

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA BORUN GEBE HAYVANLARDA
KARACİĞER NF-KB TNF- α ve IL-6 mRNA
EKSPRESYONLARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Gamze DAL

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
15.SAĞ.BİL.16 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez no: 2016-009

2016-Afyonkarahisar

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Medikal Biyoloji ve Genetik Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 05./12./2016


Prof. Dr. Cevdet UGUZ
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Üye


Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gamze Dal'ın "Ratlarda Borun Gebe Hayvanlarda Karaciğer NF-kB, Tnf- α ve IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine etkileri" başlıklı tezi 06./12./2016 günü saat 15:00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması aşamasında bana yol gösteren ve her zaman destek olan değerli danışman hocam Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a teşekkürlerimi sunarım. Tüm laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan değerli hocam Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a ve tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini esirgemeyen değerli hocam Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sinan İNCE'ye teşekkür ederim. Tez aşamamda bana destek olan Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk LENGER'e ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme ve tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Gamze DAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	vii
Tablolar	viii
1.GİRİŞ	1
1.1 Bor.....	1
1.1.1. Borun Tanımı	1
1.1.2. Borun Kaynakları	2
1.1.3. Borun Sağlıkta Kullanım Alanları	3
1.1.4 .Bor Yetersizliği	3
1.1.5. Bor Toksisitesi	4
1.1.6. Bor ve Embriyo Gelişimi	5
1.2. Borun Canlılar Üzerindeki Etkisi	6
1.2.1. Borun Bitkilere Etkisi	7
1.2.2. Borun Hayvanlara Etkisi	8
1.2.3. Borun İnsanlara Etkisi.....	9
1.3. Sitokinler.....	12
1.3.1. Tnf- α	13
1.3.2. IL-6.....	14
1.3.3. NF-kB.....	15
1.4. Tezin Amacı	16
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. GEREÇ.....	18
2.1.1. Hayvan Materyali.....	18
2.1.2. Deneysel Aşama.....	18
2.1.3. Bor Diyetinin Hazırlanması	19
2.2. YÖNTEM.....	20
2.2.1. RNA izolasyonu	20
2.2.1.1. RNA'ların Kalite Kontrolü	22
2.2.1.2. DNaz Uygulaması	22
2.2.2. cDNA Eldesi	22
2.2.3. Real Time PCR	23
2.2.4. Agaroz Jel Elektrofez.....	25

2.2.5. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	25
2.2.6. Yem Örneklerinde Bor Analizi	27
2.2.7. İstatistiksel Analiz.....	27
3. BULGULAR	28
3.1. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi	28
3.2. Borun Tnf- α Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	29
3.3. Borun IL-6 Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	32
3.4. Borun NF-kB Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	35
3.5. Bor Analiz Bulguları	38
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ	42
ÖZET	43
SUMMARY	44
KAYNAKLAR	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

Tnf- α	Tümör nekroz faktör alfa
IL-6	İnterlökin-6
NF-kB	Nükleer faktör kabba B
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
RNaz	Ribonükleaz
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
İn vivo	Canlı ortamda
TAE	Tris asetik asit etilen diamin tetra asetik asit
Tm	Erime sıcaklığı
HCL	Hidroklorik asit
B/ml	Bor/mikrolitre
Ct	Eşik devri
dk	Dakika
sn	Saniye
g	Dakika başına düşen devir sayısı
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
Mm	Milimolar
Ng	Nanogram
$^{\circ}$ C	Santigrad derece

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. cDNA'ların 1/4 oranındaki sulandırmalarına ait amplifikasyon eğrileri... 26	26
Şekil 2.2. Örneklere ve genlere ait melting curve eğrisi	26
Şekil 3.1. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri.....	29
Şekil 3.2. 15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri.....	30
Şekil 3.3. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri	31
Şekil 3.4. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyler	32
Şekil 3.5. 15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyleri.....	33
Şekil 3.6. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları. A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyleri.....	34
Şekil 3.7. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları. A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri.....	35
Şekil 3.8. .15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri.....	36
Şekil 3.9. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları. A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri	37

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Bor diyeti içindekiler	19
Tablo 2.2. Real Time PCR analizinde kullanılan primerler	23
Tablo 2.3. Çalışılan genlere ait PCR koşulları	24
Tablo 3.1. Gruplardan izole edilen RNA miktarları	28



1. GİRİŞ

Canlılar için en önemli iz elementlerden birisi olan borun ekonomik öneminin yanı sıra, insanların ve hayvanların sağlığı üzerine olan etkileri yapılmış olan çalışmalarla ortaya konulmaktadır. Son yıllara kadar genellikle borun sanayi alanında yapılmış olan çalışmaları daha çok ön plana çıkmıştır. Borun sağlık üzerine olan etkilerine ise çok değinilmemiştir. Fakat bilimin ilerlemesi ve teknolojinin gelişmesi, doğal kaynaklarla beraber ve alternatif kaynakların da sağlık alanında kullanımlarının artmasıyla borun sağlık alanı üzerindeki etkilerinin de belirlenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Borun canlı organizmasında önemli bir rol oynadığı, aynı zaman da enerji ve üreme metabolizmasını düzenlediği bilinmektedir. Bu çalışma ile gebelik süresince etkili olan karaciğer NF-kB, Tnf- α , IL-6 mRNA ekspresyonu üzerine borun etkisi in vivo olarak belirlenecek ve yapılacak diğer çalışmalara kaynak oluşturacak bilgilerin eldesi de sağlanacaktır.

1.1 Bor

1.1.1. Borun Tanımı

Bor periyodik tabloda “B” sembolüyle gösterilen, yer kabuğunda, insanların, hayvanların ve bitkilerin yaşadığı ortamlarda bulunan metalle ametal arasında yarı iletken özellikte bir elementtir (Warrington, 1923).

Bor periyodik tablonun üçüncü grubunun en başında bulunur. Atom numarası 5’ dir ve kütle numarası 10-11 olan iki kararlı izotopdan oluşmaktadır. Topraktaki bor

miktarı ortalama 10-20 ppm, tatlı sularda ortalama 0,01-1,5 ppm, deniz suyunda ise ortalama 0,5-9,6 ppm, aralığındadır (Woods, 1994).

Çok yüksek miktarlarda kasıtlı olarak borun alınması dışında toksik etkisi görülmemektedir. Borun sağlığa etkilerini belirleyen faktörlerden bazıları dozu, ne kadar süreyle maruz kalındığı ve bireysel özelliklerdir (Uçkun, 2013).

1.1.2. Borun Kaynakları

Bor; insan, hayvan ve bitkiler için esansiyel bir mikro elementtir. Bitkiler tarafından topraktan alınarak, gıda zinciriyle insanlara geçebilmektedir. Coğrafik koşullara göre değişmekle birlikte, insanlar tarafından günlük 1-7 mg arasında bor alındığı belirlenmiştir (Richold, 1988).

İnsan sağlığı bakımından borun temel kaynağını bitkisel içerikli ürünler oluşturmaktadır. Bor içeriği bakımından zengin olan gıdalar yeşil yapraklı sebzeler, kuru baklagiller ve kabuklu meyvelerdir. Elma, biber, üzüm, fındık, fasulye, ceviz pancar ve baklagillerde yüksek oranda bulunurken; tahıllarda ve patatesten az miktarlarda bor olduğu belirlenmiştir. En önemli bor kaynaklarından biri olan erik kurusunun 100 gramının, vücudun günlük ihtiyacı olan boru karşılayabildiği tespit edilmiştir (Gezmen ve Türközü, 2014).

Süt ve süt ürünleri az miktarlarda bor içermelerine rağmen beslenmemizde önemli bir yer tuttıkları için bor alımına önemli oranda fayda sağlamaktadırlar. Et, balık, tavuk ise bor açısından zayıf kaynaklar arasındadır (Gezmen ve Türközü, 2014).

1.1.3. Borun Sağlıkta Kullanım Alanları

Bor metabolizma da kalsiyum, fosfor ve magnezyum dengesini ayarlayabilmektedir. Sağlıklı kemiklerin, kasların oluşumuna ve beyin fonksiyonlarının gelişmesine yardımcı olur (McCoy ve ark., 1994). Son zamanlarda yapılan çalışmalar daha çok borun eklem ve kemik sağlığı bakımından önemi üzerinedir. Bununla beraber borun beyin fonksiyonuyla alakalı çalışmalar da yapılmaktadır (Bilgiç ve Dayık, 2013). Günlük bor alımının östrojenin etkisini arttırarak osteoporoz tedavisinde de etkili olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir (Nielsen ve ark., 1987). Yapılan farklı bir çalışmada da borun koroner kalp hastalıklarına iyi geldiği ve HDL kolesterolü azalttığı saptanmıştır (Samman ve ark., 1998).

Bor Nötron Yakalama Tedavisi özellikle beyin kanseri tedavilerinde yeni bir umut ışığı olmaktadır. Bu tedavide, öncelikle borun ilaç formu p-bronofenilalanin tümörlü dokuya verilir, sonra nötron bombardımanı yapılır. Bu tedavi yöntemi nötron bombardımanından sonra yalnızca tümörlü hücrelerin yok edilmesi esasına dayanmaktadır. Bu şekilde DNA'sı parçalanmış olan hücre bölünme döngüsüne giremez ve tümörlü olan doku ameliyata gerek kalmadan tedavi edilmiş olur (Barth ve ark., 1999).

1.1.4. Bor Yetersizliği

Hayvanlarda bor yetersizliğinde öncelikle kıkırdak ve kemik gelişiminde etkili olan magnezyum, plazma ve organ kalsiyum, fosfor düzeyleri ile alkali fosfataz aktivitesinin etkilenebileceği saptanmıştır (Nielsen ve Schuler, 1992).

D vitamini eksikliğine olan ratlarda bor ilavesi ile fosfor ve kalsiyum dengesinde ve emilimlerinde artış olduğu belirlenmiştir. Bu hayvanlarda beyin fonksiyonlarının beslenmedeki bor düzeyinden etkilendiği belirlenmiştir. Bor yetersizliklerinde beyin

korteksi başta olmak üzere kalsiyum konsantrasyonunun yükseldiği tüm beyinde saptanmıştır (Penland, 1993).

Bor yetmezliğinin beyin elektriksel aktivitesinde azalma meydana getirdiği ortaya koyulmuştur. Bor yetmezliği, insanlarda dikkat ve algılama da bozukluklara, hafıza kayıplarına, motor aktivite hızının düşmesine sebep olur. Bütün bunların oluşmasını açıklayan ana prensip ise borun sinir uyarı transportundaki etkisinin olabilme ihtimalidir (Nielsen, 2000).

Menopoz döneminde düşük miktarlarda bor içeren diyetle beslenen kadınlarda magnezyum ve kalsiyum üriner atımlarının arttığı, serum 25-kolekalsiferol ve plazma iyonize kalsiyum konsantrasyonlarının azaldığı, osteokalsin ve serum kalsitonin konsantrasyonlarının ise arttığı belirtilmiştir (Nielsen ve ark., 1987).

1.1.5. Bor Toksisitesi

Bor, kısa süre içinde vücuttan uzaklaştırıldığı için toksik etkisini sadece yüksek dozlarda alındığında gösterir. Tek doz olarak alınmışsa öldürücü olma ihtimali çok düşüktür. Eğer bireylerde dolaşım bozukluğu, böbrek yetmezliği gibi rahatsızlıklar bulunuyorsa yüksek dozda bor alındıktan birkaç gün sonra ölümün görülebileceği saptanmıştır (Devirian ve Volpe, 2003).

İnsanlarda bor zehirlenmesiyle ilgili 2 vaka kayıt altına alınmıştır. Bunlardan birincisinin raporunda, hamile olan bir kadın yanlışlıkla 70 g borik asidi ağız yolu ile aldığı ve iki saat içerisinde düşük yaptığı belirtilmiştir. Fetüsün de dolaşım bozukluğu ve kalp durmasından dolayı öldüğü bildirilmiştir. İkinci vaka da ise 24 g civarında borik asit alarak bir kadının intihar ettiği ve borik asit alımını takip eden iki günde mide bulantısı ve eksfoliyatif dermatit görüldüğü belirtilmiştir. Sıvı tedavisiyle hasta hayatının kurtarıldığı da vaka raporunda yer almaktadır (Fail ve ark., 1998).

Bora akut olarak maruz kalındığı zaman ishal, karın ağrısı, kusma, mide bulantısı görülen belirtiler arasında başlıdır. Bunlar haricinde yüksek ateş, renal tübüllerde hasar, merkezi sinir sisteminde bozukluk, konvülsiyon, deride kızarıklık ve karaciğer fonksiyonunda anormallikler gibi belirtiler görülür. Bora kronik olarak maruz kalındığında ise halsizlik, alopesi, anoreksi, anemi, dermatit ve gastrointestinal gibi belirtiler görülür (Gregory ve Kelly, 1997).

Borun fazla miktarlarda alımında sığırlarda; bacaklarda yangı ve ödem, riboflavinüri, diyare, zayıflama, büyüme ve yem tüketiminde azalma ve hemoglobinin düzeylerinin düştüğü saptanmıştır (Mc Dowell, 1992). Kanatlılar da ise fazla bor alımında diyare, hipertoni, ataksi, ayak parmaklarında paraliz ve koordinasyon bozukluğu olduğu bildirilmiştir (Sander ve ark., 1991).

Ratlarda meydana gelen bor toksisitesinde ise depresyon, deri ve mukoz membranlarda kırmızı-menekşe renk, ataksi, konvülziyon, ovaryum gelişiminde bozukluk, hemoglobin değerlerinde ve osteoblast aktivitesinde azalma, sperma yapısında inhibisyon saptanmıştır (Treinan ve ark., 1991). Tavşanlarda bor toksisitesinde ise diyare, kilo kaybı, anoraksi ve testiküler atrofi görülmüştür (WHO, 1998).

Akut bor toksisitesi meydana getirilen keçilerde serum sodyum, glikoz, hemoglobilin, kolesterol düzeylerinde yükselme görülürken, magnezyum, serum potasyum ve alkalı fosfataz ve düzeylerinde düşme görülmüştür (Sisk ve ark., 1995). Köpeklerde fazla bor alımı bacaklarda sertlik, konvülziyon, mukoz membranlarda siyanoz-kırmızı menekşe rengi ve şoka neden olmuştur (WHO, 1998).

1.1.6. Bor ve Embriyo Gelişimi

Bor yaşamın erken dönemlerinde embriyo gelişimi için gerekli bir elementtir (Nielsen, 2000). 1985 yılında Eddy ve Talbat embriyo gelişimi için borun olumlu etkisinin ilk

defa gösterilmiş olduğu çalışmayı yapmışlardır (Eckhert, 1998). Loomis 1986 yılında, Riebesell 1991 yılında, Fort ise 1999 yılında *Xenopus Laevis*de (Güney Afrika Kurbağası) borun embriyo gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Beslenmesinde bor miktarı azaltılmış olan kurbağalarda artmış embriyo ölümleri görülmüştür. Bu çalışmalar sonucu *Xenopus Laevis*de embriyogenezis üzerinde borun olumlu bir etkisinin olduğu belirlenmiştir (Fort ve ark., 1999).

Embriyonik büyümesi yavaş olan balıklar üzerinde 1995 yılında yapılmış olan bir çalışmada; bor konsantrasyonunun düşük olduğu saptanmıştır. Sudaki bor miktarı 2 µm/L iken 11µm/L'ye çıkarılmış ve bu sayede büyümede %8 oranında artış gözlenmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından bor düzeyi 2µm/L'den 4 µm/L'ye çıkarıldığında ise embriyonik dönemdeki büyümede %6,5 oranında artma gözlenmiştir (Eckhert, 1998). Zebra balıklar üzerine 1998'de yapılmış olan bir araştırmada erken postfertilizasyon esnasında, bor bakımından fakir diyetle beslenen balıkların %45' inin embriyoları ölmüştür (Nielsen, 2000).

Lannove 1999 yılında dişi fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmasında deneklere bordan sınırlı ve bor bulunan diyetler uygulamıştır. Bu çalışmasında çift hücre embriyosunun gelişimini izlemiştir. Bordan sınırlı diyet alan dişi farelerin embriyolarınının diğer grubun embriyolarına oranla daha fazla dejenere olduğu belirlenmiştir. Bordan sınırlı diyet uyguladığı dişi farelerin embriyolarınının %57'si zarar görürken, bor ile desteklediği diyeti uyguladığı dişi farelerin ise embriyolarında %20'sinin dejenere olduğu saptanmıştır (Fort ve ark., 1999).

1.2. Borun Canlılar Üzerindeki Etkisi

Canlı varlığının devam edebilmesi; canlı türlerini ve doğa zenginliklerini korumakla mümkündür. Bor, su ve topraktan bitkilere taşınabilmektedir. Bu yüzden dünyamızın yapısında ve dünya üzerinde yaşayan canlılarda bor bulunmaktadır (Mergen ve ark., 2006).

Bor kaynaklarından alınan miktarlar, insanlarda, hayvanlarda toksisiteye sebep olacak oranda değildir. Fakat yüksek düzeylerdeki bor, yaşayan organizmalara zehirli etkiler yapmaktadır. Ayrıca suda yaşayan canlılara zehirli etkisiyle büyük zararlar verebilmektedir (Uygan ve Çetin, 2004).

1.2.1. Borun Bitkilere Etkisi

1920 yıllarından itibaren borun bitkilerin gelişimi ve ürün verebilmeleri için gerekli bir element olduğu bilinmektedir (Warrington, 1923). Bor hücre farklılaşması ve olgunlaşmasında, hormon ve nükleik asit metabolizmasında görevleri vasıtasıyla rol alır. Gerekli zamanlarda gübreye eklenebilen bor ile toprak zenginleştirilmektedir (Mergen ve ark., 2006).

Bor bitki içerisinde kısmen hareketsizdir. Bitkilerde borun, polen döllemesine, hücre döllemesine, çiçek açmasına, hormonların hareket ve etkinliğine, azot ve karbonhidrat metabolizmasına, aktif tuz absorpsiyonuna ve su-bitki ilişkilerini etkilediği belirlenmiştir. Bitki köklerinin gelişebilmesi için kalsiyuma ek olarak bor iyonuna da ihtiyaçları vardır. Fakat, fazla miktarlarda bor toksik etki gösterir ve bitkilerin gelişmelerini geciktirebilir hatta onları öldürebilir (Uygan ve Çetin, 2004).

Bitkileri geliştirmek için bor kullanımının yanı sıra gelişimlerine engel olmak için de kullanılabilir. Toprak sterilizasyonunda, yabancı ot kontrolünde, yanmayı geciktirici özelliği ile petrol rafineleri, kereste depoları gibi benzeri alanlarda bitkileri yok etmek için bor kullanılır (Kalafatoğlu ve ark., 1997).

1.2.2. Borun Hayvanlara Etkisi

Borun hayvanlar üzerindeki etkilerini belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. Hayvanlar üzerinde borun kanserojen etkisini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalar sonucunda borun genotoksik olmadığı saptanmıştır. Bor ve bor bileşikleri ile temas edilmesinin kansere ve kromozom düzensizliğine sebep olmadığı, genleri değiştirmedeği ortaya koyulmuştur (Dieter, 1994).

Borun hayvanlar üzerindeki uzun süreli etkileri farelerde incelenmiştir. Bu çalışmada içme suyuna katılmış olan 0,84 mg/kg bor eklenmiş ve bunun bir zararı gözlenmemiştir. Bu süre uzatılınca ve miktar arttırılınca üreme organları başta olmak üzere, bazı sistemlerin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir (Erdoğan ve ark., 2004).

Bor maruziyetinde hayvanlar için öldürücü doz, hayvanın türüne bağlı olmakla birlikte hayvanın her kg'ı için 1,2-3,45 g arasında değişen bir değerdir (DSİ, 1983). Oral yol ile alınan birim kg vücut ağırlığına 3-4 g gibi yüksek dozlar farelerde kısa bir süre içinde titremeler ve depresyon yaratır. Sonunda ise hayvanın ölümüne neden olmaktadır. Buna ek olarak aşırı bor maruziyetinin farelerde ishal, köpeklerde kusma gibi belirtileri vardır (Uygan ve Çetin, 2004).

Alabalıklar üzerinde yapılmış olan bir çalışmaya göre 2000 mg/l borik asidi balığa bir zarar vermemiştir. 5000 mg/l borik asidin ise balığın derisi üzerinde koyulaşmaya sebep olduğu saptanmıştır (DSİ, 1983). Küçük deniz balıklarının 20 derecede 6 saat süre ile sert suda ise 19-19,5 g/l veya damıtık suda 18-19 g/l bor ile teması letal doz olarak belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada bir süt ineğine 40 gün süreyle her gün 16-20 g arası borik asit verilmesi sonucunda bir etki gözlenmemiştir (Cantürk ve Onar, 2004).

Zebra balıklarında bor yetersizliği, fotofobiye neden olmaktadır. Ayrıca bor yetersizliğinin fotoreseptör distrofiye neden olabileceği görülmüştür. Bor takviyesi yapılan zebra balıklar ile bordan fakir diyet alanlar karşılaştırılmıştır. Bordan fakir diyet almış olan zebra balıklarda bor yetersizliğinin segment ve myoid azalması nedeniyle fotoreseptör hücrelerini azalttığı sonucuna varılmıştır (Nielsen, 2000).

Hegsted ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; D vitamini yetersizliği olan ratlar değişik bor içeren diyetlerle beslenmiş ve büyüme, gelişme, kemik ve mineral yoğunluğu, serum mineral emilim düzeyindeki değişiklikleri araştırılmıştır. Gruplardan birine 0,158 ppm/gün, diğerine ise 2,72 ppm/gün bor verilmiş ve ratlar 11 hafta süresince gözlenmiştir. Çalışma sonunda yüksek bor içeren diyetle beslenen ratlarda fosfat ve kalsiyum emiliminde artış belirlenmiştir. Vücut ve organ ağırlığı, kemik parametrelerinde çok az değişiklik belirlenmiştir. Çalışma sonunda yüksek bor içeren diyet alan ratlarda mineral dengesinin olumlu etkilendiği ve hipokalseminin önlendiği ortaya koyulmuştur (Hegsted ve ark., 1991).

Yapılan başka bir araştırmada; ratların diyetine eklenen, borik asit ve boraksın antioksidan aktivite, lipid peroksidasyon, bazı vitamin düzeyleri ve DNA hasarı üzerine olan etkilerine çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmada, diyete 100 mg/kg bor bileşikleri eklenmiş ve bu bor bileşiklerinin lipid peroksidasyonu azalttığını, vitamin durumunu ve antioksidan savunma sistemini geliştirdiğini gözlenmiştir. Bu araştırma sonucunda; karaciğer GSH ve A vitamini konsantrasyonu dışında bor bileşikleri arasında serum oksidan-antioksidan dengesi ve biyokimyasal parametrelerinde fark olmadığı belirlenmiştir (Ince ve ark., 2010).

1.2.3. Borun İnsanlara Etkisi

Bor insan vücuduna doğal olarak su ve besinlerle oral yolla, tozlarla solunum yoluyla, kremlerle ise deri yoluyla girmektedir. Vücuda ne şekilde girerse girsin, %90-95 kadarı vücutta birikmez ve idrar yolu ile dışarı atılır. Sadece kemiklerde, kıllarda ve karaciğer, dalak gibi organlarda birikebilmektedir (Şaylı ve ark., 2007).

Borun bakır, kalsiyum, magnezyum, glikoz, azot ve trigiliseritler gibi hayat boyunca önemli olan birçok bileşenin kullanılmasında ve metabolizmasında önemli roller aldığı insanlar üzerinde yapılan araştırmalar ile ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenlerden dolayı; çeşitli vücut bölümlerinin yapılarını ve fonksiyonlarını etkileyebilmektedirler. Yapılan çalışmalar sonucunda borun toksik etkisinin çok düşük

olduğunu saptanmıştır. Borun akut etkisi ise 15-30 g boraks veya 2-5 g borik asit kisten alınırsa görülmektedir. Borun kronik etkisi bakımından günde 3 g borik asit veya 5 g boraksın herhangi bir etkisinin olmadığı, 5-10 g boraksın yalnızca protein metabolizmasını etkilediği saptanmıştır (Moseman, 1994).

Borun toksik etkisi çocuklarda genelde havale, koma gibi beyin zarı tahribi etkileri şeklinde görülmektedir. Yetişkinlerde kusma, ishal, baş ağrısı heyecan veya depresyon şeklindedir. Parmak uçlarındaki pembe renk, bor ile zehirlenmiş olmanın belirtisi olan karakteristik bir görünümdür (Mc Kee ve Wolf, 1963).

Borun testise nasıl ve ne şekilde zarar verdiği ve metabolizması henüz açıklanamamıştır. Ancak ülkemizde ve dünyada yapılmış olan birçok araştırmada borun kısırılığa sebep olmadığı ortaya koyulmuştur (Şaylı, 2003).

Yapılan başka bir araştırmada; doğal yol ile alınan borun erkeklerde prostat büyüklüğüne, alt üriner sistem semptomlarına ve bening prostat hiperplazisine etkileri üzerine çalışılmıştır. Araştırmada, yüksek oranda bora maruz kalmış olan erkekler üzerinde yürütülmüş daha önceki çalışmalardan farklı olarak daha küçük prostat boyutunun olduğu belirlenmiştir. Bu araştırma sonucunda kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha fazla bora maruz kalan erkeklerde daha küçük prostat boyutları olduğu belirlenmiştir. Böylelikle önceki yapılmış olan çalışmalarda elde edilen bu verinin doğru olduğu bilimsel olarak ispatlanmıştır. Aynı zamanda veriler sonucunda prostatın iyi huylu büyümesi anlamına gelen bening prostat hiperplazisinde borun etkili olabileceği düşünülmektedir (Müezzinoğlu ve ark., 2011).

İçme sularında yüksek miktarlarda bor bulunması, sindirim sisteminde rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Ayrıca karaciğerde büyüme ve sinir sisteminden kaynaklanan bazı sorunlara sebep olmaktadır (Cantürk ve Onar, 2004).

Yalnızca bitkiler için önemli olduğu düşünülen borun, 1980'lerden sonra yapılan çalışmalar neticesinde hayati önemi olduğu ortaya koyulmuştur ve bor mineralinin insan vücudu için pek çok yararlı etkisinin olduğu bulunmuştur. Bor, D vitamini ve kalsiyum gibi minerallerin metabolizmada düzenlenmesinde rol alır. Aynı

zamanda magnezyum ve kalsiyum azalmasını önleyerek bu sayede kemik yapısını koruduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir (Şaylı ve ark., 2007).

Günlük 3,25 mg bor alımında motor aktivitelerde ve tepki süresinde gelişmeye katkı sağladığı bulunmuştur. Daha düşük dozlarda bor alımında ise zayıf zihinsel ve psikomotor performans sergilendiği belirlenmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda görülmektedir ki zihinsel performans ve beyin fonksiyonları için bor önemli bir elementtir (Penland, 1994).

Nielsen tarafından 1992 yılında yapılmış olan bir çalışma sonucunda bor içeren gıdaların kemik erimesini önlemeye yardımcı olabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca borun kalsiyum ve magnezyum metabolizmasını artırarak östrojenik katkı sağladığı, Nielsen tarafından yüksek kemik erimesi riski taşıyan yaşları 48-52 arasında değişen kadınlar üzerinde yapmış olduğu bir araştırmada belirlenmiştir. Erkeklerde ise testosteron seviyesini artırarak buna bağlı olarak kas ve doku miktarında artışa sebep olduğu belirlenmiştir (Nielson, 1987).

Bor mineralinin fazla olduğu bölgelerde, borun su ve besinlerle vücuda alınmasıyla bölgedeki prostat kanserli oranının azaldığı ve borun prostat kanserinin önlenmesinde etkili olduğu belirlenmiştir (Müezzinoğlu ve ark., 2011).

Yapılan başka bir çalışmada ise bir malatyon toksisitesi oluşturmuş olan ratlarda borun birçok dokuda oluşan oksidatif stres üzerine etkisine çalışılmıştır. Malatyon toksikasyonuna maruz kalmış olan ratların, karaciğer dokusu, beyin dokusu ve böbrek dokularında, malondialdehid, glutatyon, nitrik oksit, katalaz ve aktivitelerinin yanı sıra serum asetilkolinesteraz ve 8-dihidroksiguanin (oksidatif DNA hasarı göstergesi) seviyeleri araştırılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda elde edilmiş olan biyokimyasal ve histopatolojik veriler, malatyon toksisitesiyle birlikte artan oksidatif stres ve doku hasarına borun tedavi edici bir etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır (Karabağ ve ark., 2015).

1.3. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arasında iletişimi sağlamada önemli rol oynayan, çeşitli biyolojik fonksiyonları düzenleyen hormon benzeri protein veya glikoproteinlerdir (Senatorski ve ark., 2002). Düşük molekül ağırlığına sahip olan sitokinler, başta makrofajlar ve aktive olmuş lenfositler olmak üzere birçok hücre tarafından sentezlenebilmektedir (Gündüz ve ark., 2000).

İlk kez Cohen ve arkadaşları tarafından immun sistem hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücre tarafından salgılanan, hücre çoğalması, hücre gelişmesi, doku tamiri, bağışıklık gibi bir çok görevi olan bu polipeptit yapıları tanımlamak amacıyla sitokin adı kullanılmıştır (Dupont ve ark., 1974). İlk zamanlarda lenfositler tarafından salgılanan sitokinler lenfokin; monositler tarafından salgılanan sitokinler monokin; lökositler tarafından salgılanan sitokinler ise interlökin olarak adlandırılmıştır (Page, 1991). Zamanla farklı hücrelerin benzer sitokinleri salgılama yetenekleri olduğu bulunmuş ve Hefti ve arkadaşları tarafından hücre üzerindeki temel etkisi dikkate alınarak 5 ana gruba ayrılmıştır. Bunlar; kemotaktik sitokinler, proinflamatuvar sitokinler, antiinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörü sitokinler ve immun düzenleyici sitokinlerdir (Hefti, 1993).

Sitokinler birçok yönden hormonlara benzemektedir. Ancak etkileri hormonların etkilerinden daha farklıdır. Sitokinler özelleşmiş bir dokudan değil de, değişik hücreler tarafından oluştuğu için hormon kabul edilmezler (Abul ve ark., 2000). Hücre dışına salınmış olan sitokinler kısa bir süre içerisinde lokal olarak etkisini gösterirler. Eğer sitokinler salındıkları hücrelere etki ediyorsa buna otokrin etki denir. Sitokinlerin yakınındaki bir hücreye etki etmesine parakrin etki denirken, uzaktaki bir hücreye etkisine ise endokrin etki denir (Güneri ve ark., 1997). Sitokinlere ait önemli bir özellikte, farklı hücreler tarafından aynı sitokinin salgılanabilmesi ya da koşullara göre bir tür sitokinin farklı hücrelere etki etmesi olayına pleiotropik etki denir. Ayrıca, sitokinler birbirlerinin fonksiyonlarını etkileyerek sinerjist veya antagonist etki de gösterebilirler (Wilson ve ark., 2002).

Sitokinlerin üretimi sınırlıdır ve genellikle sitokinler depolanmazlar. Bu yüzden sitokin ihtiyacı halinde yeni bir gen transkripsiyonu başlatılır. Bu periyodun süresi kısadır. Hızla sentezlenen sitokinlerin salınımları da hızlı bir şekilde olur (Nororiha ve ark., 1995).

1.3.1. Tnf- α

Tümör nekroz faktör (Tnf), polipeptit bir sitokindir. Tnf- α ve Tnf- β olmak üzere iki çeşittir. Tnf- α kaşektin olarak da bilinen klasik formdur. Tnf- β ise lenfosit olarak bilinmektedir (Krillova ve ark., 1999).

Tnf- α inflamasyonda önemli bir rolü olan, makrofajlar ve lenfositler tarafından salınan, tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayan bir sitokindir (Matthews ve Watkins, 1978). Tnf- α ilk defa 1975 yılında tanımlanmış ve tümör hücrelerini nekrotize edebildiği için bu isim verilmiştir (Empl ve ark., 2001). Ayrıca Tnf- α ; kaşektin, nekrozin, hemorajik faktör gibi isimlerle de bilinmektedir (Fitzgerald ve ark., 2001). Tnf- α 'nın, TnF-R1 ve Tnf-R2 olmak üzere 2 reseptörü vardır ve bu reseptörler ile etkilerini gösterirler (Vandenabeele ve ark., 1995). Tnf-R1'in ekspresyonu bütün hücreler ve tümör hücrelerinde gerçekleşirken, Tnf-R2 ekspresyonu ise sadece immun sistem hücrelerinde yapılır (Vanhorssen ve ark., 2006).

Tnf- α 'nın birçok otoimmün hastalıkla ilgili olduğu ve birçok biyolojik etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca hücre farklılaşması, apoptozis, doğal ve sonradan kazanılmış bağışıklık üzerinde önemli etkilere sahiptir (Sklavounou ve ark., 2000). Tnf- α 'nın tümör hücrelerinde sitotoksik etki gösterirken, normal hücrelerde bunu göstermemesi en önemli özelliklerinden biridir (Anderson ve ark., 2004). Tnf- α 'nın başlıca kaynakları arasında monositler, makrofajlar, aktif T ve B lenfositler, keratonisitler bulunmaktadır. Ayrıca beyindeki glial hücreler ile kalpteki kardiyak myositlerde de üretilebilmektedir (Ruuls ve ark., 1998). Tnf- α 'nın sentezini arttıran faktörler arasında parazitler, virüsler, mikrobakteriler, enterotoksin ve endotoksinler ile Tnf'nin kendisi de bulunur (Beutler., 1999).

Tnf- α karaciğer rejenerasyonu sırasında Kupffer hücrelerinin senteziyle oluşturulur. Fakat Tnf- α 'nın aşırı ekspres edilmesi sonucunda hepatositler hiperplazi gösterirler ve karaciğer ağırlığının vücut ağırlığına göre ihtiyaçtan daha fazla artmasına sebep olurlar (Yamada ve Fausto, 1998). Tnf- α 'nın normal konsantrasyonlarda bulunmasının doku onarımı, doku yenilenmesi, antitümoral immünite gibi yararları bulunmaktadır (Papadakis ve Targan, 2000). Tnf- α 'nın yüksek seviyelerde olması doku yaralanmaları, doku hasarı, septik şok, sitotoksite, ateş, adrenal hemoraji, gastrointestinal nekroz gibi bazı olumsuz durumlara neden olabilmektedir (Shohami ve ark., 1999). Kronik olarak Tnf- α düşük seviyede anoreksiya, kilo kaybı, lipit tüketimi, protein katabolizması, insülin direnci gibi sorunlar görülebilmektedir (Papadakis ve Targan, 2000).

1.3.2. IL-6

İnterlökin-6 (IL-6); makrofajlar, monositler, T ve B lenfositler ile birçok tümör hücresi tarafından salgılanan bir sitokindir. Diğer sitokinler gibi inflamasyon ve kanser patogeneğinde önemli yer tutar (Emral, 2006).

IL-6 1986 yılında ilk kez T hücreleri tarafından salgılanan ve B hücrelerinin farklılaşmasını indükleyen bir faktör olarak tanımlanmıştır (Nakarata ve Nishimoto, 2006). IL-6'nın kemik katabolizması, immün, sinir, endokrin, hemotopietik sistem gibi pek çok sistemde önemli rolü bulunmaktadır (Guzman ve ark., 2010). Ayrıca T ve B lenfositlerinin farklılaşmasında, makrofajlar ve monositlerin fonksiyonlarında önemli yer tuttuğu bilinmektedir (Kishimoto ve ark., 2002). Geni 7. Kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır (Banks ve ark., 1994). IL-6'nın reseptörü (IL-6R) sinyal ileten alt birim ve bağlayıcı bir proteinden oluşur (Richord, 1998).

IL-6'nın en önemli kaynağı mononükleer fagositik hücrelerdir. T ve B lenfositler, mast hücreleri, dendritik hücreler, monositler, makrofajlar, endotelial hücreler, osteoblastlar, mezengial hücreler, kondrositler ve birçok immün sistem hücresi tarafından ekspres edildiği bilinmektedir (Guzman ve ark., 2010). Ayrıca

yapılan invitro çalışmalarda nöronlar tarafından da IL-6 eksprese edildiği ortaya koyulmuştur (Ali ve ark., 2000).

IL-6'nın en iyi açıklanmış olan etkileri B lenfositler ve hepatositler ile ilgilidir (Gündüz ve Er, 2000). IL-6 B lenfositlerde farklılaşmayı ve antikör sekresyonunu uyarmaktadır ve büyüme faktörü olarak rol almaktadır (Yeğin, 1990). Hepatositleri ise NK hücrelerini ve makrofajları aktive ederek, akut faz protein oluşumu için uyarır. Karaciğeri toksik hasarlardan korumada büyük bir önemi bulunmaktadır (Deboneraka ve ark., 2001).

Serumda bulunan IL-6 seviyesinin otoimmün hastalıklar, karaciğer hastalığı, AIDS, lenfoma, sepsis ve bazı infeksiyon hastalıklar gibi durumlarda yükselmektedir (Hirano ve ark., 1990). Yapılan çalışmalarda bazı kanser hastalarında IL-6 seviyesinde artış gözlenmiştir (Hatada ve Miki, 2000). Ayrıca proinflamator sitokinlerden olan Tnf- α ve IL-6'nın artan seviyelerinin AIDS hastalarının plazma ve dokularında olduğu belirlenmiştir (Shimizu ve ark., 2005).

1.3.3. NF-kB

Nükleer faktör kappa B (NF-kB) apoptozis, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, inflamasyon gibi olaylardan sorumlu çok sayıda gen ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Nakshatri ve ark., 1997).

NF-kB ilk kez Sen ve Baltimore tarafından 1986 yılında keşfedilmiş ve tanımlanmıştır (Baldwin, 2001). Yapılan ilk tanımlama da B lenfositlerin çekirdeklerinde bulunan, immunglobulin kappa hafif zincir genine bağlanıp ekspresyon düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak açıklanmıştır (Sen ve Baltimore, 1986). NF-kB'nin birçok organizma ve hücre tipinde bulunan, pek çok genin ekspresyonu için önemi olan düzenleyici bir protein olduğu tespit edilmiştir (Pahl, 1999). Memeli hücrelerinde, NF-kB' ye ait 5 alt ünite olduğu belirlenmiştir

(Chen ve ark., 1999). Bunlar; NF-kB₁, NF-kB₂, Rel A, Rel B ve c-Rel' dir (Ghosh ve ark., 1999).

NF-kB hücrelerin sitoplazmasında inaktif halde bulunur. Yalnızca aktive edildiği zaman çekirdeğe geçer (Shishodia ve Aggarwal, 2004). Nükleusa geçen NF-kB, DNA'ya bağlanır ve burada 150' den fazla genin ekspresyonunu düzenler (Baeurle ve Henkel, 1994). NF-kB; inflamasyon, hastalık, apoptozis, kanser, gelişimsel işlemler ve bazı genlerin ekspresyonlarını içeren pek çok fizyolojik işlem ile ilişkilendirilmiştir (Wu ve Kral, 2005). NF-kB'nin uyarılması için bazı faktörlere ihtiyaç vardır. Bu faktörler arasında sitokinler, serbest radikaller, iyonizan radyasyon ve mikrobiyal ajanlar vardır (Tripathi ve Aggarwal, 2006). NF-kB'nin anormal aktivasyonunun; septik şok, kanser, akciğer fibrozisi, felç, astım, AIDS gibi inflamasyon ile ilgili bazı hastalıklara ve patolojik durumlarla alakalı olduğu belirlenmiştir (Baldwin, 2001). NFkB'nin sürekli inaktivasyonu ise apoptoziz ve gecikmeli hücre büyümesine neden olmaktadır (Baldwin, 1996).

NF-kB'nin bazı tümör hücrelerinin gelişiminde önemli bir rolü vardır (Garg ve Aggarwal, 2002). Yapılan çalışmalar da NF-kB'nin tümörlerde baskılanması durumunda hücre siklusunu durdurup, apoptozise sebep olduğu belirlenmiştir (Bharti ve Aggarwal, 2002). Aynı zamanda tümör hücrelerinin NF-kB inhibisyonu ile kemoterapiye duyarlı bir hale gelebildiği yapılan çalışmalar sonucu saptanmıştır (Rundall ve ark., 2004).

1.4. Tezin Amacı

Bor doğada bulunan en değerli elementlerden birisidir. Sağlık alanında hücrelerin enerji metabolizmasını düzenlediği, birçok enzimi indüklediği ve vücudun savunmasını kuvvetlendirdiği bilinmektedir. Ayrıca borun hastalık olgularında (karaciğer hasarı ya da kanser terapisinde radyoloji alanında kullanılması gibi) vücuttaki hasarlara karşı koruyucu etkisinin bulunduğu da belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında borun diyetinde yokluğu, düşük, marjinal ve normal miktarda bulunmasının gebelik sürecinde etkili olan karaciğer NF-kB, Tnf- α ve IL-6 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi in vivo olarak belirlenecektir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Hayvan Materyali

Tez çalışması kapsamında 100-200 g ağırlığındaki 15 adet Sprague Dawley Irkı dişi rat kullanılmıştır. Ratlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. 25 °C sıcaklıkta ve % 50±5 nemli odalarda barındırılan ratların su ve yemleri her gün değiştirilerek ve ad libitum olarak verilmiştir. Çalışma için Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onay alınmıştır (AKÜHADYEK-513-15 referans nolu 49533702/109 sayılı araştırma).

2.1.2. Deneysel Aşama

Çalışmanın in vivo denemesi için; süttten kesilmiş ve kuru yem yemeye başlamış 2 haftalık dişi ratlar her grupta 3 rat olacak şekilde kontrol negatif (işlem görmüş-bor içermeyen yem), kontrol pozitif grup (işlem görmemiş yem), özel olarak hazırlanmış bor içermeyen yemlere ek olarak gastrik gavajla bor normal grup (2 µg B/ml), bor marjinal grup (0,3 µg B/ml), ve bor düşük grup (0,04 µg B/ml) miktarlarda bor verilmek üzere ratlar 5 gruba ayrılmıştır. İki hafta boyunca bor içeren diyetler ile beslenmiş olan dişi ratlara 25-30 IU gebe kısrak serumu gonodotropin (PMSG) yapılmıştır. 24 saat sonra da insan 30 IU serum gonodotropin (HCG) hormonları yapılmış ve erkek ratlar ile çiftleştirilmek üzere bir araya bırakılmıştır. Çiftleşmiş olan ratlar yem yemeye devam etmişler ve çiftleşmeden sonra gebeliğin 10., 15. ve 20. günlerinde gebe ratların karaciğerlerin toplanması yapılmıştır. Bu ratlardan elde edilen dokular NF-kB, TNF-α ve IL-6 mRNA düzeylerine bakılmak üzere çalışmada kullanılmıştır.

2.1.3. Bor Diyetinin Hazırlanması

Tablo 2.1. Bor diyeti içindekiler

İÇİNDEKİLER (g/kg)	KONTROL	DÜŞÜK	MARJİNAL	NORMAL
1. Bor (gastrik gavajla)	-	0.04	0.318	1.908
2. Asit ile yıkanmış mısır	743.44	743.4	743.082	741.492
3. Vitaminden yoksun kazein	140	140	140	140
4. Trace mineral karışımı	10	10	10	10
5. Makro mineral karışımı	25.4	25.4	25.4	25.4
6. Vitamin karışımı	4	4	4	4
7. Mısır yağı	75	75	75	75
8. DL-alfa tokoferol	0.2	0.2	0.2	0.2
9. Kolin bitartarat	2	2	2	2

1. Bor; gastrik gavajla bor verilerek elde edilen son konsantrasyonlardır.

2. Asit ile yıkanmış mısır; mısırlar 2,8 litre 2 N HCl ile 30 dk yıkanmış, üstteki kısımlar atılmış ve daha sonrasında 1,2 litre deiyonize su ile 3 sefer art arda yıkanmıştır. Yıkandıktan sonra 48 saat boyunca 75 °C de kurutma işlemi tamamlanmıştır. Yemler kurutma sonrası diyetle eklenmek için hazır hale gelmiştir.

3. Vitaminden yoksun kazein

4 Trace mineral karışımı (g/kg): asitle yıkanmış mısır, 8,497; NaCl, 0,0450; Zn(CH₃COO)₂·2H₂O, 0,0350; CuSO₄·5H₂O, 1,3000; (CH₃COO)₂Mn·4H₂O, 0,0340; iron silgi, 22 çaplı, 0,0240; Na₂O₃Si·9H₂O, 0,0510; Na₂HAsO₄·7H₂O, 0,0050; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0,0003; (CH₃CO₂)₇Cr₃(OH)₂, 0,0020; NiCl₂, 0,0020; NaF,

0,0020; KI, 0,0005; NH_4VO_3 , 0,0002; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,0003 ve 3,5 g demir tozu (26 mL distile suda hazırlanmış olan 6 mol/L HCl kullanılarak çözdürülmüştür).

5. Makromineral karışımı (g/kg): $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 4,4; KC, 4,0; CaHPO_4 , 17,0.

6. Vitamin karışımı (g/kg): D-dekstroz, 3,7855; inositol, 0,050; D pantotenik asid, 0,016; nikotinik asit, 0,030; riboflavin, 0,027; thiamine-HCl, 0,010; piridoksin-HCl, 0,015; vitamin B12 (% 0,1'lik mannitoldeki çözeltisi), 0,050; 1-5 dihidroksikolekalsiferol (400,000 IU/g), 0,005; retinil palmitat (500,000 IU/g), 0,0025; para-aminobenzoik asid, 0,002; D-biotin, 0,005; folik asid, 0,001; menadion, 0,001.

7. Mısır yağı

8. DL-alfa tokoferol

9. Kolin bitartarat (Bourgeois ve ark., 2007)

2.2. YÖNTEM

2.2.1. RNA izolasyonu

Alınan örnekler kriyo tüplere konularak sıvı azot içinde dondurulmuştur. Bütün örnekler RNA izolasyonuna kadar $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ' de saklanmıştır. Gebe ratlardan alınan karaciğer doku örnekleri $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ' den çıkarılmış ve RNA izolasyonunun yapılması için GeneJet RNA Purification Kit (Thermo Scientific, K0732) kullanılmıştır. Bu kit protokolüne göre RNA eldesi için:

1. 30 mg doku RNaz free tüpler içerisinde tartılmıştır.

2. Daha sonra üzerlerine 300 µl lysis buffer solüsyonu eklenmiştir. Plastik havan ile tüpün içerisinde 10 sn preslenerek parçalanmıştır.
3. Mikrosantrifüj tüplerine 600 µl Proteinaz K solüsyonu eklenerek, 24,5 °C‘ de 10 dk inkübe edilmiştir.
4. İnkübasyondan sonra 10 dk, 4 °C‘ de 12.000 g’ de santrifüj edilmiş ve süpernatant yeni RNaz free tüplere aktarılmıştır.
5. Üzerlerine 450 µl etanol (%96-100) eklenerek pipetlenmiştir.
6. Bu karışımdan 700 µl alınarak fitreli kolon tüplere aktarılmıştır.
7. 1 dk, 4 °C ‘ de, 12.000 g’ de santrifüj edilmiş ve tüpün alt kısmı dökülerek, kolon tüplerin üst kısmına kalan karışım konulmuştur.
8. Tekrar 1 dk, 4 °C‘ de, 12.000 g’ de santrifüj edilmiştir.
9. 700 µl wash buffer-I den bu kolona eklenmiştir.
10. 1 dk, 4 °C‘de, 12.000 g’ de santrifüj edilmiş ve tüpün altındaki sıvı dökülmüştür.
11. Kolona 600 µl wash buffer-II den eklenmiştir.
12. 1 dk, 4 °C‘de, 12.000 g’de santrifüj edilerek tüpün alt kısmındaki sıvı dökülmüştür.
13. Daha sonra tekrar kolona 250 µl wash buffer-II den eklenmiştir.
14. 2 dk, 4 °C ‘ de, 12.000 g’ de santrifüj edilmiş ve kolon RNaz free ependorf tüplere aktarılmıştır.
15. 100 µl nükleaz free su eklenmiş ve. 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
16. 2 dk, 4 °C‘ de, 12.000 g’ de santrifüj edilmiştir.

17. Daha sonra tekrar 1 dk, 4 °C' de ve 12.000 g' de santrifüj edilmiştir.

18. İzole edilen RNA' lar -80 °C' de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

2.2.1.1. RNA'ların Kalite Kontrolü

İzole edilen total RNA'lar kalite ve miktar açısından değerlendirilmek üzere hem Multiskan Go (Thermo Scientific) cihazı ile hem de Qubit RNA HS Assay Kiti (Thermo Fisher, Q32855) kullanılarak Qubit 2.0 Florometre (Invitrogen) cihazıyla ölçülmüştür. RNA/DNA oranı 1,7 ve üzeri olanlar çalışmada kullanılmıştır.

2.2.1.2. DNaz Uygulaması

RNA'lardan DNA'yı uzaklaştırabilmek için; 1 µg total RNA, 1 µl MgCl₂ içeren 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µl RNaz free DNaz I (Thermo Scientific, EN0525) eklendi ve DEPC (diethylpyrokarbonat) ile muamele edilmiş su eklenerek toplam hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Karışım 30 dakika 37°C inkübe edilmiştir.

2.2.2. cDNA Eldesi

RevertAid H Minus Single Strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, # K1632) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Bu kitin protokülüne göre:

1. DNaz uygulanmış olan 10 µl RNA bulunan tüpe, 1 µl 50 mM EDTA eklenerek 10 dk süreyle 65 °C'de inkübe edilmiştir.

2. Daha sonra tek zincir cDNA sentezi için tüplere 1 µl Oligo (dT)₁₈ ilave edilmiş ve 5 dakika 65°C’de inkübe edilmiştir.

3. Tüplere sırasıyla 4 µl 5X reaksiyon solüsyonu, 1 µl RiboLock RNaz inhibitörü (20 u/µl), 2 µl 10Mm dNTP karışımı ve 1 µl RevertAid H Minus M-MuL V Revers Traskriptaz (200 u/µl) eklenerek, karıştırılmıştır.

4. Çok kısa bir süre santrifüj edildikten sonra 42°C’de 60 dakika ve 70°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir.

5. Sonra sentezlenen cDNA’lar -80 °C’ye kaldırılmıştır.

Tablo 2.2. Real Time PCR analizinde kullanılan primerler

Gen	Oligonükleotid Dizisi	Ürün Boyutu (bp)	Gen Bankası No
β-actin	F GAGGGAAATCGTGCGTGACAT R ACATCTGCTGGAAGGTGGACA	452	NM_031144,3
Tnf-α	F CCACGTCGTAGCAAACCAAG R CAGGTACATGGGCTCATACC	358	NC_005119,4
NF-κB	F ACCTGAGTCTTCTGGACCGCTG R CCAGCCTTCTCCAAGAGTCGT	472	NM_001276711,1
IL-6	F GGAGTTCGGTITTCTACCTGG R GCCGAGTAGACCTCATAGTG	275	M26744,1

2.2.3. Real Time PCR

Ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılığı daha iyi görebilmek için cDNA’lar 1/4 oranında azalan oranda sulandırılarak Real Time PCR analizi yapılmış ve ekspresyon düzeyinin belirleneceği en iyi sulandırma oranı tespit edilmiştir. Tüm genlerde cDNA’lar için en iyi sulandırma oranı 1:10 olarak belirlenmiştir. cDNA’lar

sulandırılarak analize kadar -80°C de saklanmıştır. Seçilmiş olan genlerin ve housekeeping genin (β -actin) ekspresyonu için 5 grup üzerinden alınan karaciğer örnekleri LightCycler 480[®] II Real Time PCR cihazı kullanılarak incelenmiştir. Herhangi bir işlem yapılmayan ve özel olarak hazırlanmış bor içermeyen yem ile beslenen grup kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Çalışmada β -actin, Tnf- α , NF-kB ve IL-6 genlerine özgü primerler sentezlenmiştir. Real Time PCR tekniğiyle Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı kullanımıyla cDNA'lar çoğaltılmıştır. Amplifikasyon sırasında DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarları florimetrik deteksiyon filtresi ile ölçülmüştür. Ölçümlerdeki floresans ışına DNA ürünü ile orantılı olarak belirlenmiştir.

Her 12,5 μl PCR reaksiyonu için, 1:10 oranında sulandırılmış tekrar 1/5 oranında sulandırılan 5 μl cDNA, 6,25 μl SYBR Green Master Mix (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve Rox solüsyonu), 0,375 μl forward primer, 0,375 μl reverse primer ve 0,5 μl distile su eklenmiş ve hazırlanan örnekler Real Time PCR cihazına yerleştirilmiştir. DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla her örnek ve gen bölgesi için melting curve analizi yapılmıştır. Her örnek için analizler 3 kez tekrar edilmiş ve istatistik analizlerde bu üç tekrarın ortalaması kullanılmıştır.

Tablo 2.3. Çalışılan genlere ait PCR koşulları

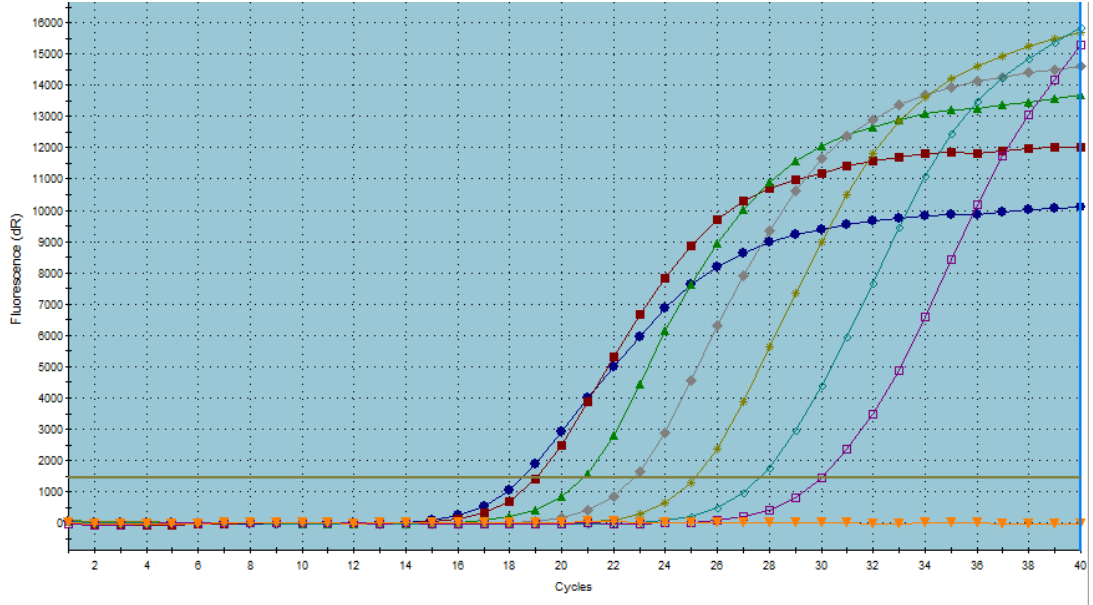
Gen	Başlangıç Ayrılma			Ayrılma		Yapışma		Uzama		Döngü
	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (dk)	Döngü Sayısı	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (sn)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (sn)	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (sn)	
β -actin	95	10	1	95	15	58,5	30	72	30	40
Tnf- α	95	10	1	95	15	65	30	72	30	40
IL-6	95	10	1	95	15	60	30	72	30	40
NF-kB	95	10	1	95	15	70	30	72	30	40

2.2.4. Agaroz Jel Elektrofez

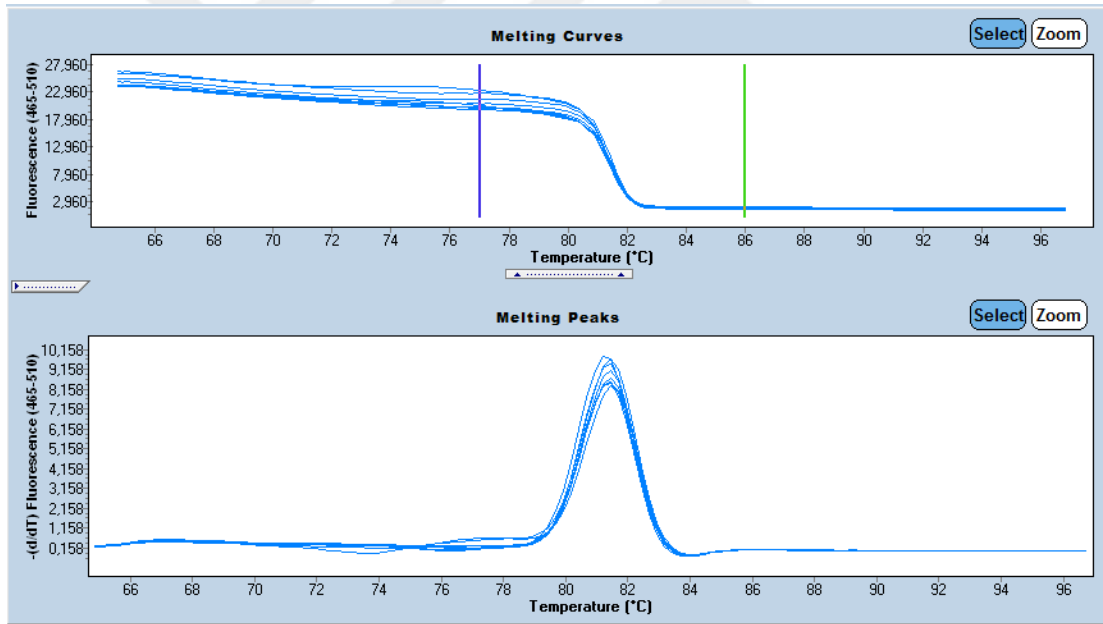
Real Time PCR' dan elde edilen sonuçlar agaroz jel elektrofezi ile görüntülenmiştir. Agaroz jel; 1 g agaroz ve 50 ml 1×TAE (Tris asetat EDTA) ile hazırlandıktan sonra karışım kaynatılarak agaroz çözündürülmüştür. Agaroz soğutulduktan sonra içerisine 2 µl RedSafe (renklendirme solüsyonu) eklenerek, karıştırılmış ve uygun sıcaklığa getirilmiştir. Daha sonra ise karışım kalıba dökülerek 1 saat kadar donması beklenmiştir. Agaroz donduktan sonra cDNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırılmış ve kuyucuklara eklenmiştir. Koşurma işlemi ise Thermo Electron Corporatin 4000P Power Supply kullanılarak 7 V/cm'da 1 saat süreyle yapıldıktan sonra Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemiyle örnekler görüntülenmiştir.

2.2.5. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Ayrılma, primer yapışması (annealing) ve zincir uzatma (extention) olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait Ct değerlerinden faydalanarak, genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla hesaplanmıştır (Pfaffl, 2001). Bu hesaplama için; $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$ formülünden faydalanılmıştır. Hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konulmuş ve mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlenmiştir. Endojen kontrol (house-keeping gene) olarak beta aktin geni kullanılmış ve her bir örneğe ait beta aktin gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulanmıştır.



Şekil 2.1. cDNA'ların 1/4 oranındaki sulandırılmalarına ait amplifikasyon eğrileri.



Şekil 2.2. Örneklere ve genlere ait melting curve eğrisi

2.2.6. Yem Örneklerinde Bor Analizi

Tez çalışması için kullanılan yem örneklerinde herhangi bir olumsuzluğa neden olmaması için bor miktarı analizleri TÜBİTAK-MAM'da bulunan ICP-OES ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 20.0 istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapılmıştır. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulanmış, veriler "ortalama \pm standart sapma" olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi

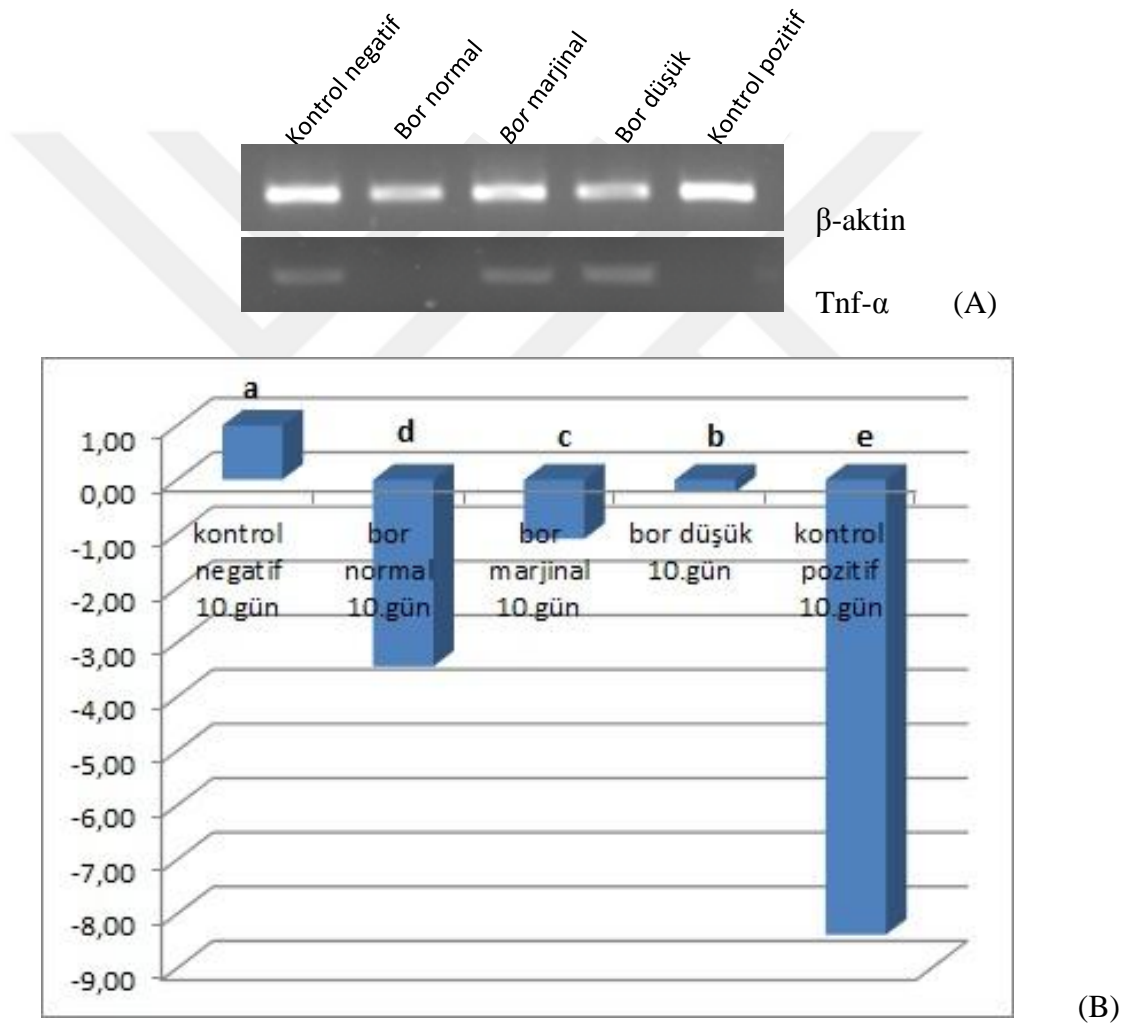
Ratların karaciğer dokularından izole edilen RNA'ların saflığı ölçülmüş ve 1,7 ve üzeri emilim oranına sahip olan örnekler tercih edilmiştir. Tablo 3.1'de gruplara göre elde edilen ortalama RNA miktarları gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Gruplardan izole edilen RNA miktarları

Günler	Gruplar	RNA miktarları (ng/ml)
10. GÜN	Kontrol negatif	373
	Bor normal	276
	Bor marjinal	361
	Bor düşük	368
	Kontrol pozitif	338
15. GÜN	Kontrol negatif	850
	Bor normal	407
	Bor marjinal	277
	Bor düşük	276
	Kontrol pozitif	515
20. GÜN	Kontrol negatif	250
	Bor normal	351
	Bor marjinal	222
	Bor düşük	445
	Kontrol pozitif	296

3.2. Borun Tnf- α Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

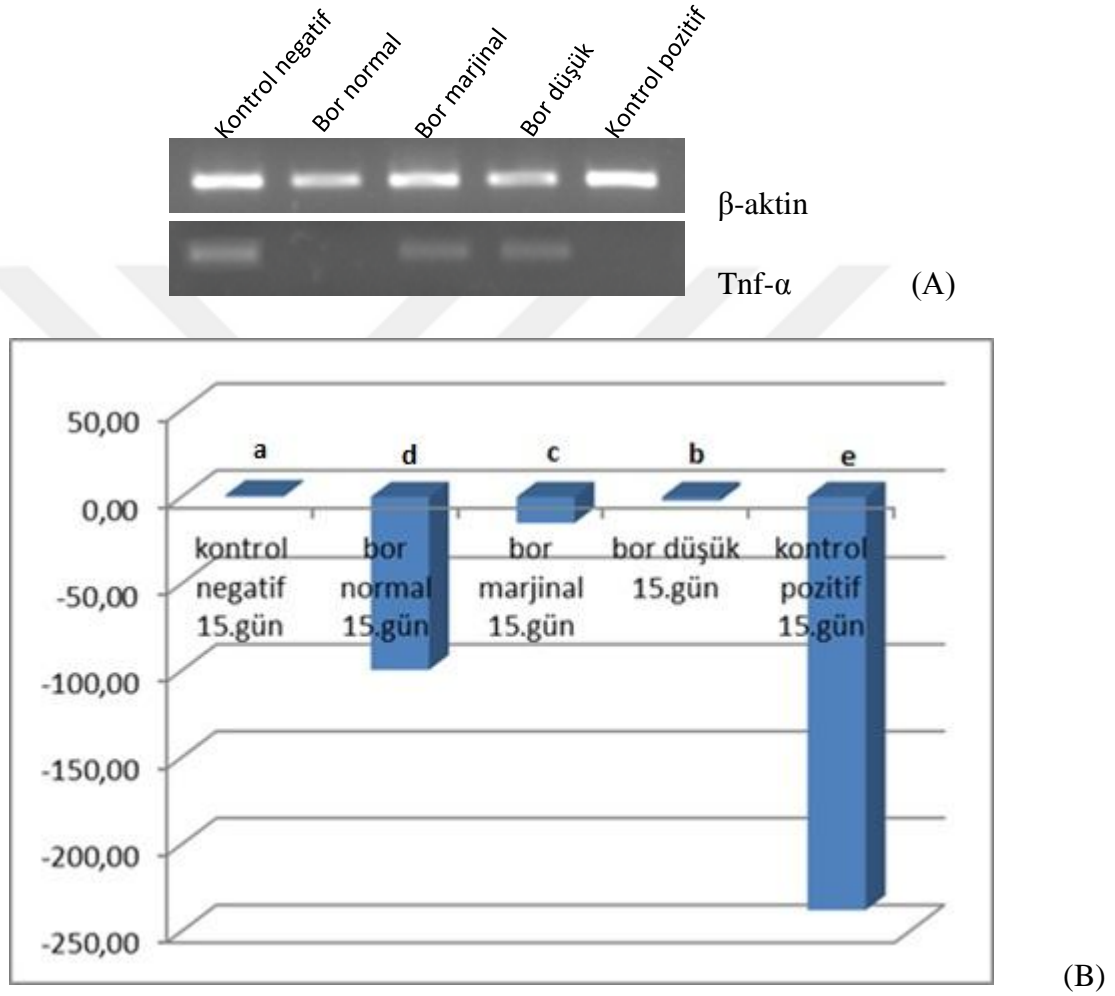
Tnf- α gen ekspresyonunun analizinde, gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerinde gebe ratlardan alınmış olan karaciğer dokularından elde edilen RNA ve cDNA ile hazırlanmış olan örneklerin amplifikasyonu yapılarak analiz edilmiştir ve agaroz jel elektroferesi ile görüntülenmiştir. Tnf- α 'nın gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerindeki gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri sırasıyla şekil 3.1, 3.2 ve 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları
A: Agaroz jel elektroferesi görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri

Gebeliğin 10. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, Tnf- α mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-3,44 \pm 0,12$, bor marjinal grupta $-1,09$

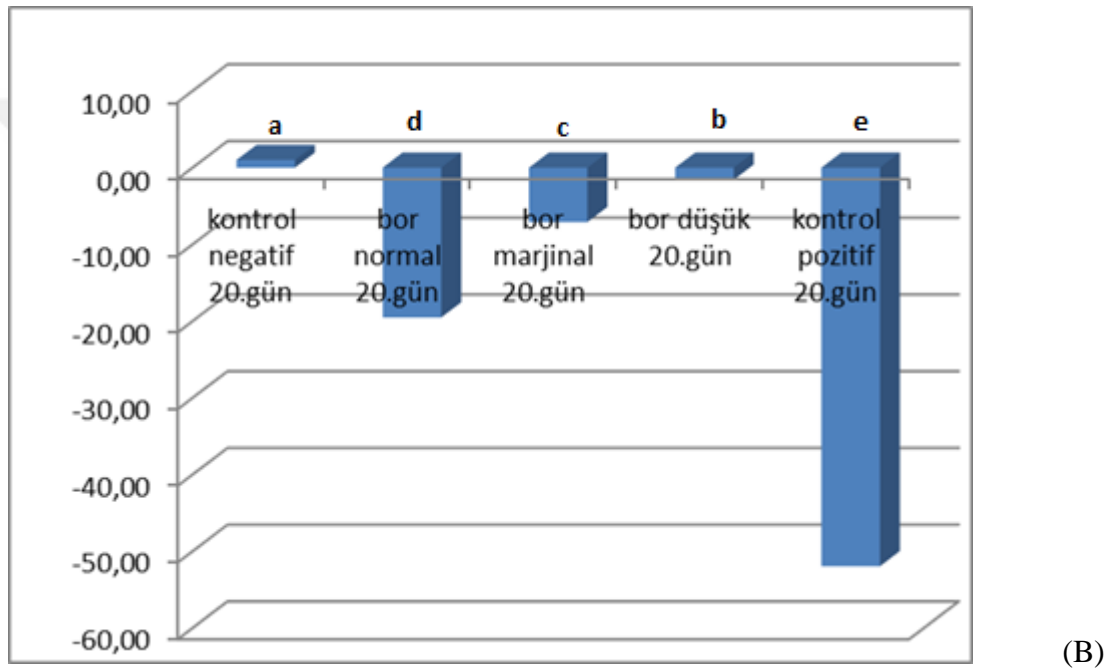
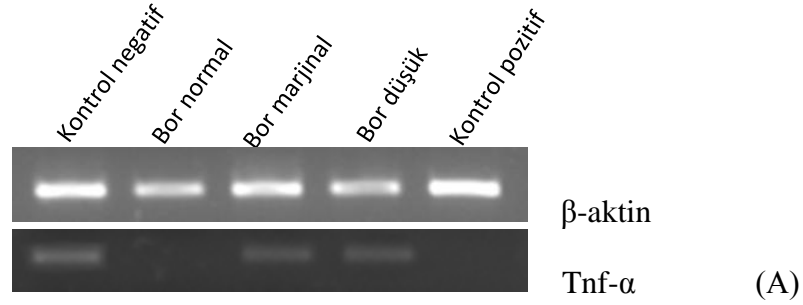
$\pm 0,03$, bor düşük grupta $-0,23 \pm 0,01$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-8,38 \pm 1,07$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak Tnf- α ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise Tnf- α ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. 15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları
A: Agaroz jel elektroferes görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri

Gebeliğin 15. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, Tnf- α mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-99,66 \pm 15,56$, bor marjinal grupta $-15,08 \pm 2,64$, bor düşük grupta $-2,30 \pm 0,17$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-237,86 \pm 32,95$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak Tnf- α ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor

içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise Tnf- α ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

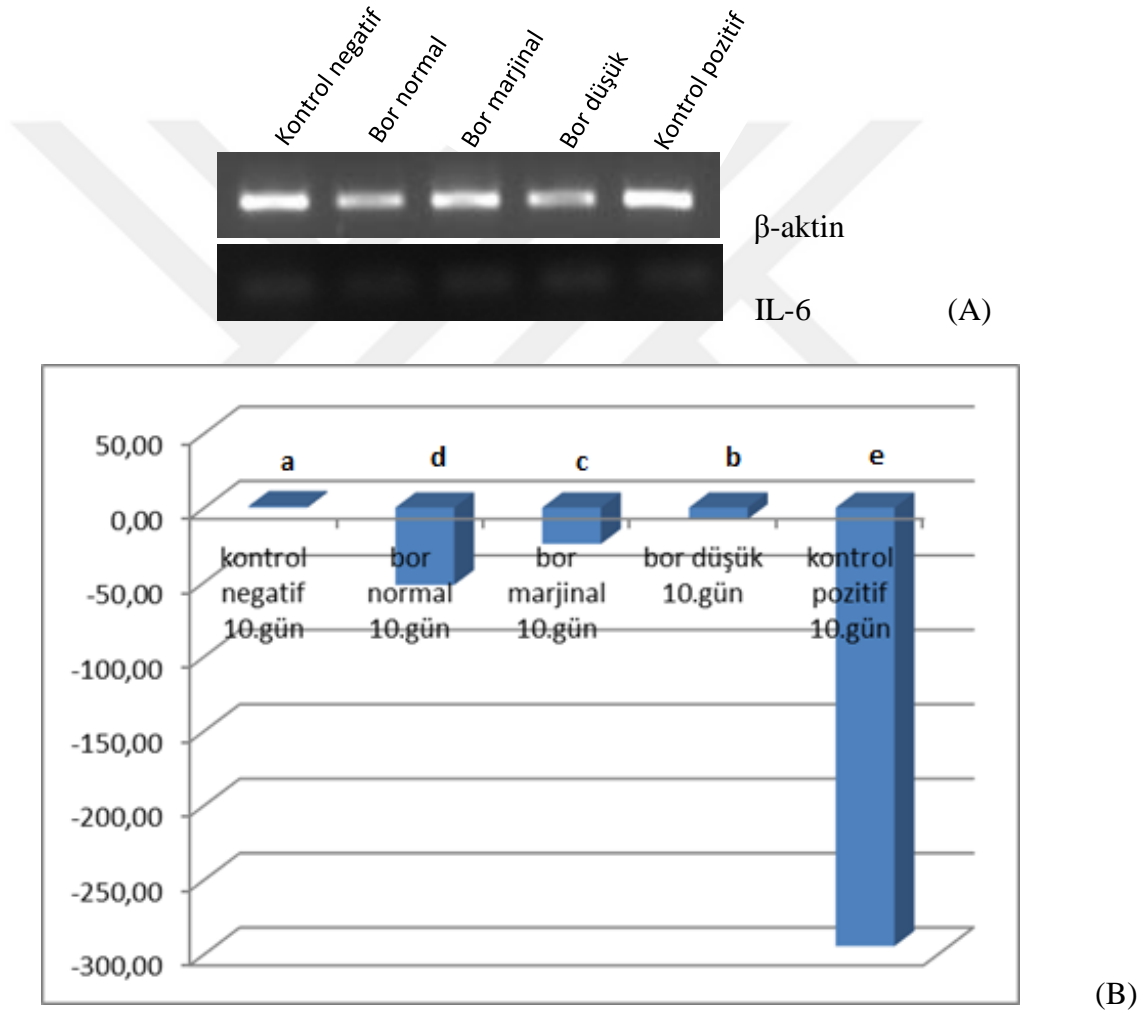


Şekil 3.3. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki Tnf- α ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroferez görüntüleri B: Tnf- α mRNA düzeyleri

Gebeliğin 20. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, Tnf- α mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-19,53 \pm 5,61$, bor marjinal grupta $-7,09 \pm 2,90$, bor düşük grupta $-1,59 \pm 0,33$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-51,95 \pm 13,88$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak Tnf- α ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise Tnf- α ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

3.3. Borun IL-6 Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

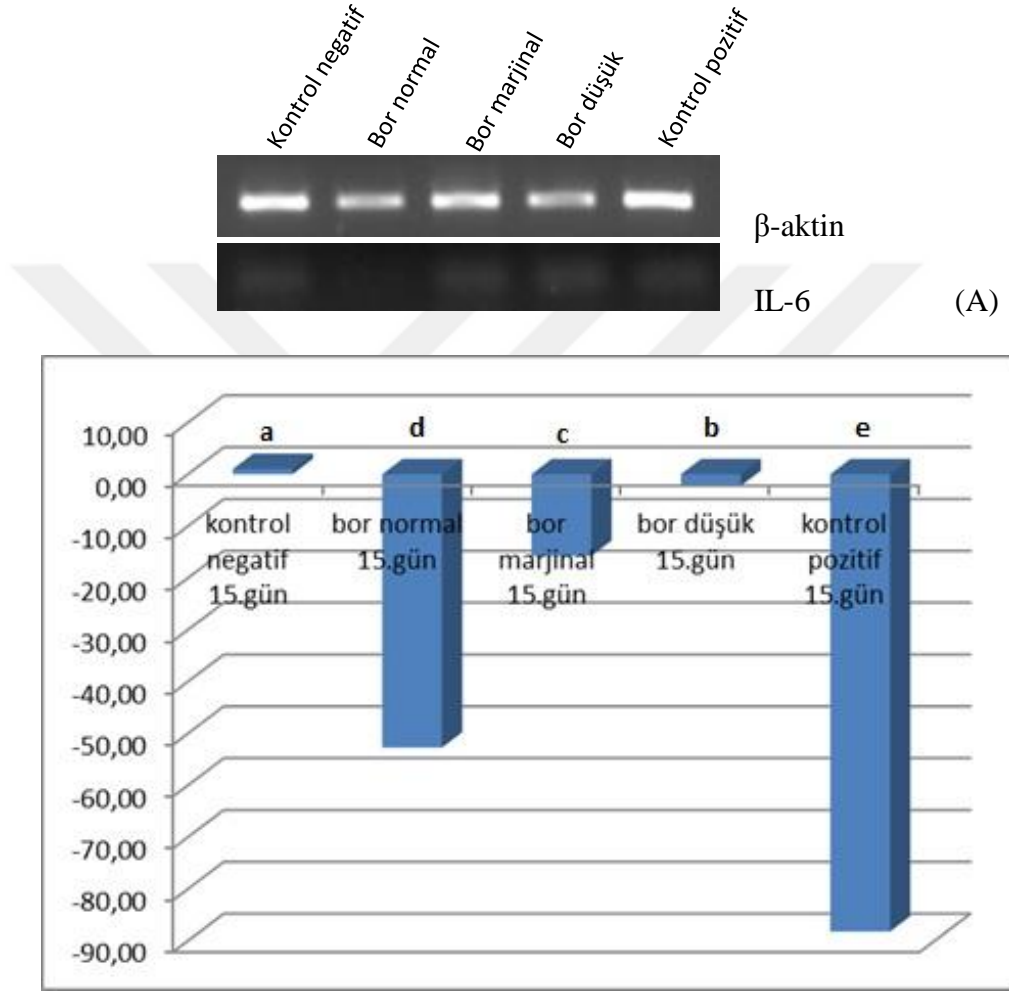
IL-6 gen ekspresyonunun analizinde, gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerinde gebelardan alınmış olan karaciğer dokularından elde edilen RNA ve cDNA ile hazırlanmış olan örneklerin amplifikasyonu yapılarak analiz edilmiştir ve agaroz jel elektroferesi ile görüntülenmiştir. IL-6' nın gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerindeki gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri sırasıyla şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.4. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroferesi görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyleri

Gebeliğin 10. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, IL-6 mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-52,08 \pm 8,85$, bor marjinal grupta

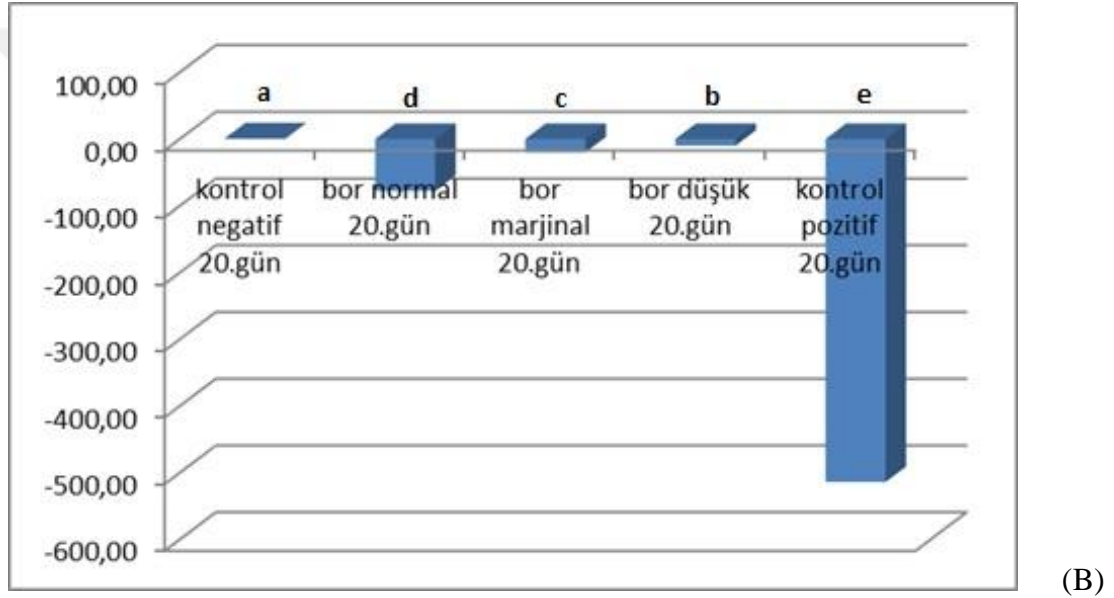
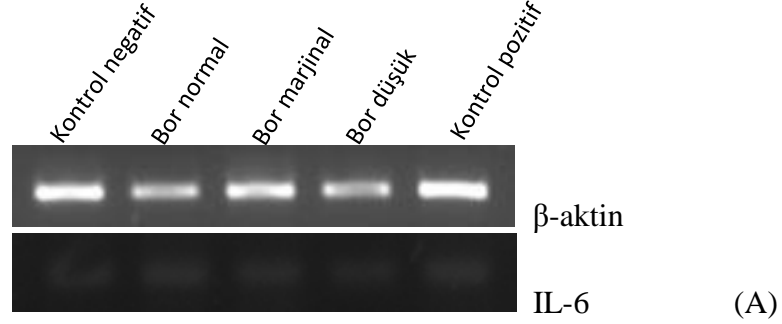
-24,46±5,78, bor düşük grupta -7,96±2,46 misli, kontrol pozitif grubunda ise -294,70 ±30,02 misli azalma olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak IL-6 ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise IL-6 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.



Şekil 3.5. 15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroferez görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyleri

Gebeliğin 15. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, IL-6 mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta -52,76±9,28, bor marjinal grupta -15,80±4,27, bor düşük grupta -7,96±2,46 misli, kontrol pozitif grubunda ise -294,70 ±30,02 misli azalma olduğu tespit edilmiştir (p<0,001). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak IL-6 ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor

içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise IL-6 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

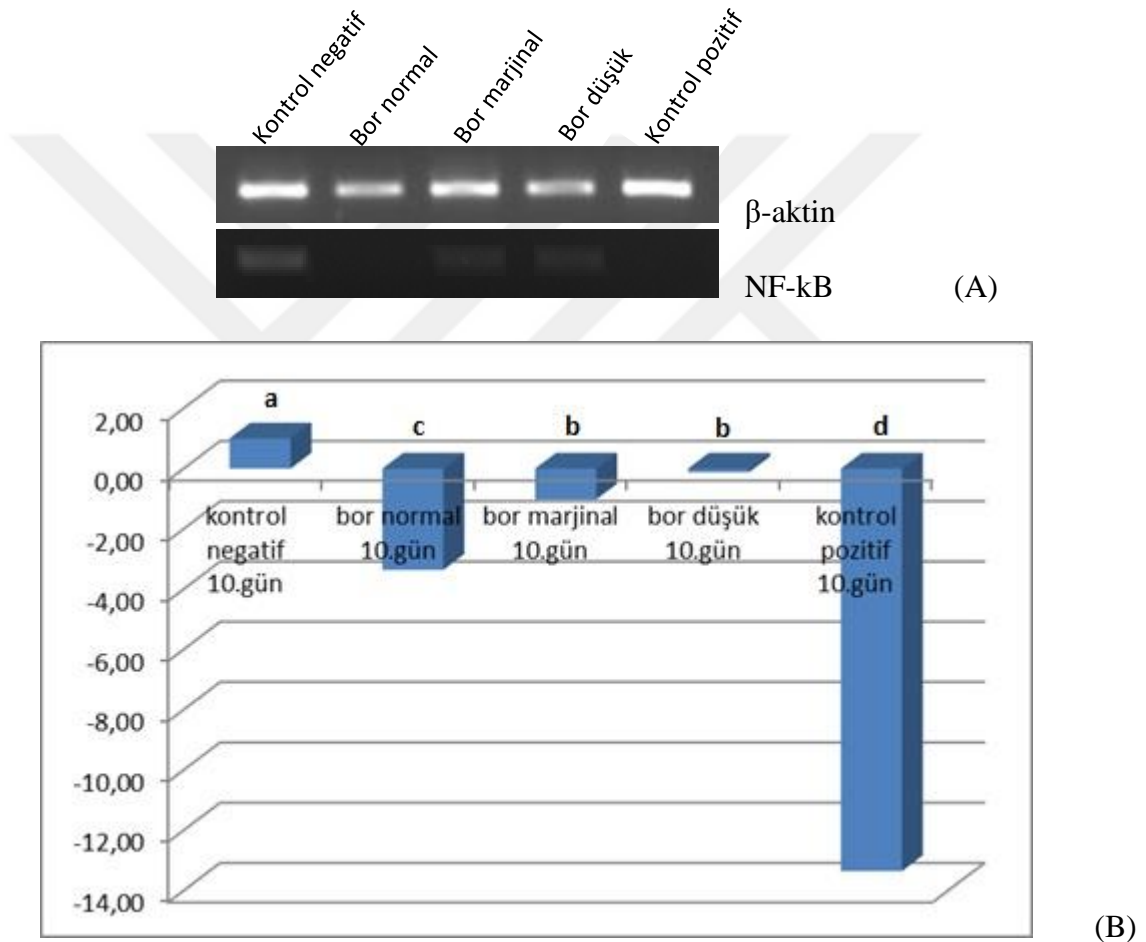


Şekil 3.6. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki IL-6 ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroferez görüntüleri B: IL-6 mRNA düzeyleri

Gebeliğin 20. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, IL-6 mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-77,96 \pm 12,16$, bor marjinal grupta $-20,24 \pm 6,33$, bor düşük grupta $-10,17 \pm 3,31$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-513,93 \pm 62,23$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak IL-6 ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise IL-6 ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

3.4. Borun NF-kB Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

NF-kB gen ekspresyonunun analizinde, gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerinde gebelardan alınmış olan karaciğer dokularından elde edilen RNA ve cDNA ile hazırlanmış olan örneklerin amplifikasyonu yapılarak analiz edilmiştir ve agaroz jel elektroferezi ile görüntülenmiştir. NF-kB' nin gebeliğin 10. 15. ve 20. günlerindeki gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri sırasıyla şekil 3.7, 3.8 ve 3.9'da gösterilmiştir.

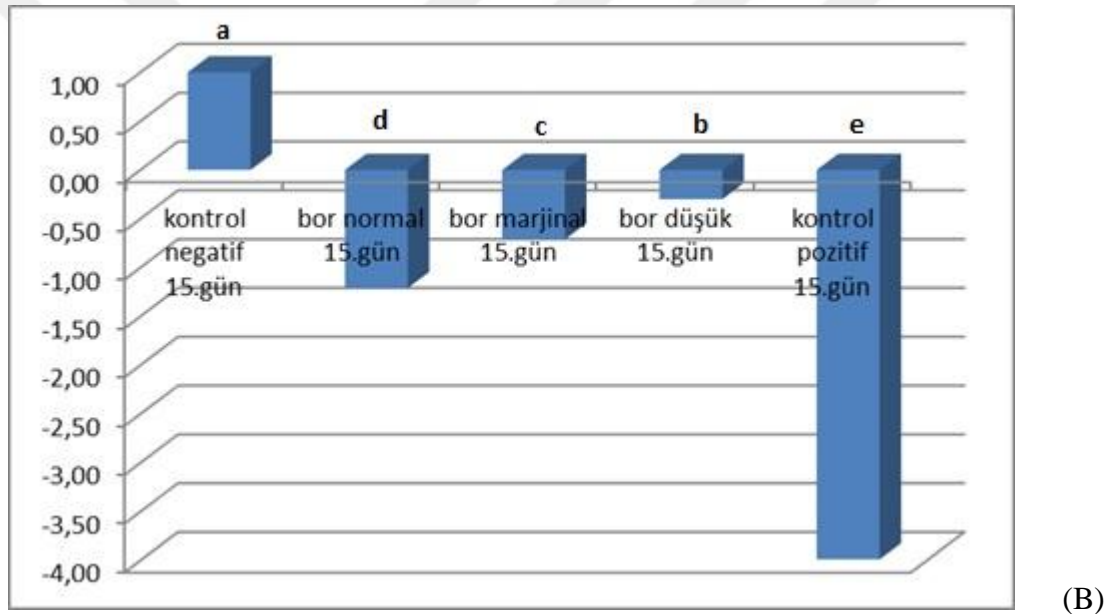
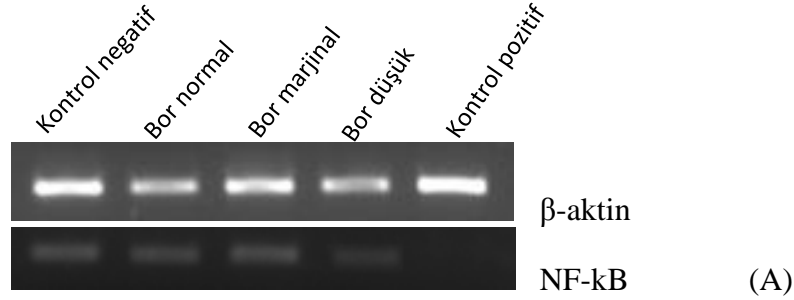


Şekil 3.7. 10 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları.

A: Agaroz jel elektroferez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri

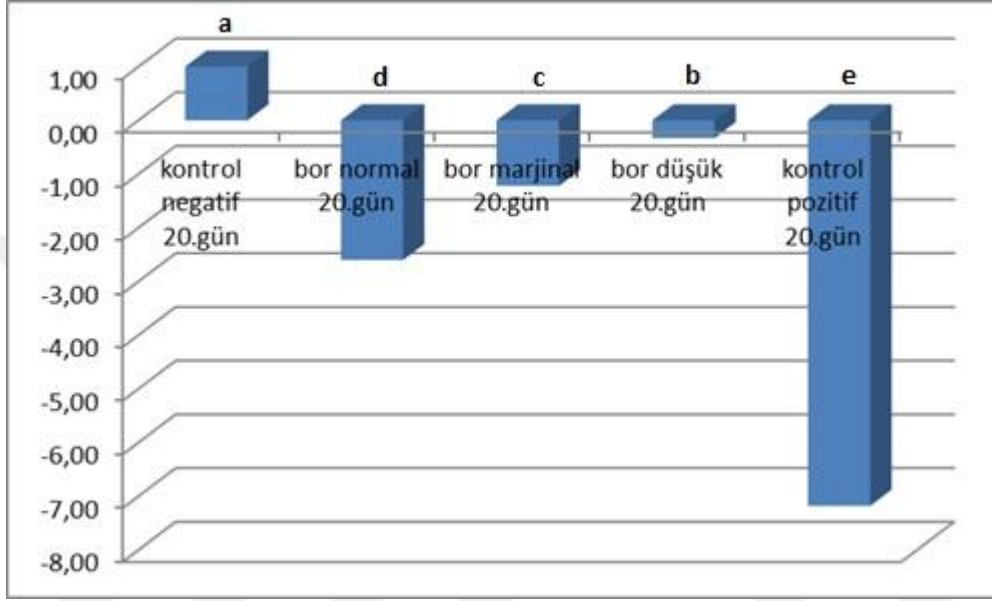
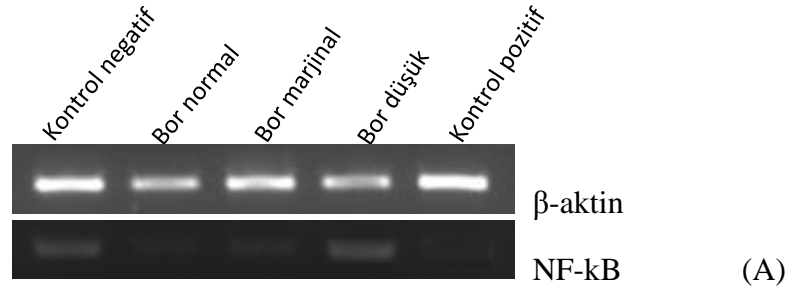
Gebeliğin 10. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, NF-kB mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-3,36 \pm 0,66$, bor marjinal grupta $-1,02 \pm 0,08$, bor düşük grupta $-0,12 \pm 0,27$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-13,35 \pm 1,49$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen

gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak NF-kB ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise NF-kB ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. .15 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroforez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri

Gebeliğin 15. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, NF-kB mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-1,21 \pm 0,20$, bor marjinal grupta $-0,71 \pm 0,37$, bor düşük grupta $-0,30 \pm 0,16$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-3,99 \pm 0,38$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak NF-kB ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise NF-kB ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.



Şekil 3.9. 20 günlük gebe ratların karaciğer dokusundaki NF-kB ekspresyonları.
A: Agaroz jel elektroferez görüntüleri B: NF-kB mRNA düzeyleri

Gebeliğin 20. gününde alınan karaciğerlerden yapılan analizler sonucunda, NF-kB mRNA düzeyleri işlem görmüş bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubuyla karşılaştırıldığında bor normal grupta $-2,60 \pm 0,77$, bor marjinal grupta $-1,22 \pm 0,15$, bor düşük grupta $-0,33 \pm 0,15$ misli, kontrol pozitif grubunda ise $-7,18 \pm 0,88$ misli azalma olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu sonuçlara göre bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak NF-kB ekspresyon düzeylerinin azaldığı, bor içermeyen yem ile beslenen kontrol negatif grubunda ise NF-kB ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir.

3.5. Bor Analiz Bulguları

Ratlara verilen bor içermeyen diyet ve işlem görmemiş yem örneklerindeki bor miktarı; işlem görmemiş gruba verilen yemlerde bulunan bor içeriği 0,265 ve 0,666 mg/kg, hazırlanan diyetle bulunan bor içeriği ise <0,018 mg/kg olarak belirlendi. Değerler incelendiği zaman, özellikle özel olarak hazırlanan diyetle bulunan bor miktarının çok düşük olması diyetin çalışma için uygun olduğunu göstermiştir. Ayrıca çalışmada verilen bor miktarlarına ilave bir etki yapmadığını da göstermektedir. Hayvanlara içme suyu olarak ise önceden analiz edilen ve içerisinde bor içermediği tespit edilen deiyonize su verilmiştir.



4. TARTIŞMA

Tümör nekrozis faktör- α (Tnf- α) karaciğerde önemli bir fonksiyona sahiptir. Bu karaciğerdeki hepatositlerin normal olarak proliferasyonunda gereklidir. Hem komitojen hemde NF-kB'nin transkripsiyonunda fonksiyon almaktadır. Diğer taraftan, birçok hayvan modelinde konkanavalin A and lipopolisakkarid ile oluşturulan hepatotoksistide mediyatör olarak rol oynamaktadır. Ayrıca karaciğer hastalıkları ve viral hepatitis gibi hastalıklarda önemli bir patojenik mediyatör olarakta değerlendirilmektedir (Cynthia ve ark., 1998). Tnf- α ve IL-1 gibi yangısal sitokinler NF-kB nin hızlı translokasyonuna neden olurlar. Lökosit adezyon molekülleri, kemokinler, hemapoetik büyüme faktörleri gibi yangısal cevapları içeren genler NF-kB ile regüle edilirler. Böylece NF-kB, Tnf- α nın anahtar mediyatörüdür ve yangının önlenmesi veya terapotik romatoid artirit gibi yangısal hastalıkların tedavisel yaklaşımında önemli hedef noktalardan birisidir (Beg ve Baltimore, 1996). IL-6, HGF, Tnf- α ve Tgf- β gibi diğer faktörlerle beraber karaciğer rejenerasyonunda önemli bir rolü olan sitokindir (Galun ve ark., 2000). Özellikle kronik karaciğer hastalıklarında, hastalığı mekanizmasının anlaşılmasında klinik ve laboratuvar parametrelerin başında gelmektedir (Tilg ve ark., 1992).

Birçok maddeye karşı duyarlılık veya metabolizma fonksiyonlarının düzenlenmesinde cinsiyet farklılığı en önemli etken olmaktadır. Alkolik karaciğer hasarının kadınlarda daha şiddetli ve hızlı geliştiği, bunun bir örneğinin bildirildiği çalışmada, 4 hafta alkol verilen erkek ve dişi ratların karaciğerlerindeki MCP-1 ve MIP-2 şemokinler ile NF-kB aktivasyonunun arttığı belirtilmiştir. (Nanji ve ark., 2001). Kono ve ark., (2000) yaptıkları çalışmada diyetlerine alkol ve yağ katılarak karaciğer hasarı oluşturulan erkek ve dişi ratlarda, CD14 kupffer hücrelerinde Tnf- α ve NF-kB mRNA ekspresyonlarının arttığı, Tnf- α düzeyinin dişilerde erkeklerden 3 kat daha fazla eksprese olduğunu rapor etmişlerdir. Böylece NF-kB ekspresyonunun aktive olmasının Tnf- α mRNA ekspresyonunun artışına ve sonuçta karaciğer hasarının şekillenmesine yol açtığı bildirilmiştir. Şizofreninin hem gebe ratlarda hemde yavrularında oluşturabileceği etkilerinin araştırıldığı çalışmada, 18. gün gebe ratlara

bakteriyel endotoksin lipopolisakkarid (¹²⁵I-LPS) uygulanması ile hem gebelerde hemde f tuslarda inflamasyon sitokinlerin seviyeleri analiz edilmiştir. Çalışmada Tnf- α , IL-1 β ve IL-6 düzeylerinin plazma ve plasentada yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Ashdown ve ark., 2006).

Diyetle alınan borun fizyolojik miktarları insan ve hayvanlarda metabolik olayların gelişmesinde yararlı bir etkiye yol açmaktadır (Hunt ve Idso, 1999). Özellikle yangı ve yangısal sitokinler üzerinde önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin formaldehidle romatoid artrit oluşturulan ratlara 10 mg/kg miktarda borun verilmesinin pozitif bir etki oluşturduğu, böylece antiartritik ve antipiretik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Shah ve Vohora, 1990). Borun fizyolojik öneminin araştırıldığı bir başka çalışmada; Ince ve ark., (2015) ilk kez borun embriyo gelişimine ve gelişiminde rol oynayan Hex, Nanog ve Oct-4 erken embriyonik genlerinin mRNA düzeyleri üzerine etkisinin in vivo olarak belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, erken embriyonik genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin bor ile beslenen gruplarda arttığı ve beslenmeyen gruplarda ise d şuk seviyede olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, embriyoların morfolojik gelişim parametrelerinin bordan eksik diyetle beslenen grupta bor verilen gruplara kıyasla istatistiksel olarak azaldığı belirlenmiş, histopatolojik olarak incelemede bor ile beslenen gruplarda f tal gelişimde doku ve organların daha net şekillendiği rapor edilmiştir. Çalışmada, bordan yoksun beslenmede in vivo embriyo gelişimde rol alan erken embriyonik genlerin ekspresyonlarının azaldığı ve borun f tal gelişimin şekillenmesinde önemli rol oynadığı sonucu ifade edilmiştir.

Cao ve ark., (2008) borik asidin yangısal düzeydeki etkisini araştırdığı çalışmada, lipopolisakkarid ile indüklenen thiol bağımlı mekanizma ile THP-1 hücrelerinde Tnf- α oluşumu üzerine borik asidin inhibe edici etkisini belirlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada, 3-metilkolatren (3-MC) uygulanan sıçanlarda boraksın (300 mg/L/gün) inflamasyon göstergeleri, hematolojik parametreler ve total oksidan - antioksidan durumlar üzerine etkileri araştırılmış, çalışma sonunda kan analizlerinde, diğer gruplarla karşılaştırıldığında 3-MC grubunda Tnf- α ve IL-1 β seviyelerinin istatistiksel önemde artış gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca alışma sonunda belirtilen dozda boraksın kullanımının inflamasyon ve kanser göstergeleri olan Tnf- α , IL-1 β , IL-

6 seviyelerini azaltabileceği vurgulanmıştır (Comba ve ark., 2016). Deneysel olarak ratlarda asfeksi ve hipoksi ile oluşturulan nekroze enterokolitis modeli üzerinde borik asit ve 2-aminoethoxydiphenyl boratın etkisinin araştırıldığı çalışmada, eneterokolitle artan Tnf- α düzeyini borik asidin engellediğini, IL-6 düzeyinin ise her iki bileşik tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Yazc ve ark., 2014). Ratlarda karaciğer iskemi ve repüfüzyonu üzerinde yapılan deneysel çalışmada borik asidin (200 mg/kg, i.p.) antioksidan etkisinin değerlendirildiği çalışmada, iskemi repüfüzyonla yükselen serum Tnf- α ve IL-6 düzeylerinin borik asit uygulamasıyla azaldığı bildirilmiştir (Basbug ve ark., 2015). Karbontetraklorürle (CCl₄) karaciğer hasarı oluşturulmuş farelerde borik asidin koruyucu etkisinin değerlendirildiği çalışmada, erkek albino farelere periton içi borik asit (50, 100 ve 200 mg/kg) ve silimarin günlük olarak 7 gün boyunca ve 7. gün % 0,2'lik CCl₄'ün (10 mL/kg, ip) zeytinyağındaki çözeltisi verilmiştir. Çalışma sonunda borik asit uygulamasının farelerin karaciğerindeki sitokrom P450E1 ve beta hücrelerinin aktivasyonu ile artan sürdürülebilir NF-kB ekspresyonlarını iyileştirdiği, iNOS gen ekspresyonu üzerinde etki göstermediği vurgulanmıştır (Ince ve ark., 2012).

Bu belirtilen bilgiler ışığında; yapılan bu çalışmada farklı miktarlarda bor verilen ve hiç verilmeyen gebe ratların karaciğerlerinden Tnf- α , IL-6 ve NF-kB sitokinlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Elde edilen veriler incelendiğinde, 10, 15 ve 20. gün gebe ratların Tnf- α , IL-6 ve NF-kB mRNA ekspresyonlarının bor verilmeyen grupta arttığı, borun artan dozlarına bağlı olarak ekspresyonların azaldığı gözlenmiştir. Bu durum borun antiinflamatuvar (Hall ve ark., 1990; Banderdour ve ark., 1998) ve antioksidan etkisinden kaynaklanabileceğini, aynı zamanda fizyolojik olaylarda metabolizma üzerinde düzenleyici etkisinden (Hunt ve Idso, 1999) kaynaklanabileceğini akla getirmektedir.

5.SONUÇ

Gelişen ve gelişmekte olan teknoloji ve tıpla beraber, sağlık alanında birçok hastalık olgusunda teşhiste ve tedavide alternatif olarak bazı maddelerin kullanımı söz konusu olabilmektedir. Ülkemiz bor yatakları bakımından çok zengindir ve borun gerek sanayi gerek sağlık gibi birçok alanda kullanımının arttırılması ile ekonomik açıdan da önemli katkılar sağlanabilecektir. Bu durumun da yapılan ve yapılmakta olan proje ve çalışmalarla gerçekleştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu amaçlar doğrultusunda yapılmış olan bu tez çalışmasında borun diyetle bulunmasının önemi ve gerekliliği belirlenmiştir. Bordan yoksun diyetle beslenen ratlarda NF-kB, Tnf- α ve IL-6 genlerinde mRNA ekspresyonlarında artış söz konusudur.

Elde etmiş olduğumuz sonuçların insan sağlığına katkılarının yanında çiftlik hayvanlarının diyetlerinde de ek olarak bora yer verilebileceğinin ve borun yem katkı maddesi olarak da kullanılabileceği belirlenmiştir.

ÖZET

Ratlarda Borun Gebe Hayvanlarda Karaciğer NF-kB Tnf- α ve IL-6 Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Doğada birden çok bileşiği bulunan borun, sanayi alanında kullanılmasının yanında bitkiler için esansiyel bir element olduğu ve canlıların metabolik, fizyolojik olaylarında etkin bir rol oynadığı bilinmektedir. Bu çalışma da ilk kez borun gebe hayvanlarda karaciğer NF-kB, Tnf- α ve IL-6 mRNA ekspresyonları üzerine etkisinin in vivo olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 15 dişi rat kullanılmıştır. İn vivo değerlendirmede dişi ratlar her grupta 3 rat olacak şekilde kontrol negatif (işlem görmüş-bor içermeyen yem), kontrol pozitif (işlem görmemiş yem), özel olarak hazırlanmış bor içermeyen yemlere ek olarak gastrik gavajla bor normal (0,2 μ g B/ml), bor marjinal (0,3 μ g B/ml), ve bor düşük (0,04 μ g B/ml) miktarlarda bor içeren diyetlerle beslenenler olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Dişi ratlar 2 hafta boyunca beslendi ve beslendikten sonra erkekler ile çiftleşmeye tabi tutulmuştur. Çiftleşmeden sonra gebeliğin 10., 15. ve 20. günlerinde karaciğerler gebe ratlardan toplanmıştır. Karaciğer NF-kB, Tnf- α ve IL-6 mRNA ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ile belirlenmiştir. Buna göre mRNA ekspresyon düzeylerinin bor verilen gruplarda dozlardaki artışa bağlı olarak azaldığı, kontrol negatif grubunda ise arttığı tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: bor, karaciğer, NF-kB, Tnf- α , IL-6, rat

SUMMARY

The Effects of Boron on NF-kB Tnf- α and IL-6 Gen Expressions in Pregnant Rats Liver

Boron is present as constituent of several different compounds in nature. Besides its industrial use, boron is an essential element and plays a very important role in the physiology of plants. In this study, we aimed to determine the in vivo effects of boron on liver NF-kB, Tnf- α and IL-6 mRNA expression on pregnant rats. Rats were divided into 5 experimental groups containing 3 animals in each group. Experimental groups are as follows; negative control (fed with feed containing no boron), positive control (fed with normal feed), normal boron group (fed with containing 2 μg boron/ml), marginal boron group (fed with feed containing 0,3 μg boron/ml) and low boron group (fed with feed containing 0,04 μg boron/ml). Female rats fed for two weeks and fed after mating with the male. After mating, on the 10th, 15th and 20th days of pregnancy, livers were collected from pregnant rats. The expression levels of liver NF-kB, Tnf- α and IL-6 mRNA were determined by using Real Time PCR. Results showed that the expression levels of liver NF-kB, Tnf- α and IL-6 mRNA decreased with an increase in boron concentrations in experimental groups, whereas the expression levels of liver NF-kB, Tnf- α and IL-6 mRNA increased in control negative group.

Key words: boron, liver, NF-kB, Tnf- α , IL-6, rat

KAYNAKLAR

- ABUL, K.A., LICHTMAN, H.A., POBER, J. (2000). Cytokines, Cellular and Molecular Immunology, 235-269.
- ALÌ, C., NÌCOLE, O., DOCOGNE, F. (2000). Ischemia-induced IL-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, **20**: 66-956.
- ANDERSON, G.M., NAKADA, M.T., DEWITTE, M. (2004). Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, **4**: 314-320.
- ASHDOWN, H., DUMONT, Y., POOLE, S., BOKSA, P., LUHESHI, G.N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Molecular psychiatry*, **11(1)**: 47-55.
- BAEUERLE, P.A., HENKEL, T. (1994). Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol*, **12**: 141-179.
- BALDWIN, J.R. (1996). The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annual Rev. Immunol*, **14**: 643-683.
- BALDWIN, J.R., (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest*, **107**: 3-6.
- BANKS, W.A., KASTIN, A.J., GUTIERREZ, E.G., (1994). Penetration of interleukin-6 across the murine blood-brain barrier. *Neurosci Lett*, **26**: 6-53.
- BARTH, R., SOLOWAY, A., GOODMAN, J., GAHBAUER, R., GUPTA, N., BLUE, T., YANG, W., TJARKS, W. (1999). Boron neutron capture therapy of brain tumors: an emerging therapeutic modality, *Neurosurgery*, **44**: 433-451.
- BASBUG, M., YILDAR, M., YAMAN, I., OZKAN, O.F., AKSIT, H., CAVDAR, F. DERICI, H. (2015). Effects Of Boric Acid In An Experimental Rat Model Of Hepatic Ischemia-Reperfu-Sion Injury. *Acta Medica Mediterranea*, **31(5)**: 1067-1073.
- BEG, A.A., BALTIMORE, D. (1996). An essential role for NF-kB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*, **82**: 274-288.

- BENDERDOUR, M., BUIVAN, T., DICKO, A., BELLEVILLE, F. (1998). In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of trace elements in medicine and biology*, **12(1)**: 2-7.
- BEUTLER, B.A. (1999). The role of tumor necrosis factor in health and disease, **57**: 16-21.
- BHARTI, A.C., AGGARWAL, B.B. (2002). Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol*, **64**: 883-888.
- BİLGİÇ, M., DAYIK, M. (2013). Borun özellikleri ve tekstil endüstrisinde kullanımıyla sağladığı avantajlar, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **7**: 27-37.
- BOURGEOIS, A.C., SCOTT, M.E., SABALLY, K., KOSKİ, K.G. (2007). Low dietary boron reduces parasite (nematoda) survival and alters cytokine profiles but the infection modifies liver minerals in mice. *Journal of Nutrition*, **137**: 86-280.
- CANTÜRK, M., ONAR, R. (2004). Bor ve Sağlık. Eti Maden işletmeleri Genel Müdürlüğü ARGE Daire Başkanlığı Çevre Müdürlüğü, 41-43.
- CAO, J., JIANG, L., ZHANG, X., YAO, X., GENG, C., XUE, X., ZHONG, L. (2008). Boric acid inhibits LPS-induced TNF- α formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22(3)**: 189-195.
- CHEN, F., CASTRANOVA, V., SHİ, X., DEMERS, L.M. (1999). New insights into the role of nuclear factor factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, **45**: 7-17.
- COMBA, B., GÖKHAN, T.O., LEYLA, M.S., ÖZDEMİR, H., COMBA, A. (2016). Effects of Borax on Inflammation, Haematological Parameters and Total Oxidant-Antioxidant Status in Rats Applied 3-Methylcholanthrene. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22(4)**: 539-544.
- CYNTHIA, A. BRADHAM, J.P., MICHAEL, P., MANNIS, D.A., BRENNER, C.T. (1998). TNF-induced liver injury. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* Published 1 September, **275(3)**: 387-392.
- DEBONERAKA, F., ALDEGUER, X., SHEN, X., GELMAN, A.E, GAO, F., QUE, X., GREENBAUM, L.E., FURTH, E.E., OLTHOFF, K.M. (2001). Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation, *Journal of Surgical Research*, **96**: 289-295.

- DEVIRIAN, TA., VOLPE, S.L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, **43**: 31-219.
- DIETER, M.P. (1994). Toxicity and Carcinogenicity Studies of Boric Acid in Male and Female B6C3F1 Mice. *Environment Health Perspect*, **102**: 93-97.
- DSİ, (1983). "Kırka Yöresi Bor Kirliliği Araştırma Raporu" Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, DSİ İçmesuyu ve Kanalizasyon Dairesi Başkanlığı Ankara, 1-23.
- DUPONT, Y., COHEN J.B., CHANGEUX J.P. (1974). X-ray diffraction study of membrane fragments rich in acetylcholine receptor protein prepared from the electric organ of *Torpedo marmorata*, **40**: 130-133.
- ECKHERT, C. (1998). Boron Stimulates Embryonic Trout Growth. *J Nutr.*, **128**: 2488-2493.
- EMPL, M., RENAUD, S., ERNE, B., FUHR, P., STRAUBE, A., SCHAEREN, W.N., STECK, A.J. (2001). TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*, **56**: 1371-1377.
- EMRAL, R. (2006). Adiponektin ve Diğer Sitokinler. *J Med Sci.*, **26**: 409-420.
- ERDOĞMUŞ, E., SEVİNÇ, S., AKCAN, K., (2004). Borun canlılara ve çevreye etkisi. *Ekoloji Magazin Dergisi*, **2**.
- FAIL, P.A., CHAPIN, R., PRICE, C.J., HEINDEL, J.J. (1998). General, Reproductive, Developmental and Endocrine Toxicity of Boronated Compounds. *Reproductive Toxicology*, **12(1)**: 1-18.
- FITZGERALD, K.A, O'NEILL, A.J., GEARING, J.H., CALLARD, R.E. (2001) *The Cytokine Facts Book*, Academic Press, USA **2**: 11-30.
- FORT, D., STOVER, E., STRONG, P.L., MURRAY, F.J., KEEN, J.L. (1999). Chronic Feeding Of A Low Boron Diet Adversely Affect Reproduction And Development İn *Xenopus Laevis*. *J Nutr.*, **129**: 2055-2060.
- GALUN, E., ZEIRA, E., PAPPO, O., PETERS, M., ROSE J.S. (2000). Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *The FASEB Journal*, **14(13)**: 1979-1987.
- GARG, A., AGGERWAL, B.B. (2002). Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia*, **16**: 1053-1068.
- GEZMEN, K., TÜRKÖZÜ, D. (2014). Diyetle Bor Alımının Sağlık ile Etkileşimi, *Güncel Bakış, Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **3(2)**: 781-782.

- GHOSH, S., MAY, M.J., KOPP, E.B. (1998). NF-Kb and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, **16**: 225-260.
- GREGORY, S., KELLY, G.S. (1997). Boron; A Review of its Nutritional Internations and The Rapeatic Uses. *Alternative Medicine Review*, **2(1)**: 48-56.
- GÜNDÜZ, A., ER, H. (2000). Sitokinler ve Oftalmolojideki Yerleri. *Türkiye Klinikleri J Ophthalmol*, **9**: 53-58.
- GÜNERİ, İ., ÖZMEN, D., BAYINDIR, O. (1997). Sitokinler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, **17**: 65-74.
- GUZMAN, C., CALLEROS, C.H., GRİEGO, L.L., MONTOR, J.M. (2010). Interleukin-6: A cytokine with a pleitropic role in the neuroimmuno endocrine network. *The Open Neuroendocrinology Journal*, **3**: 152-160.
- HALL, I.H., STARNES, C.O., MCPHAIL, A.T., WISIAN N.P., DAS, M.K., HARCHELROAD, F., SPIELVOGEL, B.F. (1980). Anti- inflammatory activity of amine cyanoboranes, amine carboxyboranes, and related compounds. *Journal of pharmaceutical sciences*, **69(9)**: 1025-1029.
- HATADA, K., MİKİ, C. (2000). Nutritional status and postoperative cytokine response in colorectal cancer patients, **12**: 1331-1336.
- HEFTİ, A.F., (1993). Aspects of cell biology of the normal periodontium. *Periodontol*, **3**: 64-75.
- HEGSTED, M., KEENAN, M.J, SİVER, F., WOZNIK, P. (1991). Effect Of Boron On Vitamin D Deficient Rats. *Biological Trace Element Research*, **28**: 243-255.
- HİRANO, T., AKİRA, S., TAGA, T., KİSMMOTO, T. (1990). Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today*, **11**: 443-9.
- 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.
- İNCE, S., KELES, H., ERDOGAN, M., HAZMAN, O., KUCUKKURT, İ. (2012). Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride–induced hepatotoxicity in mice. *Drug and chemical toxicology*, **35(3)**: 285-292.

- İNCE, S., KÜÇÜKKURT, İ., CİĞERCİ, İ.H., FİDAN 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 Elements in Medicine and Biology*, **24(3)**: 161-164.
- KALFATOĞLU, E., ÖRS, N., SAİN, S.(1997). Bor Bileşikleri İçeren Atık suların Arıtılması. Tübitak Marmara Araştırma Merkezi, Gebze-Kocaeli, 1-9.
- KARABAG, Ç.F., İNCE, S., KÜÇÜKKURT, İ., DEMİREL, H.H., HAZMAN, O. (2015). Boron attenuates malathion induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, **38**: 391-99.
- KİSHİMOTO, T., AKİNA, S., NARAZAKİ, M. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp-130. *Blood*, **86**: 1243-1254.
- KONO, H., WHEELER, M.D., RUSYN, I., LIN, M., SEABRA, V., RIVERA, C.A., THURMAN, R.G. (2000). Gender differences in early alcohol-induced liver injury: role of CD14, NF- κ B, and TNF- α . *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **278(4)**: 652-661.
- KRİLLOVA, I., CHAISSON, M., FAUSTO, N. (1999). Tumor Necrosis Factor induces DNA replication in hepatic cell through nuclear factor kappaB activation, *Cell Growth Diff*, **10(12)**: 819-828.
- MC DOWELL, L.R., (1992). *Minerals In Animal and Human Nutrition*. Academic Press Inc, London, 367-370.
- MC KEE, J.E., WOLF, H.W., (1963). *Water Quality Criteria*. California State Water Resources Control Board, **15**: 407- 411.
- MCCOY, H., KENNEY, M.A., MONTGOMERY, C., IRWIN, A., WILLIAMS, L., ORRELL, R. (1994). Relation of boron to the composition and mechanical properties of bone. *Environmental Health Perspective*, **102**: 49-53.
- MERGEN, A., CÜCE S., TÜRKÖZ S., KOCABAŞ, M. (2006) .Studies Made on the Effect of Boron on Human Healthy by Eti Mine Works General. Management III. International Boron Symposium Congress Book. Ankara, **3**: 1-7.
- MOSEMAN, R.F (1994). Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environ Health Perspect*, **102**: 113-117.

- MÜEZZİNOĞLU, T., KORKMAZ, M., NEŞE, N., BAKİRDERE, S., ARSLAN, Y., ATAMAN, O.Y., Lekili, M. (2011). Prevalence of Prostate Cancer in High Boron-Exposed Population: A Community-Based Study, *Biological Trace Element Research*, **144**: 49-57.
- NAKAHARA, H., NISHIMOTO, N. (2006). Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy in rheumatic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **6**: 81-373.
- NAKSHATRİ, H., BHAT N.P., MARTİN, D.A., GOULET, R.J., SLEDGE, G.W. (1997). Constitutive activation of NF- κ B during progression of breast cancer to hormone independent growth. *Molecular and Cellular Biology*, **17**: 3629-3639.
- NANJI, A.A., JOKELAINEN, K., FOTOUHINIA, M., RAHEMTULLA, A., THOMAS, P., TIPOE, G.L., DANNENBERG, A.J. (2001). Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, **281(6)**: 1348-1356.
- NIELSEN, F.H., HUNT, C.D., MULLEN, L.M., HUNT, J.R. (1987). Effect of dietary boron on mineral,estrogen, and testosterone metabolism in post menopausal women. *Faseb Journal*, **1**: 394-397.
- NIELSEN, F.H., SCHULER T.R., (1992). Studies of the interaction between boron and calcium, and its modification by magnesium and potassium in rats, Effects on growth, blood, variables and bone mineral composition, *Biol Trace Elem Res.*, **35**: 225-237.
- NIELSEN. F.H. (2000). The Emergence Of Boron As Nutritionally Important Throughout The Life Cycle. *Nutrition*, **16**: 514-521.
- NORORİHA, I.L., NİEMİR, Z., STEİN, H., WALDHER, R., (1995). Cytokines and growth factors in renal disease: Nephrol Dial Transplant, **10**: 775-786.
- PAGE, R.C. (1991). The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.*, **26**: 230-242.
- PAHL, H.L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, **18**: 6853-6866.
- PAPADAKİS, K.A., TARGAN, S.R. (2000). The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflamm Bowl Dis.*, **6**: 303-313.

- PENLAND, J.G. (1993). Effects of Dietary Boron and Magnesium on Brain Function of Mature Male and Female Long-Evans rats, *J.Trace Elem Exp Med.*, **1**: 394-397.
- PENLAND, J.G. (1994). Dietary Boron , Brain Function and Cognitice Performance. *Envirion Health Perpect*; **102**: 65-72.
- PFAFFL, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR . *Nucleic Asids Research*, **29**, No.9.
- RICHARDS, C.D., (1998).“Interleukin-6, Cytokines”, Mire-Sluis, A., Thorpe, R., Academic Press, London, 87-100.
- RICHOLD, M. (1988). Boron Exposure From Consumer Products.*Biological Trace Element Research*, **66**: 121-129.
- RUNDALL, B.K., DENLINGER, C.E., JONES, D.R. (2004). Combined histone deacetylase and NF-kB inhibition sensitizes non-small cell lung cancer to cell death. *Surgery*, **136**: 416-425.
- RUULS, S.R, SEDGWICK, D. (1999). Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatilby complex: Lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum Genet.*, **65**: 294-301.
- SAMMAN, S., NAGHIİ, M.R., LYONS, P.M., VERUS, A.P. (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biological Trace Element Research*, **66**: 227-235.
- SANDER, J.E., DUFOUR, L., WYATT, R.D, BUSH, P.B., PAGE, R.K., (1991) Acute toxicity of boric acid and boron tissue residues after chronic exposure in broiler chickens. *Avian Dis.*, **35**: 745-749.
- ŞAYLI, B.S. (2003). Low frequency of infertility among workers in a borate processing facility. *İbid.*, **93**: 19-29.
- 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.
- SEN, R., BALTIMORE, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancerbinding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, **47**: 921-928.

- SENATORSKI, G., PACZEC, L., KROPIEWNICKA, E., BARTLOMIEJCZYK, I. (2002). "Cytokines in noninvasive diagnostics of diabetic nephropathy progression", *Pol. Merkuriusz Lek.*, **13(1)**: 28-32.
- SHAH, S.A., VOHORA, S.B. (1990). Boron enhances anti-arthritic effects of garlic oil. *Fitoterapia*, **61(2)**: 121-126.
- SHIMIZU, Y., MIYAZAKI, Y., IBUKI, K., SUZUKI, H., KANEYASU, K., GOTO, Y., HAYAMI, M., MIURA, T., HAGA, T. (2005). Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF- α gene at an early stage of infection . *Virology*, **343**: 151-161.
- SHISHODIA, S., AGGARWAL, B.B. (2004). Nuclear Factor-kB: a friend or a foe in cancer? *Biochem Pharmacol*, **68**: 1071-1080.
- SHOHAMI, E., GINIS, I., HALLENBECK, J.M. (1999). "Dual Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Brain Injury." *Cytokine Growth Factor Reviews*, **10**: 119-130.
- SISK, D.B., COLVIN, B.M., MERRILL, A., BONDADI, K., BOWEN, J.M. (1990). Experimental acute inorganic boron toxicosis in the goat: Effects on serum chemistry and CSF biogenic amines. *Vet Hum Toxicol.*, **32**: 205-211.
- SKLAVOUNOU, A., CHRYSOMALI, E., SCORILAS, A. (2000). TNF-alpha expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.*, **29**: 5-370.
- TILG, H., WILMER, A., VOGEL, W., HEROLD, M., NÖLCHEN, B., JUDMAIER, G., HUBER, C. (1992). Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*, **103(1)**: 264-274.
- TREINAN, K.A., CHAPIN, R.E., (1991). Development of testicular lesions in F344 rats after treatment with boric acid. *Toxicol Appl Pharm.*, **107**: 325-335.
- TRIPATHI, P., AGGARWAL, A. (2006). NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Sci.*, **90**: 519-531.
- UÇKUN, Z. (2013). Esansiyel Bir Komponent: Bor-Borun Günlük Alımı ve Fizyolojik Etkileri, **6(2)**: 119-123.
- UYGAN, D., ÇETİN, Ö. (2004). Borun Tarımsal ve Çevresel Etkileri: Seydisuyu Toplama Havzası . Köy Hizmetleri Araştırma Enstitüsü, Su Yönetimi Bölümü; 530-532.

- VANDENABEELE, P., DECLERCQ, W., BEYAERT, R., FIERS, W., (1995). Two Tumor Necrosis Factor Receptors: Structure and Function, *Trends in Cell Biology*, **5**: 392-399.
- VANHORSSEN, R., HAGEN, T.M., EGGERMONT, A.M. (2006). TNF- α in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility, *The Oncologist*, **11**: 397-408.
- WARRINGTON, K. (1923). The Effect of Boric Acid on the Broad Bean and Certain Other Plants. *Ann Botany*; **37**: 629-672.
- WHO, (1998). Boron. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria Ohio, USA., **204**: 1-201.
- WILSON, J., BALKWILL, F. (2002). The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. *Semin Cancer Biol.*, **12**: 113-120.
- WOODS, W.G. (1994). An Introduction to Boron: History, Sources, Uses and Chemistry, *Environment Health Perspect*, **102**: 5-12.
- WU, J.T., KRAL, J.G. (2005). The NF- κ B/ I κ B signaling system: A molecular target in breast cancer therapy. *The Journal of Surgical Research*, **123**: 158-169.
- YAMADA, Y., FAUSTO, N. (1998). Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor, *Am J. Pathol.*, **152**: 1577-1589.
- YAZC, S., AKSIT, H., KORKUT, O., SUNAY, B., ÇELİK, T. (2014). Effects of Boric Acid and 2-Aminoethoxydiphenyl Borate on Necrotizing Enterocolitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **58(1)**: 61-67.
- YEĞİN, O. (1990). B ve T hücre reseptörleri interlökin 6. *Temel İmmunoloji Notları*, Akdeniz Üniversitesi, **41**: 25-46.