücrelerde oluşan DNA hasarını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedeği gözlemlenmiştir ($p>0.05$, one-way ANOVA).

Çizelge 3.2. V79 hücrelerine uygulanan 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 200 μ M konsantrasyonlarda borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.

Borik Asit	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%) (Ort $\pm$ SS)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim) (Ort $\pm$ SS)
Kontrol	3,9505 $\pm$ 5,5302	0,3038 $\pm$ 0,4673
5 μ M BA	6,3326 $\pm$ 8,7732	0,5951 $\pm$ 0,8799
10 μ M BA	5,0393 $\pm$ 7,2261	0,3727 $\pm$ 0,4922
50 μ M BA	5,6595 $\pm$ 8,3439	0,4398 $\pm$ 0,6657
100 μ M BA	3,6495 $\pm$ 5,9799	0,2811 $\pm$ 0,4922
200 μ M BA	6,4411 $\pm$ 9,7187	0,6390 $\pm$ 1,2596

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



Şekil 3.3. V79 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.

V79 hücrelerine 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında borik asit ilave edildikten 16 saat sonra 50 μM H_2O_2 maruziyeti uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre öncelikle, 50 μM H_2O_2 ilavesiyle oluşan DNA hasarının kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. V79 hücrelerine 5 farklı konsantrasyonda borik asit ile ön-maruziyet uygulanmasının ardından 50 μM H_2O_2 ilavesi sonucunda DNA hasarının azaldığı görülmüştür. Bu azalma pozitif kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

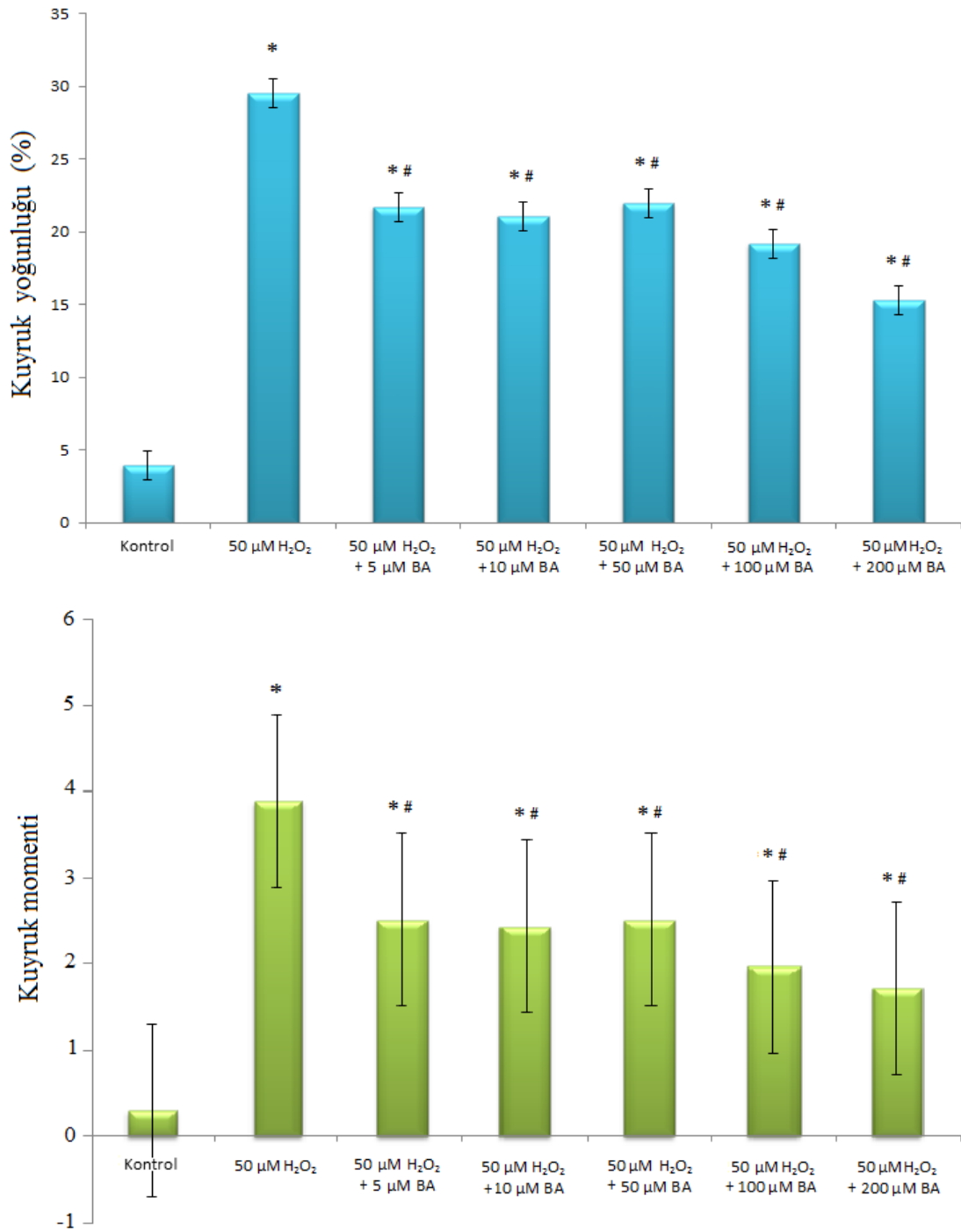
Çizelge 3.3. V79 hücre kültürlerine 16 saatlik ön-maruziyet ile 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM borik asit uygulanması ve 50 μM H_2O_2 maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.

H_2O_2 + Borik Asit	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%) (Ort $\pm$ SS)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim) (Ort $\pm$ SS)
Kontrol	3,9505 $\pm$ 5,5302	0,3038 $\pm$ 0,4673
50 μM H_2O_2	29,5153 $\pm$ 23,3095*	3,8857 $\pm$ 3,7894*
50 μM H_2O_2 + 5 μM BA	21,6932 $\pm$ 17,7229* [#]	2,5072 $\pm$ 2,1173* [#]
50 μM H_2O_2 + 10 μM BA	21,0849 $\pm$ 16,8299* [#]	2,4269 $\pm$ 2,4876* [#]
50 μM H_2O_2 + 50 μM BA	21,9928 $\pm$ 17,2346* [#]	2,5088 $\pm$ 2,1953* [#]
50 μM H_2O_2 + 100 μM BA	19,2057 $\pm$ 13,7187* [#]	1,9657 $\pm$ 1,5269* [#]
50 μM H_2O_2 + 200 μM BA	15,3321 $\pm$ 12,8625* [#]	1,7229 $\pm$ 1,5016* [#]

*[#] $p < 0.05$, one-way ANOVA,

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity

Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



Şekil 3.4. V79 hücrelerine 16 saatlik ön-maruziyet ile borik asit uygulanması ve 50 μM H_2O_2 maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.

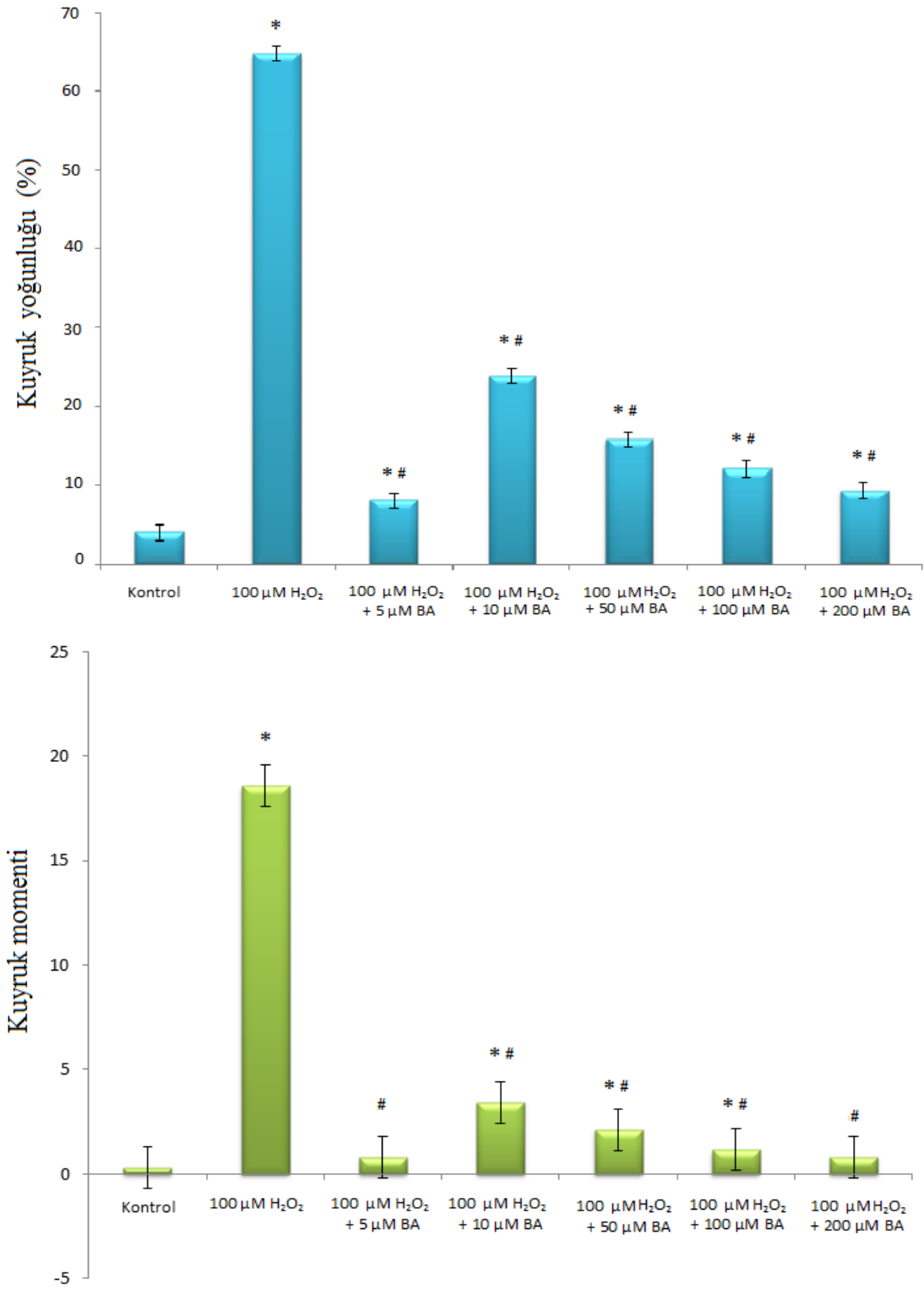
*Kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı artmalar gözlenmiştir. #Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

V79 hücrelerine 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM konsantrasyonlarında borik asit ilave edildikten 16 saat sonra 100 μM H_2O_2 maruziyeti uygulanmıştır. Öncelikle 100 μM H_2O_2 ilavesiyle oluşan DNA hasarının kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlenmiştir. V79 hücrelerine bu 5 farklı konsantrasyonda borik asitin ön-maruziyetinin ardından 100 μM H_2O_2 uygulanması sonucunda ise DNA hasarının azaldığı ve bu azalmanın pozitif kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$, one-way ANOVA).

Çizelge 3.4. V79 hücre kültürlerine 16 saatlik ön-maruziyet ile 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM borik asit uygulanması ve 100 μM H_2O_2 maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.

H_2O_2 + Borik Asit	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%)	Ortalama Kuyruk Momenti (birim)
	(Ort $\pm$ SS)	(Ort $\pm$ SS)
Kontrol	3,9505 $\pm$ 5,5302	0,3038 $\pm$ 0,4673
100 μM H_2O_2	64,7769 $\pm$ 20,1186*	18,5744 $\pm$ 8,7450*
100 μM H_2O_2 + 5 μM BA	7,9657 $\pm$ 11,0133* [#]	0,7743 $\pm$ 1,1295 [#]
100 μM H_2O_2 + 10 μM BA	23,7189 $\pm$ 25,2276* [#]	3,4228 $\pm$ 4,4028* [#]
100 μM H_2O_2 + 50 μM BA	15,7623 $\pm$ 13,6708* [#]	2,1221 $\pm$ 2,0631* [#]
100 μM H_2O_2 + 100 μM BA	12,0371 $\pm$ 12,4076* [#]	1,1581 $\pm$ 1,2749* [#]
100 μM H_2O_2 + 200 μM BA	9,2640 $\pm$ 12,7384* [#]	0,8202 $\pm$ 1,1530 [#]

*[#] $p < 0.05$, one-way ANOVA,
Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity
Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



Şekil 3.5. V79 hücrelerine 16 saatlik ön-maruziyet ile borik asit uygulanması ve 100 µM H₂O₂ maruziyeti ile elde edilen alkali komet test sonuçları.

*Kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı artmalar gözlenmiştir. # Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

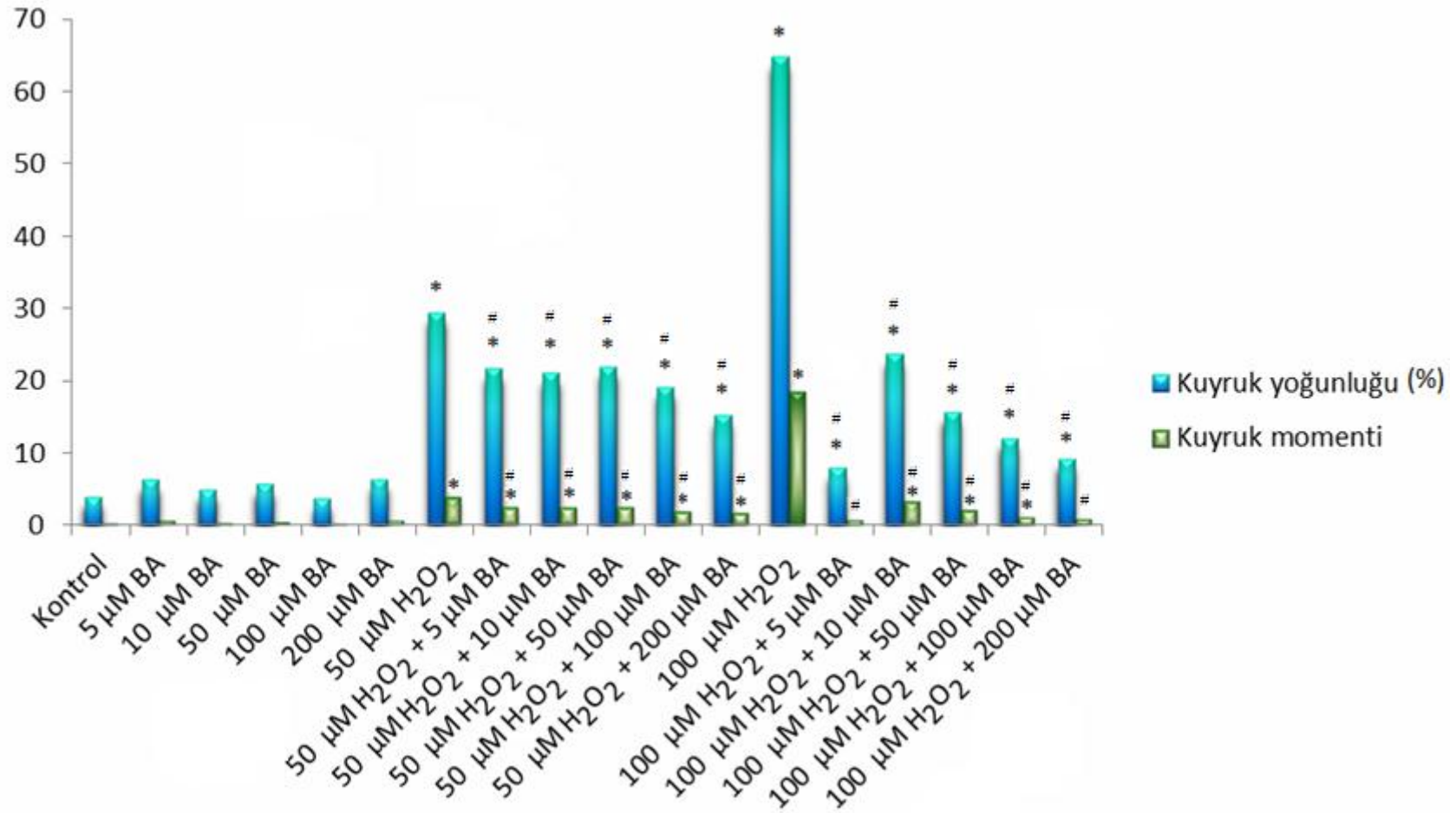
Çizelge 3.5. V79 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan H₂O₂ ve borik asit ile elde edilen alkali komet testi sonuçları.

	Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (Ort ± SS)	Ortalama Kuyruk Moment (Ort±SS)
Kontrol	3,9505 ± 5,5302	0,3038 ± 0,4672
5 µM BA	6,3326 ± 8,7732	0,5951 ± 0,8799
10 µM BA	5,0393 ± 7,2261	0,3727 ± 0,4922
50 µM BA	5,6595 ± 8,3439	0,4398 ± 0,6657
100 µM BA	3,6495 ± 5,9799	0,2811 ± 0,4922
200 µM BA	6,4411 ± 9,7187	0,6390 ± 1,2596
50 µM H₂O₂	29,5153 ± 23,3095*	3,8857 ± 3,7894*
100 µM H₂O₂	64,7769 ± 20,1186*	18,5744 ± 8,7450*
50 µM H₂O₂ + 5 µM BA	21,6932 ± 17,7229* [#]	2,5072 ± 2,1173* [#]
50 µM H₂O₂ + 10 µM BA	21,0849 ± 16,8299* [#]	2,4269 ± 2,4876* [#]
50 µM H₂O₂ + 50 µM BA	21,9928 ± 17,2346* [#]	2,5088 ± 2,1953* [#]
50 µM H₂O₂ + 100 µM BA	19,2057 ± 13,7187* [#]	1,9657 ± 1,5269* [#]
50 µM H₂O₂ + 200 µM BA	15,3321 ± 12,8625* [#]	1,7229 ± 1,5016* [#]
100 µM H₂O₂ + 5 µM BA	7,9657 ± 11,0133* [#]	0,7743 ± 1,1295 [#]
100 µM H₂O₂ + 10 µM BA	23,7189 ± 25,2276* [#]	3,4228 ± 4,4028* [#]
100 µM H₂O₂ + 50 µM BA	15,7623 ± 13,6708* [#]	2,1221 ± 2,0631* [#]
100 µM H₂O₂ + 100 µM BA	12,0371 ± 12,4076* [#]	1,1581 ± 1,2749* [#]
100 µM H₂O₂ + 200 µM BA	9,2640 ± 12,7384* [#]	0,8202 ± 1,1530 [#]

*[#] p<0.05, one-way ANOVA,

Ortalama Kuyruk Yoğunluğu (%): Tail % Intensity

Ortalama Kuyruk Momenti: Tail Moment



Şekil 3.6. V79 hücrelerine H₂O₂ ve borik asitin farklı konsantrasyonlarda ilavesi sonucunda alkali komet test sonuçları.

*Kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı artmalar gözlenmiştir.

Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında DNA hasarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

4. TARTIŞMA

Kimyasal sembolü B olarak tanımlanan bor elementi periyodik sistemde 3. grubun başında bulunur. Atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81'dir. Oksijen ve diğer elementlerle oluşturduğu bileşiklere borat denir. Tabiatta 230 çeşit bor minerali vardır. Genellikle sodyum (Na), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) gibi metallerle bileşik halinde bulunurlar. Kolemanit, üleksit, tinkal gibi kalsiyum veya sodyum boratlar en önemlileridir. Ancak bu bor bileşikleri doğada su ile çözünerek borik asit formuna dönüşür. Aynı zamanda bor bileşiklerinin oral alımında da fizyolojik sıvılarda (kan, idrar vb.) gözlenen formu da borik asittir. Bu nedenle borik asitin antioksidan özelliğinin araştırılması, aynı zamanda tüm boratların antioksidan özelliklerinin araştırılması anlamına gelecektir.

Borik asit genellikle endüstri, sağlık ve tarım alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Oral yolla uygulamadan sonra tamamı hızla absorbe olur ve gastrointestinal yoldan kan dolaşımına geçer (Usuda ve ark., 1998). Çeşitli bor bileşiklerinin hipolipidemik, antienflamatuvar ve anti-kanser özelliklerinin olduğu bulunmuştur (Barranco ve ark., 2009). Borun özellikle; antioksidan aktivitesi, D vitamini (Hunt, 1996), kalsiyum, potasyum ve kemik metabolizması (Meacham ve ark., 1994), aldehit dehidrogenaz, ksantin oksidaz, sitokrom-b5 redüktaz (Hunt, 1996; Devirian ve Volpe, 2003), insülin, östrojen, testosteron, T3, T4 (Armstrong ve ark., 2001), trigliserit, glukoz (Eren ve ark., 2006), beyin fonksiyonları (Penland, 1994), immün sistem (Hunt ve Idso, 1999), üreme sistemi ve prostat kanseri (Gallardo-Williams ve ark., 2003), vajinal kandidiyazis (Iavazzo ve ark., 2011) üzerine etkileri bugüne kadar yapılmış olan pek çok araştırmada gösterilmiştir. Ayrıca bor bileşiklerinin bakteri ve kültürü yapılmış memeli hücrelerinde genotoksik etki potansiyelinin olmadığı gösterilmiştir (Moore, 1997). Bunlara ek olarak meyve ve sebzelerin tüketilmesiyle alınan borun birçok faydalı etkileri olduğu da bildirilmiştir (Devirian ve Volpe, 2003). Borik asitin kalsiyum ve potasyum metabolizmasında; D vitamini ve reaktif oksijen türleri (Türkez ve ark., 2007; 2012;

İnce ve ark., 2011) üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlar iki temel hipoteze dayandırılmaktadır. Bu hipotezlerden ilki bor bileşiklerinin hücre membran fonksiyonlarında rol oynayarak hormonlar üzerine etkisini göstermesi, ikincisi ise birçok enzimatik sistemde metabolik düzenleyici olarak rol oynaması olabilir. Ancak bunların yanında bor bileşiklerinin antioksidan savunma mekanizması üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Pawa ve Ali, 2006). İn-vitro ve in-vivo olarak antioksidan etkisinin olup olmadığı halen araştırılmaktadır.

Serbest radikaller; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, çok etkin, kararsız, kısa ömürlü, molekül ağırlığı düşük moleküller olarak tanımlanır (Abdollahi ve ark., 2003; 2004). Serbest radikal en yakınındaki stabil moleküle atak yaparak onun elektronunu alır ve kendisine atak yapılan molekül elektron kaybederek serbest radikal haline gelir. Böylece zincir reaksiyon başlar. Bu süreç başladıktan sonra yaşayan hücrenin hasar görmesi ile sonuçlanır (Cheeseman ve Slater, 1993). Bu eşleşmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak; protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi yakınındaki birçok molekülle etkileşime girmesine neden olur. Bu durum yaşlanmayı teşvik ederek kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları ve bağışıklık sisteminde zayıflık gibi birçok hastalığa sebep olmaktadır (Diplock, 1998). Bor, organizmadaki depo glutatyon ve türevlerinin veya diğer reaktif oksijen türlerini nötralleyici ajanların miktarında artışa sebep olarak oksidatif hasar oluşumunu baskılar (Hunt ve Idso, 1999). Birçok hastalığın tedavisinde rol oynayabilecek faydalı etkilerinin bilinmesi ancak antioksidan etkisinin tam olarak aydınlatılamamış olması, borun antioksidan özelliklerinin çalışılmasını çok önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir.

Alkali komet testi (pH:13); DSB (DNA çift zincir kırıkları), SSB (DNA tek zincir kırıkları) ve ALS (alkali-kararsız bölgeleri) tespit edebilen bir yöntemdir. DNA üzerinde oluşabilen tek zincir kırıkları, genellikle DNA'daki oksidatif hasarın bir göstergesi olarak düşünülmektedir ve hücrede oluşan oksidatif stresin bir

biyogöstergesi olarak kullanılmaktadır. Bu tezde de alkali komet testi aynı amaçla kullanılmıştır.

Uyguladığımız alkali komet testinde pozitif kontrol olarak H_2O_2 kullanılmıştır. Oksidatif hasara neden olduğu bilinen H_2O_2 ile hücrelerde oksidatif hasar oluşturulmuş ve bu hasarın önlenmesinde borik asitin etkili olup olmadığı araştırılmıştır. H_2O_2 'i pozitif kontrol olarak kullanmış olduğumuz deneylerde (çizelge 3.1), 50 μM ve 100 μM H_2O_2 konsantrasyonlarının hücrelerdeki oksidatif DNA hasarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttırdığı ($p<0.05$) gözlenmiştir.

Aynı deney; V79 hücrelerinin 16 saat süre ile 5 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM ve 200 μM borik asit içeren medyumlarda inkübe edilmesinden sonra tekrar uygulanmıştır. Bu deneyde, 50 μM ve 100 μM H_2O_2 'in V79 hücrelerinde oluşturduğu oksidatif DNA hasarının borik asidin artan konsantrasyonu ile azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) görülmüştür.

Oral yolla alınan bor bileşiklerinin (100 mg/kg) kandaki glutatyon konsantrasyonunu ve plazma C vitamini düzeyini artırdığı bilinmektedir (İnce ve ark., 2010). Diğer taraftan borik asidin belli konsantrasyonlarının ağır metal (arsenik trioksit, koloidal bizmut subsitrat, kadmiyum, civa ve kurşun) maruziyetine bağlı olarak lenfositlerde oluşabilecek genotoksik etkileri azaltabildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Türkez ve ark., 2012). Bu tez kapsamında yapmış olduğumuz çalışmalar daha önceden yukarıda adı geçen konularda yapılmış olan çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Yapmış olduğumuz bu çalışmanın bundan önceki çalışmalardan en önemli farkı; çalışmamızda insanların günlük maruz kalabileceği dozda borun oluşturduğu kan konsantrasyonlarının test edilmiş olmasıdır. Borik asidin antioksidan etkilerini test etmiş olduğumuz konsantrasyonların öneminin daha anlaşılabilir bir şekilde izah edilebilmesi için bu konunun biraz daha derinlemesine incelenmesi faydalı olacaktır.

Bilindiği gibi borik asit, Avrupa Birliği'nin CLP (Classification, Labeling and Packaging) yönetmeliği çerçevesinde üreme üzerinde toksik (reprotoxic) olan

kimyasal maddeler sınıfında “Kategori 1B H360FD” altında sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya esas olan sıçanlardaki gelişim toksisitesi (developmental toxicity) testinde bor için tespit edilmiş olan NOAEL (fetüste kilo kaybı) değeri 9.6 mg/kg/gün’dür. Yapılan çalışmalar sıçanlarda günde 9.6 mg/kg bor maruziyetinin oluşturduğu kan bor konsantrasyonunun 1270 ng/g kan (ppb) olduğunu göstermektedir (Price ve ark., 1997). Ayrıca bugüne kadar yapılmış olan epidemiyolojik çalışma sonuçlarından mesleki ortamlarda bile oluşabilecek maksimum kan bor konsantrasyonları bilinmektedir. Aşağıda bu çalışmalarda tespit edilmiş olan kan bor konsantrasyonları çizelgeler halinde gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bugüne kadar yapılmış olan 2 önemli epidemiyolojik çalışmada tespit edilen günlük bora maruz kalma seviyeleri ve buna karşılık gelen kan bor konsantrasyonları.

Maruz kalma grupları	n	Bora günlük ortalama maruz kalma seviyeleri (mg B/gün)	Ortalama kan bor konsantrasyonları (ng B/g kan, ppb)	Epidemiyolojik çalışmanın kaynağı
Kontrol grubu	49	4.68 ± 1.63	<48.5	Duydu, 2011
Düşük maruz kalma grubu	72	7.39 ± 3.97	72.94 ± 15.43	
Orta maruz kalma grubu	44	11.02 ± 4.61	121.68 ± 15.62	
Yüksek maruz kalma grubu	39	14.45 ± 6.57	223.89 ± 69.49	
Kontrol grubu	9	1.2 ± 0.8	22.1 ± 6.7	Xing, 2008 (2003 sonuçları)
Maruz kalma grubu	60	37.0 ± 77.5	204.8 ± 365.8	
Kontrol grubu	15	2.3 ± 3.0	48.0 ± 23.9	Xing, 2008 (2004 sonuçları)
Uzak kontrol grubu	15	4.3 ± 3.1	96.5 ± 90.8	
Maruz kalma grubu	15	41.2 ± 37.4	499.2 ± 790.6	

Görüldüğü gibi kan bor konsantrasyonları bu iki çalışmada 22.1– 499.2 ng/g kan (ppb) konsantrasyonları arasında değişmektedir. Bu çalışma dahilinde test etmiş olduğumuz kan bor konsantrasyonları ise aşağıdaki çizelgede görülmektedir. Test etmiş olduğumuz konsantrasyonların “ppb” olarak karşılıkları da yine Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. V79 hücrelerinde test edilen borik asit konsantrasyonlarının ppb ve bor eşdeğeri karşılıkları.

	Test edilen borik asit (H_3BO_3) konsantrasyonları				
	5 μM	10 μM	50 μM	100 μM	200 μM
H_3BO_3					
H_3BO_3 (ppb karşılığı)	309 ng/ml	618 ng/ml	3090 ng/ml	6180 ng/ml	12360 ng/ml
Bor eşdeğeri, (ppb karşılığı)	54 ng/ml	108 ng/ml	541 ng/ml	1082 ng/ml	2163 ng/ml

Borik asit ve borun molekül ağırlıkları sırasıyla 61.8 g/mol ve 10.8 g/mol dır. Bor eşdeğeri, borik asit miktarının 0.175 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

Yukarıdaki çizelgeden de görüldüğü gibi V79 hücrelerinde test etmiş olduğumuz bor konsantrasyonları 54 – 2163 ppb arasında değişmektedir. Bu konsantrasyonlar hem sıçanlardaki gelişim toksisitesi testlerinde fetüsteki kilo kaybını temsil eden günlük bor miktarına (NOAEL: 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. Dolayısıyla günlük bor maruziyeti neticesinde insanlarda oluşabilecek kan bor konsantrasyonlarının deneylerde test edilmesine dikkat edilmiştir. Bu sayede (bu tez dahilindeki deneyler in vitro koşullarda gerçekleştirilmiş olsa da) borik asidin insanlarda da oksidatif DNA hasarını azaltabileceği diğer bir deyişle koruyucu olabileceği yönünde yorum yapmak mümkün olabilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Avrupa Birliği'nde tüm kimyasal maddeler REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) adı verilen büyük bir kimyasal madde yönetmeliği altında insan sağlığına olan etkilerine göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama kapsamında borik asit ve sodyum boratlar üreme üzerine toksik (reprotoxic) olan kimyasal maddeler grubunda (Kategori 1B, H360FD) sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmaya esas olan sıçanlardaki gelişim toksisitesi (developmental toxicity) testinde borik asit için tespit edilmiş olan NOAEL (fetüste kilo kaybı) değeri 9.6 mg/kg/gün dür. Yapılan çalışmalar sıçanlarda günde 9.6 mg/kg borik asit maruziyetinin oluşturduğu kan bor konsantrasyonunun 1270 ng/g kan (ppb) olduğunu göstermektedir (Price ve ark., 1997).

Türkiye, bor rezervi açısından dünyanın en zengin ülkesi konumundadır ve Dünya'daki tüm bor rezervinin yaklaşık %75'ine sahip durumdadır. Bu bor rezervleri genelde Marmara bölgesinin güneyinde yoğunlaşmaktadır. Özellikle Bigadiç, Kestelek, Emet ve Kırka bor rezervleri açısından en zengin yörelerdir. Bugüne kadar bu yörelerde yapılmış olan çalışmalar içme sularındaki bor konsantrasyonlarının çok yüksek olduğunu göstermektedir. Avrupa Birliği ve Dünya Sağlık Örgütü'nün standartlarına göre içme suyunda bulunabilecek maksimum bor konsantrasyonu sırasıyla 1 mg/L ve 2.4 mg/L'dir. Ancak yukarıda adı geçen yerleşim yerleri ve civarında yapılan çalışmalar içme sularındaki bor konsantrasyonunun 29 mg/L'ye kadar ulaşabildiğini göstermiştir (Şaylı ve ark., 1998). Bu bulgular (adı geçen yörelerde yaşayan ve yüksek düzeyde bora maruz kalan insanlarda) borik asidin erkelerde üreme ve kadınlarda fetüs gelişimi üzerine olumsuz etki oluşturup oluşturmayacağı yönündeki soruları hep gündemde tutmaktadır. Günlük olarak yüksek düzeyde bora maruz bırakılan dişi sıçanlarda (9.6 mg bor/kg/gün) fetüs ağırlığında düşme görülmüş olması da bu yöndeki kaygıları arttırmaktadır. Ancak son yıllarda biri ülkemizde olmak üzere yapılmış olan iki büyük epidemiyolojik çalışma insanların hayvan testlerinde test edilen seviyelerde bora günlük olarak maruz kalamayacağını göstermiştir (Xing ve ark., 2008; Duydu ve ark., 2011; 2012).

Özellikle ülkemizde yapılmış olan işyeri çalışma ortamı gibi çok yüksek günlük bora maruz kalma seviyelerinin söz konusu olduğu yerlerde bile (Bandırma Borik Asit Fabrikası) günlük bora maruz kalma düzeylerinin hayvan deneylerinde test edilen konsantrasyonların çok altında olduğunu göstermiştir (Duydu ve ark., 2011; 2012; Başaran ve ark., 2012; Bolt ve ark., 2012). Bu çalışmalar bor rezervleri civarında yaşayan insanların, hayvan testlerinde karşılaşılan istenmeyen toksik etkilerle karşılaşma olasılığının bulunmadığını göstermiştir. Bu tez çalışmasında ise o yörelerde bora maruz kalan insanların maruz kaldıkları günlük bor konsantrasyonlarına karşılık gelen kan bor konsantrasyonlarının (Çizelge 4.2) antioksidan etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Diğer bir tabirle (deneysel olarak tasarlanmış aşırı yüksek günlük maruz kalma koşullarında) erkek sıçanlarda üreme ve dişi sıçanlarda fetüs gelişimi üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilme potansiyeline sahip olan borun, gerçekçi maruz kalma koşullarında insanlar için faydalı etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasının sonuçları, günlük olarak maruz kalınan (gerçekçi) bor konsantrasyonlarının hücrelerde oluşabilecek oksidatif DNA hasarını azaltabileceği ve koruyucu olabileceğini göstermiştir. Bu nedenle günlük olarak maruz kalmakta olduğumuz bor konsantrasyonlarının zararlı değil, aksine faydalı olabileceği anlaşılmaktadır.

ÖZET

Borik Asitin Antioksidan Aktivitesinin Hücre Kültüründe Araştırılması

Bor bitkiler için esansiyel olduğu kanıtlanan, insanlar için de esansiyel olduğu düşünülen; sağlık, bilim ve tarım için önemli bir mineraldir. Ancak bu görüşün kanıtlanabilmesi için daha fazla epidemiyolojik çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bu yararlı etkilere rağmen, borik asit ve sodyum boratlar CLP (Sınıflandırma, Etiketleme ve Paketleme) yönetmeliğinde üreme üzerine toksik etkili olarak sınıflandırılmışlardır. Bu sınıflandırma hayvanlardaki deneysel çalışma sonuçlarını temel almaktadır. Sıçanlarda gözlenen kritik toksik etki fetüste kilo kaybı şeklindedir ve NOAEL değeri 9.6 mg/kg/gündür. Bu tezin amacı V79 hücrelerinde oksidatif DNA hasarına karşı borik asitin koruyucu etkisini araştırmaktır. Bu tez çalışmasında test edilmiş olan borik asit konsantrasyonları epidemiyolojik çalışmalarda tespit edilen konsantrasyonlar temel alınarak seçilmiştir. Bu nedenle bu tezde test edilen borik asit konsantrasyonları insanların günlük yaşamda maruz kalabilecekleri seviyeleri yansıtmaktadır.

Sonuçta, borik asitle ön-maruziyet uygulanmış V79 hücrelerinde H₂O₂'nin oluşturduğu oksidatif DNA hasarı anlamlı bir şekilde azalmıştır. Dolayısıyla borik asitin V79 hücrelerinde oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi 5, 10, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarında kanıtlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan aktivite, bor, borik asit, komet testi, oksidatif DNA hasarı.

SUMMARY

Investigation of Antioxidant Activities of Boric Acid in Cell Culture

Boron is an important mineral for health, science and agriculture which is proved being essential for plant and thought for human as well. Nevertheless, more epidemiological research needs to be done to demonstrate this prediction.

In spite of its beneficial effects, boric acid and sodium borates are classified as toxic to reproduction under the CLP (Classification, Labeling and Packaging) regulation. This classification is mainly based on the results of experimental studies in animals. The critical toxic effect observed in rats was decreased fetal body weight with the NOAEL of 9.6 mg/kg/day. The aim of this thesis was to investigate the protective effect of boric acid against oxidative DNA damage in V79 cells. The concentrations of boric acid tested for its protective effects were selected by taken into consideration of the available epidemiological study results. Therefore the concentrations of boric acid tested in this thesis represent the exposure levels of humans in daily life.

Consequently, pre-incubation of V79 cells with boric acid has significantly reduced the H₂O₂ induced oxidative DNA damage in V79 cells. Thereby, the protective effect of boric acid against oxidative DNA damage in V79 cells at 5, 10, 50, 100 and 200 µM concentrations has been proved in this thesis.

Key words: Antioxidant activity, boric acid, boron, comet assay, oxidative DNA damage.

KAYNAKLAR

- ABDOLLAHI, M., BAHREINI-MOGHADAM, A., EMMAMI, B., FOOLADIAN, F., ZAFARIET, K. (2003). Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **135**: 331-336.
- ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIE, A. (2004). Pesticides and oxidative stress : a review. *Medical Science Monitor*. **10**: 141-147.
- ACWORTH, I.N., BAILEY, B. (1997). Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. *Massachusetts: ESA Inc.* p:1-1 to 4-4.
- AKPOYRAZ, M., DURAK, I. (1995). Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası*. **48**: 253-262.
- ANDREOLI, C., GIGANTE, D., NUZIATA, A. (2003). A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in Vitro*. **17**: 587-594.
- ARMSTRONG, T.A., SPEARS, J.W., LLOYD, K.E. (2001). Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by longterm boron supplementation in gilts. *Journal of Animal Science*. **79**:1549–1556.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1992). Toxicological profile for boron and compounds; TP-91/05. Available from ATSDR, Atlanta, GA.
- BARILE, F.A. (1994). Introduction to *in vitro* cytotoxicology mechanisms and methods. CRC Pres., Boca Raton, Florida, USA, 53-55.
- BARRANCO, W.T., ECKHERT, C.D. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters-Journal-Elsevier*. **216(1)**: 21-9.
- BARRANCO, W.T., ECKHERT, C.D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*. **94(6)**: 884-90.
- BARRANCO, W.T., HUDAK, P.F., ECKHERT, C.D. (2007). Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes & Control - Springer*. **18(1)**: 71-7.
- BARRANCO, W.T., KIM, D.H., STELLA, S.L., Jr ECKHERT C.D. (2009). Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell Biol Toxicol*. **25**: 309-20.
- BAŞARAN, A.A. (2002). Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Eskişehir. p: 53-60.

- BAŞARAN, N., DUYDU, Y., BOLT, H.M. (2012). Reproductive toxicity in boron exposed workers in Bandırma, Turkey. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **26**: 165-167.
- BENHUSEIN, G.M., MUTCH, E., ABURAWI, S., WILLIAMS, F.M. (2010). Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay. *Libyan Journal of Medicine*. **5**: 4637.
- BOLT, H.M., BAŞARAN, N., DUYDU, Y. (2012). Human environmental and occupational exposures to boric acid: reconciliation with experimental reproductive toxicity data. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, **75**:508-514.
- BULGER, E. M., HELTON, W. S. (1998). Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology Clinics of North America*. **27(2)**: 403-419.
- BULYCHEV, A., TROUET, A., TULKENS, P. (1978). Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Cell Res*. **115**: 343-355.
- BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R. (1999). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.
- CAMPBELL, A., CHAPMAN, M. (2000). Borax. *Handbook of Poisoning in Dogs and Cats; Blackwell Science: Oxford, London*. pp 86-89.
- CHEESEMAN, K.H., SLATER, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*. **49(3)**: 481-93.
- COLLINS, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. **26**: 249-261.
- CORTES-GUTIERREZ, E.I., HERNANDEZ-GARZA, F, GARCIA-PEREZ, J.O., DAVILA-RODRIGUEZ, M.I., AGUADO-BARRERA, M.E., CERDA-FLORES, R.M. (2012). Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia based on alkaline and neutral comet assay techniques. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 385245, 7 pages.
- CRESPI, C.L., LANGENBACH, R., PENMAN, B.W. (1993). Human cell lines, derived from AHH-1 TK +/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology*. **82(1-3)**: 89-104.
- ÇİÇEK, C., BİLGİÇ, A. (2006). Klinik Viroloji Laboratuvarlarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model. *İnfeksiyon Dergisi*. **20(3)**: 231-241.
- ÇOLAK, S., GEYİKOĞLU, F., KELEŞ, O.N., TÜRKEZ, H., TOPAL, A., ÜNAL, B. (2011). The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride- induced neurotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*. **8**: 700-10.
- DAS, R.C. (2001). Proteins and antibodies make advantages as therapeutic products. **20(5)8**: 10-14.

- DE BAER, J., HOEIJMAKERS, J.H.J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*. **21(3)**: 453-460.
- DEMİRER, S., KARA, M.I., ERCİYAS, K., ÖZDEMİR, H., ÖZER, H., AY, S (2012). Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol*. 57:60-65.
- DEVIRIAN, T.A., VOLPE, S.L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **43**: 219-31.
- DIPLOCK, A. (1998). Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*. p:59, Belgium.
- DUYDU, Y., BAŞARAN, N., ÜSTÜNDAĞ, A., AYDIN, S., ÜNDEĞER, Ü., ATAMAN, O.Y., AYDOS, K., DÜKER, Y., ICKSTADT, K., WALTRUP, B.S., GOLKA, K., BOLT, H.M. (2011). Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Archives of Toxicology*. **85**: 589-600.
- DUYDU, Y., BAŞARAN, N., ÜSTÜNDAĞ, A., AYDIN, S., ÜNDEĞER, Ü., ATAMAN, O.Y., AYDOS, K., DÜKER, Y., ICKSTADT, K., WALTRUP, B.S., GOLKA, K., BOLT, H.M. (2012). Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Archives of Toxicology*. **86**: 27- 35.
- DUYDU, Y., BAŞARAN, N., BOLT, H.M. (2012). Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **26**: 161-164.
- EATON, D., KLAASSEN, C. (1996). Principles of Toxicology. C. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (5. Baskı). New York: McGraw-Hill.
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals). (1994). Reproductive and general toxicology of some inorganic borates and risk assessment for human beings. Technical Report No. 65. Brussels: European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals.
- EREN, M., KOCAOĞLU-GÜÇLÜ, B., UYANIK, F., KARABULUT, N. (2006). The effects of dietary boron supplementation on performance, carcass composition, and serum lipids in Japanese quail. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. **5**: 1105–1108.
- FAIL, P.A., CHAPIN, R., PRICE, C.J., HEINDEL, J.J. (1998). General, reproductive, developmental, and endocrine toxicity of boronated compounds. *Reproductive Toxicology*. **12(1)**: 1-18.
- FENT, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro*. **15**: 477-488.
- FINTER, N.B., GARLAND, A.J., TELLING, R.C. (1990). Large-scale mammalian cell culture: a perspective. *Bioprocess Technology*. **10**: 1-14.

- FLECK, O., NIELSEN, O. (2004). DNA repair. *Journal of Cell Science*. **117(4)**: 515-517.
- FOTAKIS, G.,TIMBRELL, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. **160**: 171-177.
- GAD, S.C. (2000). In vitro toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, New York.
- GALLARDO-WILLIAMS, M.T., MARONPOT, R.R., WINE, R.N., BRUNSSSEN, S.H., CHAPIN, R.E. (2003). Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*. **54(1)**: 44-9.
- GALLARDO-WILLIAMS, M.T., CHAPIN, R.E., KING, P.E., MOSER, G.J., GOLDSWORTHY, T.L., MORRISON, J.P., MARONPOT, R.R. (2004). Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic Pathology*. **32(1)**: 73-8.
- GREEN, M.H., LOWE, J.E., DELANEY, C.A., GREEN, I.C. (1996). Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods in Enzymology*. **269**: 243-66.
- GREENWALD, R.A. (1991). Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: Pathophysiological considerations and implications for treatment. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. **20**: 219-240.
- GRIFFITHS, B. (2000). Animal cell products, overview. *Encyclopedia of Cell Technology*. Vol. 1. New York: John Wiley & Sons. p: 70-76.
- GUNARATNA, C. (2000). Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery: A primer for bioanalytical chemists, Part I. *Current Separations*. **19(1)**: 17-23.
- GÜLBAHAR, Ö. (2007). Protein oksidasyonunun mekanizması, önemi ve yaşlılıkla ilişkisi. *Turkish, Journal of Geriatrics*. **10(1)**: 43-48.
- HALLIWELL, B., ARUOMA, O. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*. **281**: 9-19.
- HALLIWELL, B. (1995). Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Annals of the Rheumatic Diseases*. **54(6)**: 505-510.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. (2000). Free Radicals in Biology and Medicine, 3.ed. Oxford New York.
- HENDERSON, K., STELLA, S.L., KOBYLEWSKI, S., ECKHERT, C.D. (2009). Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One Journal*. **4(6)**: e6009.

- HU, W. (2006). Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies, New York London. p: 1-5, 41-79.
- HUNT, C.D. (1996). Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *The Journal Trace Elements in Experimental Medicine*. **9**:185–213.
- HUNT, C.D. (1998). Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biological Trace Element Research*. **66(1-3)**: 205-25.
- HUNT, C.D., IDSO, J.P. (1999). Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress. *The Journal Trace Elements in Experimental Medicine*. **12**: 221–33.
- IYVAZZO, C., GKEGKES, I.D., ZARKADA, I.M., FALAGAS, M.E. (2011). Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. *Journal of Women's Health (Larchmt)*. **20(8)**: 1245-55.
- IEHR (Institute for Evaluating Health Risks). (1997). An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents.
- ILIZAROV, A.M., KOO, H.C., KAZAZ, J.A., MANTELL, L.L., LI, Y., BHAPAT, R. (2001). Overexpression of manganese superoxide dismutase protects lung epithelial cells against oxidant injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. **24**: 436-41.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1998). Boron, Environmental Health Criteria (EHC). **204**: 1-192. WHO, Geneva, Switzerland.
- İNCE, S., KÜÇÜKKURT, I., CİĞERCİ, I.H., FİDAN, A., ERYAVUZ, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **3**: 161-4.
- İNCE, S., KELEŞ, H., ERDOĞAN, M., HAZMAN, O., KÜÇÜKKURT, I. (2011) Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*. p: 15.
- KING, N., ODOM, T.W., SAMPSON, H.W., YERSIN, A.G. (1991). The effect of in ovo boron supplementation on bone mineralization of the vitamin D-deficient chicken embryo. *Biological Trace Element Research*. **31(3)**: 223-33.
- KAHRAMAN, G. (2004). Design of polymeric carrier containing boron for boron neutron capture therapy and its use in tissue cultures. *Radiology and Nuclear Medicine*. Vol.35. S62.
- KOMISSAROVA, E.V., SAHA, S.K., ROSSMAN, T.G. (2005). Dead or dying: the importance of time in cytotoxicity assays using arsenite as an example. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **202**: 99-107.

- KRAMER, P.J. (1998). Genetic Toxicology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **50**: 395-405.
- LANGDON, S.P., (2004). Cancer Cell Culture, Methods and Protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- LINDEN, C.H., HALL, A.H., KULIG, K.W., RUMACK, B.H. (1986). Acute Ingestions of Boric Acid. *Clin. Toxicol.* 24 (4), 269-279.
- LITOVITZ, T.L., KLEIN-SCHWARTZ, W., ODERDA, G. M., SCHMITZ, B. F. (1988). Clinical Manifestations of Toxicity in a Series of 784 Boric Acid Ingestions. *Am. J. Emerg. Med.*, 6, 209-213.
- LODISH, H., BERK, A., MATSUDAIRA, P., KAISER, C. A., KRIEGER, M., SCOTT, M. P., ZIPURKSY, S. L., DARNELL, J. (2004). *Molecular Biology of the Cell*.
- MATÉS, J.M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. **153**: 83-104.
- MCKEE, J.E., WOLF, H.W. (1963). Quality criteria for water. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, D.C.
- MCKELVEY-MARTIN, V.J., GREEN, M.H., SCHMEZER, P., POOL-ZOBEL, B.L., DE MÉO, M.P., COLLINS, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research*. **288(1)**: 47-63.
- MEACHAM, S.L., TAPER, L.J., VOLPE S.L. (1994). Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environmental Health Perspectives*. **102**:79–82.
- MOORE, J.A. (1997). Expert Scientific Committee. An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*. **11**: 123–60.
- MURRAY, F.J. (1995). A human health risk assessment of boron (boric acid and borax) in drinking water. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 22: 221-230.
- MUZNY, C., BARNES, A., MENA, L. (2012). Symptomatic *Trichomonas vaginalis* infection in the setting of severe nitroimidazole allergy: successful treatment with boric acid. *Sex Health*. **9(4)**: 389-91.
- NIELSEN, F.H. (1988). Boron - an overlooked element of potential nutritional importance. *Nutr. Today*. (Jan/Feb), 4-7.
- NIELSEN, F.H. (1998). The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biological Trace Element Research*.
- NIELSEN, F.H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Review*. **66(4)**: 183-91.

- OSTLING, O., JOHANSON, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **123**: 291-298.
- PAWA, S., ALİ, S. (2006). Boron ameliorates fulminant hepatic failure by counteracting the changes associated with the oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions*. **160**: 89-98.
- PENLAND, J.G. (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental Health Perspectives*. **102**: 65-72.
- POPIOLKIEWICZ, J., POLKOWSKI, K., SKIERSKI, J.S., MAZUREK, A. (2005). In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs-genistein glycosides. *Cancer Lett.*, **229**: 67-75
- POWER, P.P., WOODS, W.G. (1997). The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil*. **193**: 1-13.
- PRICE, J.C., STRONG, P.L., MURRAY, F.J., GOLDBERG, M.M. (1997). Blood boron concentrations in pregnant rats fed boric acid throughout gestation. *Reproductive Toxicology*, Vol.11. No. 6pp. 833-842.
- PRYOR, W.A. (1997). Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*. (Suppl 4): 875-82.
- PUTNAM, K.P., BOMBICK, D.W., DOOTITTLE, D.J. (2002). Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicology In Vitro*. **16**: 599-607.
- REIGART, J.R., ROBERTS, J.R. (1999). Boric Acid and Borate. *Recognition and Management of Pesticide Poisonings: Other Insecticides*, 5th ed.; U. S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, U.S. Government Printing Office: Washington, DC. pp 75-76.
- ROBBINS, E., SCHARFF, M.D. (1967). The absence of a detectable G1 phase in a cultured strain of Chinese hamster lung cell. *Journal of Cell Biology*. 08-01.
- ROBBINS, W.A., XUN, L., JIA, J., KENNEDY, N., ELASHOFF, PING, L. (2010). Chronic boron exposure and human semen parameters. *Reproductive Toxicology*. **29**: 184-190.
- SAMMAN, S., NAGHII, M.R., LYONS, W., VERUS, A.P. (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biol. Trace Elem. Res.*, 66, 227 - 235.
- SANCAR, A., LINDSEY BOLTZ, L.A., ÜNSAL KAÇMAZ, K., LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of Mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. **73**: 39-85.
- SAYGI, S. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*. **45(3)**: 291 – 298.

- SHAPOSHNIKOV, S., FRENGEN, E., COLLINS, A.R. (2009). Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization—a review. *Mutagenesis*. **24(5)**: 383-9.
- SHENG, M.H., TAPER, L.J., VEIT, H., THOMAS, E.A., RITCHEY, S.J., LAU, K.H. (2001). Dietary boron supplementation enhances the effects of estrogen on bone mineral balance in ovariectomized rats. *Biological Trace Element Research*. **81(1)**: 29-45.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEDER, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. **175**: 184-191.
- SLATER, T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal*. **222**: 1-15.
- STORICI, F. (2011). DNA Repair-On the pathways to fixing DNA damage and errors. *InTech*. Open Access Publisher, Rijeka Croatia and Vienna Austria, EU.
- STRONG, P.L. (2001). Boric Acid and Inorganic Borate Pesticides. *Handbook of Pesticide Toxicology, Volume 2: Agents*, 2nd ed.; Krieger, R. I., Ed.; Academic Press: San Diego, CA. pp 1429-1437.
- SUN, W., WU, R., LAST, J.A. (1995). Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheobronchial epithelial cell line. *Toxicology*. **100(1-3)**: 163-74.
- ŞAYLI, B. S., TÜCCAR, E., ELHAN, A.H. (1998). An assessment of fertility in boron-exposed turkish subpopulations. *Reproductive Toxicology*. Vol. 12, No. 3, pp. 297-304.
- ŞAYLI, B. S. (2000). İnsan Sağlığı ve Bor Mineralleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi ve A.Ü.Tıp Fakültesi - Eti Holding Projeleri Yürütücüsü, Ankara (www.bigadic.gov.tr).
- TİCE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. **35**: 206-21.
- TÜRKEZ, H., GEYİKOĞLU, F., TATAR, A., KELEŞ, S., ÖZKAN, A.(2007). Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Z Naturforsch C*. **62**: 889-96.
- TÜRKEZ, H., GEYİKOĞLU, F., TATAR, A., KELEŞ, M.S., KAPLAN, I. (2012). The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *Experimental and Toxicologic Pathology - Journal - Elsevier* **64**: 93-101.
- U.S.DHHS. (U.S. Department of Health and Human Services) (2007). *Draft Toxicological Profile for Boron*. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Atlanta, GA.
- U.S.EPA. (U.S. Environmental Protection Agency) (1987). Health effects assessment for boron and compounds. Prepared by the Office of health and environmental

assessment, environmental criteria and assessment Office, Cincinnati, OH for the Office solid waste and emergency response, Washington, DC.

- U.S.EPA (2004). Toxicology review of boron and compounds in support of summary information on integrated risk information (IRIS). National Center for Environmental Assessment, Washington, DC. Erişim: [<http://www.epa.gov/iris>].
- U.S.EPA (2006). Boric Acid/Sodium Borate Salts: HED Chapter of the Tolerance Reassessment Eligibility Decision Document (TRED); Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, Health Effects Division, U.S Government Printing Offices: Washington, DC.
- UÇKUN, Z., ÜSTÜNDAĞ, A., KORKMAZ, M., DUYDU, Y. (2009). Micronucleus levels and sister chromatide exchange frequencies in boron exposed and control individuals. *J. Fac. Pharm, Ankara*. 38 (2) 79-88.
- UPPANGALA, N. (2010). Application of animal cell culture technique. *Biotech articles*. 07:48:09.
- USUDA, K., KONO, K., ORITA, Y., DOTE, T., IGUCHI, K., NISHIURA, H., TOMINAGA M., TAGAWA, T., GOTO E., SHIRAI, Y. (1998). Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate. *Archives of Toxicology*. 72: 468-74.
- ÜSTÜNDAĞ, A. (2010). Hiperbarik Oksijen Tedavisinin (HBOT) Sebep Olduğu Genotoksik Etkilerin İncelenmesi, *Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi*, p: 103.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39: 44-84.
- VOLPE, S.L., TAPER, L.J., MEACHAM, S. (1993). The relationship between boron and magnesium status and bone mineral density in the human: a review. *Magnesium Research*. 6(3): 291-6.
- WATAHA, J. C. (2001). Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 86: 203-9
- WEIR, R.J., FISHER, R.S. (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 23 (3), 351-364.
- WELCH, S. (2004) Boric Acid. *Clinical Veterinary Toxicology*; Plumlee, K. H., Ed.; Mosby, Inc.: St. Louis, MO. pp 143-145.
- WEYERMANN, J., LOCHMANN, D., ZIMMER, A. (2005). A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics*. 288: 369–376.
- WHO (World Health Organization). (1998). Boron in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, Switzerland.

- WISEMAN, H., HALLIWELL, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* **313**: 17-29.
- WONG, L.C., HEIMBACH, M. D., TRUSCOTT, D. R., DUNCAN, B. D. (1964). Boric Acid Poisoning: Report of 11 Cases. *Canad. Med. Ass. J.* 90, 1018-1023.
- WOODS, W.G. (1994). An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives.* **102 (Suppl 7)**: 5-11.
- WOOSTER, R., EBNER, T., SUTHERLAND, L., CLARKE, D., BURCHELL, B. (1993). Drug and xenobiotic glucuronidation catalysed by cloned human liver UDP-Glucuronosyltransferases stably expressed in tissue culture cell lines. *Toxicology.* **82(1-3)**: 119-29.
- XING, X., WU, G., WEI, F., LIU, P., WEI, H., WANG, C., XU, J., JIA, J., KENNEDY, N., ELASHOFF, D., ROBBINS, W. (2008). Biomarkers of environmental and workplace boron exposure. *Journal of Occupational Hygiene.* **5**: 141-147.
- YANO, C.L., MARCONDES, C.C.G. (2005). Cadmium chloride-induced oxidative stress in skeletal muscle cells in vitro. *Free Radical Biology & Medicine.* **39**: 1378-1384.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Sezen

Soyadı: Yılmaz

Doğum yeri ve tarihi: İstanbul – 1987

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

II- Eğitimi

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2005-2010

Batman Süper Lisesi, 2004-2005

Konya Süper Lisesi, 2001-2004

Kars Atatürk İlköğretim Okulu, 2000-2001

İzmir Ömer Özkan İlköğretim Okulu, 1999-2000

Söğüt Ertuğrul Gazi İlköğretim Okulu, 1997-1999

Bingöl Atatürk İlköğretim Okulu, 1995-1997

İzmir Yavuz Selim İlkokulu, 1993-1995

Yabancı Dili: İngilizce

III- Unvanları

Eczacı

IV- Mesleki Deneyimi

Ankara Özel Güven Hastanesi-Eczacı, 05.2010-02.2011

Eczane Sezen Yılmaz-Eczacı, 03.2011-12.2012

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi-Araştırma Görevlisi, 2013-

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Toksikoloji Derneği