



T.C

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BOR İÇEREN BİLEŞİKLERİN NÖRODEJENERASYONA OLAN
OLASI ETKİLERİNİN İN VİTRO AKSOTOMİ MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI**

CENNET SENA PARLATAN

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üye. MEHMET OZANSOY

İSTANBUL/2018

TEŞEKKÜR

Bu tezi yazabilmek için geçtiğim tüm süreçlerde yoluma ışık olan, Başöğretmenimiz Mustafa Kemal Atatürk başta olmak üzere üzerimde emeği olan tüm öğretmenlerime saygı ve şükranlarımı sunarım. En büyük amacımın “muasır medeniyetler seviyesine” ulaşmasına yardımcı olmak olan ülkeme ve milletime,

İleride olmak istediğim başarılı bilim insanı kimliğinde en büyük örneğim Prof. Dr. Lütfü HANOĞLU’na bize yeni ufuklar kazandırdığı, her daim ilgisi ve yardımlarını yanımdan eksik etmediği için,

Tezimi hazırlamam süresince danışmanlığımı yapan, motivasyonumuzu ve enerjimizi hep yüksek tutan Dr. Öğr. Üye. Mehmet OZANSOY’ a öncelikle sabrı ve anlayışı, bu süreçteki yardımları için,

Çalışmalarımız boyunca tecrübeleri ve güzel kalbiyle her sıkıntımızda yanımda olan kıymetli Öğr.Gör. M. Beyza OZANSOY’a , arkadaşlıkları ve her türlü sıkıntımızda uzattıkları yardım elinin hakkını ödeyemeyeceğim Sadık Bay ve Gülsena Baydaş’a , onların nezdinde tüm REMER çalışanları ve hocalarıma,

Bugün olduğum yerde en büyük emek sahipleri annem, babam ve canım kardeşime; tek tek isim veremesem de her koşulda gönül yükümü ferahlatan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	I
BEYAN.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 Borun Tarihçesi	5
4.2 Bor Bileşiklerinin Fizyolojik Etkileri.....	5
4.3 Bor Toksisitesi.....	8
4.4 Bor Ve Sağlığa Etkileri	9
4.4.1 Bor ve İmmün Sistem	10
4.4.2 Bor ve Kanser	12
4.4.3 Bor ve Sinir Sistemi	13
4.4.4 Bor ve Diğer Etkileri.....	14
4.5 Nöron Hasarları	16
5. METOD VE MATERYAL.....	18
5.1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması	19
5.2 Hücre Kültürü İçin Gerekli Hazırlıklar	19
5.3 Diseksiyon	20
5.4 Kültür protokolü	20
5.5 Borik asit ve Boraks'ın Hazırlanması	21
5.6 Aksotomi Uygulaması	21
5.7 İmmünotokimya Uygulaması	22
6. BULGULAR.....	23
6.1 Kortikal Hücre Kültürünün 24 saat sonra kontrol edilmesi	23
6.2 Madde Eklenmiş Hücrelere Aksotomi Uygulaması.....	25
6.3 LDH Analizleri.....	29
7. TARTIŞMA.....	31
8. SONUÇ.....	35

9. KAYNAKLAR	36
10. ETİK KURUL ONAYI	42
11. ÖZGEÇMİŞ	44



RESİM ve ŞEKİL LİSTESİ

Resim 6.1.1 : Kortikal nöron kültürünün 24 saat sonunda çekilmiş fotoğrafları (20x büyütme)	23
Resim 6.1.2 : Kortikal nöron kültürünün 24 saat sonunda çekilmiş fotoğrafları (40x büyütme)	24
Resim 6.2.1 :Aksotomi öncesi 300 µg/ml Borik Asit eklenen hücre (100x büyütme)	25
Resim 6.2.2 : Aksotomi sonrası 300 µg/ml Boraks eklenen hücre (100x büyütme)	26
Resim 6.2.3 : Aksotomi uygulaması öncesi seçili bölge.....	27
Resim 6.2.4 : Aksotomi uygulaması sonrası seçili bölge (PI boyama).....	28
Şekil 6.3.1 : Madde eklendikten 24 saat sonra değişen canlılık oranları grafiği	29
Şekil 6.4.1 : Borik asit LDH grafiği.....	30
Şekil 6.4.2 : Boraks LDH grafiği	30

1. ÖZET

BOR İÇEREN BİLEŞİKLERİN NÖRODEJENERASYONA OLAN OLASI ETKİLERİNİN İN VİTRO AKSOTOMİ MODELİNDE ARAŞTIRILMASI

Toplumdaki yaşam ömrü ortalamasının artması nörodejeneratif hastalıkların artmasına, bu da araştırmacıların bu konuya olan dikkatlerinin artmasına sebep olmuştur. Sinir sistemi hücrelerinin kabul edilen yargıyla bölünememesi, hasar söz konusu olduğunda geri dönüşümsüz bir “ölüm yolu”na girmelerine sebep olmaktadır. Hasarlı bölge hücrenin gövdesinde olmadığı veya bu bölgeye erişemediğinde hücrenin hasarı geri döndürme şansı olduğu periferik sistem üzerinde gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalarda bu durumun merkezi sinir sistemi için de mümkün olduğu öğrenilmiştir. Akson hasarlama yöntemlerinden biri olan aksotomi; hücre sağ kalım oranlarının yüksek olması sebebiyle bu deneysel çalışmada hasar modeli olarak kullanılmıştır. Yenidoğan farelerde, kortikal hücre kültüründe aksotomi yöntemiyle oluşturulan hasarların etkilerini azaltmak ve hatta süreci tersine çevirmek adına kullanılmak üzere bor bileşiği tercih edilmiştir. Bor mineralinin bitki, hayvan ve insanlar da ve hatta canlıların evrimsel süreçlerinin devamlılıklarında esansiyel olduğu yıllardır süregelen çalışmalarla gösterilmektedir. Bor bileşiklerinin nörodejenerasyona olan etkilerini görmek adına, literatürde oldukça çok karşımıza çıkan iki bileşik seçilmiştir; boraks ve borik asit. Hücreler, hasar verilmeden önce, bu bileşiklere maruziyete uğratılmış, daha sonra aksotomi yapılmıştır. Eklenen maddelerin etkinliğini gözlemek için PI(propidyum iyodür) boyaması ile canlılık tespiti yapılmıştır. Çıkan sonuçlar daha önceki çalışmalarla korelasyon göstermiştir. Yapılan bu çalışmanın henüz çok araştırma yapılmamış olan bu alanda öncü olması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: aksotomi, bor, nörodejenerasyon, nörorejenerasyon, kortikal nöron kültürü

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF POSSIBLE EFFECTS OF BORON CONTAINING COMPOUNDS ON NEURODEGENERATION IN VITRO AXOTOMY MODEL

The increase in the average life expectancy in society has led to an increase in neurodegenerative diseases, which has increased the attention of researchers to this topic. Failure of the nervous system cells to divide by the accepted formation, causes them to enter an irreversible "death path" in case of damage. It has been shown on the peripheral system that the damaged region has a chance of returning damage to the cell when it is not in its body or when it cannot reach this region. In recent studies it has been learned that this situation is also possible for the central nervous system. Axotomy, which is the one of the methods of axon injury, was used as the damage model in this experimental study because of the high survival rate of the cells. In neonatal mice, boron compound was preferred to reduce and even to reverse the process the effects of axotomy-induced damage in cortical cell cultures. For many years researches show that the boron mineral is essential to the continuity of the evolutionary processes of plants, animals, humans, and even living things. In order to see the effects of boron compounds on neurodegeneration, two compounds were chosen which appeared quite common in the literature; borax and boric acid. Cells were exposed to these compounds before being damaged, then axotomized. To observe the efficacy of the added substances, viability was determined by PI (propidium iodide) staining. Results correlated with previous studies. It is expected that this study will be a pioneer in this field which has not been much investigated yet.

Key words: axotomy, boron, neurodegeneration, neuroregeneration, cortical cell culture

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöronlar farklılaşmalarını tamamlamış, bölünme özelliği olmayan hücrelerdir. Sinir sisteminin yapıtaşı olan nöronlar vücut fonksiyonlarının yönetimi, kontrolü, vücudun external durumlara adaptasyonu gibi son derece önemli konularda özelleşmişlerdir. "Nörodejenerasyon"; sonucunda hücrenin ölümüne sebep olacak bir dizi nöron yapı ve fonksiyon kaybı aşamasını ifade etmektedir. Alzheimer, Huntington gibi protein bozukluğu kaynaklı veya travmatik hasarlar sonucu oluşan nörodejeneratif hastalıklar popülasyon içinde çok büyük bir kesimi etkilemektedir. Hücre ölümlerinin sebeplerinin bulunması terapötik yöntemler üretilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

Akson dejenerasyonu nörodejenerasyon basamaklarından biridir. Memeli modellerinde yapılan çalışmalar göz önüne alındığında 3 akson dejenerasyon tipi tanımlanmaktadır;

- 1) Aksotomi; aksonun uç kısmından kesik oluşturulması (Wallerian dejenerasyonu olarak da bilinir)
- 2) Tüm nöronun hem aksonların hem de somaların dejenerasyonuna neden olan apoptotik uyarılara maruz kaldığı "Akson Apoptozu" olarak tanımladığımız apoptosiz ile indüklenen Akson Dejenerasyonu
- 3) Akson Budama; Budama-indüklenmiş Akson Dejenerasyonu. (62)

Bu çalışmada hasar modellemesi açısından aksotomi kullanılmıştır. Beynin kompleks işler birimi olan korteksin hücrelerini aksotomi yöntemiyle hasarlayarak; merkezi sinir sistemi hasarlarında tedaviye yönelik çalışmalar yapmak amaçlanmıştır. Aksotomi çalışmalarında hücre sağ kalım oranlarının fazla olması sebebiyle ilaç uygulaması için bu yöntem tercih edilmiştir. Tedavi edici ajan olarak ise ülkemizde bolca kaynağa sahip bor minerali kullanılmıştır. Bor, bitkiler, hayvanlar ve insan sağlığı için gerekli olan, metabolizma açısından önemli roller taşıyan esansiyel bir

mineraldir. İn vitro deneyler, borun beslenme miktarlarında kemik büyümesini ve merkezi sinir sistemi fonksiyonunu olumlu yönde etkilediğini, enfektif bulguları hafiflettiğini ve hormon regülasyonunu sağladığını göstermiştir. Borun çeşitli etkileri, sayısız biyokimyasal süreçlerde yer alan maddelerin oluşumunu ve / veya aktivitesini etkilediğini göstermektedir. Bor mineralinin sağlık üzerinde pozitif etkileri göz önüne alınarak hücre yenilenmesi, hasarlanan mekanizmaların düzeltilmesi ve hasar etkilerinin ortadan kaldırılması planlanmıştır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde kanserden doku iyileşmesine kadar birçok farklı alanda borun tedavi edici etkisinin gözlemlendiği görülmüştür. Bulunan verilerin ileriki aşamalarda yapılacak çalışmaların önünü açması ümit edilmiştir.

Çalışma kapsamında primer kortikal nöron kültürü kullanılarak, dejenerasyonun etkilerini durdurmak ve hatta azaltmak hedeflenmektedir. Bu kapsamda bor içeren bileşiklerin nörodejeneratif yaralanmaları etkileri üzerindeki etkilerini gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Deney dahilinde yaralanma sonucunda bor minerallerine verilen hücresel tepkiler moleküler olarak takip edilecektir. Bor ile ilgili yapılan çalışmalar kısıtlı düzeyde kalmış, özellikle nörodejeneratif süreç çalışmaları in vitro deneylerle desteklenmemiştir. Yapılacak olan çalışma in vitro düzeyi de kapsamı açısından önem arz etmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Borun Tarihçesi

Tarih sahnesinde bor mineraliyle ilk karşılaşmamız Babillilerin 4000 yıl kadar önce Uzak Doğu'dan bor ihraç etmeleriyle gerçekleşmiştir. Babillilerin boru çoğunlukla altın işlemek için kullandıkları söylenmektedir. Mısır Uygarlığında mumyalama, tıbbi ve metalürjik uygulamalarda borun kullanıldığını işaret eden göstergeler bulunmaktadır. Ancak bu veriler doğrulanabilir nitelikte değildir. İlk kanıtlar 8. Yüzyıl dolaylarında bir bor minerali olan tinkarın Arap tüccarlar tarafından Mekke, Medine ve hatta Çin'e getirildiği yönündedir. Avrupa'da ise 12. Yüzyıla kadar uzanan bir bor kullanımı gözlenebilmektedir (5). Geriye gidildiğinde ilk Boraks kaynağının Tibet Gölleri olduğu söylenmektedir (6). Her ne kadar kullanımı tarih öncesi devirlere kadar dayansa da bor ilk kez Fransız kimyagerler Joseph Gay-Lussac ve Baron Louis Thenard tarafından saf olarak elde edilmiştir. Saflaştırma işlemi potasyum ile ısıtılarak gerçekleştirilmiştir (7). Türkiye'ye baktığımızda ilk borat yatakları Romalılar döneminde, yaklaşık 13. ya da 14. yüzyılda işletilmeye başlanmıştır (8). 1865 yılında "Compaigne Industrielle des Mazures" şirketi Susurluk ilçesinin, Aziziye köyünde maden işletmesine başlamış ve daha sonra bu maden devlete devredilmiştir. ETİBANK maden işletmesi 1969 yılında sondaj çalışmaları yaparak maden rezervinin 480 milyon tonun üzerinde bir değere sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmalar sonucunda, temel bor bileşiklerini üreten ilk tesisler Bandırma ve Kırka'da kurulmuştur ve uzun yıllar Avrupa 'da bulunan borik asit üreticilerine kolemanit ihraç etmiştir. (9).

4.2 Bor Bileşiklerinin Fizyolojik Etkileri

Biyolojik sistemlerde bor minerali oksijenle yapmış oldukları ortoboratlara ve sodyumla yapmış oldukları organoboronlar bileşiklerinde bulunurlar. Bu

bileşikler bitki, hayvan ve insan dokularında oluşmaktadır (4). Fizyolojik açıdan normal koşullarda organizmada bulunan borun %96'sı borik asit $B(OH)_3$ ve az bir miktarı da borat anyonu $B(OH)_4$ formundadır. Her iki formu da cis-hidroksil grupları içeren riboflavin, adenosin monofosfat, piridoksin, askorbik asit, şeker molekülleri ve polisakkaritler gibi birçok biyomolekülle kuvvetli bağlar oluşturmaktadırlar (10). Borun biyolojik formları su, kan ve tükürük gibi fizyolojik sıvılarda çözünmektedirler. Oral alımlarında kan ve idrarda görünen bor formu borik asittir (11).

Bor bileşikleri organizmaya oral, intravenöz, dermal veya inhalasyonla alınabilmektedir. Yarılanma ömürleri 24 saat ve daha az olabilmektedir. Bor bileşiklerinin gelişmiş canlıların kanlarında temizlenmeleri %92 oranında idrar yoluyla gerçekleşir ve vücuttan uzaklaştırılmaları birkaç gün alabilmektedir (12). Organizma içine her ne şekilde alınmış olursa olsun bor bileşikleri glomerular filtrasyona maruz kalırlar ve bu filtrasyon farelerde insanlara nazaran 3- 4 kat daha fazla olmaktadır(13). İdrarla atılan formu ağırlıklı olarak boratlar olmaktadır. Bileşikler vücut içerisinde pasif difüzyon ile dağılım göstermektedirler. Borun dokularda dağılımını gözlemlemek için birçok hayvan çalışması yapılmış olmasına rağmen insan dokularındaki dağılımını gözlemleyen çalışmalar daha dar kapsamlı olarak kalmıştır. Bilinenler ele alındığında; insan vücudunda özellikle kemiklerde biriktiği, kas, kalp akciğer ve bağırsaklarda da az miktarda bulunabildiği söylenmektedir (14). Gelişmiş canlılarda boratların düşük konsantrasyonları fizyolojik sıvılarda dengeli pH düzeylerinde borik aside dönüşmektedir. Borik asit biyolojik moleküllerle etkileşime daha açıktır. Özellikle hidroksil, amino ve tiyol gruplarıyla bağlantısalığının fazla olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur (15).

Borun insan yaşamı için ne derece gerekli olduğu tam olarak kanıtlanmış olmasa da yüksek canlılar için esansiyel olduğunun bilimsel kaynaklarda ilk ayak izleri 1920'li yılların başına dayanmaktadır. Warrington damarlı bitki tohumlarında yaptığı çalışmalarla bitkilerin bor eksikliğinde metabolik birçok bozukluk yaşadığını göstermiştir (16). Yarım asırdan daha uzun bir süre sonra Hunt civciv türleri üzerinde yoksunluk gözlemleri yapmış, borun büyümeye katkısı olduğunu, kolekalsiferol ile

birlikte bor diyeti uygulandığında büyümenin daha da yavaşladığını öne sürmüştür. Yeniden bor takviye edilen civcivlerin mineral dengelerinin düzene girdiğini ve büyümelerinin normal hızına erişebildiğini söylemiştir (17). Aynı yıllarda Nielsen ve ekibi insan çalışmalarını başlatmış ve menopoz döneminde bulunan kadınlar üzerinde bor takviyesinin etkilerini gözlemlenmişlerdir. Yapılan deney sonucu beklenenden fazla olarak idrarda kalsiyum atılımının azaldığını göstermiş ve borun kalsiyum ile ilişkisine dikkat çekmiştir. Menopoz dönemindeki bu kadınların aldığı bor takviyesiyle osteoporoz risklerinin azaldığı söylenmiştir (18). Olumlu sonuçları olan hayvan ve insan çalışmaları sebebiyle Dünya Sağlık Örgütü 1996 yılında boru “insan sağlığı için olası esansiyel elementler” grubunda kabul etmiştir (19).

Yapılan çalışmalar bor mineralinin diyatolar, siyanobakteriler, deniz yosunları gibi daha basit canlılar ve vasküler bitkiler gibi daha gelişmiş canlı gruplarının gelişiminde rol oynadığını göstermekle birlikte, yapılan hayvan ve insan çalışmaları vazgeçilmez bir yapı taşı olduğuna dair ikna edici sonuçlar vermemiştir (20). Farklı birçok alanda gerçekleştirilen hayvan ve insan deneyleri borun canlı sağlığına etkilerini anlamakta bize yardımcı olmaktadır. Öncelikle hücresel düzeyde bakacak olursak; borun yaptığı görevleri 3 ana başlıkta toplamak mümkün olmaktadır:

- a) Metabolik aktivitelerin desteklenmesi,
- b) Hücre membranı işlevlerine yardımcı olunması,
- c) Hücre duvarına sahip canlılarda duvar yapısının desteklenmesi. (20,21)

Bunun yanı sıra bakteriler üzerinde yapılan çalışmalar bakteri enveloupu sabitliğini pozitif yönde etkilediğini, simbiyotik bakterilerde sinyal mekanizmasında ve azot döngüsünde görev aldığını göstermiştir (22). Bu da bor mineralinin sinyal yollarında da etkili olabileceğini düşündürmektedir. Şufen bitkisinin nodüllerinde yapılan genetik analizler bor eksikliğinde kritik bazı genlerde değişimler olduğunu göstermiştir. Bu genler; hücre döngüsü, hücre duvarı düzeni ve ribozom biyogenezinde görev almaktadırlar (23).

Moleküler çalışmalar arttıkça boronun metabolik olarak önemli sinyal molekülleriyle de bağlantılı olduğu ortaya çıkmıştır. Özellikle fosfoinositlerin boronun potansiyel hedeflerinden biri olduğu ve nükleik asitler, adenilatlar, guanilatlar ve oksitlenmiş nikotinamidler gibi birçok molekül ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir. Fosfoinositlerin yapmış olduğu bağlantılardan PI, PIP, PIP2 ve IP3 bağımlı olanlar sinyal yollarının transdüksiyonlarına, ER lardan sitoplazmaya IP3 bağımlı kalsiyum salımına ve ayrıca bazı proteinlerin hücre membranına tutunmasına etki ettiği yapılan çalışmalarla da gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara ilaveten hayvan çalışmaları göstermiştir ki; bor eksikliği embriyogenez ve gelişimsel bir çok süreçte bozukluklara sebep olmaktadır (1).

4.3 Bor Toksisitesi

Bor bileşiklerinin yoğun çalışılmaması sebebi ve çalışılmadığı için rahatça gözlenemeyen kısmı toksisitedir. Birçok hayvan deneyinde oral, inhalasyon veya intravenöz olarak verilen bileşikler akut veya kronik etkiler için çok uzun ve büyük oranda uygulamalara gereksinim duyduğundan insanlarla karşılaştırılması mümkün olmamaktadır. Araştırmalar göstermektedir ki; borik asitin oral yolla alınımında letal doz 640 mg/kg, deri yoluyla 8600 mg/kg ve intravenöz yoluyla 29 mg/kg'dır (24). Boraks söz konusu olduğunda günde 5-10 gr alımında yalnızca protein metabolizmasının ve idrar azot derişiminin değiştiği rapor edilmiştir (Moseman, 1994). Bu değerleri düşünecek olursak çocuklar için 3-6 gr ve yetişkinler içinse 15-20 gramın potansiyel letal doz olduğu söylenebilmektedir (25). Özellikle bir üst başlıkta da belirtildiği gibi hangi yolla insan vücuduna girerse girsin ilk 24 saat içinde %90-95 kadarı idrarla atıldığı ve birikme yapmadığı için toksisite oluşturmayacağı öngörülmektedir (12).

Borca zengin kaynaklara sahip olan ülkemizde bu durumun olası etkilerini gözlemlemek adına içme suları ve toprakta farklı oranlarda bor bulunduran iki ayrı bölgede toplam 4687 birey üzerinde kıyaslamalar içeren bir çalışma yürütülmüştür.

Çalışma sonuçları daha yüksek oranda bora maruz kalan bireylerde üreme sistemlerinde verim kaybı veya başka bozuklukların ortaya çıkma oranlarında farklılık gözlenmemiştir (26). Balıkesir/Bandırma Borik Asit Fabrikası'nda çalışan işçiler üzerinde yapılan başka bir çalışmada Şaylı'nın çalışmasını kanıtlar niteliktedir ve en yüksek düzeyde maruziyete uğrayan bu işçilerde de herhangi bir üreme sorunu gözlenmemiştir (27). Bunun aksine Rusya'da gerçekleştirilen bir araştırmada bor madenlerinde çalışan işçilerin sperm sayısı ile cinsel yaşamlarında gerileme olduğu ve ABD' de yapılan bir başka çalışmada erkek çocuğa oranla kız çocuk sahibi olma oranının bor işçilerinde daha da arttığı söylenmiştir (28). Bunlara rağmen hayvan deneyleri sonuçlarını baz alarak 2008 yılında REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) Avrupa Birliği Komisyonu borik asit ve boratları üremeye olumsuz etkili olarak sınıflandırılmıştır. Bor madenlerinde çalışan işçiler üzerinde daha bir çok çalışma yapılmış ve bu işçilerde dental ve solunum yolu problemleri ile alerjen tepkiler gözlemlendiği kaydedilmiştir. U.S. Ulusal Toksikoloji Programı, yıllarca süren ve yeterli kanıtların oluşmadığı çalışmalar ve hayvan deneyi sonuçlarını göz önüne alarak bor bileşiklerinin kanserojen olmadığını açıklamıştır (29).2002'de Cantürk'ün yapmış olduğu çalışma içme sularında yoğun miktarda bor mineralinin bulunmasının sindirim bozukluklarına yol açacağını, sinir sistemi ve karaciğer yapısında bozulmalar yapabileceğini göstermiştir (30).

4.4 Bor Ve Sağlığa Etkileri

Bitki ve hayvan çalışmalarında alınan olumlu sonuçlar sonucunda bilim insanları borun insan sağlığını nasıl etkilediğine dair araştırmalara başlamıştır. Her ne kadar yapılan çalışmalar dar bir alanda sınırlı kalsa da göstermektedir ki; bor minerali insanlar için de esansiyeldir (31). Çalışmaların sınırlı olarak değerlendirilmesinin altında yatan neden ise bu elementin biyokimyasal işlevlerinin tam anlamıyla çözümlenmemesi olduğu söylenebilir. Özellikle 1980'li yıllarda ivmelenen yoksunluk çalışmaları gelişimde ne denli önemli olduğunu ortaya koymuştur. Nielsen ve arkadaşlarının hem hayvan hem de insanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmanın sonuçları bir insanın günlük güvenli bor alım miktarının 1-13mg olması gerektiğini,

fakat nüfusun önemli bir kısmının günde 1 mg'dan daha az bor tükettiğini göstermektedir. Nielsen'a göre bu durum insan sağlığı açısından kritik derecede önemli bir endişe uyandırmaktadır (32). 10 yıl süresince yaptığı birçok çalışmada Nielsen bor mineralinin özellikle bağışıklık sistemi, iskelet-kas sistemi, sinir sistemi, üreme sistemleri ve enerji metabolizmasına olan etkilerini araştırmış ve düşük dozda bor alımının bu sistemlerde bozukluklara yol açacağını söylemiştir. (33).

Çalışmalar esnasında düşünülen temek noktalardan biri borun kanserojen etkisi olmaktadır. Bir grup açıklama bu sebeple borun kullanımının yanlış olduğunu söylemektedir. Ancak borun insan vücuduna doğal yollarla; yiyecek-içeceklerle sindirim yoluyla, toz formunda solunum, krem ve ilaçlarla deri yoluyla girmesi ve daha sonra %90-95 oranında vücutta birikmeden dışarı atılması kanser vb hastalıklara sebep olmayacağını göstermektedir. Bor minerali çok küçük oranlarda kemik, tırnak, kıllarla veya karaciğer ve dalak gibi internal organlarda birikebilmektedir (26).

Bu bilgiler ışığında özellikle çalışılan sistemler üzerinden bor mineralinin etkileri aşağıda incelenmektedir:

4.4.1 Bor ve İmmün Sistem

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki; bor bileşiklerinin farklı formları bağışıklık sistemi üzerinde oldukça etkilidir. Bu konuda literatürde göze çarpan ilk yetkin çalışma 1999 yılında Hunt ve Idso tarafından sıçanlar üzerinde yapılmıştır. Farklı beslenme tiplerine bölünen 8 grup erkek sıçanın bir gram pozitif bakteri olan *M. Butyricum* enfeksiyonuna karşı metabolik cevapları incelenmiştir. Sonuçlar enfeksiyon sonrasında takviye borun NK hücreleri, CD8a+/CD4- hücreleri ile nötrofillerin dolaşımdaki konsantrasyonlarını etkileyerek immüno-modülatör bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, beslenmeye takviye

olarak verilen borun fizyolojik miktarlarının immünomodülatör etkisi için ilk in vivo kanıtı sunduğundan dolayı önem teşkil etmiştir (34).

1996 yılında boromisin ile ilgili yapılan bir çalışma bileşiğin HIV üzerinde etkili bir antibiyotik olarak kullanılabileceğini söylemektedir. Klinik olarak izole edilen HIV alt grubunda replikasyon için gerekli matürasyonu baskıladığı ve enfeksiyonu engellediği gösterilmiştir (35). 2001 yılında Armstrong ve arkadaşları süttten yeni kesilmiş domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmada diyetlerinde bor desteği olan ve olmayan iki grubu kıyaslamışlardır. Bor desteği olan diyetin intradermal fitohemaglütinin enjeksiyonuna karşı antienflamatuvar yanıtı arttırdığı gözlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda tiroid hormon konsantrasyonlarında artış olduğu da kayıtlarda gösterilmiştir (36). Kuzey Carolina Eyalet Üniversitesi'nde sığırlarda yapılan bir çalışmada bor mineralinin etkinliği beklenenin altında kalmıştır. 36 hayvan ve 3 grup üzerinde yapılan gözlemler yaklaşık 78 gün boyunca sürdürülmüştür. İlave olarak 5 ve 50mg/kg sodyum borat bileşiği verilen sığırlarda T ve B lenfositlerinin proliferasyonunda anlamlı bir artış kaydedilememiştir. Çıkan sonuçlar değerlendirildiğinde ilave borun immün fonksiyonlara minimal etkileri olduğu söylenirken, büyümeye katkısı olmadığı söylenmiştir (37).

Demirer ve arkadaşları borik asitin sıçanlarda periodontitis üzerine etkilerini araştırmak üzere sıçanlara ligatür bağlayarak 11 gün boyunca sistemik borik asit uygulamışlardır. 11 gün bittiğinde kontrol gruplarıyla kıyasla borik asite maruz kalan sıçanların alveolar kemik ve hücre kayıpları ile osteoklast sayılarında azalma gözlenmiştir. Borik asitin periodontal hastalıklarda enfeksiyon miktarını anlamlı ölçüde azalttığı gösterilmiştir (38). 2017 yılına geldiğimizde birbirini tam manasıyla desteklemeyen ve kesin hükümler koyamadığımız immün fonksiyonlarla ilgili Jin ve arkadaşları sıçan modeli üzerinde yapılan çalışmalarını yayınlamışlardır. İçme sularına eklenen ilave borun sıçan serumlarında IgG konsantrasyonları, dalak IFN- γ ve IL-4 ekspresyonunun yanı sıra splenik CD3 +, CD4 + ve çoğalan hücre nükleer antijen (PCNA) + hücrelerinin sayısında anlamlı artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Bu

kapsamıyla çalışma 1999 yılında Hunt ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir (39).

4.4.2 Bor ve Kanser

Günümüzde en çok rastlanılan hastalıkların başında kanser gelmektedir. Hızla artış gösteren kanserli birey sayısı bilim insanlarını da bu konuda hummalı bir çalışmaya itmiştir. Bor minerali de hücre metabolizmasına ve yüksek canlılarda pozitif etkilerine dayanarak bu çalışmalarındaki yerini almıştır. 2000'li yıllarda kanser çalışmalarının ivmelenmesinde 1995 yılında kemoterapotik olarak piyasaya sürülen bortezomib içerikli bir ilacın birçok kanser çeşidinin tedavisinde kullanılmasının etkisi büyüktür (40). Daha sonra yapılan farklı çalışmalar da bortezomibin etki kapsamının artmasına sebep olmuştur.

2000'li yılların başında yapılan bir çok çalışma besinler yoluyla alınan borun prostat ve servikal kanserin görünme sıklığını azalttığını belirtmiştir (41,42). 2004 yılında Gallardo-Williams'ın yürüttüğü bir hayvan çalışmasında androjene hassas prostat adenokarsinoma (LNCaP) hücreleri enjekte edilen transgenik farelerde borik asitin IGF-1 (tümör tropik faktör) ve PSA (prostat spesifik antijen) seviyesini düşürdüğünü, tümör hacmini azalttığını kaydetmiştir (43). Barranco hücre kültürü çalışmalarının yanı sıra insan grupları arasında da çalışmalar yapmış ve 2007 yılında içme sularında yüksek bor bulunan bölgelerde prostat kanseri olma olasılığının azaldığını rapor etmiştir (44). 2009 yılında Henderson ve arkadaşları Barranco'nun çalışmalarını destekler nitelikte sonuçlar buldukları bir deney düzeneği kurmuş; prostat kanseri olan ve olmayan insan hücre kültürlerinde borik asite 1 saat maruziyetin Ca^{+2} ve NAD^{+} kanallarında değişikliğe ve bu sebeple kanserli hücre hatlarının çoğalmasını engellemeye sebep olduğunu göstermişlerdir (45).

Yalnızca prostat kanseri değil; farklı zamanlar farklı çalışmalar, değişik kanser türlerinde bor bileşiklerinin terapotik etkisini gösterir nitelikte olmuştur. Lenfosit hücrelerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları borik asitin apoptotik süreçleri

hızlandırdığını ve bunun sebebinin mitokondri çalışmasının etkilenmesiyle olduğunu göstermiştir (46). Mahabir ve arkadaşları kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarla besinsel borun akciğer kanseri riskini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir (47). Özellikle borik asitin meme, deri ve melanoma gibi kanser çeşitlerinde invazyonu engellediği birçok çalışmada desteklenmiştir. Bor ile ilgili çalışmalarda adını çokça duymuş olduğumuz Nielsen bor alımının kanserle ilişkilendirilebilmesinin bağışıklık sistemi üzerindeki düzenleyici etkisinden kaynaklandığını söylemektedir (33).

Yukarıda değinilenlerin haricinde daha birçok kanser çalışmasının ümit verici sonuçları kanser tedavilerinde kullanım için bor bileşiklerinin önünü açmıştır. Kanser tedavilerinin en büyük açmazlarından biri kanser hücrelerini öldürürken, sağlıklı hücre kaybının da yoğun miktarda olmasıdır. “Bor Nötron Yakalama Terapisi” tam burada imdada yetişmiştir. Bu teknik yalnızca tümör hücrelerini hedef alıp, sağlıklı hücrelere zarar vermeyen bir radyasyonla tedavi yöntemidir. Başta Amerika olmak üzere dünyadaki birçok gelişmiş ülkede BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) merkezleri açılmış olup, klinikte hastalar üzerinde yapılan denemelerde de başarı sağlandığı gözlenmektedir. Daha 1968 yılında Japonya’da yürütülen bir çalışmada 9 beyin tümörlü hasta 10 yıl boyunca gerçekleştirilen tedavi ve takiplerle olumlu sonuçlar göstermiş ve bu sonuçlar bu konuda yapılacak çalışmalara ivme kazandırmıştır (48). BNCT yöntemi temel olarak p-boronofenilalaninin tümörlü dokuya uygulanması ve sonrasında nötron bombardımanı ile kanserli hücrenin yok edilmesini kapsamaktadır (49). Kararlı yapıda olan bor izotopu bombardıman sonrasında He ve Li çekirdekleri ortaya çıkarmaktadır. Bu çekirdekler oldukça yüksek enerjiye sahiptirler ve kanserli hücre içine tüm enerjilerini salarlar. Böylece hasarlı hücrelerin çoğalması engellenmiş olmaktadır (50).

4.4.3 Bor ve Sinir Sistemi

Kısıtlı bor çalışmalarının daha da kısıtlı olan alt grubu borun sinir sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Sinir sisteminin plastisitesi, çalışmanın zorluğu

ve yalnız hayvan deneylerinin bu noktada yeteli olmaması bilim insanlarını diğer konulara itmiştir. Ancak yine de bu konuda yapılmış dikkate değer birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle Penland'ın yıllarca süren çalışmaları literatürde önemli bir yer tutmaktadır. Penland bu çalışma kapsamında 3 küçük çaplı deney yapmış ve sonuçlarını birleştirerek yayınlamıştır. Bu deneyler sağlıklı, yaşlı, erkek ve kadın bireyler üzerinde gerçekleştirilmiştir. 3 ayrı çalışmada farklı beslenme ve gözleme süreçlerinden geçen bireyler ilave bor takviyesi almışlardır ve kognüsyon testleri, kan testleri ile EEG gibi beyin görüntüleme teknikleriyle taranmışlardır. Sonuçlar göstermektedir ki; düşük bor alımı beyin elektrofizyolojisini ve performansını oldukça etkilemektedir. İlave bor alımını vücut koordinasyonu, dikkat, algı, kısa ve uzun süreli hafızada artışa sebep olmuştur. Bireylerde daha az uyuşukluk ve dalgınlık gözlenmiştir. Penland'ın çalışmalarında kullandığı bor alımını 3.25 mg'dır (51). 2006 senesinde Nielsen ve Penland'ın birlikte yapmış olduğu hayvan deneylerinde ilave bor alımının sıçan davranışlarında anlamlı değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir (52).

2011 yılında Türkiye'de yürütülen bir çalışmada borun nöroprotektif etkisi araştırılmıştır. Alüminyum kloridle beyin hasarına maruz kalan sıçanlar borik asit uygulanması ile gözlemlenmiştir. Sonuçlar Penland'ın belirlediği miktar olan 3.25 mg /2000 kkal/günlük'ün hasarlı bölgelerde hasar etkilerinin tersine çevrilebildiğini göstermiştir (53). Bunlara ek olarak BNCT'nin glioblastoma ve melanoma tipi beyin tümörlerinde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir.

4.4.4 Bor ve Diğer Etkileri

Bor minerali tam olarak etki mekanizması açıklanamadığından vücut işlevlerinin birçoğu üzerinde araştırılmıştır. Yapılan araştırmaların bir kısmına bu başlık altında bakabiliriz.

Bor bileşiklerinin oksidatif stres etkilerini baskıladığı ve hatta geri döndürdüğü bilinmektedir. 48 sıçanla yapılan bir hayvan deneyinde bu etkinin gözlemlenmesi için sıçanlara gastrik gavaj yöntemiyle malatyon verilmiş ve ilave borun etkileri incelenmiştir. Borun karaciğer, böbrek ve beyin dokularında histopatolojik etkilere

karşı koruyucu görev yaptığı, hasar gören dokuların iyileşmesine katkı sağladığı, antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği ve oksidatif stresi düşürdüğü gözlenmiştir (54).

Borun mineral dengesi üzerinde etkileri, vücut yapılarının birçoğunun korunmasında önem arz etmektedir. 1990 yılında Nielsen borun optimal kalsiyum metabolizması için ve postmenopozal kadınlarda ve ileri yaştaki erkeklerde ortaya çıkan kemik kaybının önlenmesinde yararlı ve gerekli olduğunu göstermiştir. Deneylelerinin sonucunda bor takviyeli diyetin D vitamini ve kalsitonin konsantrasyonunu arttırdığı, plazmadaki kalsiyum miktarını ise azalttığı gözlenmiştir (55). 1996 yılında Naghii ve arkadaşları klinik çalışmalarda idrarda kalsiyum miktarının azaldığını, kemikte ise tutulumunun arttığını belirtmişlerdir (56). Yapılan çalışmalarda bor mineralinin kalsiyum ve magnezyum emilimini kolaylaştırdığının gözlenmesiyle; kemik yapısının güçlenmesine katkı sağladığı ortaya çıkmıştır. Edinilen bu bilgilerin ışığında 2010 yılında bor bileşiklerinin kemik rejenerasyonunda yeni nesil bir biyomateryal olarak kullanılması hedeflenmiştir (57).

2008 yılında Naghii ve Mofid'in birlikte yürüttükleri bir çalışmada 7'si kontrol 16 sağlıklı erkek üzerindeki borun steroid hormon metabolizması arasındaki ilişki gözlemlenmiştir. Günlük 5 mg bor takviyesi alan deney grubunda 4 ve 8 haftalık süreç sonunda kan değerleri sonuçları göstermiştir ki; bor takviyesi kanda hormon konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde arttırmıştır. Bu da araştırmacıların kronik birçok hastalıkta borun koruma üzerine etili olabileceğini düşünmesini sebep olmuştur (58).

2010 yılında Türkiye'de İnce ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sıçanlarda borun antioksidan, DNA hasar onarımı ve lipid peroksidasyonu etkilerini incelemiştir. 30 erkek sıçanda 3 farklı grupta borik asit ve boraksı deneyen araştırmacılar, özellikle borik asitin DNA hasarını azalttığını, kanda C vitamini miktarını ve böbreklerde katalaz aktivasyonunu azalttığını göstermişlerdir (59). 2015 yılında bu deneyin devamı niteliğinde lipid peroksidasyonunu araştırmak üzere aynı ekip içme sularına

arsenik eklenen sıçanları incelemiştir. İlave bor alımı kan ve dokularda lipid peroksidasyonunu arttırmıştır (60). Süregelen çalışmalarda sıçanlarda içme sularına ilave bor eklemenin sıçanların vücut ağırlığını azalttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar yapılan bir çok deneyle bu durumun eşlenmemiş proteinlerin gen ekspresyonu ile (UCP) ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bor takviyesi alan sıçanların beyaz yağ dokusunda ve iskelet kas dokusunda UCP2 gen ekspresyonunda; kahverengi yağ dokusunda da UCP1 gen ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Burdan şu sonuç çıkarılabilmektedir; bor bileşikleri termogenezi artırarak vücut ağırlığının azalmasına katkı sağlamaktadırlar (61).

4.5 Nöron Hasarları

Sinir sisteminin en kompleks birimi olan beyin, insanlarda, 100 milyar nöron ve trilyonlarca glial hücre içermektedir. Beyin 3 ana kısımdan oluşmaktadır; Serebrum, beyin sapı ve serebellum. Beyin sapı serebrumu omuriliğe bağlayan beyin bölümüdür. Kardiyovasküler, sindirim ve solunum sistemlerinin kontrollerinden sorumludur. Uyku-uyanıklık, vücut stereotip hareketlerinde de düzenleyici görevleri bulunmaktadır. Serebellum beyin sapının hemen arkasında bulunan hareket, denge ve postürün düzenlenmesi gibi fonksiyonlardan sorumludur. Serebrum ise beynin en dış kısmıdır. Sağ ve sol olmak üzere 2 hemisferden oluşur. Serebrumun en dış kısmına korteks adı verilmektedir. Bu yapılar duyu bilgilerin algılanması, öğrenilmiş bilgilerin hafızada depolanması ve kompleks hareketlerin organizasyonunda sorumludur. Korteks yüksek beyin işlevlerinin yönetim birimidir. İnsan gibi yüksek organizasyonlu canlılarda korteks oldukça girintili çıkıntılı yapıdadır; ancak fareler gibi daha basit memelilerde korteks yapısının girintili olmadığı gözlenmektedir.

Sinir sistemi hücrelerinin hasarı nörodejenerasyon olarak adlandırılmaktadır. “Nörodejenerasyon” terimi, nöronların ölümü ile sonuçlanan, hücre işlev ve yapının aşamalı kaybını ifade etmektedir. Nöronlar bölünme yeteneği olmayan hücrelerdir. 1

yaşındaki bir insanda yaklaşık 100 milyon nöron bulunur. Yıllar geçtikçe nöron sayısı düşer ancak nöronlar arası bağlantısallığın artması beyin aktivitesinin düzenli ilerlemesini sürdürür. Hasarlar, alkol tüketimi, hipoksi gibi sebeplerle nöronların kaybı veya hasarlanması bu durumda geri dönüşümsüz olarak algılanabilmektedir. Periferik sistem nöronları eğer hücre gövdesi hasar görmediyse kendilerini onarabilmektedir, merkezi sistemde ise son yıllara kadar bu durumun mümkün olmadığı söylenmekteydi. Ancak yapılan çalışmalar bu teorinin değişmesine sebep olmuştur.

1980'lerde Richardson ve arkadaşları o zamana kadar bir söylemden ileriye gidememiş merkezi sinir sistemi rejenerasyonunu modern teknikler yardımıyla kanıtlamayı başarmışlardır (63). Merkezi sinir sisteminde rejenerasyonun ses getirmesi ise 1991 yılında Cajal tarafından gerçekleştirilmiştir (64). Bu çalışmalar aksonal ortamın katkısına ilave olarak nöron gövdesinin yanıtının da kritik rol oynadığını göstermiştir. Bütün bunların yanısıra 1984 yılında Richardson ve arkadaşları dönüm noktası olacak bir çalışmaya imza atmışlardır. Ekip deneyleri için nörodejenerasyon çalışmalarında şu anda oldukça popüler olan dorsal kök gangliyon (DRG) hücrelerini kullanmışlar ve omurilikte bulunan periferik aksonlarda bir kesilme olduğunda, merkezi nöronların omuriliğin dorsal kolona nakillerinde kendilerini yenileyebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışma periferik akson hasarında yenilenme yeteneğinin vücut aktivasyonu yanıtıyla gerçekleştirdiğini ortaya çıkarmışlardır (65). 1999 yılında bu güne kadar yapılan deneylere kanıt nitelikte Neumann ve arkadaşları bir çalışma yapmış ve siyatik sinir hasarlarında merkezi nöron aksonlarında spinal kord hasar bölgesinde bile filizlenme gösterdiğini gözlemlemişlerdir (66).

Yukarıda anlatılan çalışmalar süregelen yıllarda bu çalışmalara ilave birçok çalışmaya kapı niteliğindedir ve merkezi sinir sistemi hücrelerinin rejenerasyon yetenekleri bilim dünyasında yerini almıştır. Ancak hala her şey çok net açıklanabilmiş durumda değildir. Bu çalışmaların sonuç vermesi günümüzde birçok merkezi sinir sistemi hasarı sebebiyle ortaya çıkan hastalığa umut olacaktır.

5. METOD VE MATERYAL

Sarf Malzemeler	Firma	Katalog Numarası	Ülke
35 mm cam tabanlı Petri	WPI	FD35-100	ABD
Poly-L-Lysine	Sigma	P6282	Almanya
NBA (Without L-Glutamine, with Phenol Red)	Gibco	10888-022	ABD
Antibiyotik antimikotik solusyon	Biosera	A4110/100	Fransa
GlutaMAX	Gibco	35050061	ABD
B-27® Serum-Free Supplement	Gibco	17504044	ABD
DNase	Biomatik	A2442	ABD
FBS(Fetal Bovin Serum)	Sigma	F4135	Almanya
HBSS (With Sodium Bicarbonate, with Phenol Red)	Gibco	14175	Almanya
[PBS] Tablet	Biomatik	A3602	ABD
Triton X-100	Sigma	T8787	ABD
Papain	Sigma	P4762	ABD
HANKS	Sigma	H9269	ABD
15 mm plastik Petri	Thermo	150318	İngiltere
Hybernate-A	Gibco	A12475	Almanya
Propidyum İyodür			
Borik Asit			
Boraks			

5.1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Deneyler için İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi'nden temin edilen yenidoğan fareler kullanıldı. Çalışma için gerekli etik kurul onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (38828770-604.01.01-E.35948).

5.2 Hücre Kültürü İçin Gerekli Hazırlıklar

Hücrelerin ekileceği cam tabanlı Petri kapları deneye başlamadan 2 saat önce hidrofilik yapıya gelmesi amacıyla Poly-L-Lysine ile kaplanmıştır. Her bir deney kabı için 750 µl %10'luk Poly-L-Lysine 35 mm'lik steril kültür kabının orta kısmına yayıldı. Deney kapları 2 saat süresince oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildi. Gerekli sürenin sonunda Petri kapları 3 kez distile su ile yıkandı ve kurumaları için kabin içerisinde deney aşamaları süresince bekletildi.

Petri kaplarının hazırlanmasından sonra diseksiyon için kullanılacak besiyeri hazırlandı. Besiyeri için Hybernat-A solüsyon içerisine %1 antibiyotik ve %1 glutamax eklendi. Diseksiyon için kullanılacak kaplara bölünen besiyerleri diseksiyon işlemine kadar -20 °C'de bekletildi.

Deney prosedürü boyunca kullanılacak bir diğer besiyeri olan L-15 besiyeri için L-15 solüsyon içine %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 eklendi. Besiyeri deney süresince +4 °C'de bekletildi.

Kültür besiyeri için Neurobasal A solüsyon kullanıldı. İlave olarak solüsyona %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 eklendi. Ekim işlemine kadar besiyeri 37 °C'de kapağı yarım açık şekilde muhafaza edildi.

5.3 Diseksiyon

Yenidoğan farelerin kafa kısımları soğutulmuş diseksiyon besiyerine alındı. Beyinler solüsyon içinde çıkarıldı. Her iki hemisferden korteks kısımları ayrıldı. Subkortikal kısımları ve meninksleri stero mikroskop altında, soğuk tabla üzerinde ve aseptik koşullarda hızlı bir şekilde temizlendi. Çıkarılan korteksler 15 ml'lik Falkon tüplere alındı, retina makasıyla nazikçe parçalandı.

5.4 Kültür protokolü

Ependorf tüp içerisinde korteksin parçalanması için gerekli enzim solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon L-15 besiyeri ile hazırlanan solüsyonun 1 ml'sine 20 µl Dnase ve 20 µl papainden oluşmaktadır. Falkon tüpte makasla parçalanmış korteks üzerine yavaşça eklenen enzim solüsyonuyla birlikte kap +4 °C buzdolabında sabit frekanslı bir ajitator içerisinde alındı ve burada 45 dakika bekletildi.

45 dakika sonunda süpernatantı uzaklaştırılan pelet tiritürasyon aşamasına alındı. Bu aşama için önce 1 ml'lik pipet ucu bir miktar kesildi, uç ateş yardımıyla yumuşatıldı. Nazikçe pipetaj uygulandı. En az 15 kez tekrarlandıktan sonra 200 µl'lik pipet ucu ile aynı işlem tekrarlandı. Daha sonra bir Pasteur pipetin ucu ateşle yakılarak yumuşatıldı. Korteksi inceltmek için pipetaj en az 15 kez olacak şekilde sürdürüldü. 1 dk beklendi ve üst kısım başka bir Falkon tüpe alındı. Geri kalan kısım üzerine 1 ml L-15 solüsyondan eklendi ve pipetajla başlayan bu işlem 3 kez tekrarlandı. Üst kısımların toplanmasıyla doku seyreltilmiş ve kirli kısımlar bir miktar uzaklaştırılmış oldu. Üst kısımları bulunduran Falkon tüp 800 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi.

5 ml %20 FBS'li L-15 solüsyon hazırlandı. Santrifüj sonunda dikkatli bir şekilde süpernatant uzaklaştırıldı ve hazırlanan solüsyon pelet üzerine eklendi. Pipetaj yapmak suretiyle karışım homojenize edildi. 10 dakika hücreler bu şekilde kabin içinde bekletildi. 10 dakika sonra 800 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj tekrarlandı.

Santrifüj işleminden geçirilen solüsyonun süpernatantı uzaklaştırıldı ve ekim solüsyonu olan NBA solüsyonundan 1 ml nazıkçe eklendi. Karışım homojen hale gelebilsin diye pipetaj yapıldı.

Karışımından 10 µl alınıp hematositometre ile hücre sayımı yapıldı. Her Petri kap için 35bin hücre 500 µl NBA solüsyonu içerisinde karıştırılarak cam tabanlı Petrilerin orta kısmına ekim gerçekleştirildi. 1 saat etüvde bekletilen kaplara 1 saat sonunda nazıkçe 1'er ml'lik NBA solüsyonu eklemesi yapıldı. Petri kaplar 24 saat bekletmek için etüv içerisine alındı.

5.5 Borik asit ve Boraks'ın Hazırlanması

Etkisi araştırılmak üzere akson hasarından 15 dakika önce etken maddeler hücrelerin besiyerlerine eklendi. Her iki bileşik için 3 ayrı doz kullanıldı. Bu dozlar her ml için 100 µg, 200 µg ve 300 µg olarak belirlendi. Hassas tartıda ölçümleri yapılan toz şeklindeki bileşikler 1,5 ml için taze hazırlanan ekim solüsyonunun 50 µl'sine eklendi. Petri kaplarından 50'şer µl besiyeri çekildi ve üzerlerine bor bileşiklerinin olduğu besiyerleri eklendi. Bu işlemler sonunda üçer Petri kabından oluşan 2 deney grubu ile madde eklenmemiş hasar verilmiş ve madde eklenmemiş hasar verilmemiş olan 2 Petrilik kontrol grubu olmak üzere 8 Petri kabı elde edilmiş olundu.

5.6 Aksotomi Uygulaması

Kortikal nöronların aksonlarına hasar verme işlemi aksotomi modeli ile gerçekleştirildi. Bu model için PALM CombiSystem kullanıldı.

Cihaz iki adet temassız lazer sistemine sahiptir. Bunlar; infrared lazer ve ultraviyole lazerdir. Ayrıca renkli ve tek-renk iki kamera, inkübatör ve florasan üniteler bulundurmaktadır. 5 aşamalı (10X, 20X,40X, 32X ve 100X) büyütmesi olan EC-Plan-Neofluar objektifler, zaman aralıklı çekim, Z-stack çekim gibi bir çok

avantajlı özelliğe de sahiptir. Cihaz yazılımı PALM RoboSoftware'dir ancak sistem içerisinde ZenBlue yazılımı da bulunmaktadır.

Aksotomi işlemine başlamadan önce cihaz inkübatörünün 37 °C'de olması sağlandı. İşlem için her Petri kabından yaklaşık 10 adet hücre seçildi. Seçim esnasında hücrelerin akson boylarının hücre gövdesi çapından daha uzun olması, tek tek düşmesi gibi unsurlara dikkat edildi. Kesim işlemi akson başlangıcından itibaren hücre çapı kadar uzaklıktan yapıldı. Ölçümler ve aksotomi işlemi 100x objektif altında yapıldı. Aksotomi uygulanan hücrelerin aralarında mesafe olmasına dikkat edildi.

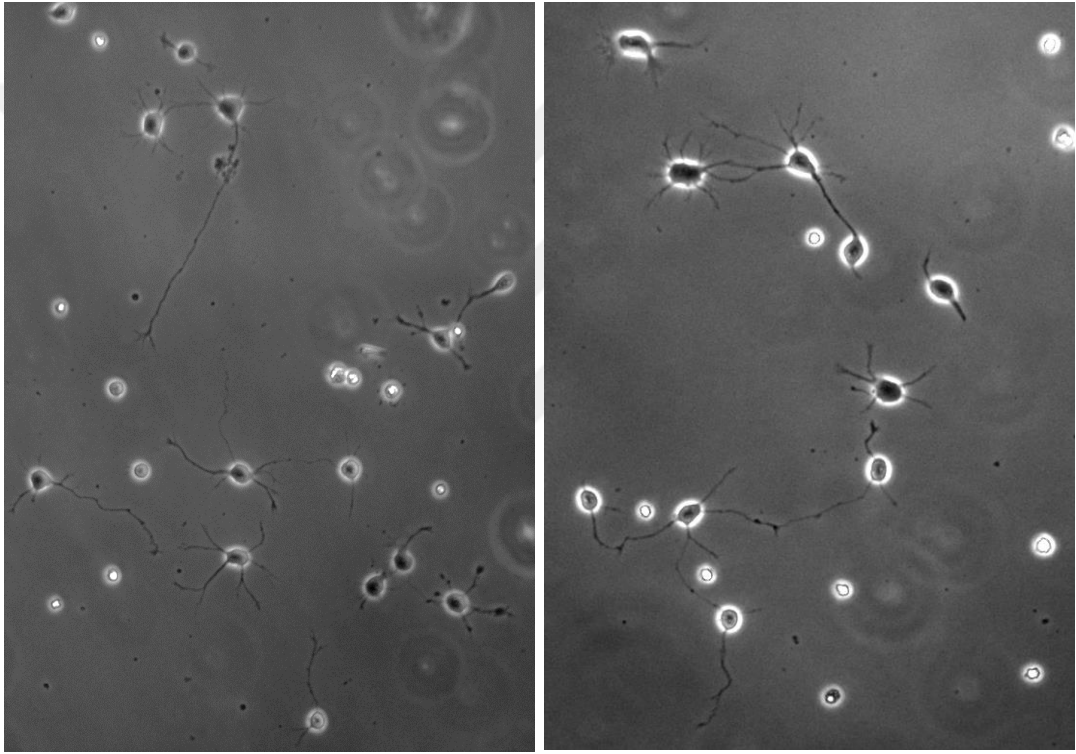
5.7 Hücrelerin sağ kalımının propidyum iyodür (PI) boyama ile belirlenmesi

Aksotomi uygulaması yapıldıktan 24 saat sonra hücrelerin besiyerlerine 1 µg/ml PI boya eklendi. 15 dakika süresince boyanın hücrelere nüfus etmesi beklendi. Süre sonunda ışımalar floresan mikroskop yardımıyla görüntülendi.

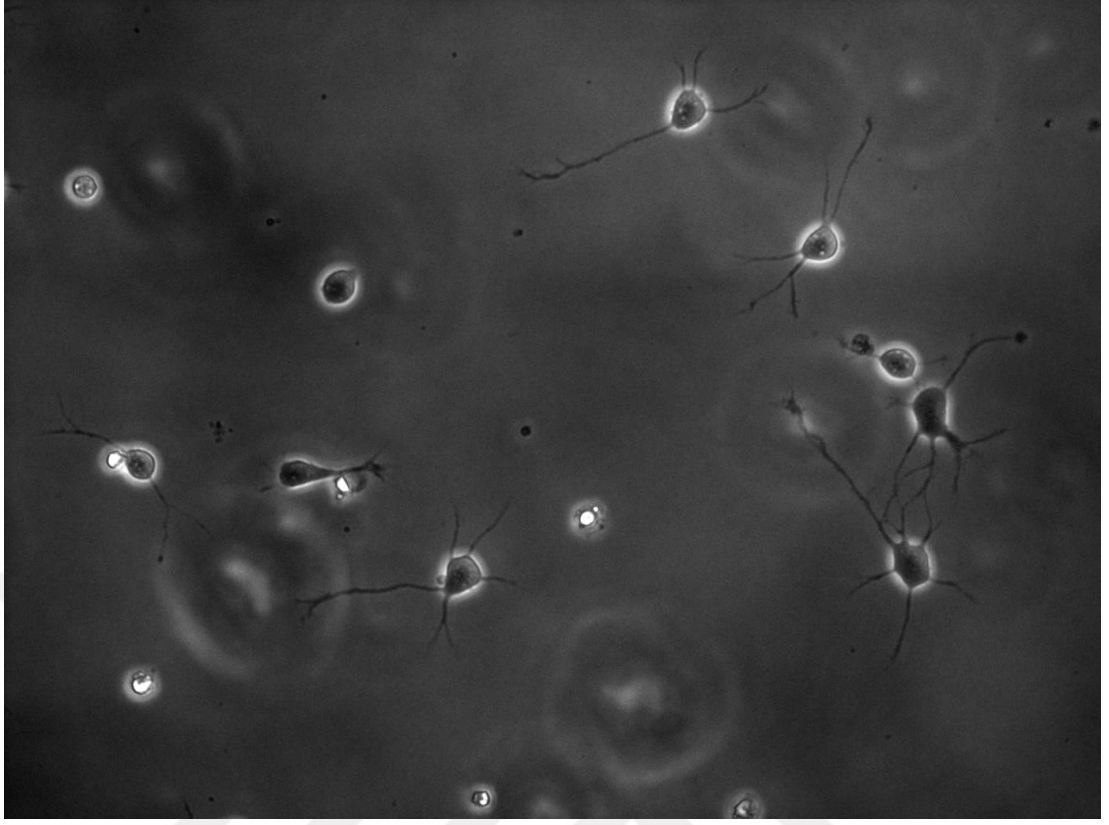
6. BULGULAR

6.1 Kortikal Hücre Kültürünün 24 saat sonra kontrol edilmesi

Cam tabanlı Petri kaplara ekilen hücreler 24 saat boyunca büyümeye bırakıldı. Süre sonunda madde eklenmeden önce fotoğrafları çekildi. Bu fotoğraflar aşağıda bulunmaktadır.



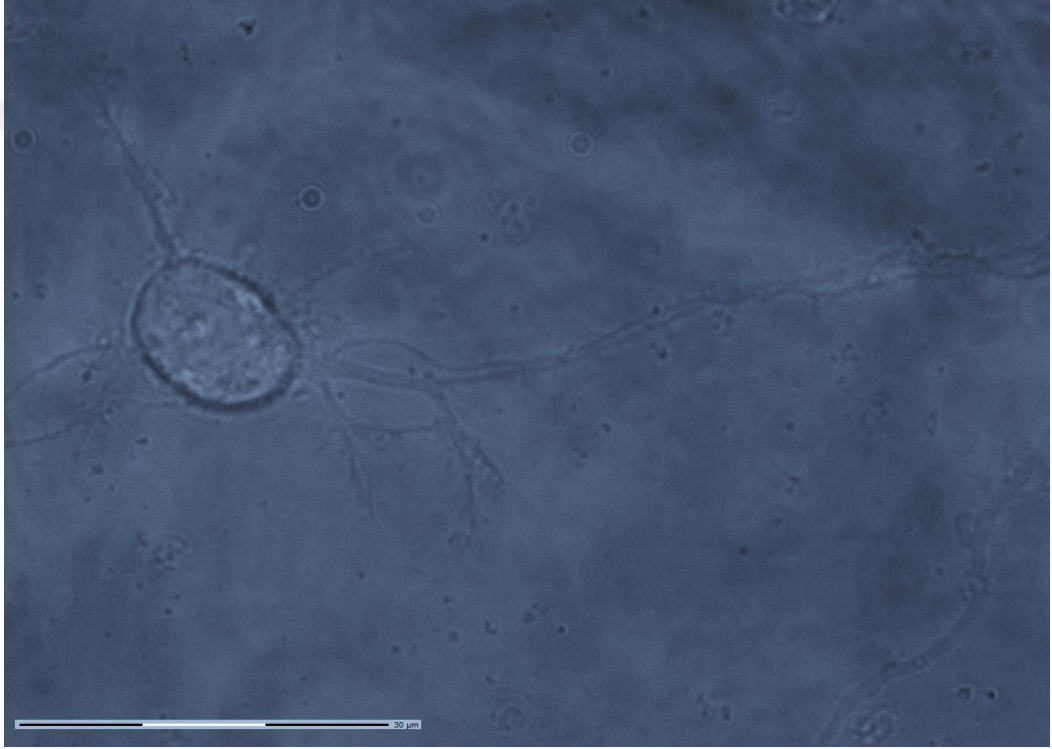
Resim 6.1.1 : Kortikal nöron kültürünün 24 saat sonunda çekilmiş fotoğrafları (20x büyütme)



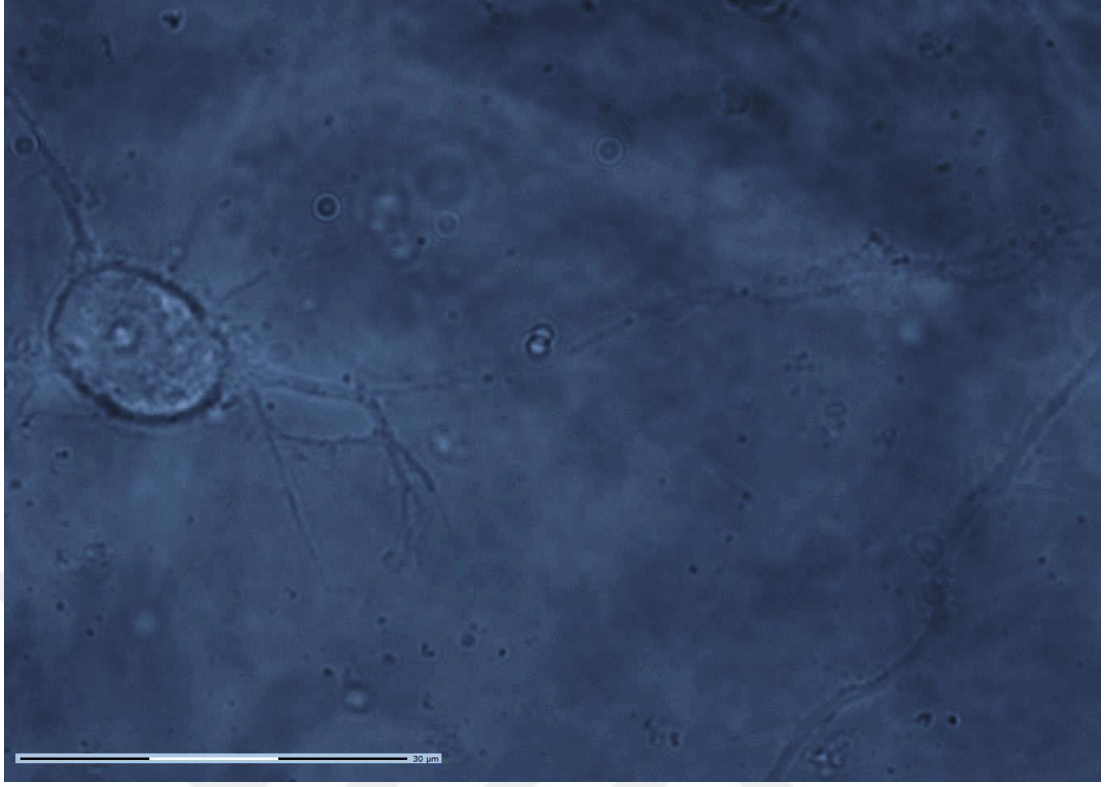
Resim 6.1.2 : Kortikal nöron kültürünün 24 saat sonunda çekilmiş fotoğrafları (40x büyütme)

6.2 Madde Eklenmiş Hücelere Aksotomi Uygulaması

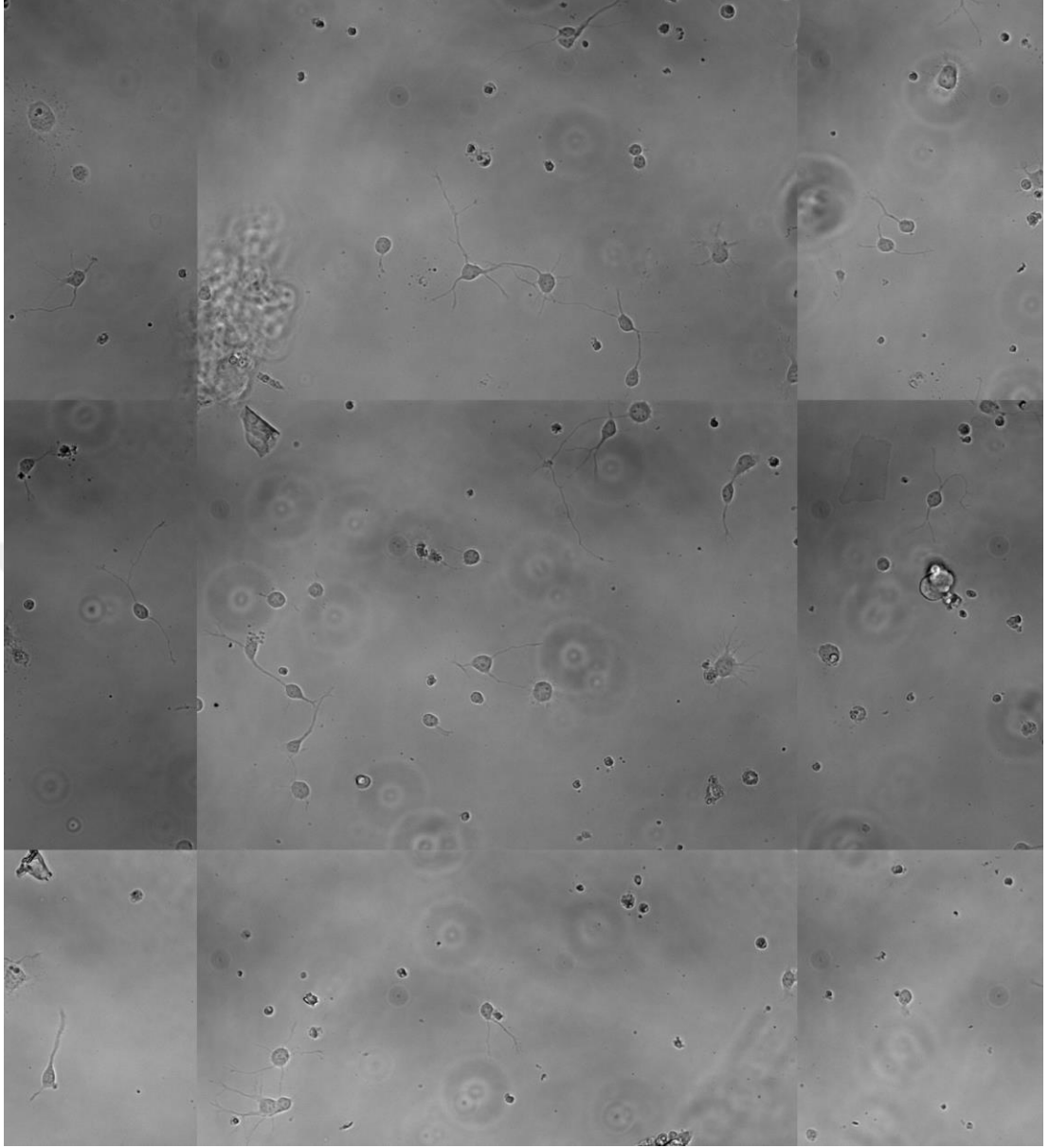
Hücelere aksotomiden 15 dakika önce bor bileşikleri metotta belirtildiği şekliyle eklendi. Aksotomi uygulaması için hücre gövdesinin çapından daha uzun aksona sahip olan hücreler seçildi. Kesim yapılan hücrelerden örnekler aksotomi öncesi ve sonrası olacak şekilde aşağıda yer almaktadır.



Resim 6.2.1 :Aksotomi öncesi 300 µg/ml Borik Asit eklenen hücre (100x büyütme)



Resim 6.2.2 : Aksotomi sonrası 300 µg/ml Boraks eklenen hücre (100x büyütme)

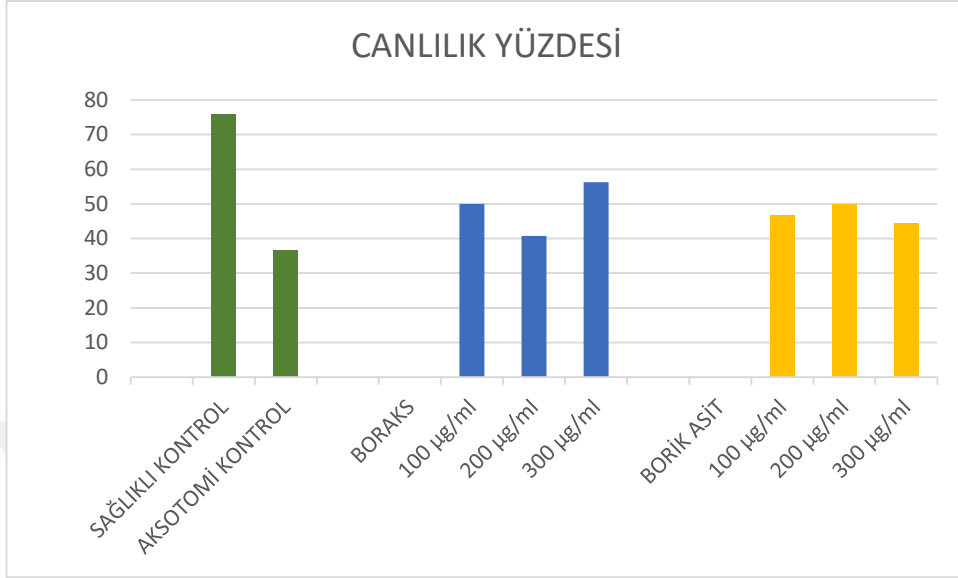


Resim 6.2.3 : Aksotomi uygulaması öncesi seçili bölge



Resim 6.2.4 : Aksotomi uygulaması sonrası seçili bölge (PI boyama)

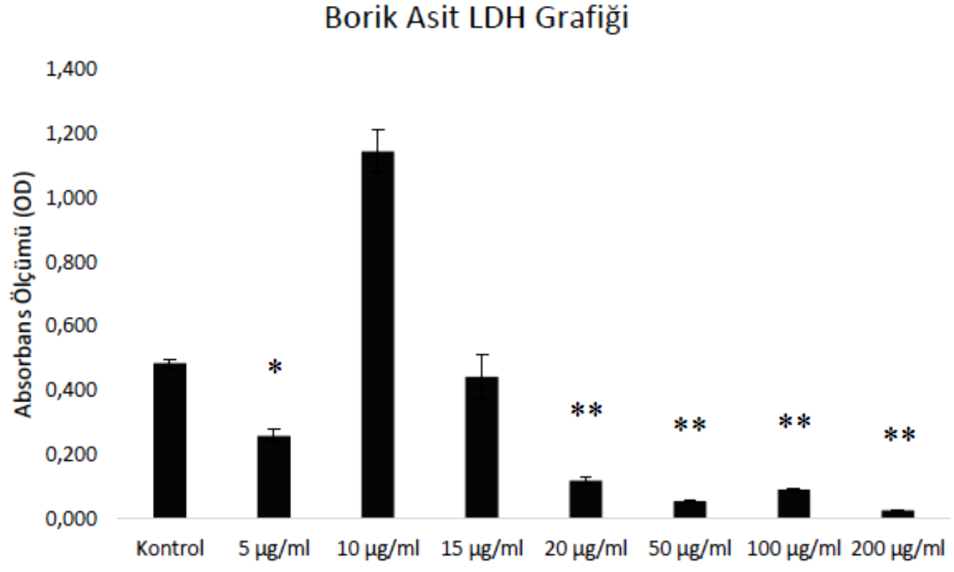
6.3 Canlılık Takibi



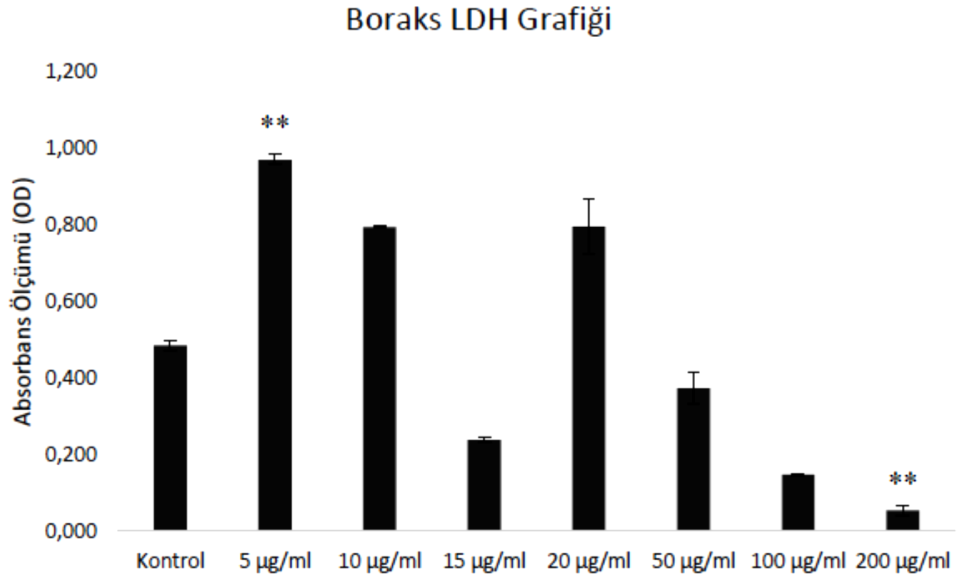
Şekil 6.3.1 : Madde eklendikten 24 saat sonra değişen canlılık oranları grafiği

6.4 LDH Analizleri

Laboratuvar grubumuzda yapılan bir diğer çalışmada bor bileşiklerinin toksisite ve hasar oranlarını belirlemek için yapılan LDH analizleri olmuştur.



Şekil 6.4.1 : Borik asit LDH grafiği



Şekil 6.4.2 : Boraks LDH grafiği

7. TARTIŞMA

Ülkemiz bor mineralince zengin topraklara sahiptir. Endüstriden hijyene birçok alanda bu mineral kullanılmaktadır. Dünya üzerinde de kullanımı oldukça yaygındır. Bu kadar kullanım olması, geniş maden yataklarının varlığı, insanları bor bileşiklerinin toksisitesi hakkında çalışmalara itmiştir. 1996 yılında Dünya Sağlık Örgütü “insan sağlığı için olası esansiyel elementler” grubunda kabul etmiş (19) olsa da, 2008 yılında hayvan deneyleri esas alınarak ‘üremeye olumsuz etkili’ olarak sınıflandırılmasıyla bor çalışmaları ve ekonomisi büyük bir darbe almıştır. Türkiye bu durumu tersine çevirmek adına, Ulusal Bor Enstitüsü ve Etibank Maden İşletmesi’nin birlikte yürüttüğü, 200 maden işçisinin incelendiği bir çalışma yürütmüştür. Sonuçlar bor bileşiklerinin üremeye olumsuz etkisi olmadığını göstermiştir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar da benzer sonuçlar vermiştir (42). Yapılan çalışmalar borun yüksek maruziyeti sonucu toksik etkisi yanı sıra sağlığa faydalı olduğunu ve hatta esansiyel bir element olduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda bor ilaç olarak kullanılmaya da başlanmıştır.

Moleküler ve klinik çalışmalar bor bileşiklerinin canlılardaki olumlu etkilerini ve bileşiklerin fizyolojik etkilerini incelemeye odaklanmışlardır. Çalışmaların kısıtlı olması ve birçok başka parametre sebebiyle bileşiklerin etkileriyle ilgili her zaman kesin kararlar verilememiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle üremeye, kansere ve antioksidan etkileri üzerinde durulduğu gözlenmektedir. Kognitif ve sinir sistemi çalışmaları da olmakla birlikte oldukça az sayıda ve temellendirmelerden uzak olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar hakkında tezin “Genel Bilgiler” kısmına bakılabilir. Burada bizim neden bor mineralinin nöron dejenerasyonu üzerinde bir çalışma yaptığımız akla gelebilir. Literatürde bor bileşiklerinin in vitro olarak nöronlardaki hasara etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışma bu yönüyle özgündür ve ilk olma özelliğine sahip olmuştur.

Ortalama insan ömrünün beklenenin üzerine çıkması nörodejeneratif hastalıkların toplum içindeki görülme sıklığının artmasına sebep olmuştur. Alzheimer, Parkinson gibi internal hastalıkların yanı sıra travmatik beyin hasarları toplum içinde büyük bir sorun haline gelmiştir. Araştırmalar hastalıkların etkilerini azaltıcı tedavi yöntemleri bulmuş olmakla birlikte, tam manasıyla hastalık öncesi duruma geri dönüş sağlanamamaktadır. Bunun sebebi olarak nöronların bölünme özelliğinin olmaması ve hasar sonucu dejenerasyonlarının gerçekleşmemesi gösterilmektedir. Ancak son zamanlarda bu kanı değişmiştir. Hasar bölgesi çevredeki sağlıklı nöronların kollateral dallanma göstermesi, hasar sonucu etkilenen fonksiyonların sinir sisteminde yeniden şekillenmesi veya hasarlı aksonların rejenerasyonu ile iyileşme ya da adaptasyon sağlanabilmektedir (67). Eğer nöronların hücre gövdeleri hasara maruz kalmazsa, hasar buna sebep olacak kadar yakında değilse aksonların rejenerasyonlarının mümkün olduğu gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında hasar için in vitro ortamda aksotomi modeli kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan hasar modeli Öztürk ve arkadaşlarının 2013 yılında dejenerasyon tiplene çalışmasından alınmıştır. Yapılan çalışmada bahsettiği iki dejenerasyon tipinden biri olan aksonun geri çekilmesi, sağ kalım olarak hasar verilmemiş hücrelerle eş değer bir yapı göstermiştir (68). Aksonları hasarlıken bu hususa dikkat edilmiştir. Gallo'nun 2004'te yayınladığı çalışmayla korele şekilde, baloncuk formu alan aksonların büyüme konileri oluşturduklarını göstermişlerdir (69). Bu çalışmalar yaptığımız deneylerde görmeyi beklediğimiz sonuçlara referans olmuşlardır.

Akson dejenerasyonunda iki tetikleyici durum bulunmaktadır. Bunlar; nöronal taşımanın kesilmesi ve kalsiyum akışıdır. Bu tetikleyiciler akson kaybına ve hatta hücre gövdesine uzanan hasarlanmaları başlatan adımlardır. İyileştirici olarak verilecek maddelerin bu özellikleri baskılaması hasar mekanizmasının ilerlemesini durduracaktır. Ayrıca hasarlanma sonucu hücrede oluşacak oksidatif stres, hücreyi ölüme kadar götürecektir bir süreç başlatacaktır. Bu veriler ışığında bor çalışmalarını değerlendirilmiştir. 2007 yılında Barranco prostat kanseri hücrelerinde borik asitin NAD⁺ ve NADP⁺'yi baskıladığını ve böylece kalsiyum salınımını azalttığını göstermiştir (44). Bor bileşiklerinin ER'dan kalsiyum salınımını indükleyen sıklık ADP ribozu inhibe ederek, hücre içi kalsiyum homeostazisini düzenlediği gözlenmiştir

. DU-145 prostat kanseri hücrelerinde de benzer bir durum gözlenmiştir. Borik asit'in riyanodin reseptörlerini inhibe ederek kalsiyum salınımını baskıladığı bulgusuna erişilmiştir (45). Buna ek olarak oksidatif stres modellerinde yapılan çalışmalarda da borun oksidatif stresi azalttığı ve doku hasarının iyileşmesine yardımcı olduğu gözlenmiştir (54). Bu ve benzeri çalışmalar göz önüne alındığında bor bileşiklerinin nöronlarda benzer etkiler yaparak hücre ölümüne kadar uzayan süreçlere engel olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda mukayese imkânı veren bir diğer çalışmanın verilerinden de yararlanılmıştır (70). Bulgular kısmında yer alan LDH (laktat dehidrogenaz) verileri laboratuvarımızda yapılan bir diğer çalışmadan alınmıştır. LDH sitoplazmada bulunan, enerji metabolizmasıyla ilişkili bir enzimdir. Hasar durumlarında seviyesinde artış gözlenmektedir. Borik asitin 5,20,50,100 ve 200 µg/ml dozlarında LDH miktarında anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Ancak boraks için bu durum geçerli değildir. Yalnızca 15, 100 ve 200 µg/ml dozlarında anlamlı azalma gözlenirken, 5, 10 ve 20 µg/ml dozlarında artış gözlenmiştir. Bu veriler ışığında kortikal hücelere doz belirlenmesi yapılmış ve 100, 200 ve 300 µg/ml dozlar uygulanmıştır.

Çalışmamızda aksotomi hasar modeliyle hasarlanan hücelere bor bileşiklerinin olası etkilerinin tespiti için, bir tür canlılık göstergesi olan PI (propidium iodide) boyama yapılmıştır. Propidyum iyodür membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerde nükleik asit spesifik, kırmızı florasan boyama sağlamaktadır. Belirli bir bölge içerisinde seçilen hücelere hasar verilmiş ve 24 saat sonra hücelere boyama ile kontrol edilmiştir. Hiç hasar verilmemiş, hasar verilmiş ancak madde eklenmemiş gruplar kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Gruplarda nöronların hayatta kalma yüzdeleri mukayese edilmiştir.

Çıkan sonuçlar umut verici olmuştur. Aksotomi hasarı ve herhangi bir madde verilmemiş grupta 24 saat sonra canlılık yüzdesi yaklaşık %76'ya düşerken, hasar verilmiş grubun canlılık yüzdesi %37'lere düşmektedir. Borik asit verdiğimiz grupta

en iyi gelen doz 200 µg/ml olmuştur ve hasar verilen hücrelerin canlılığını %50'ye kadar çıkarmıştır. 100 µg/ml dozda %47; 300 µg/ml dozda %44'lük hayatta kalma gözlenmiştir. Boraks için canlılık oranını en çok arttıran doz olan 300 µg/ml 'lik dozda hayatta kalma oranı %56 iken, 100 µg/ml'de %50, 200 µg/ml' de ise %40'dır. Bu sonuçlar göstermektedir ki; borik asit ve boraksın hasar öncesi hücrelere eklenmesi hasar sonrası yaşam oranlarında anlamlı farklılıklara sebep olmaktadır. Sonuçlar aynı laboratuvarında yapılan LDH deneyleriyle uyum göstermektedir. Literatürde birçok yayında karşımıza çıkan ve şüphelere sebep olan bor bileşiklerinin toksik etkisi, yapmış olduğumuz çalışmada karşımıza çıkmamış; aksine canlılık ihtimalini arttırdığı gözlenmiştir.

Bu bilgiler ışığında bor içeren bileşiklerin beyin hasarlarında, bugüne kadar geri dönüşümsüz olduğu düşünülen hücre kayıplarında bilinen gerçekliği değiştirebileceği, ilaç olarak kullanıp hasarları azaltabileceği düşünülebilir. Hatta daha ileri çalışmaların yapılması halinde belki de hasarların geri dönüşümü sağlanması umut edilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmanın bu çalışmalara öncülük etmesi temennimizdir.

8. SONUÇ

Yapılan çalışmada kortikal nöron kültür hücrelerinde aksotomi modeliyle hasar sağlanmıştır. LDH analizleriyle belirlenen borik asit ve boraks miktarları hasardan önce hücrelerin besiyerlerine eklenmiş ve sonrasında hücrelerin hayatta kalma oranlarında artış gözlenmiştir. Bu gözlem PI boyama ile sağlanmıştır.



9. KAYNAKLAR

1. Bolaños L, Lukaszewski K, Bonilla I, Blevins D. *Why boron?*. Plant Physiol Biochem. 2004 ;42(11):907-12. Epub 2005.
2. Bor raporu. Tmmob Metalurji Mühendisleri Odası.2003
3. O'Neill MA, Eberhard S, Albersheim P, Darvill AG. *Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for Arabidopsis growth*. Science 2001 ; 26:294(5543):846-9.
4. Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals .Report of the Expert Group on Vitamins and Minerals. 2003
5. Travis, NJ, Cocks, EJ. *The Tincal Trail. A history of borax*. Harrap, London, 311. 1984
6. Woods WG. *An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry*. Environ Health Perspect. 1994 Nov; 102(Suppl 7): 5–11
7. Özcan E, Bayat C, ve Zeki A. *Etibank boraks fabrikası atıklarından ham boraks, saf boraks, borik asit, perborat üretim şartlarının araştırılması*, Kimya ve Sanayi, C:30, S: 147-148,89-99. 1986
8. Garret DE. *Borates Handbbok of Deposits, Processing, Properties, and Use*, Academic Press (ed), USA, 1-22. 1998
9. Doğan G, Sabah E, Erkal T. *Borun Çevresel Etkileri Üzerine Türkiye'de Yapılan Bilimsel Araştırmalar*. Türkiye 19. Madencilik Kongresi, 09-12 Haziran 2005, IMCET 2005, İzmir, Türkiye, 425-431. 2005
10. Hunt CD. *Dietary Boron: An Overview of the Evidence for Its Role in Immune Function*. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine, 16:291–306,2003
11. Green Fact. *Scientific facts on boron*. IPCS.1998
12. Moseman RF. *Chemical disposition of boron in animals and humans*. Environ Health Perspect; 102: 113-117. 1994
13. Murray FJ. *A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans*. Biol Trace Elem Res. 66(1-3):331-41. 1998

14. WHO (World Health Organization). *Environmental health criteria 204: boron. International programme on chemical safety*, Geneva, Switzerland. ISBN 92.4.157204 3, pp. 105–106. 1998
15. U.S. EPA. *Toxicological Review of Boron and Compounds in Support of Summary Information on Integrated Risk Information (IRIS)*. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC. 2004
16. Warrington K. *The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants*. *Ann Bot*; 37: 629-642. 1923
17. Hunt CD. Dietary boron modified the effects of magnesium and molybdenum on mineral metabolism in the cholecalciferol deficient chick. *Biol Trace Elem Res* ; 22:201-220. 1989
18. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, testosterone, metabolism in postmenopausal women. *Faseb J*; 1: 394-397. 1987
19. WHO (World Health Organization). *Trace Elements in Human Nutrition And Health.*, Geneva; pp 175- 182. 1996
20. Chellan P, Sadler PJ. *The elements of life and medicines*. *Phil. Trans. R. Soc. A* 373: 20140182. 2015
21. Brown PH, Bellaloui N, Wimmer MA, Bassil ES, Ruiz J, Hu H, Pfeffer H, Dannel F, Romheld V. *Boron in plant biology*, *Plant Biol.* 4, 203–223.2002
22. Bolaños L, Esteban E, Lorenzo C, Fernández-Pascual C, Felipe MR, Gárate A, et al. *Essentiality of boron for symbiotic dinitrogen fixation in pea (Pisum sativum)–Rhizobium nodules*, *Plant Physiol.* 104, 85–90. 1994
23. Redondo-Nieto M, *Boron and Calcium Relationship in Rhizobium– Legumes Symbioses*, Ph.D. Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 2002.
24. Stokinger HE. *The halogens and the nonmetals, boron and silicon*. In clayton GD, clayton FE, eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*, 2B, 3rd rev. Ed. New York, NY, John wiley, 1981.
25. Litovitz TL, Klein-Schwartz W, Oderda GM, Schmitz, BF. *Clinical manifestation of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions*. *Am J Emerg ed.*, 6, 209-213. 1988

26. Şaylı, BS. *İnsan Sağlığı ve Bor Mineralleri*, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eti Holding Araştırma Projeleri. 2000
27. Duydu Y, Başaran N, Üstündağ A, Aydın S, Ündeğer Ü, Ataman OY. *Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey*. Arch Toxicol.; 85:589–600. 2011
28. Kocatürk PA. *Rat Testis Dokusu Üzerine Akut Borik Asit Uygulamasının 181 Fizyopatolojik ve Histopatolojik Etkileri*. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara. 1998.
29. N.T.P.. *Toxicology and carcinogenesis studies of boric acid in B6C3F1 mice (feed studies)*. Research Triangle Park, North Carolina, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. 1987
30. Cantürk M. *Borun Etkileri*. TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi. 2002
31. Devirian TA, Volpe SL. *The physiological effects of dietary boron*. Crit Rev Food Sci Nutr.;43(2):219-31. Review. PubMed PMID: 12705642. 2003
32. Nielsen FH. *The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron*. Biol Trace Elem Res.;66(1-3):319-30. 1998
33. Nielsen FH. *Is boron nutritionally relevant?*. Nutrition Reviews.66(4):183-91. 2008
34. Hunt CD, Idso JP. *Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress*. J. Trace Elements Exp. Med. 12, 221–233. 1999
35. Kohno J, Kawahata T, Otake T, Morimoto M, Mori H, Ueba N, Nishio M, Kinumaki A, Komatsubara S, Kawashima K. *Boromycin, an anti-HIV antibiotic*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60, 1036–1037. 1996
36. Armstrong TA, Spears JW, Lloyd KE. *Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts*. J. Anim. Sci., 79: 1549–1556. 2001
37. Fry RS, Lloyd KE, Jacobi SK, Siciliano PD, Robarge WP, Spears JW. *Effect of dietary boron on immune function in growing beef steers*. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).;94(3):273-9. 2010

38. Demirer S, Kara MI, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S. *Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats*. Arch Oral Biol ; 57:60-65. 2012
39. Jin E, Ren M, Liu W, Liang S, Hu Q, Gu Y, Li S. *Effect of Boron on Thymic Cytokine Expression, Hormone Secretion, Antioxidant Functions, Cell Proliferation, and Apoptosis Potential via the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 Signaling Pathway*. J Agric Food Chem ;65(51):11280-11291. 2017
40. Adams J, Kauffman M, *Development of the proteasome inhibitor velcade*, Cancer Investigation, 22, 304-311. 2004
41. Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, et al. *Dietary boron intake and prostate cancer risk*. Oncol Rep.;11(4):887–892. 2004
42. Korkmaz M. *Boron İnsan Sağlığına Etkisi*, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa. 2007
43. Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE. *Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid*. Prostate; 54:44–49. 2003
44. Barranco WT, Hudak PF, Eckhert CD. *Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States)*. Cancer Causes Control; 18:71–7. 2007
45. Henderson K, Stella Jr, SL, Kobylewski S, Eckhert CD. *Receptor activated Ca²⁺ release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells*. Plos One, Vol. 4, No. 6, pp. 1-10. 2009
46. Cantürk Z, *Bor bileşiklerinin lösemi hücrelerine venormal lenfositlere olan etkisinin hücrekültüründe ve transmission (geçirimli) elektron mikroskopunda incelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmüno-Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir. 2007
47. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR. *Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women*. Am J Epidemiol 167, 1070-1080, 2008.

48. Ornat ST, Konuk M. *BNCT (Boron Neutron Capture Therapy) ile Kanser Tedavisi*. II. Uluslararası Bor Sempozyumu Kitabı, sf 549-551. 2005
49. Kim YJ, Yoon WK, Ryu SY, Chun KJ. *Histopathological changes of testes and eyes by neutron irradiation with boron compounds in mice*. J. Vet. Sci., 7(1), 19–23. 2006
50. Kamida A, Fujita Y, Kato I, Iwai S, Ono K, Suzuki M, Sakurai Y, Yura, Y, *Effect of neutron capture therapy on the cell cycle of human squamous cell carcinoma cells*, Int. J. Radiat. Biol., 84, 191 – 199. 2008
51. Penland JG, *Dietary boron, brain function and cognitive performance*, Environ Health Perspect. 102, 7:65-72 .1994
52. Nielsen FH, Penland JG. *Boron deprivation alters rat behavior and brain mineral composition differently when fish oil instead of safflower oil is the diet* source. Nutr Neurosci;9:105–12. 2006
53. Çolak S, Geyikoğlu F, Keleş ON, Türkez H, Topal A, Ünal B. *The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride- induced neurotoxicity*. Toxicology and Industrial Health. 8: 700-10. 2011
54. Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Hazman O. *Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats*. Drug Chem Toxicol; 38: 391-9. 2015
55. Nielsen FH, Mullen LM, Gallagher SK. *Effect of boron depletion and repletion on blood indicators of calcium status in humans fed a magnesium- low diet*. J Trace Elem Exp Med; 3: 45-54. 1990
56. Naghii MR, Samman S. *The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects*. Biol Trace Elem Res; 56: 273-86. 1997
57. Pan HB, Zhao XL, Zhang X, Zhang KB, Li LC, Li ZY, et al. *Strontium borate glass: potential biomaterial for bone regeneration*. J R Soc Interface ; 7: 1025-31. 2010
58. Naghii MR, Mofid M, *Elevation of biosynthesis of endogenous 17-B oestradiol by boron supplementation: One possible role of dietary boron consumption in humans*, Journal of Nutritional & Environmental Medicine; 17, 127–135. 2008

59. İnce S, Kucukkurt İ, Cigerci İH, Fidan AF, Eryavuz A, *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, 24, 161–164. 2010
60. Kucukkurt I, Ince S, Demirel HH, Turkmen R, Akbel E, Celik Y. *The effects of boron on arsenic-induced lipid peroxidation and antioxidant status in male and female rats*. J Biochem Mol Toxicol; 29: 564-71. 2015
61. Kucukkurt I, Akbel E, Karabag F, Ince S. *The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats*. Toxicol Ind Health; 31: 255-60. 2015
62. Geden MJ, Deshmukh M, *Axon degeneration: context defines distinct pathways*, Curr Opin Neurobiol. ; 39: 108–115. 2016
63. Richardson PM, McGuinness UM, Aguayo AJ, *Axons from CNS neurons regenerate into PNS grafts*. Nature 284:264–265. 1980
64. Cajal R. *Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system*. New York: Oxford University Press. 1991
65. Richardson PM, Issa VM, *Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones*. Nature 309:791–793. 1984
66. Neumann S, Woolf CJ. *Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury*. Neuron 23:83–91. 1999
67. Fu SY, Gordon T. *The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration*. Mol Neurobiol.;14(1-2):67-116. 1997
68. Öztürk G, Cengiz N, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK, Yenidünya E, Aysit N. *Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 39(4), 362–376. 2013
69. Gallo G. *Myosin II activity is required for severing-induced axon retraction in vitro*. Exp Neurol; 189: 112–21. 2004
70. Altıntaş MÖ. *In Vitro Amiloid-Beta Toksikite Modelinde Boraks ve Borik Asidin Eksozomal Protein İçeriğine Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı. 2018

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35948
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/10/2017

Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Bor İçeren Bileşiklerin Nörodejenerasyona Olan Olası Etkilerinin İn Vitro Aksotomi Modelinde Araştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09.10.2017 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 6F3608C8X9 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacak Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacak Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
06/10/2017	63		Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY

“Bor İçeren Bileşiklerin Nörodejenerasyona Olan Olası Etkilerinin İn Vitro Aksotomi Modelinde Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “ Oybirliği ” ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

ADI	CENNET SENA	SOYADI	PARLATAN
------------	-------------	---------------	----------

Eğitim Düzeyi

	MEZUN OLDUĞU KURUMUN ADI	MEZUNİYET YILI
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Konya Meram Anadolu Lisesi	2011

Yabancı Dil

Yabancı Dil	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu

Yökdil	63
--------	----

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES	83,96314	70,00354	82,58333

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım Bilgisi
Microsoft Office Programları	İyi