



**FORMALDEHİT KULLANILARAK DENEYSEL OKSİDATİF STRES
OLUŞTURULAN A549 AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNE FARKLI
DOZLARDA UYGULANAN BOR'UN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Proje No: 15.SAĞ.BİL.12

**Damla ARSLAN ACARÖZ
VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR
Afyon Kocatepe Üniversitesi**

2017-AFYONKARAHİSAR

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FORMALDEHİT KULLANILARAK DENEYSEL OKSİDATİF STRES
OLUŞTURULAN A549 AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNE FARKLI
DOZLARDA UYGULANAN BOR'UN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI

Damla ARSLAN ACARÖZ

VETERİNER BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 15.SAĞ.BİL.12 proje numarası ile desteklenmiştir

Tez No: 2017-002

2017- AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/05/2017



Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR

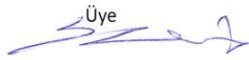
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye





Doç. Dr. Metin ERDOĞAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Dr. Funda KARABAĞ ÇOBAN

Uşak Üniversitesi

Üye



Yrd. Doç. Dr. Ayşe ÖZDEMİR

Uşak Üniversitesi

Üye



Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Damla ARSLAN ACARÖZ'ün "Formaldehit Kullanılarak Deneysel Oksidatif Stres Oluşturulan A549 Akciğer Epitel Hücrelerine Farklı Dozlarda Uygulanan Bor'un Koruyucu Etkinliğinin Biyokimyasal ve Moleküler Biyoloji Teknikleri ile Araştırılması" başlıklı tezi 24.05.2017 günü saat 16:00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Nalan BAYŞU SÖZBİLİR başta olmak üzere tecrübeleri ile bu süreçte bana yol gösteren tez izleme komitemdeki saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Sefa ÇELİK ve Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bilgi ve desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Sinan İNCE, Doç. Dr. İsmail KÜÇÜKKURT, Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ, Yrd. Doç. Dr. Fahriye ZEMHERİ ve Vet. Hek. Halil Ozancan ARSLAN'a teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim canım babam Bülent ARSLAN ve annem Nuray ARSLAN'a, tezim boyunca sonsuz sabır gösteren ve her zaman yanımda olan eşim Ulaş ACARÖZ'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle...

Ayrıca tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Serbest Radikaller.....	4
1.2 Başlıca Serbest Oksijen Türleri.....	6
1.2.1 Süperoksit Radikali (O ₂ ⁻).....	6
1.2.2 Hidroksil Radikali (•OH).....	6
1.2.3 Hidrojen Peroksit.....	7
1.3 Serbest Radikallerin Kaynakları.....	8
1.4 Serbest Radikallerin Etkileri.....	8
1.4.1 Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	8
1.4.2 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	10
1.4.3 Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri.....	11
1.4.4 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	12

1.5	Formaldehit.....	13
1.5.1	Formaldehit'in Genel Özellikleri.....	13
1.5.2	Formaldehit Metabolizması.....	13
1.5.3	Formaldehitin Toksik Etkisi.....	14
1.6	Bor Elementi.....	14
1.6.1	Bor Elementinin Özellikleri.....	14
1.6.2	Bor Bileşiklerinin Kullanım Alanları.....	15
1.6.3	Bor'un Emilimi, Dağılımı ve Atılımı.....	16
1.7	A549 Akciğer Epitel Hücre Hattı.....	16
1.8	Kurulan Hipotezler ve Tezin Amacı.....	17
2.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
2.1	GEREÇLER.....	19
2.1.1	Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler.....	19
2.1.2	Hücre Materyali.....	22
2.2.	YÖNTEM.....	22
2.2.1	Hücre Kültürü Öncesi Sterilizasyon.....	22
2.2.2	ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometri).....	22
2.2.3	Hücre Kültürü Ortamı ve İnkübasyonlar.....	23
2.2.4	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamaları.....	23
2.2.5	MTT Hücre Canlılık Testi.....	24
2.2.6	Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	25

2.2.7	Hücre Lizatlarında MDA Ölçümü.....	25
2.2.8	Hücre Lizatlarında GSH Ölçümü.....	26
2.2.9	Hücre Lizatlarında SOD Aktivitesinin Ölçümü.....	27
2.2.10	Hücre Lizatlarında CAT Aktivitesinin Ölçümü.....	29
2.2.11	Medyumda NO Ölçümü.....	30
2.2.12	Hücre Lizatlarında Protein Konsantrasyon Ölçümü.....	30
2.2.13	RNA İzolasyonu.....	32
2.2.13.1	RNA'ların Kalite Kontrolü.....	32
2.2.13.2	DNaz Uygulaması.....	33
2.2.14	cDNA Eldesi.....	33
2.2.15	Primer Tasarımı ve Real-Time PCR.....	34
2.2.16	Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
2.2.17	İstatistiksel Analiz.....	36
3.	BULGULAR.....	37
3.1	ICP-MS ile Bor Analizi.....	37
3.2	Hücre Canlılık Bulguları ve Uygulamalardan Sonra Hücrelerin Mikroskopik Görünümleri.....	37
3.3	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında MDA Düzeyine Etkileri.....	40
3.4	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında GSH Düzeyine Etkileri.....	41

3.5	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	43
3.6	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında CAT Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	44
3.7	Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Medyum NO Düzeyine Etkileri.....	46
3.8	Real-Time PCR ile Tnf- α Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	47
3.9	Real-Time PCR ile NF κ B Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	49
3.10	Real-Time PCR ile Bcl-XL Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri.....	50
3.11	Real-Time PCR ile Kaspaz-3 Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri....	52
4.	TARTIŞMA.....	54
5.	SONUÇ.....	65
	ÖZET.....	66
	ABSTRACT.....	68
	KAYNAKLAR.....	70
	ÖZGEÇMİŞ.....	91

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAT	Katalaz
cDNA	Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit
Ct	Eşik Döngü
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medyum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Dezoksinükleotittrifosfat
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
LPO	Lipid Peroksidasyon
MDA	Malondialdehit
MTT	3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromit
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NFκB	Nükleer Faktör Kappa Beta
NO	Nitrik Oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
O ₂ ^{•-}	Süperoksit Radikali
O ₂	Singlet Oksijen
O ₃	Ozon

•OH	Hidroksil Radikali
TAE	Tris Asetik Asit Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
Tnf- α	Tümör Nekroz Faktör Alfa



ŞEKİLLER

Sayfa

- Şekil 3.1.** A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi..... 38
- Şekil 3.2.** A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit uygulanan oksidatif stres oluşturulan hücrelerde borik asitin farklı dozlardaki etkisi (A) Kontrol grubunu, (B) Formaldehit grubunu, (C) B2,5 grubunu, (D) B5 grubunu, (E) B10 grubunu, (F) Formaldehit + B2,5 grubunu, (G) Formaldehit + B5 grubunu (H) Formaldehit + B10 uygulanan gruplar..... 39
- Şekil 3.3.** A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin MDA düzeylerine etkisi..... 40
- Şekil 3.4.** A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin GSH düzeylerine etkisi..... 42
- Şekil 3.5.** A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin SOD aktivitesi üzerine etkisi..... 43

Şekil 3.6. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin CAT aktivitesine etkisi.....	45
Şekil 3.7. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NO düzeyine etkisi.....	46
Şekil 3.8. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Tnf-α gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	48
Şekil 3.9. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NFκB gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	49
Şekil 3.10. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Bcl-XL gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	51
Şekil 3.11. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	52
Şekil 3.12. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda borik asit uygulaması sonucu Tnf-α, NFκB, Bcl-XL, kaspaz-3 ve β-aktin genlerinin ekspresyon düzeylerinin jel-elektroforez görüntüsü.....	53

TABLULAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. Oksijenin indirgenmesi ve sonuçta oluşan oksijen türleri.....	7
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar.....	19
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler.....	20
Tablo 2.3. Çalışmada oluşturulan gruplar.....	23
Tablo 2.4. Oligonükleotid primer dizileri.....	34
Tablo 2.5. Çalışılan genlere ait PCR koşulları.....	35
Tablo 3.1. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin hücre canlılığı üzerine etkisinin % olarak ifadesi.....	38
Tablo 3.2. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin MDA düzeylerine etkisi.....	41
Tablo 3.3. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin GSH düzeylerine etkisi.....	42
Tablo 3.4. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin SOD aktivitesi üzerine etkisi.....	44

Tablo 3.5. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin CAT aktivitesi üzerine etkisi.....	45
Tablo 3.6. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NO düzeyine etkisi.....	47
Tablo 3.7. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Tnf-α gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	48
Tablo 3.8. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NFκB gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	50
Tablo 3.9. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Bcl-XL gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	51
Tablo 3.10. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B-10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyine etkisi.....	53

1. GİRİŞ

Aerobik organizmalarda, oksijen kullanımına bağı olarak %1-2 oranında reaktif oksijen metabolitleri meydana gelmektedir (Burçak ve Andican, 2004; Evans ve Cooke, 2004). Moleküler oksijen, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen ve hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi reaktif ara ürünler meydana getirdiği için toksik etki göstermektedir. Moleküler oksijenin indirgenmesiyle oluşan bu ürünler “Reaktif Oksijen Türleri” (ROS: Reactive Oxygen Species) olarak isimlendirilmektedir (Dworakowski ve ark., 2006; Pham-Huy ve ark., 2008). ROS organizmada hücre dışında, mitokondriyal solunum zincirinde (hücre içinde) ve özellikle fagositler tarafından da oluşturulmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2005). Bunların yanı sıra çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonlarında da ROS oluşmakta ve prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanların lehine kaymasına yol açmaktadır (Kopani ve ark., 2006; Cooke ve ark., 2003; Burçak ve Andican, 2004). Vücutta savunma mekanizması olarak gelişen endojen antioksidanlar ile ROS ürünleri arasında bir denge vardır (Kopani ve ark., 2006). Diğer bir deyişle oksidatif stres, ROS ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) antioksidan sistemin karşılayabileceğinden fazla üretilmesi ya da vücuda dışarıdan alınması durumunda oksidan-antioksidan dengenin oksidan sistemin lehine değişmesi durumunda ortaya çıkmaktadır (Mercan, 2004; Serafini ve Del Rio, 2004; Henricks ve Nijkamp, 2001). Ancak endojen antioksidanların yetersiz kalması halinde dengenin serbest radikaller lehine kayması “Oksidatif Stres” olarak adlandırılmaktadır (Kopani ve ark., 2006). Oksidatif stres çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vererek hücrelerde birçok yapısal bozukluklara neden olmaktadır (Kopani ve ark., 2006; Cooke ve ark., 2003; Burçak ve Andican, 2004).

Serbest radikaller canlı hücrelerde normal hücresel metabolizma sırasında veya yüksek sıcaklık, UV ışınları, terapötik ajanlar, sigara dumanı, zararlı gazlar ve ozmotik stres gibi dışsal kaynaklar tarafından üretilmektedir. Bunun yanı sıra

makrofaj gibi vücut savunma hücreleri ve epitel hücreler tarafından da ROS üretilmektedir (Barnes, 2003; Croteau ve Bohr, 1997; Elliott ve ark., 2000; Mandavilli ve ark., 2002; Bohr, 2002).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşturabileceği hasarları ortadan kaldırarak veya en aza indirerek, radikal oluşum mekanizmalarını önleyerek, üretilen radikalleri süpürerek, hücre veya dokularda oluşan tahribatı onararak; hücre, doku ve vücut savunmasını sağlamaktadırlar (Gutteridge, 1995). Oksidatif stres belirli bir dereceye kadar tolere edilebilmekte ve oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki denge tekrar oluşturulabilmektedir (Halliwell, 2011). Tolerans sınırının aşılması durumunda DNA ve proteinlerde hasarlar ile birlikte lipid peroksidasyonu kapsayan şiddetli hücre metabolizma bozuklukları gelişebilmektedir. Bu bozukluklar, hücre hasarından hücre ölümüne ya da doku hasarına kadar değişebilmektedir (Durackova, 2010). Oksidatif stresin yangı, arteriosklerozis, yaşlanma, hipertansiyon, mutagenез, karsinogenез, immünolojik, ürolojik, nörolojik hastalıklar, göz, sindirim sistemi, deri, karaciğer ve akciğer hastalıklarının patogeneğinde ve ilerlemesinde rolü olduğu ortaya konmuştur (Halliwell, 2005; Sorg, 2004; Valko ve ark., 2007).

Fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu hücrede proteinler, lipidler, karbonhidratlar, enzimler, DNA ve nükleik asitler zarar görebilmektedir (Comporti, 1993; Rich ve ark., 2000; Büyükkokuroğlu ve ark., 2001; Nordberg ve Arner, 2001; Moldovan ve Moldovan, 2004; Sorg, 2004; Damien ve ark., 2004).

Formaldehit günlük yaşamımızda iç içe olduğumuz, oldukça zehirli ve ister istemez maruz kaldığımız kimyasal bir maddedir (Canbilen ve ark., 1999; Pabst, 1987; Zararsız ve ark., 2004; Takahashi ve Hashimoto, 2001). Bu kimyasal aldehit grubunda yer alan ve oldukça reaktif organik bir bileşiktir (Pabst, 1987; Heck ve ark., 1990; Smith, 1992; Canbilen ve ark., 1999; Schlink ve ark., 1999; Fló-Neyret ve ark., 2001). Bulunduğu her ortamda gaz haline dönüşen formaldehit, kimyasal özellikleri nedeniyle çok yaygın kullanıma sahiptir. (Pabst, 1987; Smith, 1992; Canbilen ve ark., 1999; Schlink ve ark., 1999; Fló-Neyret ve ark., 2001). Formaldehit düşük konsantrasyonlarda (0,5 ppm) dahi solunum sistemi toksisitesine yol

açmaktadır (Smith, 1992). Formaldehit birçok alanda endüstride, ev malzemelerinin yapımında, diş hekimliğinde kullanılan kaplamalarda ve laboratuvar malzemelerinde kullanılmaktadır. Bu alanların yanı sıra antiseptik, dezenfektan, boya, inşaat, plastik, tekstil, kağıt sanayisinde, seralarda, hayvancılıkta, ahşap işlemede, reçine üretiminde, tıpta ve kimyasal madde üretiminde de kullanılmaktadır. Ayrıca, proteinleri sertleştirerek çürümelerini önlediğinden biyolojik örneklerin saklanması ve mumyacılıkta da yaygın kullanıma sahip olan bir kimyasaldır. En yaygın maruziyet yolu ise sigara dumanıdır ve sigara dumanında oldukça yüksek düzeyde formaldehit bulunmaktadır. Egzos dumanında ve odunun yanması sonucunda da bol miktarda formaldehit açığa çıkmaktadır. (Pabst, 1987; Smith, 1992; Canbilen ve ark., 1999; Schlink ve ark., 1999; Fló-Neyret ve ark., 2001). Formaldehit enzimatik olmayan yolla RNA, DNA, protein ve doymamış yağ asitleri ile birleşme eğilimindedir. Bu birleşme sonucunda allerjik reaksiyonlar, sitotoksik, mutajenik, genotoksik ve kanserojenik etkiler göstermektedir (Smith, 1992).

Bor, nükleer, cam, seramik, ilaç, deterjan, tarım ve gübre sanayinden otomobil sanayisine kadar 400'den fazla alanda kullanılmakta olan, kullanım alanları her geçen gün artan bir elementtir. Mevcut kullanım alanları göz önüne alındığında bor dünyanın en stratejik madeni konumundadır (Çalık, 2002; Türkez, 2007a). Türkiye dünya bor rezervlerinin yaklaşık %60-70'ine sahiptir (Velioğlu ve ark., 1999; Velioğlu ve Şimşek, 2003).

Yeni yapılan araştırmalarla borun insan sağlığı için önemli bir element olduğu gösterilmektedir (Chapin ve ark., 1997; Nielsen, 1997; Samman ve ark., 1998; Bronner, 2008; Hakkı ve ark., 2010; İnce ve ark., 2010, İnce ve ark., 2012). Özellikle kemik ve dişlerin yapısında bulunan bor; kalsiyum, fosfor ve magnezyum absorpsiyonunda rol almaktadır. Dolayısıyla kemik sağlığı açısından önemli bir elementtir. Nitekim günlük bor takviyesinin osteoporoz tedavisinde etkili olduğu belirlenmiştir (Nielsen, 1997). Yapılan bir başka çalışmada koroner kalp hastalıklarına iyi geldiği ifade edilmektedir (Samman ve ark., 1998). Bunun yanı sıra D vitamini metabolizması için önemli olduğu bilinmekle beraber eklem iltihabı,

depresyon, halsizlik ve bazı sinir hastalıklarının tedavisinde de bor aktif olarak kullanılmaktadır (Chapin ve ark., 1997; Bronner, 2008; Hakkı ve ark., 2010).

Bu tez çalışmasında formaldehit ile oksidatif stres oluşturulan akciğer hücrelerinde borun biyokimyasal parametrelere ve gen ekspresyon düzeylerine etkileri belirlenerek literatürlerdeki boşluğun giderilmesi amaçlanmıştır.

1.1 Serbest Radikaller

Neredeyse tüm elektronlar, elektron çifti halinde bulunmaktadır ve elektron çiftleri oldukça kararlı yapıya sahiptir. İki elektron bir bağın yapısına girebilir ancak bir bağ koptuğunda ya elektronların ikisi de bir atoma katılır ve oluşan atom bir iyon olur ya da biri bir atomda, diğeri de diğeri atomda kalacak şekilde ayrılırlar. Eğer elektron çifti ayrılırsa serbest radikaller meydana gelir. Bir diğeri ifadeyle, dış orbitallerinde ortaklanmamış (eşlenmemiş) elektron taşıyan, atom veya moleküllere “serbest radikal” denilmektedir (Valko ve ark., 2004). Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya birden fazla ortaklanmamış elektron bulunduran reaktif molekül veya atomlardır (Merican, 2004). Serbest radikallerin reaktif özelliği karşı spin yönünün bir elektron kazanma isteği sonucunda meydana gelmektedir (Deaton ve Marlin, 2003).

Serbest radikallerde bulunan eşlenmemiş elektronu belirtmek için üst kısımlarına bir nokta ($X\bullet$) işareti konulur. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabileceği gibi çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır (Gutteridge, 1995).

Serbest radikaller; ROS, RNS ve diğeri reaktifler olarak üç gruba ayrılır (Sorg, 2004). Oksijenden oluşan radikaller biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikallerdir. Bunlar; hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$), süperoksit radikali ($\text{O}_2\bullet^-$), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (O_2) ve ozondur (O_3) (Peet, 2012). Serbest radikaller, oldukça kısa ömürlü ve reaktif özellik gösterirler. Elektriksel olarak; pozitif, negatif

ve nötral yüklere sahiptir (Castaner ve ark., 1990). Yüksek enerjiye sahip olan bu elektronlar oldukça reaktif özellik göstererek tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilmekte ve biyomoleküllerin fonksiyonlarını yitirmesine neden olmaktadır. Bu nedenle serbest radikaller tehlikelidir (Uysal, 1998; Yalçın, 1992).

Koroner kalp hastalığı, diyabet, hipertansiyon, bazı göz ve deri hastalıklarında, romatoid artrit ve kanserde serbest radikallerin arttığı, buna karşın antioksidan savunmada görev alan mekanizmalarının ise yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Ahsan ve ark., 2003; Okçu ve Keleş, 2009). Ancak bazı durumlarda az miktarda serbest radikal oluşumu organizmaya yararlı olabilmektedir. Serbest radikallerin belirli miktarlarda üretimi bağışıklık sisteminde, kimyasal reaksiyonların seyrinde, hücrel sinyal iletiminde ve enzim aktivasyonlarında rol oynamaktadır (Banarjee ve ark., 2003). Ayrıca, mikroorganizmaların öldürülmesinde (nötrofillerin oksijen radikalleri aracılığıyla bakterileri öldürmesi) (Sorg, 2004; Nordberg ve Arner, 2001) ve düz kas tonusunun ayarlanmasında da serbest radikaller önemli bir yere sahiptir (Banarjee ve ark., 2003).

Serbest radikaller başlıca 3 yolla oluşur. Bu yollar:

1. Kovalent bağlı molekülün bölünme sonrasında her bir parçada ortak elektronlardan birinin kalması sonucunda,
2. Radikal özelliğe sahip olmayan bir molekülün bir elektron kaybetmesi sonucu dış orbitalinde ortaklanmamış elektrona sahip olması sonucunda (Cheesman ve Slater, 1993; Wu ve Cederbaum, 2003),
3. Normal bir moleküle elektron transferi sonucu serbest radikaller meydana gelmektedir. Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikaller, genellikle elektron transferi sonucu oluşmaktadır (Cheesman ve Slater, 1993; Wu ve Cederbaum, 2003; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijen radikalleridir (Mercan, 2004).

1.2 Başlıca Serbest Oksijen Türleri

1.2.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Moleküler oksijenin dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron bulunmaktadır. Bu elektronlar paylaşılmadığında, spinleri aynı yönde ancak ayrı orbitallerde bulduklarında en düşük enerji seviyesindedir. Bu dış orbitallerin her biri birer elektron daha alabilir ve aldığı zaman süperoksit radikali oluşur (Fridovich, 1975). Oksidatif stres sonucu en çok oluşan reaktif oksijen türü süperoksit anyonudur (Erol-Dayi, 2010). Oksijen bir elektron alarak süperoksite indirgenmekte ve bu olay oksijeni kullanan hücrelerin hemen hepsinde gerçekleşebilmektedir (Halliwell, 1999; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Valko ve ark., 2007). Süperoksit grubu son derece etkindir ve hücre hasarına yol açmaktadır. Bu indirgenmede süperoksit grubuna, bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinler etki etmektedir (Mercan, 2004).

1.2.2 Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)

Hidroksil radikali son derece güçlü bir oksidan olup biyolojik sistemlerde yarılanma ömrü yaklaşık olarak 10^{-9} saniyedir. Lipidler, nükleik asitler ve proteinler dahil neredeyse bütün biyolojik molekülleri okside edebilen en toksik radikaldir (Fantel, 1996). $\cdot OH$ biyomoleküllerle güçlü reaksiyonlar meydana getirdiğinden diğer ROS'larla kıyaslandığında biyolojik sistemlerde daha fazla hasar meydana getirmektedir (Betteridge, 2000). Radikal niteliğinde olmayan H_2O_2 zayıf etkili indirgeyici bir bileşiktir. H_2O_2 geçiş metalleri (Fe^{+2} , Cu^+ , Zn , Cr , Co , Mn , Mo , Ni) varlığında Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile indirgenerek $\cdot OH$ 'a dönüşmektedir. Geçiş metalleri $\cdot OH$ oluşmasında önemli role sahiptir (Cheesman ve Slater, 1993; Lloyd ve ark., 1997; Halliwell, 1999; Sorg, 2004).

1.2.3 Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijen çevresindeki moleküllerden iki elektron alarak veya süperoksit anyonu bir elektron alarak peroksit molekülü meydana gelmektedir. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek H₂O₂'yu oluşturmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Cheesman ve Slater, 1993). H₂O₂ hidroksil ve hipokloröz asit olmak üzere birçok oksidanın oluşmasına yol açmaktadır (Deaton ve Marlin, 2003). H₂O₂; uzun ömürlü, suda iyi çözünebilen ve hücre zarlarından kolayca geçebilen bir oksidandır. H₂O₂ bir radikal olmadığı halde reaktif oksijen türlerine dahil edilmekte ve ROS biyokimyasında büyük öneme sahiptir. H₂O₂ intrasellüler iletişim molekülü olarak da görev yapmaktadır. H₂O₂, vasküler düz kas tonusu düzenleme, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi birçok sinyal iletim yolağında önemli bir sinyal molekülü ve ikincil haberci olarak hareket ettiği saptanmıştır (Reiter, 1997; Rhee, 1999; Nordberg ve Arner, 2001, Breton-Romero, 2014).

Tablo 1.1. Oksijenin indirgenmesi ve sonuçta oluşan oksijen türleri (Tabakoğlu ve Durgut, 2013)

$O_2 \cdot \rightarrow H^+ + O_2 \cdot$	Süperoksit radikali
$H_2O_2 + e \rightarrow OH^- + \cdot OH$	Hidroksil radikali
$O_2 \cdot + 2H^+ + e \rightarrow H_2O_2$	Hidrojen peroksit

1.3 Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikallerin oluşumunda endojen ve ekzojen kaynaklar rol oynamaktadır. Endojen kaynaklar; elektron transport sistemi, aktive olmuş fagositler ve otooksidasyon reaksiyonlarıdır. Ekzojen kaynaklarda ise iyonize radyasyon, güneş ışığı, hava kirliliği gibi çevresel faktörlerle birlikte ilaçlar, stres, alkol ve sigara kullanımı yer almaktadır (Song ve ark., 1997; Young ve Woodside, 2001; Kohen ve Nyska, 2002; Shadyro ve ark., 2002). Organizma ekzojen kaynaklara endojen kaynaklardan daha yüksek düzeyde maruz kalmasına karşın, endojen kaynaklar daha önemli yer tutmaktadır. Çünkü hücre içinde gerçekleşen bu maruziyet hayat boyu devam etmektedir (Kohen ve Nyska, 2002).

1.4 Serbest Radikallerin Etkileri

1.4.1 Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri

Nükleik asitler, genlerin taşıyıcısı ve protein biyosentezinde rol alan anahtar yapı taşlarıdır. Nükleik asitler içerdikleri şekerin türüne göre DNA ve RNA olarak ikiye ayrılmaktadır. Nükleik asitlerin yapısında bulunan bazlar bakımından ise purin (adenin, guanin) ve pirimidin bazları (sitozin, urasil, timin) olarak ikiye ayrılırlar. Genetik materyali DNA oluşturur, RNA ise doğrudan protein sentezine katılmaktadır (Bayşu-Sözbilir ve Bayşu, 2008). Canlılarda protein moleküllerinin, DNA ve RNA'nın temel yapıtaşları aynıdır ve aynı genetik kodu kullanırlar (Crick, 1968; Güçlü ve ark., 2014). DNA hasarı, endojen ya da ekzojen faktörler sonucu meydana gelen genetik materyaldeki değişikliklerdir (Friedberg, 1984; Kulaksız ve Sancar, 2007).

Serbest radikaller etkilerini özellikle DNA'yı oluşturan, nükleotid yapısında yer alan purin ve pirimidin bazları üzerinde gösterirler. Radikaller, DNA molekülünün yapısını değiştirmekte (özellikle guanin hidroksilasyonu sonucunda) ve DNA bazlarında geri dönüşümsüz hasar meydana getirerek hücrelerde bozukluklara,

mutasyonlar ve apoptozise yol açabilmektedir (Holley ve ark., 1993; Rich, 2000; Moldovan ve Moldovan, 2004; Valko ve ark., 2007; Peet, 2012).

Hidroksil radikali, bazlarla ve deoksiribozla kolayca reaksiyona girmektedir. Zarlardan kolayca geçebilen H₂O₂, hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücrede fonksiyon kaybına ve hatta hücre ölümüne neden olabilmektedir (Akkuş, 1995; Meram ve Aktaran, 2002; Özkan ve Fışkın, 2004). Guanin hidroksilasyonunun son ürünlerinden biri olan 8-hidroksi deoksiguanozin oksidatif stres belirteci olarak kullanılabilir (Kohen ve Nyska, 2002).

İyonize edici radyasyona maruziyet sonucu oluşan serbest radikaller DNA'yı etkilemekte ve hücrede mutasyona neden olmaktadır. Serbest radikallerin meydana getirdiği sitotoksik etki, büyük ölçüde nükleik asitlerde meydana gelen bazı modifikasyonlarından kaynaklanan kromozom değişikliklerine bağlıdır (Akkuş, 1995; Meram ve Aktaran, 2002; Özkan ve Fışkın, 2004).

Hava kirliliği içerdiği ozon, aldehid, metaller ve nitrojen oksitler nedeni ile DNA'da oksidatif hasara yol açmaktadır. Hava kirliliğine maruz kalmanın süresi ile oksidatif DNA hasarı arasında doğrusal bir oran mevcuttur (Lunec, 1998; Calderon ve ark., 1999). DNA hasarı, hücrenin yaşamı boyunca yaygın olarak görülmektedir. Bu hasar mutasyona, yaşlanmaya, kansere ve sonuçta ise hücrelerde ölüme yol açabilmektedir. Yaşam boyunca DNA hücresel metabolitlere ve ekzojen ajanlara maruz kalmaktadır. Bu değişimlerin neticesinde tek hücreli organizmalarda hücresel ölüme yol açabilmekte, çok hücreli organizmalarda ise dejenerasyon ve yaşlanma meydana gelebilmektedir (Sancar ve ark., 2004; Debeleş-Bütüner ve Kantarcı, 2006).

Hücrede DNA hasarına karşı oluşan yanıtlar:

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılmasıyla DNA hasarı onarılmaktadır. Yani DNA çift zinciri doğru bir şekilde yeniden yapılandırılır.
2. DNA hasarını kontrol eden noktaların aktivasyonu sonucu hücre döngüsünün ilerlemesi engellenmekte ve hasarlı kromozomların geçişi önlenerek hasarlı genetik materyalin tamiri sağlanmaktadır.

3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeyleri yani transkripsiyonel cevaplar hücrenin yararına olacak şekilde değişmektedir.
4. Apoptoz (programlı hücre ölümü) ile ciddi hasar görmüş hücrelerin elenmesi sağlanmaktadır (Sancar ve ark., 2004).

Oksidatif stres ve DNA hasarı; apoptozisi indükleyen önemli iki faktördür (Buttke ve Sandstrom, 1994). Mitokondri ise apoptozisin düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır (Cheung ve ark., 1986). Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi sonucu organizmada genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma meydana gelmektedir (Sancar ve ark., 2004; de Baer ve Hoeijmakers, 2000).

1.4.2 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin hepsi karbon, hidrojen, oksijen ve azot taşımaktadır. Bazı proteinler ise kükürt, fosfor, iyot, demir, bakır ve çinko gibi elementleri de bulundururlar (Bayşu-Sözbilir ve Bayşu, 2008).

Serbest radikallerin proteinlerde ne derece hasar meydana getireceği proteinin aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Serbest radikaller doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllere karşı daha yüksek reaktiviteye sahiptir. Serbest radikaller triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, sistein ve metiyonin gibi amino asitleri içeren proteinleri kolaylıkla etkilemektedir (Van Der Vliet ve ark., 1994; Davies ve Dean, 1997; Nordberg ve Arner, 2001; Netto ve ark., 2002). Özellikle prolin, histidin, arjinin, sistein ve metiyonin aminoasitleri hidroksil radikali ve oksidatif hasara oldukça duyarlıdır (Dumaswala ve ark., 1999). Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarlardan büyük ölçüde “hem” proteinleri de etkilenmektedir. Özellikle oksihemoglobin $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu methemoglobin oluşur (Rice-Evans ve ark., 1991; Brantley, 1993; Domigan ve ark., 1995; Akkuş, 1995).

Proteinler, yağ asitleri ile kıyaslandığında proteinler yağ asitlerine göre serbest radikallerden daha az etkilenirler. Fazla sayıda disülfid bağı olan albumin ve immungulobin G gibi proteinlerin ise üç boyutlu yapıları bozulmaktadır (Akkuş, 1995; Meram ve Aktaran, 2002; Khan ve Ali, 2006). Protein yapıya sahip olan enzimler de serbest radikallerden etkilenmekte ve enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir (Rice-Evans ve ark., 1991; Akkuş, 1995).

Oksidatif hasar sonucu proteinler parçalara ayrılabilir ya da kalıntıları diğer kalıntılarla çapraz reaksiyonlara girebilir. Serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı olan membran proteinleri önemli hücresel fonksiyonlarını kaybedebilmektedir (Kohen ve Nyska, 2002; Peet, 2012). Proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonuna, enzim fonksiyon kayıplarına, kontraktıl fonksiyonlarda bozulmalara, metabolit ve membran iyon transportunda aksamalara neden olmaktadır (Shacter, 2000).

1.4.3 Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikaller, karbonhidratlar üzerinde de önemli etkiler meydana getirmektedir. Monosakkaridlerin otooksidasyonu sonucu peroksit radikali, H₂O₂ ve okzoaldehit gibi ürünler meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Hyaluronik asit gözün vitröz sıvısında bol miktarda bulunmanın yanı sıra bağ dokunun dayanıklılığının sağlanmasında etkin rol oynamaktadır. Enflamatuar eklem hastalıklarında snoviyal sıvıya geçen lökositler, ekstrasellüler sıvıya H₂O₂ ve O₂ bırakırlar ve bunlar ortamdaki mukopolisakkarit yapısında olan hyalüronik asidi parçalar. Hyalüronik asitin oksidatif hasarı bağ dokuda bozulmalara, bağ doku sıvısının akışkanlığının kaybolmasına ve katarakt oluşumuna yol açmaktadır (Yarsan, 1998; Inagi ve Miyata, 1999).

1.4.4 Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Hücre membran yapısı lipid ve proteinlerden oluşmaktadır. ROS ürünleri hücre membran yapısında bulunan lipid ve proteinlerde hasar meydana getirerek hücre membran geçirgenliğini geri dönüşümsüz olarak bozmaktadır. Membranlarda meydana gelen bu bozukluklar ise normal hücresel fonksiyonların gerçekleşmesini engellemekte, doku ve organlarda işlevsel bozukluklara neden olmaktadır (Gutteridge, 1995).

Serbest radikallerden en çok etkilenen yapı membran lipidleridir (Cheesman ve Slater, 1993). Serbest radikaller hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek peroksidasyona neden olmaktadır (Freeman ve Crapo, 1982; Weiss ve Lobuglio, 1982; Halliwell ve Gutteridge, 1999; Batcioglu ve ark., 2009). Bunun sonucunda da membran akışkanlığında bozulma ve permeabilite değişiklikleri meydana gelmektedir (Kavas, 1989).

Peroksidasyon, bir metilen grubundaki bir hidrojen atomunu yerinden çıkaran herhangi bir radikal tarafından başlatılabilir. Peroksil radikalini oluşturmak için oksijen karbon radikaline eklenir ve diğer lipid molekülünden bir hidrojen atomu çıkararak lipid hidrosili oluşmasına yol açar. Yeniden bu düzenleme ile endoperoksitler malondialdehit (MDA)'in asıl kaynağını oluşturmaktadır (Sinclair ve ark., 1990; Erenel ve ark., 1992). Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA, hücrede çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu meydana gelmektedir (Porter, 1984; Placer ve ark., 1990; Gawel ve ark., 2004). Hücre membranlarında iyon alışverişine etki eden MDA bileşiklerin çapraz şekilde bağlanmasına yol açmaktadır. Bu ise enzim aktivitelerinin ve iyon geçirgenliğinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara yol açmaktadır (Porter, 1984; Niki, 1987; Moslen, 1994). Ayrıca DNA nitrojen bazları ile reaksiyona girerek genotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilere yol açabilmektedir (Porter, 1984; Placer ve ark., 1990).

1.5 Formaldehit

1.5.1 Formaldehit'in Genel Özellikleri

Formaldehit, CH_2O kimyasal formülüne sahip aldehit ailesinin en basit üyesidir. Kuvvetli elektrofilik özelliğe sahip oldukça reaktif bir kimyasal olan formaldehit oda sıcaklığında hızla gaz haline geçebilen, suda çok iyi çözünen, yanabilen, keskin kokulu ve renksiz bir bileşiktir. (Smith, 1992; Mao ve Vannice, 1995; Shaham ve ark., 1996). Molekül ağırlığı 30, erime noktası -92°C ve kaynama noktası ise -21°C 'dir. Formaldehit oda sıcaklığında ve bulunduğu her ortamda aşırı reaktif olduğu için kolaylıkla gaz haline dönüşebilmektedir. Polimerize olan katı haline paraformaldehit, %37'lik sıvı çözeltisine ise formalin adı verilir. Sıvı formaldehitin miktarı ml, gaz hali ise ppm olarak ifade edilir (Smith, 1992; Feron ve ark., 1991).

1.5.2 Formaldehit Metabolizması

Formaldehit, vücuda başlıca solunum, deri ve sindirim yoluyla alınmaktadır (Feron ve ark., 1991; Rumchev ve ark., 2002). Formaldehit vücuda alındıktan sonra eritrositlerde ve karaciğerde bulunan formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizörlüğü ile formik aside metabolize edilir. Bu reaksiyonda glutatyon kofaktör olarak görev alır. Vücutta depo edilmeyen formaldehit feçes ve idrar yoluyla veya karbondioksite okside olarak solunumla vücuttan atılır (Zararsız ve ark., 2004). Ayrıca tüm memelilerde görülen normal bir metabolittir. Vücutta pürin, timidin ve bazı aminoasitlerin biyosentezi için gereklidir (Pontel ve ark., 2015).

1.5.3 Formaldehitin Toksik Etkisi

Formaldehit suda çözünen bir bileşik olması nedeniyle dokulara hızlı bir şekilde nüfuz edebilir. Bununla birlikte protein ve nükleik asit gibi farklı makromoleküllerle reaksiyona girerek DNA-DNA, protein-DNA ve protein-protein çapraz bağlanmalarına yol açmaktadır (Metz ve ark., 2004; Merk ve Speit, 1998; Solomon ve Varshavsky, 1985). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı formaldehiti insanlar için karsinojen olarak sınıflandırmıştır (IARC, 2006).

1.6 Bor Elementi

1.6.1 Bor Elementinin Özellikleri

Bor elementi periyodik tabloda “B” sembolüyle gösterilen, 3A grubunda yer alan, atom ağırlığı 10,81 g/mol, yoğunluğu 2,84 g/cm³, atom numarası 5 ve ergime noktası 2300 °C olan bu element yer kabuğunun bileşiminde bulunmaktadır. Bor, doğada elemental formda bulunmaz her zaman oksijen ve diğer elementlerle birlikte bulunur (Kemp, 1956, Moore, 1997). Tabiatta 230 çeşit bor minerali bulunmaktadır. Bor içeren minerallere borat ismi verilmektedir (Kemp, 1956; Yenmez, 2009). Ayrıca bu element metal ile ametal arası, yarı iletken özelliklere sahiptir (Suarez ve ark., 1985; Demirtaş, 2010). Bor, amin gruplarının azotu ile kovalent bağ oluşturabilmekte (Goldbach ve Wimmer, 2007), polisakkaridler, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit ve piridin nükleotidleri gibi önemli biyolojik maddeler ile etkileşime geçebilmektedir (Samman ve ark., 1998). Yüksek sıcaklıklarda dehidre olmadığı sürece borik asit, borik oksit ve sodyum borat gibi borat bileşikleri kararlı yapıya sahiptir (Boron,1998; Kot, 2009). Bor elementini biyolojik ve jeokimyasal yapılarda analiz etmek için birçok teknik kullanılmaktadır. Ancak boru iz element düzeyinde tespit etmek için sadece birkaç teknik duyarlılık göstermektedir (Thellier ve ark., 2001). Bor konsantrasyonunu belirlemek için spektrofotometrik ve plazma kaynağı olan spektrometrik metotlar yaygın kullanıma sahiptir (Sah ve Brown, 1997a; Sah ve Brown, 1997b).

Ülkemiz bor kaynağı bakımından dünyada birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'deki bor yatakları Balıkesir, Bursa, Eskişehir ve Kütahya il sınırları içerisinde yer almaktadır. Bu bölge dünyadaki bor rezervinin %60-70'ine sahiptir. Ülkemizi, sırasıyla ABD, Arjantin, Peru, Rusya ve Çin izlemektedir. Üretim açısından ise ülkemiz bor üreten ülkeler içerisinde ikinci sırada yer almakta ve üretimin tamamına yakın kısmı işlendikten sonra ihraç edilmektedir (Velioğlu ve ark., 1999; Velioğlu ve Şimşek, 2003, Anonim, 2008).

Bor, birçok bitkide bulunan, eseri miktarda alınan ve metabolizma için oldukça gerekli bir elementtir. Bor doğrudan proton verici özelliğe sahip olup bu özelliği sayesinde hücre zar yapısına ve fonksiyonlarına etki ederek canlı sistemlere katkıda bulunmaktadır (Zeki, 1985; Türkez ve ark., 2007a). İnsan sağlığı bakımından borun temel kaynağını bitkisel içerikli ürünler oluşturmaktadır (Gezmen-Karadağ ve Türközü, 2014). Son yıllara kadar borun sadece bitkiler için gerekli temel element olduğu bilinmekteydi, ancak son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde bu elementin insanlar için de gerekli olduğu belirlenmiştir. Hatta bazı patolojik durumlarda ve hastalıklarda bor takviyesinin tedavi açısından faydalı olabileceğini ifade eden birçok çalışma da mevcuttur (Türkez ve ark., 2007b; İnce ve ark., 2010).

Şu ana kadar metabolizmada borun iki olası mekanizmayla etki edebileceğinden bahsedilmiştir. Birincisi, "bor"un hücre membranında transmembran sinyalin oluşumunda ve iyonların hücre membranından geçişinde, ikinci olarak da çeşitli enzimatik sistemlerde metabolik düzenleyici olarak rol alabileceği vurgulanmıştır (Hunt ve Idso, 1999; Nielsen, 1997).

1.6.2 Bor Bileşiklerinin Kullanım Alanları

Bor; bakteri, maya ve küflere karşı bakteriyostatik, bakteriosidal, fungistatik ve fungisidal özelliklerinden dolayı antibakteriyel ve antifungal madde olarak

kullanmak üzere ilaç endüstrisinin ilgi alanı haline gelmiştir (Van Slyke ve ark., 1981).

Borun insan sağlığı için önemli bir element olduğu yapılan yeni araştırmalarla gösterilmeye başlanmıştır. Magnezyum, kalsiyum ve fosfor'un, D vitamini metabolizması için önemli olduğu bilinmekle beraber osteoporoz, eklem iltihabı, depresyon, halsizlik, bazı sinir hastalıkları gibi şikayetlerin tedavisinde de bor aktif olarak kullanılmaktadır (Nielsen ve ark., 1987; Chapin ve ark., 1997; Şaylı ve ark., 2007; Bronner, 2008; Hakkı ve ark., 2010).

1.6.3 Bor'un Emilimi, Dağılımı ve Atılımı

İnsanlar bor elementini yiyeceklerle, solunumla, ve deri yoluyla almaktadır (Yeşilbağ, 2008). Deride herhangi bir yara olmadığı takdirde deri yoluyla bor emilimi, ihmal edilebilir düzeydedir. Organizmaya alınan bor (boraks ve borik asit) bağırsaklar tarafından çok hızlı bir şekilde emilmekte ve pasif difüzyonla tüm vücuda dağıtılmaktadır (Murray, 1998; Usuda, 1998). Anyonik iz element olduğu için diğer elementler gibi bor da idrar, feçes, ter ve solunum yoluyla atılır. 21 saatten daha kısa yarı ömre sahip olan borun tamamına yakın kısmı (%90-95) metabolize edilmeden idrarla dışarı atılmaktadır (Naghii ve Samman, 1997; Moseman, 1994; Gezmen-Karadağ ve Türközü, 2014). Yumuşak dokuda birikim göstermeyen bor çok düşük seviyelerde kemikte birikim göstermektedir (Moseman, 1994; Gezmen-Karadağ ve Türközü, 2014).

1.7 A549 Akciğer Epitel Hücre Hattı

A549 hücreleri D.J. Giard ve arkadaşları tarafından 1972 yılında Orta Asya'lı 58 yaşında bir erkeğin akciğer karsinoma dokusundan izole edilmiştir (Giard ve ark., 1973). İzole edilen bu hücreler 1000 jenerasyon boyunca kültüre edilmiş ve bu

hücrelerin ölümsüz olduğu sonucuna varılmıştır (Lieber ve ark., 1976). İki tip alveoler hücre vardır. Tip I alveollerin iç yüzeyinin %96'sını kaplamaktadır ve *in vitro* ortamda üretilmesi zordur. Tip II ise daha az yüzey kaplar ve birçok fonksiyona sahiptir. Ayrıca tip II hücreler, tip I hücrelerinin ata hücreleridir. İnsan alveoler karsinoma hücrelerden köken alan A549 akciğer hücreleri tip II alveoler hücre fenotipi ile eşleşmekle birlikte, insan primer alveoler epitel hücrelerinin sahip olduğu birçok karakteristiğe de sahiptir (Fang ve Aust, 1997; Shimizu ve ark., 2004). Bu nedenle sadece akciğer kanser modellerinde değil aynı zamanda insan alveoler epitelyal hücrelerin *in vitro* çalışmalarında da model olarak yaygın bir kullanıma sahiptir (Lieber ve ark., 1976; Mazzearella ve ark., 2007; Tian ve ark., 2009; Wang ve ark., 2009; Shin ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, A549 hücrelerinin yüksek oranda desatüre yağ asitleri ile birlikte lesitin sentezledikleri gösterilmiştir (Lieber ve ark.,1976; Nardone ve Andrews, 1979). Hücreler tek yüzeyde yapışarak çoğalır ve ikiye katlanma zamanı yaklaşık olarak 22 saattir (Ichihara ve ark., 2015).

1.8 Kurulan Hipotezler ve Tezin Amacı

Hipotez 1: Bor, formaldehit ile indüklenen oksidatif stresi azaltarak etki yapıyor olabilir.

Hücre lizatlarında oksidatif stres parametrelerinden nitrik oksit (NO), MDA, glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) seviyeleri analiz edildi. Bu hipotezi oluşturmamıza neden olan çıkış noktası formaldehitin oksidatif hasar oluşturması ve borun antioksidan etki göstermesidir.

Hipotez 2: Formaldehitin oluşturduğu hasarın azaltılması/minimize edilmesi açısından bor inflamasyon, apoptotik veya antiapoptotik mekanizmaları etkileyerek koruyucu veya tedavi edici rol oynuyor olabilir.

Bu hipotezin doğruluğunu veya yanlışlığını ortaya koyabilmek adına formaldehitin oluşturduğu hasar moleküler metotlarla belirlendi. Bununla birlikte oluşan hasarın azaltılmasında olası hangi moleküler mekanizmaların etkili olabileceğini belirlemek için inflamatuvar sitokinlerden Tnf- α ve NF κ B'nin, apoptoz ilişkili proteinlerden Bcl-XL ve kaspaz-3'ün mRNA ekspresyon düzeyleri Real-Time PCR ile belirlendi.

Tezin Amacı

A549 akciğer hücrelerinde formaldehit ile oluşturulan oksidatif strese borun etkisini belirlemek amacıyla, kontrol, sadece formaldehit (100 μ M) uygulanan, sadece borik asitin 2,5; 5 ve 10 mM dozlarda uygulandığı gruplarla birlikte formaldehit (100 μ M) + borik asitin 2,5; 5 ve 10 mM dozlarda uygulandığı toplam 8 grup oluşturuldu. Hücreler medyum ile 2,5; 5 ve 10 mM dozlarda 12 saat süreyle borik asit ve daha sonra 4 saat süreyle 100 μ M formaldehit inkübasyonuna bırakıldı. Hücre lizatı ve medyumunu elde edildikten sonra bu hücrelerde MTT, MDA, GSH, SOD, CAT, NO düzeyleri, bunlara ilaveten oluşan inflamasyonda bor kaynağı olarak borik asitin etkisini belirlemek amacıyla Tnf- α , kaspaz-3, Bcl-XL ve NF κ B genlerinin mRNA ekspresyon düzeylerinin moleküler olarak incelenmesi amaçlandı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 GEREÇLER

2.1.1 Kullanılan Ekipman ve Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 2.1’de, sarf malzemeler ise Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan cihazlar

Buzdolabı	Beko, D9470 NME, Eskişehir, Türkiye
Buz makinası	Uğur Soğutma Makinaları, Buzal 60, Türkiye
CO ₂ ’li Etüv	Thermo Scientific, Forma Direct Heat, Ohio, Amerika
ELISA Pleyt Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan GoVantaa, Finlandiya
Hassas Terazı	Sartorius, CF323 S, Almanya
ICP-MS	Agilent 7700x ICP-MS, Kaliforniya, Amerika
Mikro Pipet Seti	Thermo Scientific Finnpipet, Waltham, Amerika
Mikrosantrifüj	Thermo Scientific, Mikromax RF, Amerika
Qubit 2.0 Floresan Spektrometre	Invitrogen, Kaliforniya, Amerika
Real-Time PCR	Agilent Technology, Stratagene Mx3005P, Santa Clara, Amerika
Santrifüj	Nüve NF 800R, Ankara, Türkiye
Spektrofotometre	Shimadzu 1601 UV-VIS, Tokyo, Japonya
Steril Güvenlik Kabini (Sınıf 2)	Thermo Scientific, MSC 1.2 Advantage, Langenselbold, Almanya
Termal PCR Cihazı (Thermal Cycler)	Thermo Fisher Scientific, Veriti, Singapur

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Sarf Malzeme	Marka/Katalog Numarası
2-Merkaptoetanol	Merck, 8057400250
5,5'-Ditiyobis 2-Nitrobenzoik Asit	Sigma, D218200
8'li Real-Time PCR Tüpü	Greiner Bio-One, 673210
Agaroz	Merck, 1.01236.0100
Amonyum Sülfat	Fluka, 09980
Borik Asit	Sigma, B6768
Complete Tabletes, Mini Easypack	Roche, 04 693 124 001
CuCl ₂	Sigma, 7447-39-4
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma, D2650
DNaz-I	Thermo Scientific, EN0521
Dulbecco's Modified Eagle's Medyum	Sigma, D5671
EDTA	Sigma, E6758
Etanol	Merck, 1009832500
Formaldehit	Sigma, 47608
Fötal Buzağı Serum (FBS)	Sigma, F9665
Gene Ruler 50bp Marker Plus	Thermo Scientific, SM1191
Genejet RNA Purifikasyon Kit	Thermo Scientific, K0731
H ₂ O ₂	Sigma, 18304
Hanks' Balanced Solüsyonu	Thermo Scientific, Lsg-88284
HCl	Riedel-de Haen, 07102
HEPES Tampon	Sigma, H0887
KCl	Fischer Scientific, 7447-40-7
KH ₂ PO ₄	Merck, 1.04871
Ksantin	Sigma, X7375
Ksantin Oksidaz	Sigma, X1875
L-Glutamin	Sigma, G7513
Loading Dye	Thermo Scientific, R1161
Maxima SYBR Green QPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu	Thermo Scientific, K0252
Metafosforik Asit	Sigma, 04103
Na ₂ CO ₃	Sigma, 222321
Nükleaz İçermeyen Su	Ambion, AM9938
Na ₂ HPO ₄	Sigma, 04276
NaCl	Sigma, 13423

NaOH	Merck, 1.06462.1000
N-Bütanol	Sigma, 537993
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, N5514
PCR Tüpü	Axygen, 321-10-551
Penisilin-Streptomisin	Sigma, P4333
Piridin	Merck, 1.07463.0500
Qubit® RNA HS Assay Kit	Thermo Scientific, Q32852
Redsafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu	Intronbio, 21141
Revertaid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kiti	Thermo Scientific, K1632
Sığır Serum Albumini	Sigma, 05470
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck, 8.17034.1000
Sodyum Pirüvat	Sigma, S8636
Sodyum Tungstat	Fluka, 72069
Sodyum-Molibdat	Merck, 1.06521.0100
Steril Falcon Tüp - Santrifüj - P.P - Vida Kapaklı-50 ml - DNA/RNA Free	Isolab, 078.02.008
Steril Filtreli Pipet Ucu 0,5-10µl	Axygen, TF-300-R-S
Steril Filtreli Pipet Ucu 2-100µl	Axygen, TF-100-R-S
Steril Filtreli Pipet Ucu 50-1000µl	Axygen, TF-1000-R-S
Şırınga Filtresi	Sartorius, 16534k
T25 Steril Flasklar	TPP, 90026
T75 Steril Flasklar	TPP, 90076
TAE Tampon	Merck, 1.06023.1000
Tiyobarbitürik Asit	Sigma, 5500
Tripsin-EDTA	Sigma, T3924
Triton X-100	Sigma, T8787
LiSO ₄	Fluka, 62613
Vanadium Klorid	Sigma, 208272
Sülfanilamid	Sigma, S9251

2.1.2 Hücre Materyali

Araştırmada kullanılan insan akciğer alveoler bazal epitel hücreleri (A549) Dr. J. Mazella (CNRS, Valbonne, France)'dan temin edilmiştir.

2.2 YÖNTEM

2.2.1 Hücre Kültürü Öncesi Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır olarak bulunan steril medyumlar ticari firmalardan sağlandı. 0,22 µm pora sahip filtreler kullanılarak tüm sıvı maddeler süzülerek steril edildi. İnkubasyonlar sonrasında elde edilen hücrelerden hazırlanan lizat ve medyum örneklerinde aşağıda açıklanan metotlar kullanılarak ilgili parametrelerin analizleri yapıldı.

2.2.2 ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometri)

ICP (indüktif eşleşmiş plazma) ve MS (kütle spektrometresi) iki ayrı cihazdır. Birleştirilip tek bir cihaz haline getirilen ICP-MS, farklı yapıların eser element analizinde kullanılan yüksek hassaslıkta ve özgünlükte, aynı anda pek çok ağır metalin hızlı tayinini sağlayan, eş zamanlı çoklu element analizlerine imkan tanıyan atomik seviyede ölçüm yapabilen analitik bir tekniktir (Jenner ve ark., 1990; Rao ve Talluri 2007; Zhang ve ark. 2011; Deveci, 2012; Thomas, 2013). Bu teknik gıda, çevre, jeolojik, biyomedikal ve nükleer alandaki çalışmalarda uygulama alanı bulmaktadır (Jenner ve ark., 1990; Nardi ve ark., 2009). ICP-MS bor izotop oranlarını belirleme yeteneğine sahip olup, biyolojik çalışmalar için uygun bir metottur (Sah ve Brown,1997a).

Kullanılan Dulbecco's Modified Eagle Medyum (DMEM)'un bor içeriği Agilent 7700x ICP-MS cihazı ile analiz edilerek bor miktarının deteksiyon limiti (0,001 µg/L)'nin altında olduğu tespit edilmiştir.

2.2.3 Hücre Kültürü Ortamı ve İnkübasyonlar

Akciğer hücre hattı %10 oranında ısı ile inaktif edilmiş fötal sığır serumu ve 100 IU/ml penisilin/streptomisin içeren DMEM besi medyumunda 37 °C, %5 CO₂'li steril inkübatörde inkübe edildi. Hücrelerin çoğaltılması için yaklaşık 1x10⁶/ml sayıda hücre 20 ml medyum bulunan 75 cm² steril flaska (kültür kabına) konarak iki günde bir medyum değiştirilerek inkübasyona bırakıldı. Çalışma için yeterli sayıya ulaşan flasklar her grupta 3 adet olacak şekilde toplam 8 gruba ayrıldı.

2.2.4 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamaları

Tablo 2.3. Çalışmada Oluşturulan Gruplar

Deney Grupları	Yapılan Uygulamalar
Grup 1	Kontrol Grubu
Grup 2	Formaldehit Grubu (DMEM Medyumda 100 µM)
Grup 3	2,5 mM Borik Asit
Grup 4	5 mM Borik Asit
Grup 5	10 mM Borik Asit
Grup 6	Formaldehit (DMEM Medyumda 100 µM)+2,5 mM Borik Asit
Grup 7	Formaldehit (DMEM Medyumda 100 µM)+5 mM Borik Asit
Grup 8	Formaldehit (DMEM Medyumda 100 µM)+10 mM Borik Asit

Formaldehit ve borik asitin uygulandığı gruplarda önce borik asit uygulaması yapıldı ve 12 saat inkübasyona bırakıldı. Borik asit inkübasyonundan sonra 4 saat süresince hücreler formaldehite maruz bırakılarak çalışma gerçekleştirildi.

2.2.5 MTT Hücre Canlılık Testi

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) yöntemi, hücre topluluğunda bulunan ve mitokondriyal aktivitesi devam eden canlı hücrelerin kantitatif saptanmasında kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemin temel prensibi, mitokondriyal enzim süksinat-dehidrojenazın MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazon tuzu oluşturmasıdır (McGahon ve ark., 1995; Scinto ve Daffner, 2000). Sarı renkli MTT çözeltisi hücre mitokondrisinde, mitokondriyal dehidrojenaz enzimi ile mor renkli çözünmeyen formazan kristallerine canlı hücrelerin mitokondrileri aracılığı ile dönüştürülmektedir. Oluşan bu formazan DMSO gibi bir çözücü yardımı ile çözünür hale getirilerek oluşan renk, spektrofotometrik olarak okunarak sayısal olarak ifade edilir (Mosman, 1983; Denizot ve Lang, 1986). Mor renkte boyanan hücreler canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış olanlardır, boyanmayanlar ise ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş olan hücrelerdir (Yaka ve ark., 2006). Buna bağılı olarak oluşan mor formazan kristallerinin yoğunluğu, ortamda bulunan hücrelerin canlılığı ve hücreysel aktivitesi hakkında bilgi vermektedir. 12 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerinde inkübe edilen hücreler uygun düzeyde zemini kapladıktan sonra borik asit ve formaldehit uygulamaları uygulandı sonra renk değışimi, mikropleyt okuyucuda 540 nm dalga boyu ile belirlendi. Herhangi bir şey uygulanmayan kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilerek deney gruplarındaki hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edildi.

2.2.6 Biyokimyasal Analizler İçin Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Çalışmanın her aşamasında sterilizasyona azami özen gösterildi. İnkübasyonlar sonrası hücreleri yapışmış olduğu flask zemininden kaldırmak için flasklara tripsin (1ml %0,25) eklenerek çok kısa süre sonra hafif çırpma hareketleri ile hücreler serbest bırakıldı. Süspansiyonlar pipet aracılığı ile toplanarak kapaklı tüpler içerisinde 25°C, 400 g devirde 5 dk süreyle santrifüj edilerek pelet elde edildi. Hücre peleti PBS ile yıkandıktan sonra (tekrar santrifüj) üzerine hücre lizis tamponu eklendi. Lizis tampon şu karışımdan oluşmuştur: 50 mM HEPES tampon pH 7,2; %1 Triton X-100 (v/v), 100 mM NaH₂PO₄·2H₂O, %8 oranında proteaz inhibitör kokteyli (aprotinin, PMSF, leupeptin, NaF). Deterjanda çözünmeyen proteinler 12000 g, 4°C'de 10 dk süreyle santrifüj ile uzaklaştırılarak süpernatant elde edildi. Elde edilen süpernatant yeni bir ependorfa alınarak -20°C'de saklandı. Her bir çalışma grubundaki 3 bağımsız deneye 3'er ölçüm yapıldı (n=9) ve elde edilen veriler uygun istatistik metod ile analiz edildi.

2.2.7 Hücre Lizatlarında MDA Ölçümü

Lipid peroksidasyon (LPO) için önemli bir belirteç olan MDA serbest radikaller sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerindedir ve ölçümü Ohkawa ve ark. (1979)'nın metoduyla belirlendi. Metodun prensibi MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu sonucu ortaya çıkan rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Bu rengin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçülür. Sonuçta MDA konsantrasyonu, MDA-TBA kompleksinin absorbans katsayısıyla hesaplanarak lizatta nmol/g protein olarak ifade edildi.

MDA tayininde kullanılan çözeltiler:

- 50 mM KH₂PO₄: 3.4 g KH₂PO₄ 500 ml'ye tamamlandı.
- SDS çözeltisi: %8,1 lik SDS 2,02 g SDS 250 ml dH₂O'da çözdürüldü.
- Glasiyel asetik asit: %20'lik glasiyel asetik asit 500 ml hazırlandı.

- %0,8'lik TBA: TBA önce 1 g NaOH 500 ml dH₂O'da çözdürüldü ve 4 g TBA 500 ml'lik NaOH çözeltisinde çözdürüldü.
- N-butanol pirin karışımı: 750 ml n-butanol, 50 ml piridinle karıştırıldı.

Uygulanan metod:

- 0,2 ml hücre lizatı bir tüpe kondu. Üzerine 1,5 ml %0,8'lik TBA, 1,5 ml %20'lik glasiyel asetik asit, 0,2 ml %8,1 lik SDS ve 0,6 ml dH₂O ilave edilerek karıştırıldı.
- 1 saat 95 °C de kaynatılarak ardından hemen soğutuldu.
- Üzerine 1 ml dH₂O+5 ml n-butanol piridin ilave edildi ve karıştırıldı.
- 4000 rpm' de 10 dk santifuj edildi ve üstteki organik kısım atılarak pembe renkli kısmın 532 nm'de absorbansı ölçüldü.

2.2.8 Hücre Lizatlarında GSH Ölçümü

5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit [DTNB; 3-karboksi-4-nitrofenil disülfid; Elman Ayırıcı] sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girdiğinde sarı renkli kompleks bir disülfid bileşiği oluşturur. GSH miktarını belirlemek için bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm'de okunur (Beutler ve ark., 1963). GSH tayini aşağıdaki metotla gerçekleştirildi.

Kullanılan Çözeltiler:

- Çöktürücü: 5 g metafosforik asit + 1 g EDTA + 90 g NaCl 300 ml dH₂O'da çözdürüldü.
- Fosfat çözeltisinde 0,3 M Na₂HPO₄: 40,02 g Na₂HPO₄.7H₂O 500 ml dH₂O'da çözdürüldü.
- DTNB: 40 mg DTNB 100 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisiyle çözdürüldü.
- GSH standardı: 10 mg GSH, 25 ml dH₂O' da çözdürüldü.

Uygulanan metod:

- Standart tüpünde doku homojenizati yerine 0,2 ml GSH standardı kullanıldı.
- Kör tüpüne 2 ml distile su + 3 ml çöktürücü konarak adi süzgeç kağıdından filtre edildi.
- Kör: 2 ml distile su+ 3 ml çöktürücü; Standart: 0,2 ml GSH Standardı+ 1,8 ml dH₂O + 3ml çöktürücü iyice karıştırıldı.
- 0,2 ml doku homojenizati ya da hemolizat alındı.
- Üzerine 3 ml çöktürücü ilave edilerek, karıştırıldı. 5 dk beklenildikten sonra adi süzgeç kağıdından süzüldü.
- 2 ml filtrat başka bir tüpe alındı, üzerine 8 ml fosfat pamponu (ya da 1 ml filtrat + 4 ml fosfat tamponu), 0,5 ml DTNB ayırıcı katılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 412 nm'de 10 dk içerisinde değerlendirildi ve lizatta nmol/g protein olarak ifade edildi.

2.2.9 Hücre Lizatlarında SOD Aktivitesinin Ölçümü

Reaksiyonun meydana geldiği ortamda, enzimatik bir tepkime ile süperoksit grupları ortaya çıkmaktadır. Örnekte bulunan SOD'un, ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) ile indirgemesinin engellenmesi prensibine dayanmaktadır. Süperoksit grupları ile ksantin oksidaz reaksiyona girmekte 560 nm'de en yüksek absorbans veren formazonu oluşturmaktadır. Ortama ilave edilen ksantin oksidazın, üretilen grupları dismutasyona uğratması ile NBT indirgeme tepkimesi yavaşlamakta ve okunan absorbans değerleri düşmektedir. SOD aktivitesi, formazon oluşumunun baskılanması belirlenerek dolaylı olarak tespit edilmektedir (Sun ve ark., 1988).

Kullanılan çözeltiler:

- Ksantin stok çözeltisi (3 mmol/L): 23 mg ksantin, 50 ml'lik bir balon joje içinde 5 ml 0,1 N NaOH ile hafifçe ısıtılarak çözdürüldü ve dH₂O ile 50 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman 10 kez sulandırılarak kullanıldı.

- PBS: 0,2 g KH_2PO_4 , 0,201 g KCl , 8,06 g NaCl ve 12,636 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 L dH_2O 'da çözdürüldü ve pH'sı 7,4'e ayarlandı.
- NBT çözeltisi (150 mmol/L): 12,3 mg NBT dH_2O ile çözdürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- EDTA çözeltisi (0,6 mmol/L): 0,249 g EDTA (dihidrat) dH_2O ile çözdürüldü ve 1 L'ye tamamlandı.
- Na_2CO_3 çözeltisi (400 $\mu\text{mol/L}$): 4,2 g Na_2CO_3 dH_2O ile çözdürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- Sığır albümini çözeltisi (1g/L): 100 mg sığır albümini dH_2O ile çözdürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.
- Ksantin oksidaz enzim çözeltisi: 20 U/ml aktiviteye sahip enzim çözeltisinden 20 μmol alınarak 2 ml 2 M amonyum sülfat çözeltisi ile karıştırıldı.
- CuCl_2 (0,8 mmol/L): 10,7 mg CuCl_2 dH_2O ile çözdürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Reaktif karışımı: 20 tüplük analiz için 10 ml EDTA çözeltisi, 20 ml 10 kez sulandırılan ksantin stok çözeltisi, 6 ml Na_2CO_3 çözeltisi, 10 ml NBT çözeltisi ve 3 ml sığır albümini çözeltisi eklendikten sonra iyice karıştırıldı.

Uygulanan metod: son hacim 3 ml olacak şekilde test ve kör tüplerine aşağıdaki belirtilen sırayla çözeltiler ilave edildi.

- Test ve kör tüplerine 2,45 ml reaktif karışımı ilave edildi.
- Test tüpüne 0,5 ml numune, kör tüpüne ise 0,5 ml dH_2O ilave edildi.
- 50 μl ksantin oksidaz bütün tüplere ilave edildi ve karıştırıldı.
- 20 °C su banyosunda 20 dk süresince inkübe edildi.
- İnkübasyon süresinin sonunda tüplere reaksiyon durdurmak için 1 ml CuCl_2 eklendi ve oluşan renk 560 nm'de okundu ve lizatta U/ μg protein olarak ifade edildi.

2.2.10 Hücre Lizatlarında CAT Aktivitesinin Ölçümü

Örnekte bulunan CAT etkisi ile H_2O_2 yıkımlanmakta ve sonuçta 240 nm'de absorbansta azalma meydana gelmektedir. Meydana gelen bu azalma hızı CAT aktivitesi ile orantılıdır (Aebi, 1974). Katalaz aktivite tayini için aşağıdaki metod uygulandı.

Kullanılan çözeltiler:

- Fosfat tamponu (1/15 milimol/L; pH=7,0): 7,268 g $Na_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 3,522 g KH_2PO_4 d H_2O 'da çözdürüldü ve 1 L'ye tamamlandı. Daha sonra pH'sı 7,0'ye ayarlandı.
- Fosfat tamponunda H_2O_2 çözeltisi (10 mm): Önce hazırlanmış olan fosfat tamponunun 100 ml'sinde %30'luk H_2O_2 çözeltisi seyreltildi. Bu seyreltilen çözeltinin 240 nm'deki absorbanı 0,5 olmalıdır. Absorbans bu değerden daha düşükse küçük miktarlarda H_2O_2 ilave edilerek absorbanın 0,5 olması sağlandı.

Uygulanan metod:

- Her numunenin çalışılmasından önce numunede bulunması olası olan ve 240 nm' de absorban verebilen maddelerin sebep olabileceği absorban değerinin artışı saptamak amacıyla kör deney hazırlandı.
- Kuvars küvete 2,95 ml fosfat tamponu konduktan sonra üzerine 50 µl numune ilave edilerek kör hazırlandı ve spektrofotometre buna göre sıfırlandı.
- Test işaretli kuvars küvete H_2O_2 çözeltisi ile hazırlanan fosfat tamponundan 2,95 ml kondu üzerine 50 µl numune eklendi. Küvetler altüst edilerek iyice karışması sağlandı ve spektrofotometreye yerleştirildi.
- Spektrofotometrede 240 nm'deki absorbanın azalması takip edildi. Absorbansın 0,45'den 0,40'a inmesi esnasında geçen süre tespit edildikten sonra süre kaydedildi.
- Tespit edilen süre kullanılarak formülden hız sabiti hesaplandı. Daha sonra

CAT enzim aktivitesi hesaplandı ve $\text{nmol dk}^{-1}/\mu\text{g}$ protein olarak ifade edildi.

2.2.11 Medyumda NO Ölçümü

İnkubasyonlar sonucu elde edilen medyumlarda NO seviyeleri ölçüldü. Biyolojik sistemlerde çok yönlü hücre içi haberci olan NO, serbest radikal özelliğine sahiptir. Nitrik oksit, parakrin etki gösteren ve enzimatik olarak arjininden sentezlenen bir moleküldür. Nitrojen merkezli bir radikal olarak bilinir. Yarı ömrü birkaç saniye olan NO kolayca serbest radikallerle birleşir. Biyolojik sistemlerde hızla nitrat (NO_3^-) ve nitrite (NO_2^-) parçalanır. Bu nedenle NO üretimi, NO'nun öncül molekülleri olan NO_2^- ve NO_3^- düzeylerinin saptanmasıyla hesaplanmaktadır.

Bu yöntem 37°C 'lik ortamda vanadium klorür'ün NO_3^- 'ı, NO_2^- 'e dönüştürmesi ve Griess Reaksiyonu ile renkli bir azo türevi oluşturması sonucunda absorbansın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. NO ölçümü Miranda ve ark. (2001) tarafından geliştirilen metoda göre ölçüldü ve medyumda $\mu\text{mol/L}$ protein ifade edildi.

2.2.12 Hücre Lizatlarında Protein Konsantrasyon Ölçümü

Dokuda çalışılacak parametrelerin sonuçlarının hesaplanmasında kullanılan total protein seviyeleri Lowry ve ark. (1951)'nin kolorimetrik metoduna dayanılarak ölçüldü. Bu yöntemde, alkali ortamda +2 değerlikli bakır iyonu proteinlerin peptid bağları ile bir kompleks oluşturması sonucunda bakır indirgenir. Proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein amino asitleri ile indirgenmiş bakır Folin-Ciocalteu reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti 660 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçülür ve protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Uygulama Basamakları ve Kullanılan Çözeltiler:

- Örnek ve standart tüplerine 1 mL protein çözeltisi konduktan sonra,

A Reaktifi: %2 Na₂CO₃ solüsyonu 0,1 N NaOH'da çözünür ve son hacim 1L'ye tamamlanarak hazırlandı.

B Reaktifi: %1 CuSO₄ ve %2 sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde karıştırıldı.

C Reaktifi: 50 hacim A çözeltisi ile 1 hacim B çözeltisi karıştırılarak hazırlandı.

- Oda sıcaklığında tüm tüplere 3 ml C reaktifi eklendikten sonra 30 dk bekletildi.

Folin-Ciocalteu reaktifi:

Sodyum - Tungstat 100 g

Sodyum – Molibdat 25 g

Distile su 700 ml

Konsatire HCl 100 ml

% 85 H₃PO₄ 50 ml ilave edilir. Solüsyon alttan kaynatılır ve üstten soğutularak 10 saat süresince kaynatıldıktan sonra;

LiSO₄ 150 g

Distile su 150 ml

Brom 1-2 damla ilave edilerek tekrar kaynatıldı.

Solüsyonun rengi altın sarısıdır ve buzdolabında saklanır. Rengi yeşilimtrak olduğunda kullanılmamalıdır. Sulandırılarak kullanılır.

Stok Folin-Ciocalteu reaktifi 1 hacim

Distile su 1,5 hacim

- 30 dk sonunda tüm tüplere 300 µl Folin-Ciocalteu reaktifi vorteksenerek eklendi.
- Oda sıcaklığında 45 dk bekletildi.

- Absorbanslar 660 nm’de köre karşı okundu.
- Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplandı ve U/ μ g olarak ifade edildi.

2.2.13 RNA İzolasyonu

RNA çalışmalarında en çok dikkat edilmesi gereken husus hasar görmemiş ve en saf haliyle RNA’nın izolasyonudur. İzolasyon sırasında en sık karşılaşılan sorun ribonükleaz (RNaz) kontaminasyonudur ve RNaz ile düşük miktardaki bir kontaminasyon sonucu RNA’nın bütün olarak elde edilmesi mümkün olmayabilir. RNaz kontaminasyonunu engellemek için bütün çözelti ve sarf malzemeleri uygun şekilde steril edilmelidir.

İzolasyon sırasında dikkat edilmesi gereken diğer bir husus ise kullanılacak çözeltiler RNaz’ın aktivitesini yok edecek DEPC su ile hazırlanmalıdır. Bunun dışında Tris DEPC’yi inaktive ettiği için Tris içeren çözeltiler DEPC ile hazırlanmamalıdır.

Yaptığımız çalışmada, inkübasyonlar sonucu deney gruplarının bulunduğu 25 cm²’lik flasklardaki medyumlar uzaklaştırıldı. Tüm deney gruplarının kültürlerinden elde edilen hücrelerin total RNA izolasyonu GeneJet RNA Purifikasyon Kiti (Thermo Scientific, K0732) kullanılarak spin kolon yöntemi ile gerçekleştirildi. RNA izolasyonu sırasında kullanılan bütün malzemeler RNAaz içermemektedir. RNA izolasyonu işleminin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

2.2.13.1 RNA’ların Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA’ların kalitesi Multiskan™ Go Mikroplate Spektrofotometresi (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) cihazıyla, RNA miktarı ise Qubit RNA Analiz

Kiti (Invitrogen, Q32852) kullanılarak Qubit 2.0 floresan spektrofotometre (Invitrogen, CA, USA) cihazı ile ölçüldü.

RNA saflığı spektrofotometrede 260 nm (OD_{260}) ve 280 nm (OD_{280}) dalga boylarındaki değerler ölçülerek belirlendi. RNA/DNA oranları (OD_{260}/OD_{280}) 1,7-2,0 aralığında olan örneklerin saflığı yüksek kabul edilip, cDNA (komplementer DNA) sentezinde kullanıldı.

2.2.13.2 DNaz Uygulaması

RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırmak amacıyla 1 µg kalıp RNA, 1 µl 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µl RNaz içermeyen DNaz I (Thermo Scientific, EN0521) eklendi ve DEPC (dietil pirokarbonat) ile toplam hacim 10 µl'ye tamamlanarak 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C'de inkübasyona bırakıldı.

2.2.14 cDNA Eldesi

Temizlenen RNA'dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Scientific, K1632) ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. Protokole göre DNaz uygulanan 10 µl RNA içeren tüpe, 1 µl 50mM EDTA eklendi ve 10 dk 65°C'de inkübe edildi. Daha sonra 1 µl Oligo (dT)₁₈ ilave edilerek ve 5 dk 65°C'de bekletildi. Sırasıyla 4 µl 5X reaksiyon solüsyonu, 1 µl RiboLock RNaz inhibitörü, 2 µl 10mM dNTP karışımı ile 1 µl RevertAid H Minus M-MuL V Revers Traskriptaz eklenerek kısa bir santrifüjden sonra 42°C'de 60dk ve 70°C'de 5 dk inkübe edildi. Sentezlenen cDNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'ye kaldırıldı.

2.2.15 Primer Tasarımı ve Real-Time PCR

Primerler her bir transkripsiyon analizi için spesifik olup, literatürdeki çalışmalar referans alınarak ve FastPCR 6.0 (Bioteknoloji Enstitüsü, Helsinki Üniversitesi) programı kullanılarak belirlenen baz dizgelerinin sentezi yaptırılarak elde edildi ve reaksiyonda yaklaşık 100 ng düzeyinde kullanıldı.

Tablo 2.4. Oligonükleotid primer dizileri.

Gen		Oligonükleotid primer dizisi
<i>β-Aktin</i>	F	CACCCCAGCCATGTACGTTGC
	R	CCGGAGTCCATCACGATGCCA
<i>Tnf-α</i>	F	GAGTGACAAGCCTGTAGCCCA
	R	GCTGGTTATCTCTCAGCTCCACG
<i>Bcl-XL</i>	F	CACATCACCCCAGGGACAGCA
	R	AAAGGCCACAATGCGACCCCA
<i>NFκB</i>	F	GGTGCGGCTCATGTTTACAGC
	R	GCGTCTGATACCACGGGTTCC
<i>Kaspaz-3</i>	F	GGAAGCGAATCAATGGACTCTGGA
	R	CCTGAGGTTTGCTGCATCGAC

Real-Time PCR sisteminde Sybr Green boyası sıklıkla kullanılan boyalardan biridir ve bu boya çift iplikcikli DNA parçasına bağlanarak elektriksel impuls ile birlikte floresan ışımaya yapar. Bu ışımaya sistemin lazer dedektörü tarafından alınarak, bilgisayar ortamında grafik formata çevrilir. Ölçülen floresansın şiddeti PCR ürününün miktarı ile doğru orantılıdır. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra Syber Green boyasından alınan ışımaya sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Elde edilen bu amplifikasyon Ct değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri Stratagene Mx3005P Real-Time PCR cihazında incelendi ve sonuçlar 2^{-4Ct} metodu ile hesaplandı (Pfaffl, 2001) ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi.

Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{denek\ grubu} - (Ct_{hedef\ gen} - Ct_{beta\ actin})_{kontrol\ grubu}$$

formülü uygulanılarak; hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak beta aktin geni kullanıldı ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

Tasarlanan her bir gen için PCR döngü sayıları ve sıcaklık değerleri Tablo 2.5'te verildi.

Tablo 2.5. Çalışılan genlere ait PCR koşulları

Gen	Başlangıç Ayrılma			Ayrılma		Yapışma		Uzama		Döngü Sayısı
	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	
β-Aktin	95	10	1	95	30	64	30	72	1	40
Kaspaz-3	95	10	1	95	30	64	30	72	1	40
NFκB	95	10	1	95	30	64	30	72	1	40
Bcl-XL	95	10	1	95	30	64	30	72	1	40
Tnf-α	95	10	1	95	30	56	30	72	1	40

2.2.16 Agaroz Jel Elektroforezi

DNA moleküllerinin ayırımı için elektroforezde yaygın olarak kullanılan destek ortamı agarozdur. Ayırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak agaroz konsantrasyonları genelde %0,3 ile 2 tercih edilmektedir. Büyük DNA parçaları için düşük, küçük olanlar için yüksek agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin ayırımı sağlanır.

Çalışmamızda Real-Time PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi. Bu amaçla %2'lik agaroz jel hazırlandı. 1g agaroz (Merck,

1.01236.0100) tartıldı ve 50 ml 1×TAE (Tris Asetat EDTA) solüsyonu (Merck, 1.06023.1000) eklendikten sonra karışım kaynatılarak agarozun çözünmesi sağlandı. Kaynatılıp soğutulan agarozu sonra 2 µl RedSafe renklendirme solüsyonu (İntron Biotechnology, 21141) eklendi. Uygun sıcaklığa getirildikten sonra kalıba döküldü. 1 saat donması beklendikten sonra cDNA örnekleri yükleme boyası (6XTriTrack™ DNA Loading Dye, Thermo Scientific, R1161) ile karıştırılarak kuyucuklara eklendi. Baz uzunluğunun kontrolü için ilk kuyucuğa Gene Ruler 50bp Marker Plus (Thermo Scientific, SM1108) eklendi ve Thermo Electron Corporatin 4000P Power Supply ile 7 V/cm 'da 1 saat koşuruldu. Örnekler jel görüntüleme ve analiz sistemi ile (Vilber Lourmat, Marine la Valeé, France) görüntülendi.

2.2.17 İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 20.0 istatistik programında tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) uygulanarak yapıldı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulandı, veriler "ortalama ± standart sapma" olarak ifade edildi ve anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edildi.

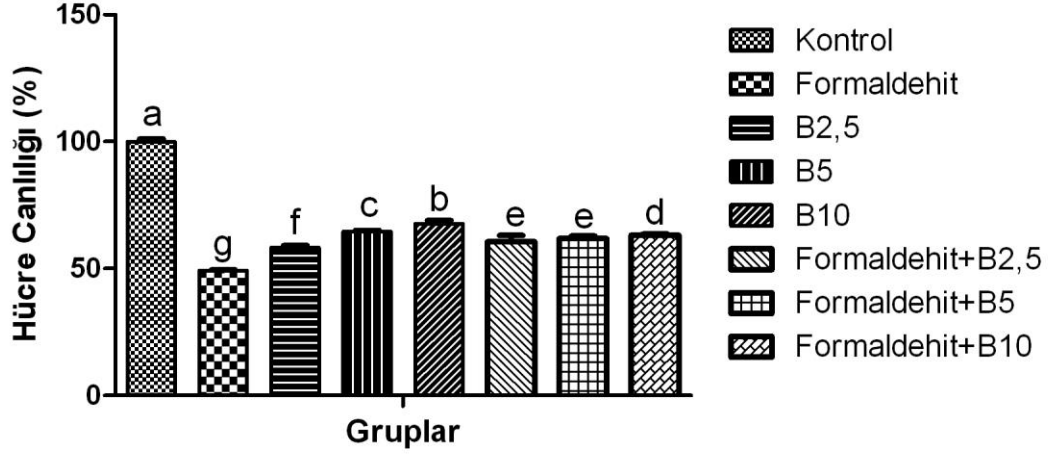
3. BULGULAR

3.1 ICP-MS ile Bor Analizi

Hücre kültürü aşamasında, A549 hücre hattının yaşatılması amacıyla kullanılan DMEM medyumda bor analizi gerçekleştirildi. Analiz neticesinde, medyumda bor miktarının tespit edilebilir limitin altında olduğu belirlendi. Bu sonuç, hücre kültür medyumunun çalışma için uygun olduğunu ve çalışmada verilen bor miktarları üzerinde ilave bir etki yapmadığını göstermektedir.

3.2 Hücre Canlılık Bulguları ve Uygulamalardan Sonra Hücrelerin Mikroskopik Görünümleri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben 100 µM formaldehit 4 saat süreyle uygulandı. Süre sonunda MTT metoduyla canlılık kontrolleri yapıldı. Herhangi bir şey uygulanmayan kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 olarak kabul edildi ve diğer grupların canlılık oranları % olarak belirlendi. Buna göre %100 olarak kabul edilen kontrol grubuna göre diğer grupların canlılık değerleri Şekil 3.1.'de gösterildi. Formaldehit grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında formaldehit grubunun hücre canlılığında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,001$). Tek başına borik asit verilen gruplarda, borik asitin kontrol grubuna göre canlılık oranlarını azalttığı buna karşın artan dozlarda borik asit uygulamasının canlılık oranını artırdığı gözlemlendi. Borik asit uygulaması ile formaldehitin canlılık yüzdesinde neden olduğu azalmanın tersine çevrildiği ve canlılık yüzdesinin arttığı görüldü. Grupların canlılık %'leri Tablo 3.1.'de ifade edildi.



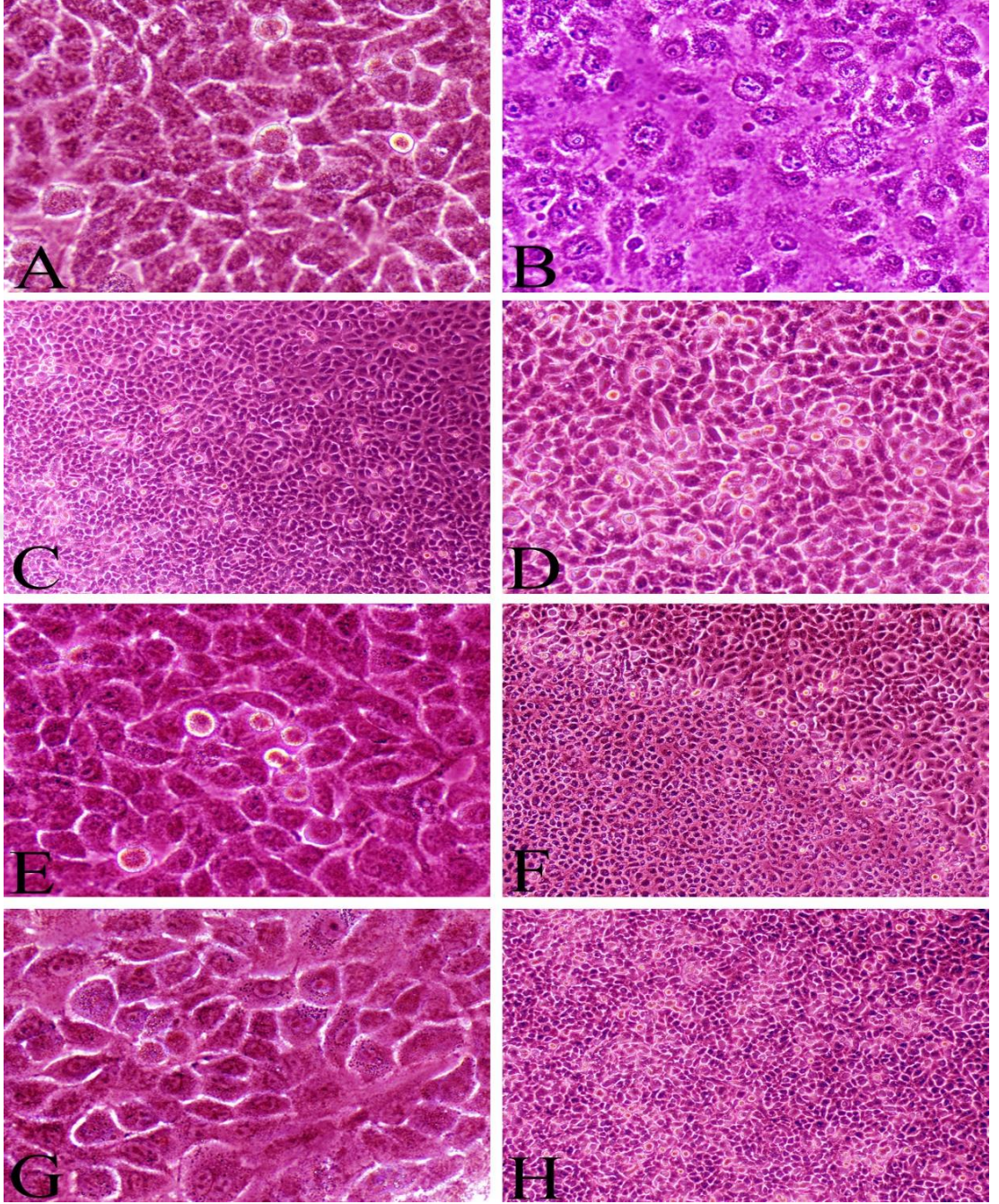
Şekil 3.1. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 μ M dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 μ M formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin hücre canlılığı üzerine etkisi.

Tablo 3.1. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 μ M dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 μ M formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin hücre canlılığı üzerine etkisinin % olarak ifadesi

GRUPLAR	MTT (% Canlılık)
Kontrol	99,99 \pm 1,04 ^a
Formaldehit	49,16 \pm 0,40 ^g
B2,5	58,28 \pm 0,81 ^f
B5	64,60 \pm 0,42 ^c
B10	67,66 \pm 1,31 ^b
Formaldehit+B2,5	60,57 \pm 2,45 ^e
Formaldehit+B5	61,77 \pm 0,99 ^e
Formaldehit+B10	63,19 \pm 0,53 ^d

Ortalama \pm standart sapma; n=9

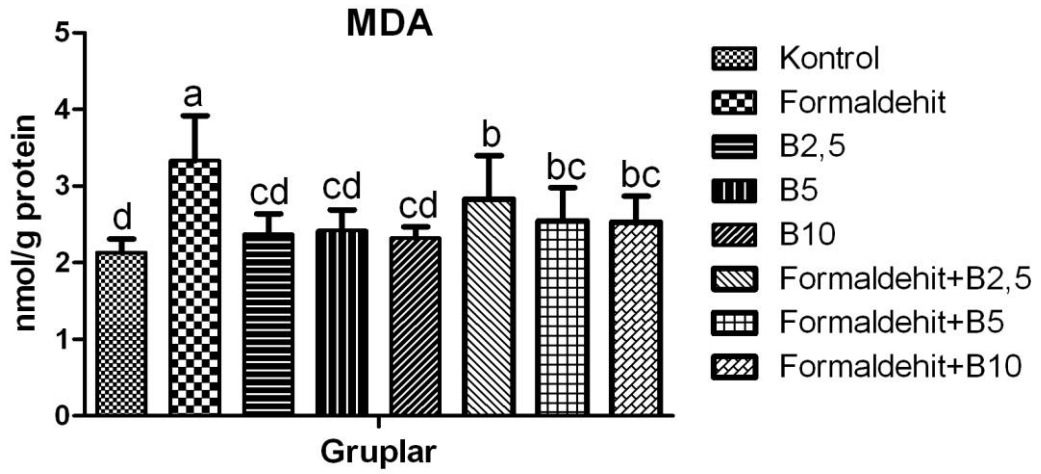
a,b,c,d,e,f,g: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir (p<0,001).



Şekil 3.2. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 μ M dozunda formaldehit uygulanan oksidatif stres oluşturulan hücrelerde borik asitin farklı dozlardaki etkisi. (A) Kontrol, (B) Formaldehit, (C) B2,5, (D) B5, (E) B10, (F) Formaldehit + B2,5, (G) Formaldehit + B5, (H) Formaldehit + B10.

3.3 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında MDA Düzeyine Etkileri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben hücrelere 100 µM dozda formaldehit uygulanarak 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Uygulamalar sonucunda elde edilen hücre lizatlarının MDA düzeyleri Tablo 3.2. ve Şekil 3.3.'te gösterildi. Buna göre tek başına formaldehit uygulamasının MDA düzeylerini artırdığı tespit edildi ($p<0,001$). Formaldehit uygulaması öncesi borik asit uygulanan hücrelerde, borik asitin artan dozuna bağlı olarak formaldehit grubu ile kıyaslandığında MDA düzeylerinde anlamlı azalma gözlemlendi ($p<0,001$). Yalnız başına borik asitin 2,5; 5 ve 10 mM uygulanması sonucunda elde edilen MDA değerleri kontrolle kıyaslandığında değişmediği tespit edildi.



Şekil 3.3. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin MDA düzeylerine etkisi.

Tablo 3.2. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin MDA düzeylerine etkisi

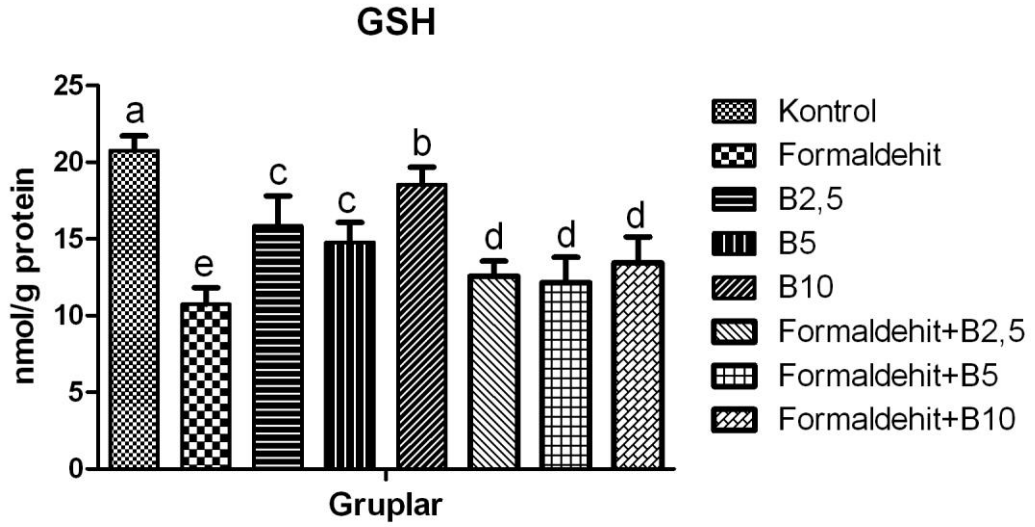
GRUPLAR	MDA (nmol/g protein)
Kontrol	2,13±0,18 ^d
Formaldehit	3,33±0,59 ^a
B2,5	2,37±0,27 ^{cd}
B5	2,42±0,27 ^{cd}
B10	2,32±0,15 ^{cd}
Formaldehit+B2,5	2,83±0,57 ^b
Formaldehit+B5	2,55±0,43 ^{bc}
Formaldehit+B10	2,53±0,34 ^{bc}

Ortalama ± standart sapma; n=9

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$).

3.4 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında GSH Düzeyine Etkileri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben hücrelere 100 µM dozda formaldehit uygulanarak 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Uygulamalar sonucunda elde edilen hücre lizatlarının GSH düzeyleri Tablo 3.3 ve Şekil 3.4'te gösterildi. Buna göre tek başına formaldehit uygulamasının GSH düzeylerini azalttığı tespit edildi ($p<0,001$). Formaldehit uygulaması öncesi borik asit uygulanan hücrelerde borik asit artan dozuna bağlı olarak GSH düzeylerinde formaldehit grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca yalnız başına borik asit 2,5; 5 ve 10 mM uygulanması sonucunda elde edilen GSH değerleri kontrolle kıyaslandığında azaldığı tespit edildi ($p<0,001$).



Şekil 3.4. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin GSH düzeylerine etkisi.

Tablo 3.3. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin GSH düzeylerine etkisi

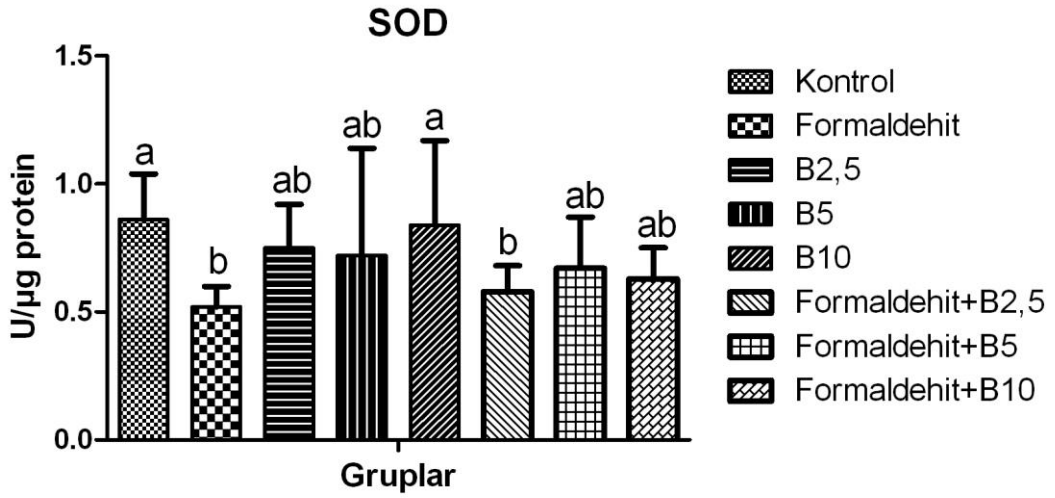
GRUPLAR	GSH (nmol/g protein)
Kontrol	20,77±0,94 ^a
Formaldehit	10,73±1,09 ^e
B2,5	15,84±1,97 ^c
B5	14,78±1,29 ^c
B10	18,53±1,14 ^b
Formaldehit+B2,5	12,57±0,99 ^d
Formaldehit+B5	12,15±1,66 ^d
Formaldehit+B10	13,45±1,68 ^d

Ortalama ± standart sapma; n=9

a,b,c,d,e: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$).

3.5 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında SOD Aktivitesi Üzerine Etkileri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben hücrelere 100 µM dozda formaldehit uygulanarak 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Uygulamalar sonucunda elde edilen hücre lizatlarının SOD düzeyleri Tablo 3.4 ve Şekilde 3.5'te gösterildi. Buna göre tek başına formaldehit uygulamasının SOD düzeylerini azalttığı tespit edildi ($p<0,05$). Formaldehit uygulaması öncesi borik asit uygulanan hücrelerde borik asit artan dozuna bağlı olarak, formaldehit grubu ile kıyaslandığında SOD düzeylerinin anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,05$). Ayrıca yalnız başına borik asitin 2,5; 5 ve 10 mM uygulanması sonucunda elde edilen SOD değerleri kontrolle kıyaslandığında değişmediği tespit edildi ($p<0,05$).



Şekil 3.5. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin SOD aktivitesi üzerine etkisi.

Tablo 3.4. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin SOD aktivitesi üzerine etkisi

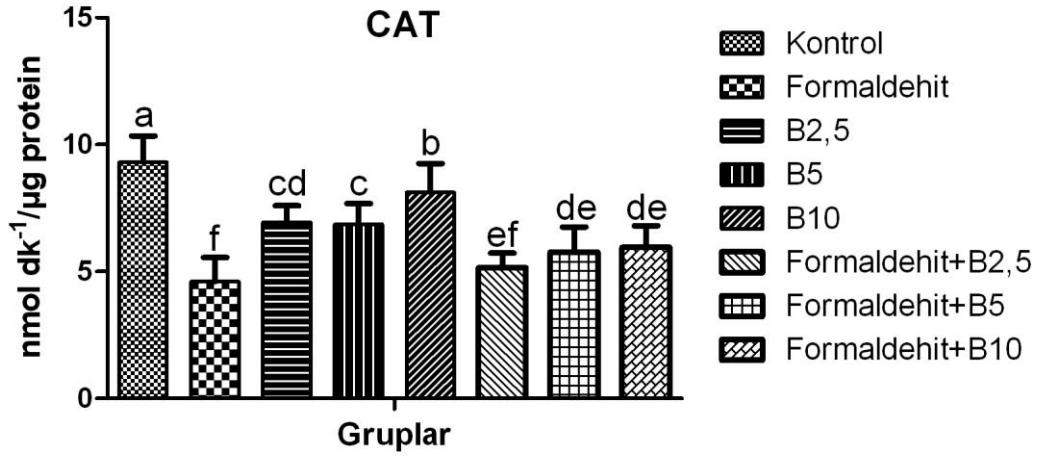
GRUPLAR	SOD (U/µg protein)
Kontrol	0,86±0,18 ^a
Formaldehit	0,52±0,08 ^b
B2,5	0,75±0,17 ^{ab}
B5	0,72±0,42 ^{ab}
B10	0,84±0,33 ^a
Formaldehit+B2,5	0,58±0,10 ^b
Formaldehit+B5	0,67±0,20 ^{ab}
Formaldehit+B10	0,63±0,12 ^{ab}

Ortalama ± standart sapma; n=9

a,b: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

3.6 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Hücre Lizatlarında CAT Aktivitesi Üzerine Etkileri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben hücrelere 100 µM dozda formaldehit uygulanarak 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Uygulamalar sonucunda elde edilen hücre lizatlarının CAT düzeyleri Tablo 3.5 ve Şekil 3.6'da gösterildi. Buna göre tek başına formaldehit uygulamasının CAT düzeylerini önemli bir şekilde azalttığı tespit edildi ($p<0,001$). Formaldehit uygulaması öncesi borik asit uygulanan hücrelerde borik asit artan dozuna bağlı olarak, formaldehit grubu ile kıyaslandığında CAT düzeylerinin arttığı belirlendi ($p<0,001$). Ayrıca yalnız başına borik asitin 2,5; 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda uygulanması sonucunda elde edilen CAT değerleri kontrolle kıyaslandığında azaldığı tespit edildi. ($p<0,001$).



Şekil 3.6. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin CAT aktivitesine etkisi.

Tablo 3.5. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin CAT aktivitesi üzerine etkisi

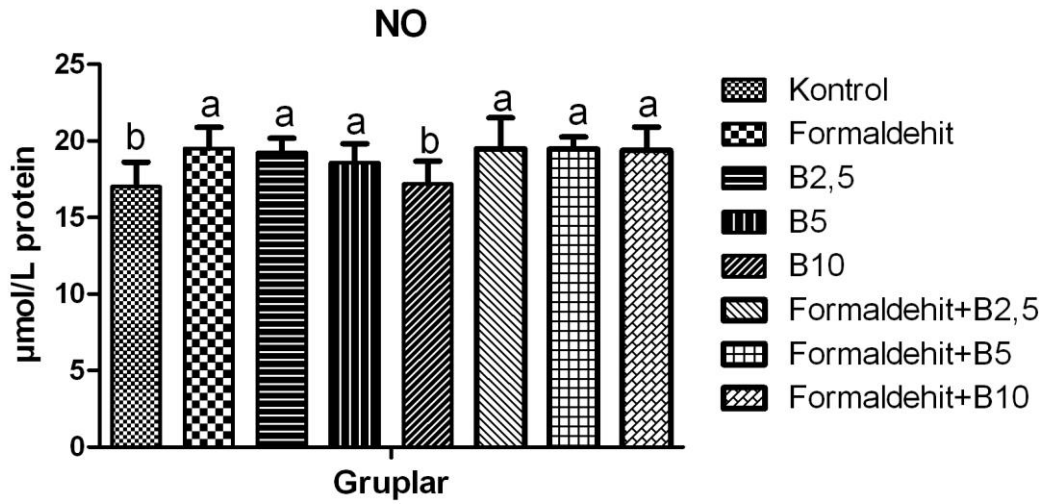
GRUPLAR	CAT (nmol dk-1/ µg protein)
Kontrol	9,31±1,03 ^a
Formaldehit	4,61±0,95 ^f
B2,5	6,95±0,64 ^{cd}
B5	6,86±0,82 ^c
B10	8,12±1,13 ^b
Formaldehit+B2,5	5,16±0,57 ^{ef}
Formaldehit+B5	5,77±0,98 ^{de}
Formaldehit+B10	5,96±0,84 ^{de}

Ortalama ± standart sapma; n=9

a,b,c,d,e,f: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,001$).

3.7 Formaldehit ve Borik Asit Uygulamalarının Medyum NO Düzeyine Etkileri

A549 akciğer epitel hücrelerine borik asitin farklı konsantrasyonları (2,5; 5 ve 10 mM) uygulanarak 12 saat inkübasyona bırakıldı. Bu inkübasyonu takiben hücrelere 100 µM dozda formaldehit uygulanarak 4 saat süreyle maruz bırakıldı. Uygulamalar sonucunda elde edilen medyum NO düzeyleri Tablo 3.6 ve Şekil 3.7’da gösterildi. Uygulamalar sonucunda medyumda ölçülen NO düzeyleri kontrolle karşılaştırıldığında borik asitin tek başına (B10 grubu hariç) ve formaldehitle birlikte uygulanması sonucunda elde edilen değerlerin anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi ($p<0,001$). B-10 grubunda ise elde edilen NO değerlerinin kontrole yakın olduğu tespit edildi.



Şekil 3.7. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NO düzeyine etkisi.

Tablo 3.6. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NO düzeyine etkisi

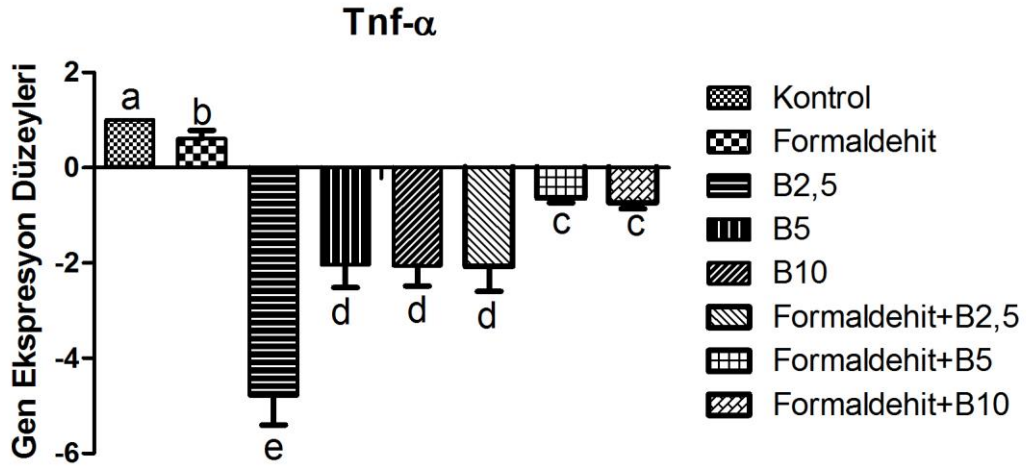
GRUPLAR	NO (µmol/L protein)
Kontrol	17,01±1,61 ^b
Formaldehit	19,52±1,37 ^a
B2,5	19,23±0,94 ^a
B5	18,57±1,25 ^a
B10	17,17±1,50 ^b
Formaldehit+B2,5	19,48±2,04 ^a
Formaldehit+B5	19,46±0,80 ^a
Formaldehit+B10	19,38±1,53 ^a

Ortalama ± standart sapma; n=9

^{a,b}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$).

3.8 Real-Time PCR ile Tnf-α Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yapılan analizler neticesinde; Tnf-α geninin mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 3.7 ve Şekil 3.8’de gösterildi. Buna göre formaldehit uygulanan grupta Tnf-α’nın ekspresyon düzeyinin 0,61±0,17 olduğu ve ekspresyonun arttığı belirlendi ($p<0,001$). Tek başına borik asit uygulanan gruplarda ise Tnf-α düzeylerinin ekspresyonlarının B2,5; 5 ve 10 grubunda sırasıyla 4,79±0,61; 2,04±0,48; 2,06±0,42 kat azaldığı belirlendi. Bununla birlikte formaldehit ve borik asitin 2,5; 5 ve 10 uygulandığı gruplarda ise sırasıyla -2,07±0,53; -0,64±0,10; -0,74±0,12 kat azaldığı, özellikle Formaldehit+B2,5 grubunda diğerlerine göre daha fazla azaldığı belirlendi ($p<0,001$).



Şekil 3.8. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 μ M dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 μ M formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Tnf- α gen ekspresyon düzeyine etkisi.

Tablo 3.7. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 μ M dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 μ M formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Tnf- α gen ekspresyon düzeyine etkisi

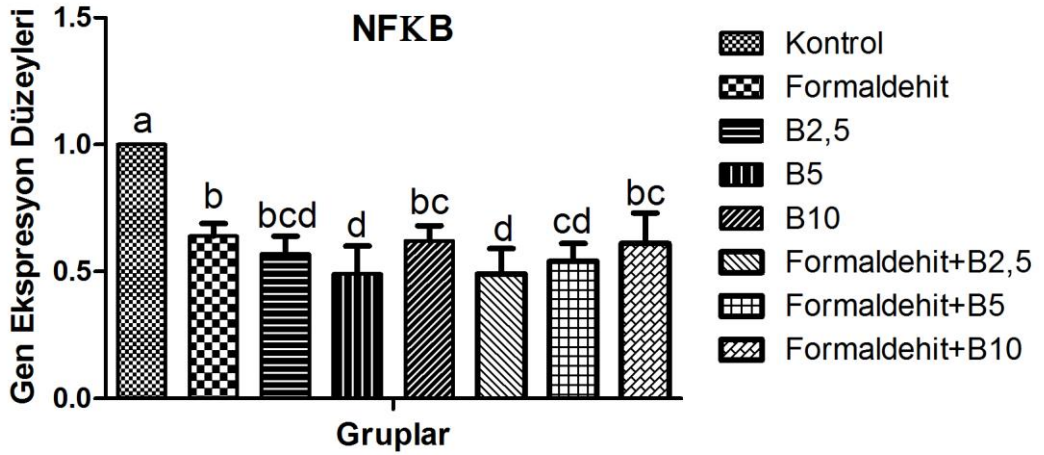
GRUPLAR	Tnf-α geninin mRNA ekspresyonlarındaki değişimler (misli olarak, +:Uyarılma, -:Baskılanma)
Kontrol	+1,00±0,00 ^a
Formaldehit	+0,61±0,17 ^b
B2,5	-4,79±0,61 ^d
B5	-2,04±0,48 ^d
B10	-2,06±0,42 ^d
Formaldehit+B2,5	-2,07±0,53 ^d
Formaldehit+B5	-0,64±0,10 ^c
Formaldehit+B10	-0,74±0,12 ^c

Ortalama \pm standart sapma; n=9

^{a,b,c,d:} Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,001$).

3.9 Real-Time PCR ile NFκB Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yapılan analizler neticesinde; NFκB geninin mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 3.8 ve Şekil 3.9'da gösterildi. Buna göre formaldehit uygulanan grupta NFκB'nin ekspresyon düzeyinin $0,64 \pm 0,05$ olduğu ve ekspresyonun arttığı belirlendi ($p < 0,001$). Tek başına borik asit uygulanan gruplarda ise NFκB düzeylerinin ekspresyonlarının B2,5; 5 ve 10 grubunda sırasıyla $0,57 \pm 0,07$; $0,49 \pm 0,11$; $0,62 \pm 0,06$ kat artırdığı belirlendi. Bununla birlikte formaldehit ve borik asitin 2,5; 5 ve 10 uygulandığı gruplarda ise sırasıyla $0,49 \pm 0,10$; $0,54 \pm 0,07$; $0,61 \pm 0,12$ kat artırdığı belirlendi ($p < 0,001$).



Şekil 3.9. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NFκB gen ekspresyon düzeyine etkisi.

Tablo 3.8. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin NFκB gen ekspresyon düzeyine etkisi

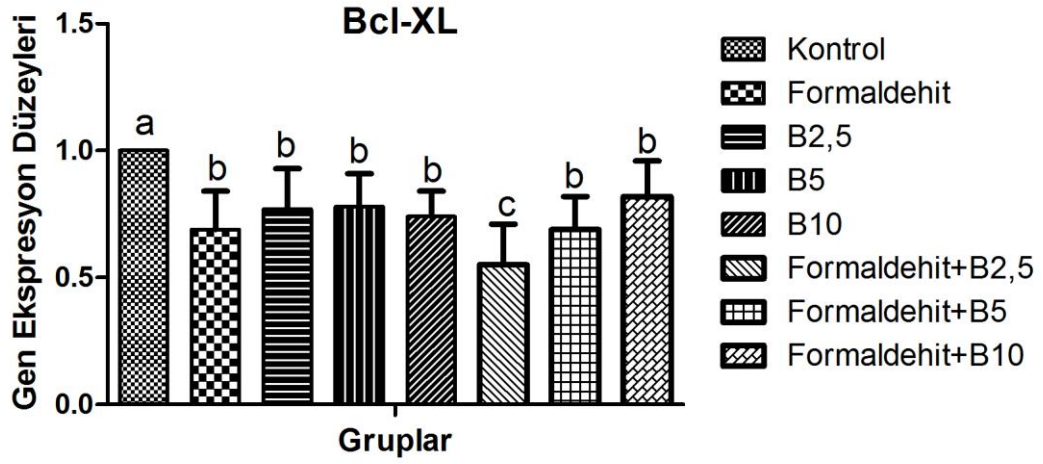
GRUPLAR	NFκB geninin mRNA ekspresyonlarındaki değişimler
	(misli olarak; +:Uyarılma)
Kontrol	+1,00±0,00 ^a
Formaldehit	+0,64±0,05 ^b
B2,5	+0,57±0,07 ^{bcd}
B5	+0,49±0,11 ^d
B10	+0,62±0,06 ^{bc}
Formaldehit +B2,5	+0,49±0,10 ^d
Formaldehit +B5	+0,54±0,07 ^{cd}
Formaldehit+B10	+0,61±0,12 ^{bc}

Ortalama ± standart sapma; n=9

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir (p<0,001).

3.10 Real-Time PCR ile Bcl-XL Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yapılan analizler neticesinde; Bcl-XL geninin mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 3.9 ve Şekil 3.10'da gösterildi. Buna göre formaldehit uygulanan grupta Bcl-XL'nin ekspresyon düzeyinin 0,69±0,15 olduğu ve ekspresyonun arttığı belirlendi (p<0,001). Tek başına borik asit uygulanan gruplarda ise Bcl-XL düzeylerinin ekspresyonlarının B2,5; 5 ve 10 grubunda sırasıyla 0,77±0,16; 0,78±0,13; 0,74±0,10 kat artırdığı belirlendi. Bununla birlikte formaldehit ve borik asitin 2,5; 5 ve 10 uygulandığı gruplarda ise sırasıyla 0,55±0,16; 0,69±0,1; 0,82±0,14 kat artırdığı belirlendi. Tek başına borik asit ve borik asit ile formaldehit uygulanan gruplarda Bcl-XL düzeylerinin kontrolle kıyaslandığında ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi (p<0,001).



Şekil 3.10. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Bcl-XL gen ekspresyon düzeyine etkisi.

Tablo 3.9. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin Bcl-XL gen ekspresyon düzeyine etkisi

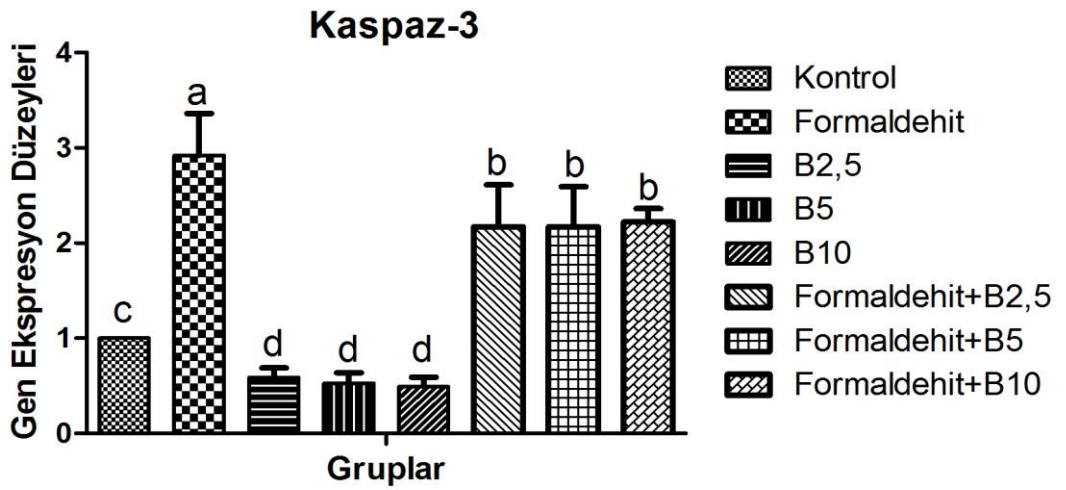
GRUPLAR	Bcl-XL geninin mRNA ekspresyonlarındaki değişimler (misli olarak; +:Uyarılma)
Kontrol	+1,00±0,00 ^a
Formaldehit	+0,69±0,15 ^b
B2,5	+0,77±0,16 ^b
B5	+0,78±0,13 ^b
B10	+0,74±0,10 ^b
Formaldehit+B2,5	+0,55±0,16 ^c
Formaldehit+B5	+0,69±0,13 ^b
Formaldehit+B10	+0,82±0,14 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=9

^{a,b,c}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$).

3.11 Real-Time PCR ile ve Kaspaz-3 Geninin mRNA Ekspresyon Düzeyleri

Yapılan analizler sonucunda; kaspaz-3 geninin mRNA ekspresyon düzeyleri Tablo 3.10 ve Şekil 3.11’de gösterildi. Buna göre formaldehit uygulanan grupta kaspaz-3’ün ekspresyon düzeyinin $2,92 \pm 0,44$ olduğu ve ekspresyonun arttığı belirlendi ($p < 0,001$). Tek başına borik asit uygulanan gruplarda ise kaspaz-3 düzeylerinin ekspresyonlarının B2,5; 5 ve 10 grubunda sırasıyla $0,59 \pm 0,10$; $0,53 \pm 0,11$; $0,49 \pm 0,10$ kat artırdığı belirlendi. Bununla birlikte formaldehit ve borik asitin 2,5; 5 ve 10 uygulandığı gruplarda ise sırasıyla $2,17 \pm 0,44$; $2,17 \pm 0,42$; $2,22 \pm 0,14$ kat artırdığı belirlendi ($p < 0,001$).



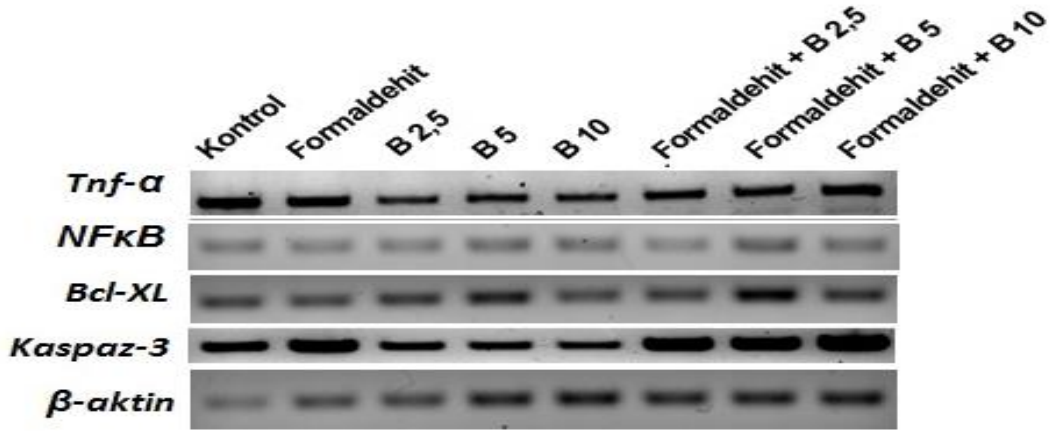
Şekil 3.11. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyine etkisi.

Tablo 3.10. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B-10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda uygulanan borik asitin kaspaz-3 gen ekspresyon düzeyine etkisi

GRUPLAR	Kaspaz-3 geninin mRNA ekspresyonlarındaki değişimler (misli olarak; +:Uyarılma)
Kontrol	+1,00±0,00 ^c
Formaldehit	+2,92±0,44 ^a
B2,5	+0,59±0,10 ^d
B5	+0,53±0,11 ^d
B10	+0,49±0,10 ^d
Formaldehit+B2,5	+2,17±0,44 ^b
Formaldehit+B5	+2,17±0,42 ^b
Formaldehit+B10	+2,22±0,14 ^b

Ortalama ± standart sapma; n=9

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,001$).



Şekil 3.12. A549 akciğer epitel hücreleri üzerine 100 µM dozunda formaldehit, 2,5 (B2,5), 5 (B5), (B10) mM borik asit ve 100 µM formaldehit + 2,5 (B2,5), 5 (B5) ve 10 (B10) mM dozda borik asit uygulaması sonucu Tnf-α, NFκB, Bcl-XL, kaspaz-3 ve β-aktin genlerinin ekspresyon düzeylerinin jel-elektroforez görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Formaldehit endüstriyel alanda yaygın kullanılan bir kirletici olup kontraplak, kaplama, sunta, yalıtım malzemeleri, ofis mobilyaları, boya ve plastik malzeme gibi pek çok ürünün yanı sıra hastane ve laboratuvarlarda da yaygın kullanıma sahip olan bir kimyasaldır (Krakowiak ve ark., 1998; Fló-Neyret ve ark., 2001, Usanmaz ve ark., 2002; Dangxia ve ark., 2011). Formaldehit çok reaktif bir bileşik olduğu için kolaylıkla her ortamda gaz haline dönüşebilmekte, oda sıcaklığında dahi uçucu hale geçerek zararlı etkilere neden olmakta hatta düşük dozlarda bile toksik etkilere yol açmaktadır (Smith, 1992; Feron ve ark., 1991). Solunum yolu epitel hücrelerinin hasarı ve fonksiyon kaybı sonucu akciğer hasarı meydana gelmektedir. Meydana gelen doku hasarı büyüme faktörleri ve sitokinlerin üretimini tetikleyerek hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir (Kheradmand ve ark., 1994; Geiser ve ark., 2000). Oksidanlar ve antioksidanlar protein fonksiyonlarını değiştiren önemli sinyal molekülleri olarak kabul edilmektedir. Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşturabileceği hasarları ortadan kaldırarak veya en aza indirerek, radikal oluşum mekanizmalarını önleyerek, üretilen radikalleri süpürerek, hücre veya dokularda oluşan tahribatı onararak hücre, doku ve vücut savunmasını sağlamaktadır (Gutteridge, 1995). Yapılan araştırmalarla bor bileşiklerinin antioksidan sistemi ve temel metabolik parametreleri olumlu yönde desteklediği belirlenmiştir (Türkez ve ark., 2007b; İnce ve ark., 2010; 2012; 2014; Küçükkurt ve ark., 2015). Fizyolojik miktarlarda diyetle alınan bor, insan ve hayvanların metabolizma faaliyetlerinde yararlı bir etkiye sahiptir (Hunt ve Idso, 1999).

Yapılan tez çalışmamızda A549 hücre canlılığı üzerine formaldehit ve borik asitin etkisi değerlendirildiğinde formaldehit grubunun hücre canlılığının düşük olduğu, buna karşın borik asit uygulamasının canlılık oranlarını artırdığı belirlendi. Çalışmamızla benzer sonuçlar elde eden Lim ve ark. (2010), 24 saat boyunca 0,1–100 mM formaldehite maruz bıraktıkları A549 hücrelerinde formaldehitin artan dozlarına bağlı olarak %80'e varan oranda hücre canlılığının azaldığını belirtmişlerdir. Speit ve ark. (2008) insan akciğer hücre hattı A549 ve nazal epitel

hücrelerinde formaldehitin genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmada; 1 saat süreyle 5-50 μM formaldehite maruz bırakılan A549 hücrelerinde, koloni oluşturma yeteneğinin 20 ve 50 μM formaldehit uygulamasında belirgin olarak azaldığını, hücre sayılarının ve gelişiminin de 200 μM formaldehit uygulaması sonucunda inhibe olduğunu belirtmişlerdir. Formaldehitin *in-vitro* sitotoksik etkisinin A549 akciğer epitel hücrelerinde ve HepG2 hepatokarsinoma hücrelerinde araştırıldığı başka bir çalışmada; 1 ve 4 saat boyunca 10 ppm ($12,3 \text{ mg/m}^3$)'in altında uygulanan formaldehitin hücreler üzerindeki etkisi belirlenmiş ve buna göre HepG2 hücre canlılığının %50'nin altında olduğu (%31,69/1,24) bu hücrelerin ($\text{IC}_{50}/103,799/23,55 \text{ mg/L}$) formaldehite A549 epitel akciğer hücrelerinden ($\text{IC}_{50}/198,369/9,54 \text{ mg/L}$) daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonunda formaldehit ve benzeri kontaminantların kültür medyumlarında toksisite değerlendirmesinin gerçekleştirilmesinde uygun yöntemlerden biri olduğu vurgulanmıştır (Bakand ve ark., 2005). 100-500 μM dozlarda borik asitin HeLa hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada (Park ve ark., 2004) borik asitin düşük dozlarda kullanımında hücre proliferasyonlarını artırdığı halde yüksek doz olan 1000 μM miktarında ise proliferasyonu inhibe ettiği ve borun hücre gelişiminde sinyal yolları üzerinden etki gösterebileceği bildirilmiştir. Kahraman ve ark. (2013)'nin insan amniyotik epitelyal hücre hatlarında CCL 62 (HeLa Kontaminant) farklı bor bileşiklerinin olası sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırdıkları çalışmada borik asitin hücre üremelerini baskılamadığı hücre proliferasyonu artırdığı, boraks pentahidratın kısmen baskıladığı ve disodyum pentaborat dekahidratın özellikle yüksek dozlarında (500 μM -1000 μM) hücre proliferasyonunu etkin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. Güven (2009) yaptığı bir çalışmada borik asitin yenidoğan sıçan yavrularının beyin korteks hücrelerinin ko-kültürlerinde MTT canlılık testi uygulayarak, nörotoksositeye yol açan glutamat (10^{-5} M) üzerine etkisini araştırmış, çalışma sonunda borik asitin 1; 2,5; 5; 7,5 ve 10 mg/L dozlarında glutamat ile oluşan nörotoksositeyi azalttığı özellikle 7,5-10 mg/L dozları en etkili olduğunu belirtmiştir.

Bu tez çalışmamızda 4 saat süresince 100 μM formaldehit uygulanan A549 hücrelerinin canlılığının azaldığı buna karşın borik asit sonrası formaldehit verilen gruplarda canlılığın yüksek seviyede olduğu ayrıca, tek başına borik asit uygulanan

gruplarda ise canlılığın daha yüksek olduğu belirlendi. Bu durum borik asitin tek başına hücre canlılığı üzerinde olumsuz etki yaratmadığını bununla birlikte formaldehit ile oluşan hücre ölümüne karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Oksidatif stres, serbest radikallerin hücre içi üretimi ve hücresel savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar ve oluşan ROS birçok biyolojik moleküle özellikle DNA'ya, proteinlere ve lipidlere zarar verir (Cai ve ark., 1997; Ince ve ark., 2010). ROS hücre membranındaki lipidlerin okside olmasına yol açar ve sonuçta hücre membran bütünlüğü bozulur (Halliwell ve Gutteridge, 1990). Formaldehitin LPO'da etkilerinin araştırıldığı *in-vitro* çalışmalarda; Lim ve ark. (2010) 24-48 saat boyunca 0,1–100 mM formaldehite maruz bıraktıkları A549 hücrelerinde formaldehitin artan dozlarına bağlı olarak LPO düzeylerinin önemli derece arttığını belirtmişlerdir. A549 akciğer hücre hattına 100 µM formaldehit 4 saat süresince uygulanması sonucu MDA düzeylerinin arttığı, buna karşın formaldehit uygulaması öncesi 1,25; 2,5; 5,0 ve 10,0 mg/L selenyum verilen hücre hatlarında selenyumun artan düzeylerine bağlı olarak MDA düzeyinin önemli derecede azaldığı ifade edilmiştir (Shi ve ark., 2014). Çiftçi ve ark. (2015)'nin formaldehitin etkisini araştırdığı bir *in-vivo* çalışmada, ratlara 15 gün boyunca intraperitoneal yol ile 9 mg/kg dozda formaldehitin uygulanması ile hayvanların serumlarında MDA düzeylerinin önemli ölçüde yüksek bulunduğunu ifade etmişlerdir. Buna karşın formaldehit ile birlikte gavaj yolu ile uygulanan 100 mg/kg miktardaki kurkuminin (zerdeçal) serum MDA düzeylerini azalttığı bildirilmiştir. Elkomy ve ark. (2015) diyete bor ilavesinin yetişkin tavşan semen parametrelerine etkisini araştırdıkları bir çalışmada 20 tavşanı her bir grupta 5 adet olacak şekilde, kontrol grubu, 17,5; 35 ve 70 mg/kg bor olarak 4 gruba ayırmışlar ve diyete bor kaynağı olarak borik asit eklenen gruplarda MDA düzeyinin önemli ölçüde azaldığı ancak ejakulat miktarının değişmediğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2013) A549 akciğer hücrelerini kurkumin ile 12 saat inkübe ettikten sonra 4 saat süresince 100 µM formaldehiti uyguladıkları çalışmada formaldehit uygulamasının akciğer hücre hattında MDA düzeyini artırdığını ifade etmişlerdir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda 4 saat süresince 100 µM formaldehit uygulanan

A549 hücrelerinde MDA düzeylerini arttığı, borik asit sonrası formaldehit uygulandığı gruplarda ise MDA düzeylerinin azaldığı belirlendi. Buna göre, artan LPO'ya karşı borun antioksidan etki (İnce ve ark., 2014; Çelikezen ve ark., 2015; Türkez ve ark., 2016) göstererek MDA düzeylerini azalttığı söylenebilir.

Horton ve ark. (1997) yaptıkları bir çalışmada doymamış bir aldehit olan akroleinin etkisini A549 insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde denemişler, akrolein (6,7 fentomol/hücre) uygulamasını takiben 2 saat sonra hücre GSH düzeylerinin %34 azaldığı ve 47 fmol/hücre düzeyinde uygulanmasında ise %65 azaldığı ifade edilmiştir. Manyetik görüntüleme sisteminde, ilaç geliştirmelerinde ve hiperthermia gibi birçok alanda uygulanan nikelferit nanopartiküllerinin A549 hücre hattında etkisi araştırılmış, nikelferit nanopartiküllerinin 24 saat boyunca 100 µg/ml uygulamanın sitotoksositeye yol açtığı, oksidatif stres ve apoptozisi indüklediği, artan ROS miktarına bağlı olarak antioksidan GSH'ın tükendiği bildirilmiştir (Ahamed ve ark., 2011). Bu çalışmamızda, formaldehit grubunda lipid peroksidasyonda artış ve GSH'da tükenme gözlenmiştir. Bu durum, formaldehit grubundaki LPO'da gözlenen artış ile birlikte gözlenen GSH seviyesindeki azalma GSH depolarının tükenmesinin bir sonucu olabilir. Formaldehit uygulaması yapılan A549 hücrelerinde doza bağlı borik asit uygulamasının GSH seviyelerini artırdığı gözlenmiştir. Bu durum borik asitin hücreler arasındaki peroksidaz aktivitesini azaltmasından kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda, İnce ve ark. (2010; 2012) yaptıkları çalışmalarla da ratlarda bor uygulamasının indirgenmiş GSH aktivitesini indüklediğini göstermişlerdir.

Antioksidan enzimler olan SOD ve CAT, reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında görevlidir. SOD enzimi süperoksit radikallerinin yok edilmesi için gerekli reaksiyonları katalize etmektedir. SOD enzimi sitoplazmada, mitokondri zarları arasında ve mitokondri matriksinde bulunur (Fridovich, 1997). SOD oksidatif strese karşı savunmada önemli bir role sahiptir (Bukowska and Kowalska, 2004). CAT, H₂O₂'yi ortadan kaldırmada görev alan enzimlerden biridir. CAT genel olarak peroksizomlarda bulunur ve iki H₂O₂ molekülünü reaksiyona sokarak su ve O₂ oluşumunu sağlar (Cederbaum ve Dey, 2006). Shi ve ark. (2014) yaptıkları *in-vitro* bir çalışmada A549 akciğer hücre hattına 100 µM formaldehiti 4 saat süresince

uygulanması sonucu SOD ve GSH-Px düzeylerinin azaldığı, buna karşın formaldehit uygulaması öncesi 1,25; 2,5; 5,0 ve 10,0 mg/L selenyum verilen hücre hatlarında selenyumun artan düzeylerine bağlı olarak SOD ve GSH-Px düzeylerinin önemli derecede arttığı ifade edilmiştir. A549 akciğer hücreleri DMEM medyumda 2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 mgL⁻¹ konsantrasyonlarında çözdürülen kurkumin ile 12 saat inkübasyonu takiben 4 saat süresince 100 µM formaldehit uygulanan çalışmada, formaldehit uygulanan gruplar kontrolle kıyaslandığında SOD ve GSH-Px aktivitelerinin belirgin olarak azaldığı belirtilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Wang ve ark. (2013) 30 adet Sprague-Dawley dişi ratı 3 gruba ayırarak, sırasıyla 0 (kontrol); 0,5; 2,46 mg/m³ formaldehiti inhalasyon yoluyla 60 gün süresince uyguladıkları çalışmada formaldehitin ovaryum dokusunda doza bağlı etki gösterdiğini belirlemişler. Çalışmada gruplar kontrolle kıyaslandığında SOD aktivitesinin belirgin olarak azaldığı belirtilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyanın A549 insan alveolar ve normal bronşiyal epitel hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada; her iki hücre tipinde CuZnSOD ve MnSOD düzeylerinin değişmediği fakat 24 saat 0-100 µM piyosiyanın uygulamasının artan dozlarına bağlı olarak CAT aktivitesinin ve protein içeriğinin önemli derecede azaldığı, aynı zamanda katalaz mRNA düzeylerinin de azaldığı bildirilmiştir (O'Malley ve ark., 2003). Hatcher ve ark. (1995)'nin yaptıkları bir çalışmada A549 hücre hattına 13 gün boyunca kadmiyum (0-40 µM) uygulanması sonucunda hücre GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit etmişlerdir. Buna karşın antioksidan enzimlerin (GSH-Px, SOD, CAT ve glutasyon redüktaz) bu uygulamadan etkilenmediği belirtilmiştir. Yapılan bu tez çalışmamızda benzer şekilde 4 saat süresince 100 µM formaldehit uygulanan A549 hücrelerinde SOD ve CAT düzeylerinin azaldığı, borik asit uygulamasından sonra formaldehitin uygulandığı gruplarda ise bu düzeylerin arttığı belirlendi. Formaldehit grubunda, SOD ve CAT düzeylerinin düşük olması oksidatif stresin artışına bağlı olarak bu enzimlerin tükenmesi ile ilişkili olabilir. Formaldehit ile borik asit verilen gruplarda SOD ve CAT aktivitelerinin formaldehit grubuyla kıyaslandığında yükseldiği tespit edildi. Bu durum, borun artan dozuna bağlı olarak bu enzimlerin aktivitesini sürdürme ve yenileme yeteneği kazandırmasına (İnce ve ark., 2010; 2012; 2014; Türkez ve ark., 2016) bağlı olabilir.

Temel haberci maddelerden biri olan NO, nitrik oksit sentaz enziminin katalize ettiği tepkimeyle L-arjinin'den üretilmektedir. Üretilen bu madde hücre membranını geçerek demir ve/veya sülfür içeren proteinlere bağlanır (Ignarro, 1990; Araujo Dos Reis ve ark., 2002). NO, nöronlarda ve damar düz kas hücre membranında bulunan guanilat siklazı aktive ederek sinirlerden uyarı geçişi ve damar dilatasyonu gibi fonksiyonların gerçekleşmesinde rol alır (Snyder, 1992). Günay ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada benzoapyren (20 µM) uyguladıkları A549 hücrelerinde kuarsetin (10 µM), damnacanthal (50 µM) ve proanthosiyanidin (50 µg/ml) etkinlikleri araştırılmıştır. 48 saatlik benzoapyren uygulaması sonucunda, A549 hücrelerinde NO düzeylerinin arttığı buna karşın kuarsetin, damnacanthal ve proanthosiyanidin uygulaması ile NO düzeylerinin azaldığı ifade edilmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada timokinon (5 µM), kafeik asit fenil ester (2 µg/ml) ve resveratrolün (10 µM) NO üzerine etkilerini 24 saat benzoapyrene (20 µM) maruz bırakılan A549 hücrelerinde incelemişler, benzoapyren ile muamele edilen hücre lizatların NO değerinin yüksek olduğu diğer maddelerin uygulanması ile NO değerinin azaldığı tespit edilmiştir (Ulasli ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda ise kontrol ve B10 grubunda NO düzeylerinin azaldığı belirlenmiş, buna karşın diğer gruplarda NO düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum yüksek miktarda borik asit uygulamasının hücrelerde oluşan oksidatif hasara karşı NO oluşumunu baskılayabileceğini ve bunun borun ve bu durum borun antioksidan etkisinden kaynaklanabileceğini gösterir. Ayrıca formaldehit, borun düşük düzeylerde ve formaldehit ile uygulandığı gruplarda NO'nun artışı formaldehit ve borun hücre üzerine olan direkt etkisinden kaynaklanabilir.

NFκB, Tnf-α'nın anahtar mediyatörüdür. Yangının önlenmesi ve yangısal hastalıkların tedavisel yaklaşımında önemli hedef noktalardan birisidir (Beg ve Baltimore, 1996). NFκB hücre proliferasyonu ve tümör gelişiminin düzenlenmesinde yer almaktadır (Ansari ve Das, 2010). Tnf-α hücrel immun cevaptan sorumlu polipeptid yapıda bir mediyatördür (Bevelaequa ve ark., 1989). Aynı zamanda Tnf-α in-vitro insan kanser hatlarında hücre ölümü ve hücre gelişiminin baskılanması üzerine direkt etkiye sahiptir (Sugarman ve ark., 1985; Old, 1985). Tnf-α'nın sitotoksik etkisi, serbest radikal üretimi, DNA fragmentasyonu ve mikrotübüllerin

zarar görmesi ile ilişkilidir (Matthews ve ark., 1988; Neale ve ark., 1988). Hücre hatları oksidatif hasara dirençlidir, bunu da Tnf- α 'nın sahip olduğu serbest radikal tamponlama kapasitesi sayesinde göstermektedir (Zimmerman ve ark., 1989). Tnf- α ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar, NF κ B'ye bağımlı yolak aracılığı ile Bcl-x ve/veya Bfl-1/A1'i up regüle ederler. A549 hücreleri, hem Tnf- α 'ya hem de kemoteröpotik ajanların sitotoksik etkilerine dirençlidir, NF κ B'nin aktivasyonu A549 hücrelerini her ikisine (Tnf- α ve kemoteröpotik ajanlara) karşı duyarlı hale getirir (Cheng ve ark., 2000). Shi ve ark., (2014) yaptıkları in-vitro bir çalışmada A549 akciğer hücre hattına 4 saat süresince 100 μ M formaldehit uygulanması sonucu Western Blot analizi ile incelenen NF κ B ve AP-1 gen ekspresyon düzeylerinin arttığını, buna karşın formaldehit uygulaması öncesi 1,25; 2,5; 5,0 ve 10,0 mg/L selenyum ile ön inkübasyona maruz bırakılan hücre hatlarında selenyumun artan düzeylerine bağlı olarak genlerin ekspresyonunu önemli derecede azalttığı ifade edilmiştir. Zhang ve ark. (2013) A549 akciğer hücreleri ile yaptıkları çalışmada, kurkumini DMEM medyumda (2,5; 5,0; 10,0 ve 20,0 mg l^{-1} konsantrasyonlarda) çözdürüp 12 saat inkübasyon uygulamasını takiben 4 saat süresince 100 μ M formaldehit maruziyetinde, Western Blot analizi ile inceleme sonucunda formaldehit uygulanan grupların NF κ B, p65 ve AP-1 ekspresyon düzeylerini artırdığını ($p < 0,05$), ancak kurkumin ile ön inkübasyonunun bunu belirgin bir şekilde engellediğini ($p < 0,05$) belirtmişlerdir. Kemoteröpatik bir ajan olan bleomisin farelere toplamda 2 ünite intratraheal olarak uygulandığı 15 günlük bir çalışmada, bleomisin ile indüklenen pneumopathi ve fibrosis olgusunda akciğer dokusunda Tnf- α mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmış ve lokal Tnf- α üretimine bağlı olarak mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (Piguet ve ark., 1989). Oligosakkaritlerle konjüge gallik asitin (gallate-COS) insan akciğer A549 hücre hatlarında antiinflamatuvar ve serbest radikalleri süpürücü etkisinin araştırıldığı çalışmada, gallate-COS'un yüksek derecede süpürücü etkisi ve H₂O₂ ile indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Ayrıca, lipopolisakkarit uygulanan A549 hücrelerinde gallate-COS'un COX-2 ekspresyon ve PGE2 üretimini baskılayıcı etki gösterdiği bununla birlikte yangısal reaksiyonla oluşan sitokinlerin (IL-8 ve Tnf- α) oluşumunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Vo ve ark., 2017). Yapılan benzer bir çalışmada, lipopolisakkarit ile uyarılan akut akciğer

hasarında kalsitriol ve aktif vitamin D'nin Tnf- α ve makrofaj inflamatuvar protein-2 (MIP-2) üzerine etkileri araştırılmıştır. Bunun için farelere intraperitoneal yolla 1 mg/kg dozda lipopolisakkarit uygulanmış ve farelerde Tnf- α ve MIP-2 belirgin olarak arttığı, buna karşın lipopolisakkarit ve 1 μ g/kg (i.p.) kalsitriol uygulanan gruplarda ise kalsitriolün NF κ B'yi bloke ettiği tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2016). You ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada, anti kanser etki gösteren suberoylanilid hidroksamik asitin (SAHA) sağlıklı ve kanser hücrelerinde hücre gelişimi üzerine etkilerini araştırmışlar ve SAHA'nın sağlıklı akciğer hücrelerinde ölümü tetiklemediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, SAHA uygulamasının özellikle akciğer kanser hücrelerinde Tnf- α reseptör-1'in -223/-29 promoter bölgesinin asetilasyonu ile Tnf- α reseptör-1'in ekspresyon düzeyini artırdığı tespit edilmiştir. Bir herbisit olan parakuat ilacının erkek ratlarda akciğer hasarı üzerine Tnf- α ile indüklenen protein-6'nın etkisini araştırdıkları çalışmada intraperitoneal olarak 50 mg/kg akut parakuat uygulaması sonrasında proinflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-6 ve Tnf- α 'nın mRNA ekspresyon düzeylerinin arttığı, protein-6'nın ise bu durumu engellediği Xu ve ark. (2016) yapmış oldukları çalışmada belirtmiştir. Yapılan tez çalışmamızda A549 akciğer hücrelerine formaldehit uygulaması sonucunda inflamasyon genleri olan Tnf- α ve NF κ B ekspresyonlarının arttığı, borik asit uygulaması ile Tnf- α (özellikle 2,5 mM dozda) ve NF κ B (özellikle 5 mM dozda) ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlendi. Bu durum borun tek başına özellikle düşük dozlarda hücrede oluşan inflamasyon üzerine etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte formaldehit ve borik asit uygulanan gruplarda bu genlerin ekspresyonlarının azaldığı tespit edildi. Bu durum borun antioksidan ve diğer farmakolojik etkilerine bağlı olarak (Nielsen, 1994, 1997, 2008; Türkez ve ark., 2007b) oksidatif stresi azaltması ile birlikte inflamasyonu baskılamasından kaynaklanabileceğini akla getirmektedir.

Kaspazlar proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize ederler, DNA tamirinde rol alan proteinlerin parçalanmasından ve nükleusta DNA'yı parçalayan Dnaz gibi enzimlerin aktive olmasından da sorumludur (Geske ve Gerschenson, 2001). Kaspazlar olarak bilinen protein ailesi apoptozisin erken dönemlerinde aktive olur apoptozda sonlandırıcı olarak görev alan kaspazlardan biri

de kaspazlar-3'tür. Kaspaz-3'ün gen ekspresyonu apoptoz altındaki hücrelerde artmaktadır (Springer ve ark., 1999; Nuttall ve ark., 2000; Lini ve ark., 2013). Programlı hücre ölümü bazı onkogen ve tümör baskılayıcı genler tarafından kontrol edilmektedir. Omurgalılarda apoptozisi c-myc, p-53 ve Bcl-2 ailesine mensup genler düzenlemektedir. Bcl-2 ailesinde yer alan, anti-apoptotik proteinlere mensup olan Bcl-XL proteinleri hem apoptozisi hem de otofajiyi inhibe edebilmektedirler (Pythoud ve ark., 2015; Annamalai ve ark., 2015). Bunların yanı sıra Minn ve ark. (1997)'de yaptıkları bir çalışma sonucunda Bcl-XL'nin intraselüler membran permeabilitesini düzenleyerek hücre canlılığını kontrol edebileceğini ifade etmişlerdir. Lim ve ark. (2010) 24 saat boyunca 0,1–100 mM formaldehite maruz bıraktıkları A549 hücrelerinde formaldehitin apoptozis ile ilişkili peroksiredoksin-2 (Prx-2) protein düzeylerini araştırmışlardır. Normal şartlarda Prx-2 geni proapoptoziste rol oynayan Bax ve Bcl-2 ile birlikte apoptozis ilişkili proteinlerin (kaspaz-3, kaspaz-9 ve polipeptid polipolimeraz) ekspresyonlarında önemli rol oynamaktadır. Yapılan çalışmada, A549 hücreleri üzerine formaldehit uygulamasının Prx-2'nin ekspresyonunu azalttığı buna bağlı olarak da apoptozisin arttığını tespit etmişlerdir. Çin'de alternatif tıpta silikozis ve artiritis tedavisinde yaygın kullanım alanı bulunan *Stephania tetrandra* bitkisinden izole edilen tetrandrin maddesinin insan akciğer karsinoma hücrelerinde apoptotik ve hücre gelişimi üzerine moleküler mekanizmaların incelendiği çalışmada; tetrandrin uygulamasının doza bağlı olarak hücre gelişimini baskılandığı ve apoptotik sub-G1 ve G1 fazını artırdığı ayrıca Cdk inhibitör p21'i indüklediği belirtilmiştir. Bunun yanında siklin D1 inhibisyonu ve kaspaz-3 aktivasyonunun da olduğu gözlenmiştir (Lee, ve ark., 2002). Antiinflamatuvar, antioksidant ve antikanser etki gösteren kuarsetin (10 µM), damnacanthal (50 µM) ve proanthosiyanidin (50 µg/ml) etkinlikleri benzoapyren (20 µM) uygulaması yapılmış A549 hücrelerinde araştırılmıştır. 48 saatlik uygulama sonucunda, benzoapyren uygulanan A549 hücrelerinde laktat dehidrojenaz seviyelerinin yüksek olduğu, buna karşın kuarsetin, damnacanthal ve proanthosiyanidin uygulanan gruplarda IFN-gamma düzeylerinin azaldığı belirtilmiştir. Çalışmada IL-1β ve Tnf-α düzeylerinin kuarsetin ve proanthosiyanidin uygulaması ile önemli derecede azaldığı bildirilmiştir. Kuarsetin ve damnacanthal uygulamasının apoptotik genlerin (Bax, p21, TRAIL-R1 ve TRAIL-R2)

ekspresyonlarını up-regüle ettiği buna karşın anti-apoptotik gen (Bcl-2, NF-κB, IKK1, cyclin-D1) ekspresyonlarını down-regüle ettiği tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda bu maddelerin benzoapyren maruziyetine karşı inflamasyon cevaplarını azalttığı vurgulanmıştır (Günay ve ark., 2016). Ulasli ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada 24 saat benzoapyrene (20 µM) maruz bırakılan A549 hücrelerinde timokinon (5 µM), kafeik asit fenil ester (2 µg/ml) ve resveratrolün (10 µM) inflamasyon belirteçleri, oksidatif stres parametreleri protein mRNA ekspresyon düzeyleri ve hücre canlılık üzerine etkilerini araştırmışlar, etkisi araştırılan maddelerin hücelere 48 saatlik uygulaması sonucunda timokinon ve kafeik asit fenil ester uygulanan hücrelerde Bax'ın up-regüle olduğu ancak resveratrol ve timokinon uygulanan gruplarda ise Bcl-2'nin down regüle olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte timokinon uygulanan gruplarda ise p21'in belirgin olarak up-regüle olduğu tespit edilmiştir. Resveratrol ve timokinon uygulanan gruplarda ise NFκB gen ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir. Zerin ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada nöronal SK-N-SH hücrelerine 12 saat süresince uygulanan formaldehitin (400 µg/mL) oksidatif stres ve apoptozis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Oksidatif stresin formaldehit uygulamasını takiben 2'inci saatte indüklendiğini gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte artan konsantrasyona bağlı olarak formaldehit uygulamasının kaspaz-3, 7 ve 9 aktivitesini artırdığını belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilere benzer olarak, yapılan tez çalışmasında A549 akciğer hücrelerine formaldehit uygulaması sonucunda kaspaz-3 gen ekspresyonunun arttığı, tek başına borik asit uygulanan gruplarda ise kaspaz-3 gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı belirlendi. Bu durum ise borun tek başına hücrede oluşan apoptozisi engellediğini göstermektedir. Borik asit uygulamasından sonra formaldehit uygulanan gruplarda ekspresyon düzeylerinin formaldehit grubuna göre azaldığı belirlendi. Bu durum borun azalan oksidatif stres ve inflamasyonla birlikte apoptozisin artışı engellediğini göstermektedir. Ayrıca, Bcl-XL geni gruplar arasında önemli bir değişiklik göstermemekle birlikte sadece 2,5 mM borik asit uygulamasından sonra formaldehitin uygulandığı grupta Bcl-XL ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Bu durum, düşük dozda borik asit uygulaması inflamasyonu azaltmakta ve buna bağlı olarak gelişen apoptozisin azalmasına sebep olarak

antiapoptotik gen olan Bcl-XL'nin ekspresyonunun da azalmasına yol açabileceğini göstermektedir.



5. SONUÇ

İnsan A549 akciğer hücre hatlarına 12 saat borik asit (2,5; 5 ve 10 mM) ve bunu takiben 4 saat formaldehit (100 µM) uygulaması sonrasında elde edilen sonuçlar;

- Formaldehit uygulaması ile hücre canlılığının azaldığı, buna karşın borik asit uygulamasının hücre canlılığını artırdığı,
- Formaldehit uygulaması sonucunda lipid peroksidasyon belirteci olan MDA'nın arttığı ve güçlü antioksidan etki gösteren GSH'nin azaldığı, borik asit uygulamasının formaldehit ile indüklenen bu değerleri tersine çevirdiği,
- Formaldehit uygulaması ile azalan hücre içi enzim aktivitelerinin (SOD ve CAT) borik asit uygulaması ile arttığı,
- Formaldehit ve borik asitin uygulaması sonucunda belirlenen NO düzeylerinin değişmediği (B10 hariç),
- İnflamasyonda rol oynayan Tnf- α ve NF κ B mRNA ekspresyon düzeylerinin formaldehit uygulaması sonrası artış gösterdiği buna karşın borik asit uygulaması ile bu ekspresyonların azaldığı,
- Apoptotik genlerden kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeylerinin formaldehit uygulaması sonrası artış gösterdiği buna karşın borik asit uygulaması ile bu ekspresyonların azaldığı, antiapoptotik gen olan Bcl-XL'nin mRNA ekspresyon düzeylerinin (formaldehit + B2,5 hariç) ise değişmediği belirlendi.

Özet olarak, formaldehit maruziyeti sonucunda A549 epitel hücrelerinde artan lipid peroksidasyon, azalan antioksidan etki, inflamasyon ve apoptoziste etkili olan genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin değişim gösterdiği, ancak borik asit uygulamasının bu olumsuz etkileri azalttığı ifade edilebilir. Ayrıca, elde edilen bu sonuçların yapılacak diğer çalışmalara kaynak teşkil edebileceği sonucuna da varıldı.

ÖZET

FORMALDEHİT KULLANILARAK DENEYSEL OKSİDATİF STRES OLUŞTURULAN A549 AKCİĞER EPİTEL HÜCRELERİNE FARKLI DOZLARDA UYGULANAN BOR'UN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Formaldehit yaygın olarak kullanılan suda çok iyi çözünen, renksiz, keskin kokulu kuvvetli elektrofilik özelliği nedeniyle oldukça reaktif bir aldehyttir. Antiseptik, dezenfektan, kozmetik sanayinde, seralarda, hayvancılıkta, ahşap işlemede, reçine üretiminde, tıpta, endüstriyel alanda, diş hekimliğinde, laboratuvar malzemelerinin üretimi gibi birçok alanda formaldehit kullanılmakla birlikte, sigara dumanında da bulunur ve oksidatif strese yol açar.

Gelişen teknoloji ve tıp ile birlikte sağlık açısından çeşitli hastalık olgularında teşhis ve tedavi amaçlı alternatif olarak birçok maddenin kullanımı söz konusu olmaktadır. Bununla birlikte, ülkemizin zengin bor madeni ihtiva etmesi ve bunun kullanımının artırılması ile ekonomik açıdan da olumlu katkılar sağlanabilecektir. Bu durumun da yapılan veya yapılacak çalışma ve projelerle gerçekleştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, A549 akciğer epitel hücrelerinde formaldehit ile oluşturulan oksidatif strese borik asitin etkisini belirlemek amacıyla hücre canlılık testi (MTT), indirgenmiş glutatyon (GSH), malondialdehid (MDA), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) düzeyleri analiz edildi. Bunlara ilaveten oluşan inflamasyonda borik asitin etkisini belirlemek amacıyla β -aktin, Tnf- α , kaspaz-3, Bcl-XL ve NF κ B genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri moleküler olarak araştırıldı. Bu amaçla, A549 hücre hatları 12 saat borik asit 2,5;5 ve 10 mM düzeylerine maruz bırakıldı. Daha sonra 4 saat süresince 100 μ M formaldehit hücre hatları üzerine uygulandı. Uygulama sonrasında, formaldehitin hücre canlılığını önemli derecede azalttığı, hücre lizatlarında MDA düzeylerini artırdığı, GSH

düzeşini azalttığı, SOD ve CAT enzim aktivitesi azalttığı, NO düzeyleri üzerine belirgin bir etki göstermediği belirlendi. Tnf- α , NFkB ve kaspaz-3 mRNA ekspresyon düzeylerinin formaldehit uygulaması ile arttığı. Buna karşın Bcl-XL mRNA ekspresyon düzeylerinde önemli bir değişim gözlenmediği belirlendi. Borik asitin formaldehit maruziyeti ile oluşan lipid peroksidasyonu, azalan antioksidan enzim aktivitesini, inflamasyon ve apoptozda rol alan genlerin artan mRNA ekspresyon düzeylerini tersine çevirdiği tespit edildi.

Sonuç olarak, bor kaynağı olan borik asitin formaldehit maruziyeti ile A549 hücrelerinde oluşan oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoziste önemli rol oynadığı ve hücre gelişimi üzerine olumlu etkilerinin olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Formaldehit, borik asit, A549, lipid peroksidasyon, hücre canlılık testi, inflamasyon, apoptozis.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF BORON ON FORMALDEHYDE-INDUCED EXPERIMENTAL OXIDATIVE STRESS IN A549 LUNG EPITHELIAL CELLS BY USING BIOCHEMICAL AND MOLECULAR BIOLOGY TECHNIQUES

Formaldehyde is a highly reactive aldehyde due to its electrophilic character, which is colourless, pungent, well soluble in water and it has a strong odour. Formaldehyde is used in many fields such as cosmetics industry, greenhouses, livestock, wood processing, production, environment, industry, dentistry and it is also used in the production of resin, laboratory materials, antiseptics, disinfectants. Besides, it is found in cigarette smoke, and it causes oxidative stress.

With the development of technology and medicine, many substances are used as an alternative for diagnosis and treatment in various diseases. Turkey possesses rich boron mine sources. The increase in the usage of boron will provide positive economic benefits. Therefore, it is of utmost importance for performing researches and projects in this area.

In this thesis, cell viability test (MTT), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) levels and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) were analysed to determine the effect of boric acid against formaldehyde-induced oxidative stress in A549 lung epithelial cells. Also, mRNA expression levels of β -actin, Tnf- α , caspase-3, Bcl-XL and NF κ B genes were molecularly evaluated to determine the effect of boric acid in inflammation. For this purpose, A549 cell lines were exposed to 2.5, 5 and 10 mM boric acid for 12 hours. Then 100 μ M formaldehyde was applied for 4 hours on cell lines. After application, it was determined that formaldehyde significantly reduced cell viability whereas increased MDA levels. However, it decreased GSH levels, SOD and CAT enzyme activities of cell lysates, and had no significant effect on NO levels of culture medium. Also, it was determined that formaldehyde administration increased Tnf- α ,

NFkB and caspase-3 mRNA expression levels, yet no significant change was observed in Bcl-XL mRNA expression levels. It was found that boric acid reversed lipid peroxidation, decreased antioxidant enzyme activity, increased mRNA expression levels of genes involved in inflammation and apoptosis which are caused by formaldehyde exposure.

As a result, it was determined that boric acid, as a boron source, plays a significant role in formaldehyde-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in A549 cells and has positive effects on cell growth.

Keywords: Formaldehyde, boric acid, A549, lipid peroxidation, cell viability test, inflammation, apoptosis.

KAYNAKLAR

- AEBI, H. (1974). Catalase in vitro, in: U. Bergmeyer (Ed.), Methods of enzymatic analysis. Academic Press, New York and London. 673-677.
- AHAMED, M., AKHTAR, M. J., SIDDIQUI, M. A., AHMAD, J., MUSARRAT, J., AL-KHEDHAIRY, A. A., ALSALHI, M. S., ALROKAYAN, S. A. (2011). Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells. *Toxicology*, **283(2)**: 101-108.
- AHSAN, H., ALI, A., ALI, R. (2003). Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical & Experimental Immunology*, **131**: 398-404.
- AKKUŞ İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye, 1-15.
- ANNAMALAI, P., THAYMAN, M., RAJAN, S., RAMAN, L. S., RAMASUBBU, S., PERUMAL, P. (2015). Ethyl acetate extract from marine sponge Hyattella cribriformis exhibit potent anticancer activity by promoting tubulin polymerization as evidenced mitotic arrest and induction of apoptosis. *Pharmacognosy Magazine*, **11**: 345-355.
- ANONİM, (2008). Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Bor Sektör Raporu.1-5.
- ANSARI, K. M., DAS, M. (2010). Skin tumor promotion by argemone oil/alkaloid in mice: evidence for enhanced cell proliferation, ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2 and activation of MAPK/NF-kappaB pathway. *Food and Chemical Toxicology*, **48**: 132-138.
- ARAUJO DOS REIS, E., SILVA DE OLIVEIRA, L., LAZZARON LAMERS, M., NETTO, C. A., TEREZINHA DE SOUZA WYSE, A. (2002). Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Research*, **951(2)**:151-157.
- BAKAND, S., HAYES, A., WINDER, C., KHALIL, C., MARKOVIC, B. (2005). In vitro cytotoxicity testing of airborne formaldehyde collected in serum-free culture media. *Toxicology and Industrial Health*, **21(5-6)**: 147-154.
- BANERJEE, A. K., MANDAL, A., CHANDA, D., CHAKRABORTI, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, **253 (1)**: 307-312.

- BARNES, P. J. (2003). New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annual Review of Medicine*, **54(1)**: 113-129.
- BATCIOGLU, K., GUL, M., UYUMLU, A. B., ESREFOGLU, M. (2009). Liver lipid peroxidation and antioxidant capacity in cerulein-induced acute pancreatitis. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*, **42**: 776-782.
- BAYŞU-SÖZBİLİR N., BAYŞU, N. (2008). Biyokimya, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara.
- BEG, A. A., BALTIMORE, D. (1996). An essential role for NFκB in preventing Tnf-α-induced cell death. *Science*, **82**: 274-288.
- BETTERIDGE, D. J. (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, **49**: 3–8.
- BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, B. M. (1963). Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **61**: 882-888.
- BEVELAEQUA, M. P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M. A., SEED, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **243**: 1160-1165.
- BOHR, V. A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, **32(9)**: 804- 812.
- BORON (1998). Environmental Health Criteria 204. World Health Organization, Geneva.
- BRANTLEY, R. E. (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin *The Journal of Biological Chemistry*, **268**: 6995–7010.
- BRETON-ROMERO, R., LAMAS, S. (2014). Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells. *Redox Biology*, **2**: 529-534.
- BRONNER, F. (2008). Metals in bone: aluminum, boron, cadmium, chromium, lanthanum, lead, silicon, and strontium. *Principles of Bone Biology*, **25(3)**: 515-531.
- BUKOWSKA, B., KOWALSKA, S. (2004) Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*, **152(1)**: 73–84.
- BURÇAK, G., ANDİCAN, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **35**: 159-69.
- BUTTKE, T. M., SANDSTROM, P. A. (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, **15**: 7-10.

- BÜYÜKOKUROĞLU, M. E., GULCIN, I., OKTAY, M., KUFREVIOĞLU, O. I. (2001). In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. *Pharmacological Research*, **44**: 491-495.
- CAI, Q., RAHN, R. O., ZHANG, R. (1997). Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals. *Cancer Letters*, **119(1)**: 99-107.
- CALDERON, G. L., WEN-WANG, L., ZHANG, Y. J., RODRIQUEZ, A. A., OSNAYA, N., VILLARREAL-CALDERÓN, A., SANTELLA, R. M. (1999). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environmental Health Perspective*, **107(6)**: 469-474.
- CANBILEN, A., SEZEN, S., AVUNDUK, M. C., CON, N. E. (1999). Formaldehit ve toksik etkileri. *Genel Tıp Dergisi*, **9**: 33-39.
- CASTANER, A., ROIG, E., SERRA, A., DE FLORES, T., MAGRINA, J., AZQUETA, M., SANZ, G., BETRIU, A. (1990). Risk stratification and prognosis of patients with recent onset angina. *European Heart Journal*, **11**: 868-875.
- CEDERBAUM, A. I., DEY, A. (2006). Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*, **43**: 63-74.
- CHAPIN, R. E., KU, W. W., KENNEY, M. A., MCCOY, H., GLADEN, B., WINE, R. N., WILSON, R., ELWELL, M. R. (1997). The effects of dietary boron on bone strength in rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, **35**: 205-215.
- CHEESEMAN, K. H., SLATER, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49(3)**: 481-93.
- CHENG, Q., LEE, H. H., LI, Y., PARKS, T. P., CHENG, G. (2000). Upregulation of Bcl-x and Bfl-1 as a potential mechanism of chemoresistance, which can be overcome by NF-[kappa] B inhibition. *Oncogene*, **19(42)**: 4936-4940.
- CHEUNG, Y. J., BONVENTRE, J. V., MALIS, C. D., LEAF, A. (1986). Calcium and ischemic injury. *The New England Journal of Medicine*, **314**: 1670-1676.
- COMPORTI, M. (1993). Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molecular Aspects of Medicine*, **14**: 199-207.

- COOKE, M. S., EVANS, M. D., DİZDAROĞLU, M., LUNEC, J. (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *The Official Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **17**: 1195-214.
- CRICK, F. H. C. (1968) The origin of the genetic code. *Journal of Molecular Biology*, **38**: 367–379.
- CROTEAU, D. L., BOHR, V. A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **272(41)**: 25409- 25412.
- ÇALIK, A. (2002). Türkiyenin bor madenleri ve özellikleri. *Mühendis ve Makine Dergisi*, **43(508)**: 36-41.
- ÇELİKEZEN, F. C., TURKEZ, H., AYDIN, E., IZGI, M. S., CELIKEZEN, B. (2015). Potent antioxidant and genotoxic effects of ammonium tetraborate in vitro. *Natural Science and Discovery*, **1(2)**: 45-49.
- ÇİFTÇİ, G., AKSOY, A., YARİM, G. F., NİSBET, C., GUVENC, D., ERTEKİN, A. (2015). Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde. *Microscopy Research and Technique*, **78(5)**: 391-395.
- DAMIEN, C., CHANTAL, V. H., PIROUZ, S., ZERIMECH, F. H., LAURENCE, J., JEAN, M. H. (2004). Cellular impact of metal trace elements in *Terricolous lichen Diploschistes muscorum (Scop.)* R. Sant.–Identification of oxidative stress biomarkers. *Water Air, & Soil Pollution*, **152**: 55–69.
- DAVIES, M. J. AND DEAN, R. T. (1997). Radical mediated protein oxidation: From chemistry to medicine, Oxford University Press, UK. 443.
- DE BAER, J., HOEIJMAKERS, J. H. J. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, **21(3)**: 453-460.
- DEATON, C. M., MARLIN D. J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **2(3)**: 278-291.
- DEBELEÇ-BÜTÜNER, B., KANTARCI, G. (2006) Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, **35(2)**: 149 – 170.
- DEMİRTAŞ, A. (2010). Bor'un insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **41(1)**: 75-80.

- DENIZOT F., LANG R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, **89**: 271–277.
- DEVECİ, T. (2012). Gaziantep’te atık sulardan etkilenen toprak ve bitkilerde eser element (Cu, Co, Mn ve Zn) ve Fe konsantrasyonlarının ICP-MS ile tayini. Kilis 7 Aralık Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- DOMIGAN, N. M., CHARLTON, T. S., DUNCAN, M. W., WINTERBOURN, C. C., KETTLE, A. J. (1995). Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**: 16542–16548.
- DUMASWALA, U. J., ZHUO, L., JACOBSEN, D. W., JAIN, S. K., SUKALSKI, K. A. (1999). Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radical Biology & Medicine*, **27 (9-10)**: 1041-1049.
- DURACKOVÁ, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research*, **59(4)**: 459-469.
- DWORAKOWSKI, R., ANILKUMAR, N., ZHANG, M., SHAH, A. M. (2006) Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochemical Society Transactions*, **34**: 960-964.
- ELKOMY, A. E., EL-HADY, A. M. A., ELGHALID, O. A. (2015). Dietary boron supplementation and its impact on semen characteristics and physiological status of adult male rabbits. *Asian Journal of Poultry Science*, **9(2)**: 85-96.
- ELLIOT, R. M., ASTLEY, S. B., SOUTHON, S., ARCHER, D. B. (2000). Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage, *Free Radical Biology & Medicine*, **28(9)**: 1438- 1446.
- ERENEL, G., ERBAŞ, D., ARICIOĞLU, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi*, **3**: 243-250.
- EROL-DAYI, Ö. (2010). Hücre kültüründe oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarları ve zeytinyağının koruyucu etkisi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- EVANS, M. D., COOKE, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*, **26**: 533-542.

- FANG, R., AUST, A. E. (1997). Induction of ferritin synthesis in human lung epithelial cells treated with crocidolite asbestos. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **340(2)**: 369-375.
- FANTEL, A. G. (1996). Reactive Oxygen Species in Developmental Toxicity: Review and Hypothesis. *Teratology*, **53**: 96–217.
- FERON, V. J., TIL, H. P., DE VRIJER, F., WOUTERSEN, R. A., CASSEE, F. R., VAN BLADEREN, P. J. (1991). Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **259(3-4)**: 363-385.
- FLÓ-NEYRET, C., LORENZI-FILHO, G., MACCHIONE, M., GARCIA, M. L. B., SALDIVA, P. H. N. (2001). Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34(5)**: 639-643.
- FREEMAN, B. A., CRAPO, J. D. (1982). Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation*, **47**: 412-426.
- FRIDOVICH, I. (1975). Superoxide dismutase. *Annual Review of Biochemistry*, **44**: 147-159.
- FRIDOVICH, I. (1997). Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**: 18515-18517.
- FRIEDBERG, E. C. (1984), DNA repair, Freeman WH and Company, New York. pp.1-2.
- GAWEŁ, S., WARDAS, M., NIEDWOROK, E., WARDAS, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie*, **57(9-10)**: 453-455.
- GEISER, T., JARREAU, P. H., ATABAI, K., MATTHAY, M. A. (2000). Interleukin-1 β augments in vitro alveolar epithelial repair. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **279(6)**: L1184-L1190.
- GESKE, F. J., GERSCHENSON, L. E. (2001). The biology of apoptosis. *Human pathology*, **32(10)**: 1029-1038.
- GEZMEN-KARADAĞ, K., TÜRKÖZÜ, D. (2014). Diyetle bor alımının sağlık ile etkileşimi, güncel bakış. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **3(2)**: 781-782.

- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H., PARKS, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **51(5)**: 1417–1423.
- GOLDBACH, H.E., WIMMER, M. (2007). Boron in plants and animals: is there a role beyond cell-wall structure? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **170**: 39–48. doi:10.1002/jpln.200625161.
- GUTTERIDGE, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **41**: 1819-1828.
- GÜÇLÜ, S., ALBAYRAK, G., DEVECİ, A., EKMEKÇİ, A. (2014). Evrimin moleküler izleri ve kanıtları. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, **77(2)**: 31-36.
- GÜNAY, E., CELİK, S., SARİNC-ULASLI, S., ÖZYÜREK, A., HAZMAN, Ö., GÜNAY, S., ÖZDEMİR, M., ÜNLÜ, M. (2016). Comparison of the anti-inflammatory effects of proanthocyanidin, quercetin, and damnacanthol on benzo(a)pyrene exposed A549 alveolar cell line. *Inflammation*, **39(2)**: 744-751.
- GÜVEN A.C. (2009). Borik asitin yeni doğan sıçan beyin hücre kültürlerinde glutamatla oluşturulan nörotoksositeye etkisi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- HAKKI, S. S., BOZKURT, B. S., HAKKI, E. E. (2010). Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24**: 243-250.
- HALLIWELL, B. (1999). Antioxidant Defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*, **31**: 261-272.
- HALLIWELL, B. (2005). Free radicals and other reactive species in disease. *eLS*.
- HALLIWELL, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, **32(3)**: 125-130.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, **219**: 1-14.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1990). Role of Free Radicals and Catalytic Metal Ions in Human Disease. *Methods in Enzymology*, **280**: 1-85.

- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. 3th ed. Oxford: Oxford Science Publications, 617-624.
- HALLIWELL, B., GUITTERIDGE, J. M. C. (2005). Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford Science Publications Pres Inc., London.
- HATCHER, E. L., CHEN, Y., KANG, Y. J. (1995). Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radical Biology and Medicine*, **19(6)**: 805-812.
- HECK, H. D., CASANOVA, M., STARR, T. B. (1990). Formaldehyde toxicity--new understanding. *Critical Reviews in Toxicology*, **20(6)**: 397-426.
- HENRICKS, P. A., NIJKAMP, F. P. (2001). Reactive oxygen species as mediators in asthma. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics*, **14**: 409-420.
- HOLLEY, A. E., WALKER, M. K., CHEESEMAN, K. H., SLATER, T. F. (1993). Measurement of n-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine*, **15**: 281-289.
- HORTON, N. D., MAMIYA, B. M., KEHRER, J. P. (1997). Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein. *Toxicology*, **122(1-2)**: 111-122.
- HUNT, C. D., IDSO, J. P. (1999). Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, **12**: 221-233.
- IARC (2006). Formaldehyde, 2-Butoxyethanol, and 1-tert-Butoxy-2-Propanol. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- ICHIHARA, H., KOMIZU, Y., UEOKA, R., MATSUMOTO, Y. (2015). Inhibitory effects of hybrid liposomes on the growth of non-small cell lung carcinoma cells and anti-invasive activity by ceramide generation without any drugs. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, **6(230)**: 2.
- IGNARRO, L. J. (1990). Nitric oxide: A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension (USA)*, **16(5)**: 477-483.
- INAGI, R., MIYATA, T. (1999). Oxidative protein damage with carbohydrates and lipids in uremia: 'Carbonyl stress'. *Blood Purification*, **17**: 95-98.

- İNCE, S., KELES, H., ERDOGAN, M., HAZMAN, O., KUCUKKURT, I. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, **35(3)**: 285-292.
- İNCE, S., KUCUKKURT, I., CIGERCI, I. H., FIDAN, A. F., 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 Element and Medicinal Biology*, **24**: 161-164.
- İNCE, S., KUCUKKURT, I., DEMİREL, H. H., ACARUZ, D. A., AKBEL, E., CİGERCİ, I. H. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, **108**: 197-204.
- JENNER, G. A., LONGERICH, H. P., JACKSON, S. E., FRYER, B. J. (1990). ICP-MS-A powerful tool for high-precision trace-element analysis in earth sciences: evidence from analysis of selected USGS reference samples. *Chemical Geology*, **83**: 133-148.
- JIANG, R. D., SHEN, H., PIAO, Y. J. (2010). The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, **51**: 663-667.
- KAHRAMAN, E., GÜRHAN, İ. D., KORKMAZ, M. (2013). Farklı bor bileşiklerinin CCL 62 (HeLa Kontaminant) insan amniyotik epitelyal hücre hatlarında olası sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması. *Medicine Science*, **2(1)**: 454-468.
- KAVAS, G. Ö. (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, **9**: 1-8.
- KEMP, P. H. (1956). The chemistry of boraks, Part 1, Borox Consolidated limited, S. W. I, London.
- KHAN, F., ALİ, R. (2006). Antibodies against nitric oxide damaged poly L-tyrosine and nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Biological Chemistry*, **39**: 189-196.
- KHERADMAND, F., FOLKESSON, H. G., SHUM, L., DERYNK, R., PYTELA, R., MATTHAY, M. A. (1994). Transforming growth factor-alpha enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **267(6)**: L728-L738.

- KOHEN, R., NYSKA, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30(6)**: 620-650.
- KOPANI, M., CELEC, P., DANISOVIC, L., MICHALKA, P., BIRO, C. (2006). Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta*, **364**: 61-66.
- KOT, F. S. (2009). Boron sources, speciation and its potential impact on health. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **8(1)**: 3-28.
- KRAKOWIAK, A., GÓRSKI, P., PAZDRAK, K., RUTA, U. (1998). Airway response to formaldehyde inhalation in asthmatic subjects with suspected respiratory formaldehyde sensitization. *American Journal of Industrial Medicine*, **33(3)**: 274-281.
- KULAKSIZ, G., SANCAR, A. (2007). Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser. *Türk Biyokimya Dergisi*, **32(3)**: 104-111.
- KÜÇÜKKURT, I., AKBEL, E., KARABAG, F., INCE, S. (2015). The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. *Toxicology and Industrial Health*, **31(3)**: 255-260. DOI: 10.1177/0748233712469648
- LEE, J. H., KANG, G. H., KIM, K. C., KIM, K. M., PARK, D. I., CHOI, B. T., SUNG, K. H., LEE, Y. T., CHOI, Y. H. (2002). Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *International journal of oncology*, **21(6)**: 1239-1244.
- LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W., TODARO, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, **17(1)**: 62-70.
- LIM, S. K., KIM, J. C., MOON, C. J., KIM, G. Y., HAN, H. J., PARK, S. H. (2010). Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology*, **271(3)**: 100-106.
- LINI, M. R., KURCHETI, P. P., BABU, G., PURUSHOTHAMAN, C. S. (2013). Effect of *Aeromonas hydrophila* Infection on *Caspase-3* Expression and Activity in Rohu, *Labeo rohita*. *Journal of Aquaculture Research & Development*, **4(6)**: 1.
- LLOYD, R. V., HANNA, P. M., MASON, R. P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, **22(5)**: 885-888.

- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- LUNEC, J. (1998), ESCODD: European standards committee on oxidative DNA damage. *Free Radical Research*, **29**: 601-608.
- MANDAVILLI, B. S., SANTOS, J. H., VAN HOUTEN, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research*, **509**: 127- 151.
- MAO, C. F., VANNICE, M. A. (1995). Formaldehyde oxidation over Ag catalysts. *Journal of Catalysis*, **154(2)**: 230-244.
- MATTHEWS, N., NEALE, M. L., FIERA, R. A., JACKSON, S. K., STARK, S. M. (1988) Tumor necrosis factor/cachectin and related cytokines, eds. Bonavida, B., Gifford, G. E., Kirchner, H. & Old, L. J. (Karger, New York), pp. 20-25.
- MAZZARELLA, G., FERRARACCIO, F., PRATI, M. V., ANNUNZIATA, S., BIANCO, A., MEZZOGIORNO, A., LIGUORI, G., ANGELILLO, I.F., CAZZOLA, M. (2007). Effects of diesel exhaust particles on human lung epithelial cells: an in vitro study. *Respiratory Medicine*, **101(6)**: 1155–1162.
- McGAHON, A. J., MARTIN, S. J., BISSONNETTE, R. P., MAHBOUBI, A., SHI, Y., MOGIL, R. J., NISHIOKA, W. K., GREEN, D. R. (1995). The end of the cell line: methods for the study of apoptosis in vitro. In: Schwartz LM, Osborne BA, eds. Cell Death. San Diego, Calif: Academic Press Inc, 153–185.
- MERAM, İ., AKTARAN, Ş. (2002). Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri. *Arşiv*, **11**: 299-304.
- MERCAN, U. (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15(1-2)**: 91-96.
- MERK, O., SPEIT, G. (1998). Significance of formaldehyde-induced DNA–protein crosslinks for mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **32**: 260–268.
- METZ, B., KERSTEN, G. F. A., HOOGERHOUT, P., BRUGGHE, H. F., TIMMERMANS, H. A. M., DE JONG, A., MEIRING, H., HOVE, J. T., HENNINK, W. E., CROMMELIN, D. J. A., JISKOOT, W. (2004). Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 6235–6243.

- MINN, A. J., VÉLEZ, P., SCHENDEL, S. L., LIANG, H., MUCHMORE, S. W., FESIK, S. W., FILL, M., THOMPSON, C. B. (1997). Bcl-XL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385(6614)**: 353.
- MIRANDA, K. M., ESPEY, M. G., WINK, A. D. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, **5**: 62-71.
- MOLDOVAN, L., MOLDOVAN, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, **122**: 395-412.
- MOORE, J.A. (1997). An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. Expert Scientific Committee. *Reproductive Toxicology*, **11**: 123-60.
- MOSEMAN, R. F. (1994). Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environmental Health Perspectives*, **102**: 113-117.
- MOSLEN, M. T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis: In free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy, Armstrong, D. (ed.), pp. 17-27. Plenum Pres, New York.
- MOSMAN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- MURRAY, F. J. (1998). A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biological Trace Element Research*, **66**: 331-341.
- NAGHII, M., SAMMAN, S. (1997). The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biological Trace Element Research*, **56**: 273-286.
- NARDI, E. P., EVANGELISTA, F. S., TORMEN, L., SAINT, T. D., CURTIUS, A. J., DE SOUZA, S. S., BARBOSA, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, **112**: 727-732.
- NARDONE, L. L., ANDREWS, S. B. (1979). Cell line A549 as a model of the type II pneumocyte: Phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, **573(2)**: 276-295.
- NEALE, M. L., FIERA, R. A., MATTHEWS, N. (1988). Involvement of phospholipase A2 activation in tumour cell killing by tumour necrosis factor. *Immunology*, **64**: 81-85.

- NETTO, L. E. S., KOWALTOWSKI, A. J., CASTILHO, R. F., VERCESI, A. E. (2002). Thiol enzymes protecting mitochondria against oxidative damage. *Methods Enzymology*, **348**: 260-270.
- NIELSEN, F. H. (1994). Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. *Environmental Health Perspective*, **102**: 59-63.
- NIELSEN, F. H. (1997). Boron in human and animal nutrition. *Plant and Soil*, **193**: 199–208.
- NIELSEN, F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Review*, **66**: 183-191.
- NIKI, E. (1987). Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, **44**: 227-253.
- NORDBERG, J., ARNER, E. S. J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**: 1287–1312.
- NUTTALL, M. E., NADEAU, D. P., FISHER, P. W. WANG, F., KELLER, P. M., DEWOLF, W. E., GOLDRING, M. B., BADGER, A. M., LEE, D., LEWY, M. A. GOWEN, M. (2000). Inhibition of caspase-3 like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in-vitro. *Journal of Orthopaedic*, **18(3)**: 356-363.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95**: 351-358.
- OKÇU, Z., KELEŞ, F. (2009). Kalp-damar hastalıkları ve antioksidanlar. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **40(1)**: 153-160.
- OLD, L. J. (1985). Tumor necrosis factor (TNF). *Science*, 230: 630-632.
- O'MALLEY, Y. Q., RESZKA, K. J., RASMUSSEN, G. T., ABDALLA, M. Y., DENNING, G. M., BRITIGAN, B. E. (2003). The Pseudomonas secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **285(5)**: L1077-L1086.
- ÖZKAN, A., FIŞKIN, K. (2004). Serbest oksijen radikalleri, karsinogenez ve antioksidant enzimler. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, **14**: 52-60.
- PABST, R. (1987). Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard? *The Anatomical Record*, **219(2)**: 109-112.

- PARK, M., LI, Q., SHCHEYNIKOV, N., ZENG, W., MUALLEM, S. (2004). NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-Coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Molecular Cell*, **16**: 331-341.
- PEET, A. (2012). Oxygen toxicity and free radical injury. In: Lieberman MA, Marks A. (Eds). *Marks' Basic Medical Biochemistry*. California; Lippincott Williams & Wilkins, pp. 437-456.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **1**; **29(9)**: e45.
- PHAM-HUY, L. A. HE, H., PHAM-HUYC, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, **4(2)**: 89-96.
- PIGUET, P. F., COLLART, M. A., GRAU, G. E., KAPANCI, Y., VASSALLI, P. (1989). Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, **170(3)**: 655-663.
- PLACER, C. A., CUSHMAN, L. L., JOHNSON, B. C. (1990). Estimation of product of lipid peroxidation (Malondialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, **16**: 259-264.
- PONTEL, L. B., ROSADO, I. V., BURGOS-BARRAGAN, G., GARAYCOECHEA, J. I., YU, R., ARENDS, M. J., CHANDRASEKARAN, G., BROECKER, V., WEI, W., LIU, L., SWENBERG, J. A. (2015). Endogenous formaldehyde is a hematopoietic stem cell genotoxin and metabolic carcinogen. *Molecular Cell*, **60(1)**: 177-188.
- PORTER, N. A. (1984). Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymology*, **105**: 273-283.
- PYTHOUD, C., ROTHENBERGER, S., MARTINEZ-SOBRIDO, L., DE LA TORRE, J. C., KUNZ, S. (2015). Lymphocytic choriomeningitis virus differentially affects virus-induced type I IFN response and mitochondrial apoptosis mediated by RIG-I/MAVS. *Journal of Virology*, **89**: 6240-6250.
- RAO, R. N., TALLURI, M. V. N. K. (2007). An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43**: 1-13.
- REITER, R. J. (1997). Aging and oxygen toxicity: relation to changes in melatonin. *Age*, **20**: 201-213.

- RHEE, S. G. (1999). Redox Signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Experimental & Molecular Medicine*, **31**: 53-59.
- RICE-EVANS, C. A., DIPLOCK, A. T., SYMONS, M. C. R. (1991). Techniques in free radicals research. Elsevier, Amsterdam, vol 22. (14p) pp.1-278.
- RICH, T., ALLEN, R. L., WYLLIE, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature*, **407**: 777 -783.
- RUMCHEV, K. B., SPICKETT, J. T., BULSARA, M. K., PHILLIPS, M. R., STICK, S. M. (2002). Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *European Respiratory Journal*, **20(2)**: 403-408. DOI: 10.1183/09031936.02.00245002
- SAH, R. N., BROWN P. H. (1997a). Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soils samples. *Plant and Soil*, **193**: 15-33.
- SAH, R. N., BROWN, P. H. (1997b). Boron determination—a review of analytical methods. *Microchemical Journal*, **56**: 285–304. doi: 10.1006/mchj.1997.1428.
- SAMMAN, S., NAGHII, M. R., LYONS WALL, P. M., VERUS, A. P. (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biological Trace Element Research*, **66(1-3)**: 227–235. doi:10.1007/ BF02783140.
- SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L. A., ÜNSAL-KAÇMAZ, K., LINN, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, **73**: 39-85.
- SCHLINK, K., JANßEN, K., NITZSCHE, S., GEBHARD, S., HENGSTLER, J. G., KLEIN, S., OESCH, F. (1999). Activity of O6-methylguanine DNA methyltransferase in mononuclear blood cells of formaldehyde-exposed medical students. *Archives Toxicology*, **73**: 15-21.
- SCINTO, L. F., DAFFNER, K. R. (2000). Early diagnosis of Alzheimer's disease. Humana press; pp 31.
- SERAFINI, M., DEL RIO, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report*, **9(3)**: 145-152.
- SHACTER, E. (2000). Protein Oxidative Damage. *Methods in Enzymology*, **319**: 428-436.

- SHADYRO, O. I., YURKOVA, I. L., KISEL, M. A. (2002). Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *International Journal of Radiational Biology*, **78**: 211–217.
- SHAHAM, J., BOMSTEIN, Y., MELTZER, A., KAUFMAN, Z., PALMA, E., RIBAK, J. (1996). DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies. *Carcinogenesis*, **17**: 121- 125.
- SHI, Y. Q., CHEN, X., DAI, J., JIANG, Z. F., LI, N., ZHANG, B. Y., ZHANG, Z. B. (2014). Selenium pretreatment attenuates formaldehyde-induced genotoxicity in A549 cell lines. *Toxicology and Industrial Health*, **30(10)**: 901-909.
- SHIMIZU, K., ENDO, O., GOTO, S., SAKODA, A., ONO, Y., SAKAI, Y. (2004). Bioassay-based evaluation of toxicity of suspended particulate matter in humans: integrated uses of alveolar cells (A549) in air-liquid interface culture and hepatocarcinoma cells (Hep G2). *Biochemical Engineering Journal*, **22**: 1–9.
- SHIN, S., CHA, H. J., LEE, E. M., LEE, S. J., SEO, S. K., JIN, H.O., PARK, I. C., JIN, Y. W., AN, S. (2009). Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells. *International Journal of Oncology*, **35(1)**: 81–86.
- SINCLAIR, A. J., BARNETT, A. H., JUNEC, J. (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, **43**: 334-344.
- SMITH, A. E. (1992). Formaldehyde. *Occupational Medicine*, **42**: 83-88.
- SNYDER, S. H. (1992). Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science*, **257**: 494-6.
- SOLOMON, M. J., VARSHAVSKY, A. (1985). Formaldehyde-mediated DNA– protein crosslinking: a probe for in vivo chromatin structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **82**: 6470–6474.
- SONG, B., ANDERSON, D. J., SCHACHT, J. (1997). Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **282**: 369-377.
- SORG, O. (2004). Oxidative Stress: A theoretical model or biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **327(7)**: 649-662.

- SPEIT, G., SCHMID, O., NEUSS, S., SCHÜTZ, P. (2008). Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **49(4)**: 300-307.
- SPRINGER, J. E., AZBILL, R. D., KNAPP, P. E. (1999). Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nature Medicine*, **5**: 943-946.
- SUAREZ, C., ANDREEFF, M., MILLER, D. R., STEINHERZ, P. G., MELAMED, M. M. (1985). DNA and RNA determination in 111 cases of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) by flow cytometry: correlation of FAB classification with DNA stemline and proliferation. *Blood*, **55(2)**: 282-93.
- SUGARMAN, B. J., AGGARWAL, B. B., HAAS, P. E., FIGARI, I. S., PALLADINO, M. A., SHEPARD, H. M. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, **230**: 943-945.
- SUN, Y., OBERLEY, L.W., LI, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. *Clinical Chemistry*, **34**: 497-500.
- ŞAYLI, B. S., KORKMAZ, M., ŞAYLI, U., BAKIRDERE, S., TİTRETİR, S., ATAMAN, O. Y., KESKİN, S. (2007). Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area. *British Journal of Nutrition*, **98**: 571-575.
- TABAKOĞLU, E., DURGUT, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *Adana Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **3(1)**: 69-75.
- TAKAHASHI, H., HASHIMOTO, Y. (2001). Formaldehyde-mediated modification of natural deoxyguanosine with amines: one-pot cyclization as a molecular model for genotoxicity. *Bioorganic And Medicinal Chemistry Letter*, **11**: 729-731.
- TAN, Z. X., CHEN, Y. H., XU, S., QİN, H. Y., WANG, H., ZHANG, C., XU, D. X., ZHAO, H. (2016). Calcitriol inhibits tumor necrosis factor alpha and macrophage inflammatory protein-2 during lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Steroids*, **112**: 81-87.
- THELLIER, M., CHEVALIER, A., HIS, I., JARVIS, M., LOVELL, M. A., RIPOLL, C., ROBERTSON, D., SAUERWEIN, W., VERDUS, M. C. (2001). Methodological developments for application to the study of physiological boron and to boron

neutron capture therapy. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, **19**: 623–657. doi:10.1081/TMA-100107597.

THOMAS, R. (2013). Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. CRC press. 1-2.

TIAN, D., ZHU, M., LI, J., MA, Y., WU, R. (2009). Cigarette smoke extract induces activation of beta-catenin/TCF signaling through inhibiting GSK3beta in human alveolar epithelial cell line. *Toxicology Letters*, **187(1)**: 58–62.

TÜRKEZ, H. (2007a). Bazı bor bileşiklerinin *in vitro* şartlarda periferel insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

TÜRKEZ, H., GEYİKOĞLU, F., TATAR, A., KELEŞ, S., OZKAN, A. (2007b). Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **62(11-12)**: 889-896.

TÜRKEZ, H., ARSLAN, M. E., ÖZDEMİR, Ö., CHİKHA, O. (2016). Ameliorative effect of boric acid against nicotine-induced cytotoxicity on cultured human primary alveolar epithelial cells. *Journal of Boron*, **1(2)**: 104-109.

ULASLI, S. S., CELİK, S., GUNAY, E., OZDEMİR, M., HAZMAN, O., OZYUREK, A., KOYUNCU T., UNLU, M. (2013). Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *The Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **14(10)**: 6159-64.

USANMAZ, S. E., AKARSU, E. S., VURAL, N. (2002). Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **11**: 93-100.

USUDA, K., KONO, K., ORITA, Y. (1998). Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate. *Archives of Toxicology*, **72**: 468-474.

UYŞAL, M. (1998). Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeneyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, **11**: 336-340.

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C. J., TELSER, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **266(1-2)**: 37-56.

VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T. D., MAZUR, M., TELSER, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and

- human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**: 44-84.
- VAN DER VLIET, A., O'NEILL, C. A., HALLIWELL, B., CROSS, C., KAUR, H. (1994). Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxyxynitrite. *FEBS Letters*, **339**: 89-92.
- VAN SLYKE, K. K., VIRGINIA P. M., MICHAEL F. R. (1981). Treatment of vulvovaginal candidiasis with boric acid powder. *American Journal of Obstetrics And Gynecology*, **141.2**: 145-148.
- VELİOĞLU, S., SAYLI, B. S., ALTUNSOY, S. (1999). Bor madeni havzalarında üretilen bazı gıdalarda bor miktarının belirlenmesi üzerine bir araştırma. *Gıda*, **24(1)**: 13-19.
- VELİOĞLU, S., ŞİMŞEK, A. (2003). İnsan sağlığı ve beslenme açısından bor. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **4(2)**: 123-130.
- VO, T. S., NGO, D. H., BACH, L. G., NGO, D. N., KIM, S. K. (2017). The free radical scavenging and anti-inflammatory activities of gallate-chitoooligosaccharides in human lung epithelial A549 cells. *Process Biochemistry*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.001>
- WANG, Y., YANG, H., LIU, H., HUANG, J., SONG, X. (2009). Effect of staurosporine on the mobility and invasiveness of lung adenocarcinoma A549 cells: an in vitro study. *BMC Cancer*, **9(1)**: 174.
- WANG, H. X., WANG, X. Y., ZHOU, D. X., ZHENG, L. R., ZHANG, J., HUO, Y. W., TIAN, H. (2013). Effects of low-dose, long-term formaldehyde exposure on the structure and functions of the ovary in rats. *Toxicology and industrial health*, **29(7)**: 609-615.
- WEISS, S. J., LOBUGLIO, A. F. (1982). Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Laboratory Investigation*, **47**: 5-18.
- WU, D., CEDERBAUM, A. I. (2003). Alcohol, oksidative stres and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, **27(4)**: 277-284.
- XU, J., ZHEN, J., ZHU, J., LIN, Q. (2016). Tumor necrosis factor- α induced protein 6 attenuates acute lung injury following paraquat exposure. *Toxicology Mechanisms and Methods*, **26(1)**: 32-35.
- YAKA, E., EĞİLMEZ, M. Y., KESKİNOĞLU, P., ÇAVDAR, Z., GENÇ, Ş., GENÇ, K., İYİLİKÇİ, L., YENER, G. G. (2006). Alzheimer hastalığında beyin omurilik

- sıvısında (BOS) biyolojik belirteçler ve BOS' un PC12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi. *Türk Geriatri Dergisi*, **9 (1)**: 1-7.
- YALÇIN, A. S. (1992). Serbest radikaller ve patolojik etkileri. *Sendrom*, **4**: 40-43.
- YARSAN, E. (1998). Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar. *Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **9(1)**: 89-95.
- YENMEZ, N. (2009). Stratejik bir maden olarak bor minerallerin Türkiye için önemi. *İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi*, **19**: 59-94.
- YEŞİLBAĞ, D. (2008). Hayvan Beslemede Bor Elementinin Kullanımı, *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **27(1-2)**: 61-68.
- YOU, B. R., HAN, B. R., PARK, W. H. (2017). Suberoylanilide hydroxamic acid increases anti-cancer effect of tumor necrosis factor- α through up-regulation of TNF receptor 1 in lung cancer cells. *Oncotarget*, doi: 10.18632/oncotarget.14628.
- YOUNG, I. S, WOODSIDE, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, **54**: 176-186.
- ZARARSIZ, İ., KUŞ, İ., ÇOLAKOĞLU, N., PEKMEZ, H., YILMAZ, R. H., SARSILMAZ, M. (2004). Formaldehit maruziyeti sonucu sıçan akciğerinde oluşan oksidatif hasara karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisi: Işık mikroskopik ve biyokimyasal çalışma. *Van Tıp Dergisi*, **11(4)**: 105-12.
- ZEKİ, A. (1985). Etibank boraks fabrikası atıklarından ham boraks, saf boraks, borik asit ve perborat üretim şartlarının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Anorganik Kimya Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi.
- ZERIN, T., KIM, J. S., GIL, H. W., SONG, H. Y., HONG, S. Y. (2015). Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Biology and Toxicology*, **31(6)**: 261-272.
- ZHANG, B. Y., SHI, Y. Q., CHEN, X., DAI, J., JIANG, Z. F., LI, N., ZHANG, Z. B. (2013). Protective effect of curcumin against formaldehyde-induced genotoxicity in A549 Cell Lines. *Journal of Applied Toxicology*, **33(12)**: 1468-1473.
- ZHANG, N., PENG, H., WANG, S., HU, B. (2011). Fast and selective magnetic solid phase extraction of trace Cd, Mn and Pb in environmental and biological samples and their determination by ICP-MS. *Microchimica Acta*, **175**: 121-128.

ZIMMERMAN, R. J., CHAN, A., LEADON, S. A. (1989). Oxidative Damage in Murine Tumor Cells Treated *in Vitro* by Recombinant Human Tumor Necrosis Factor. *Cancer Research*, **49**: 1644-1648.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Damla ARSLAN ACARÖZ

Doğum Tarihi ve Yeri: 29 Mayıs 1987, ANKARA

Üniversite Öğrenimi: Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi (2010)

Košice Veteriner Üniversitesi (2007-2008)

Anadolu Üniversitesi, İşletme Fakültesi (2017)

Yayınlar:

- 1- Sinan Ince, Damla Arslan Acaroz, Ondrej Neuwirth, Hasan Huseyin Demirel, Baris Denk, Ismail Kucukkurt, Ruhi Turkmen. Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, (2014). 72: 147–153.
- 2- Sinan Ince, Ismail Kucukkurt, Hasan Huseyin Demirel, Damla Arslan Acaroz, Erten Akbel, İbrahim Hakki Cigerci. Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere* 108 (2014) 197–204.
- 3- Sinan Ince, Damla Arslan-Acaroz. An Update on Health Effects of Metalloid Trace Element: Boron. *Aperito Journal of Drug Designing and Pharmacology*, (2015). 2(1).
- 4- Sinan Ince, Fatih Avdatek, Hasan Huseyin Demirel, Damla Arslan-Acaroz, Engin Goksel, Ismail Kucukkurt. Ameliorative effect of polydatin on oxidative stress-mediated testicular damage by chronic arsenic exposure in rats. *Andrologia* 08/2015. doi: 10.1111/and.12472.
- 5- Ulaş Acaröz, Damla Arslan-Acaröz, Zeki Gürler. Gıdalarda Antibiyotik Kalıntılarının Saptanması için Enzim İmmunoassay Geliştirilmesi. *Kocatepe Veterinary Journal*, (2016). 9(2): 122-126.

Projeler:

- 1-** Sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite üzerine polydatinin koruyucu etkisinin erkek ratlarda araştırılması 13.HIZ.DES.29, BAP, **Yardımcı Araştırmacı.**
- 2-** Gentamisin Maruziyeti İle Oksidatif Stres ve Nefrotoksisite Oluşturulan Ratlarda Borun Muhtemel Koruyucu Etkisinin Araştırılması. 214O661, TÜBİTAK-3001, **Bursiyer.**
- 3-** Salinomisine Karşı İmmunoassay Geliştirmek için Poliklonal Antikor Üretimi. BAP, 16.TEMATİK.01, **Yardımcı Araştırmacı.**
- 4-** Afyonkarahisar İlinden Toplanan Manda ve İnek Sütlerinde Listeria Türlerinin Varlığının Belirlenmesi. BAP, 15.HIZ.DES.115, **Yardımcı Araştırmacı.**
- 5-** Manda Sütlerinde Ağır Metal Varlığının Araştırılması 16.KARİYER.138 **Yardımcı Araştırmacı.**