

TC.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORİK ASİTİN YENİ DOĞAN SIÇAN BEYİN HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE GLUTAMATLA OLUŞTURULAN
NÖROTOKSİSİTEYE ETKİSİ**

Ecz. Abdullah Caner GÜVEN

**Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi
Erzurum - 2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TEŞEKKÜR.....	III
ÖZET.....	IV
SUMMARY.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Glutamat Nörotoksitesisi.....	2
2.1.1. Glutamat.....	2
2.1.2. Glutamat ve Reseptörleri.....	2
2.1.3. Glutamat Sentezi.....	5
2.1.4. Astrositlere Glutamat Taşınması.....	6
2.1.5. Glutamatın Neden Olduğu Astroglial Hücre Şişmesi.....	7
2.1.6. Nörolojik Fonksiyon Bozukluğunda Astrositler ve Glutamat.....	9
2.1.7. Glioma Hücrelerinde Glutamat Toksisitesi.....	11
2.1.8. Hücre Ölümü.....	12
2.1.9. Nörotoksosite.....	13
2.1.10. Nörotoksosite Tipleri.....	14
2.1.11. Nörodejeneratif Hastalıklarda Glutamatın Rolü.....	14
2.1.12. Glutamat Nörotoksitesisi Üzerine Daha Önce Yapılan Çalışmalar	15
2.2. Bor.....	16
2.2.1. Bor.....	16
2.2.2. Bor Bileşiklerinin Kullanım Alanları.....	17

2.2.3. Bora Maruziyet.....	19
2.2.4. İnsanlarda ve Laboratuvar Hayvanlarında Bor'un Absorpsiyonu, Dağılımı, Metabolizması ve Eliminasyonu.....	19
2.2.4.1. Absorbsiyonu.....	19
2.2.4.2. Dağılımı.....	20
2.2.4.3. Metabolizması.....	20
2.2.4.4. Eliminasyonu.....	21
2.2.5. İnsanlarda Borun Fizyolojik Etkileri.....	21
2.2.5.6. İnsanlarda Bor Toksisitesi.....	23
2.2.5.7. Deney Hayvanlarında Bor Toksisitesi.....	24
3. Materyal ve Metod.....	26
4. Bulgular.....	31
5. Tartışma.....	33
6. Kaynaklar.....	41

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve yürütülmesi esnasında maddî-manevî hiçbir yardımını esirgemeyen, her konuda anlayışlı ve rehber bir yaklaşım ile beni yönlendiren, bu çalışmanın ortaya çıkmasında çok büyük emeği bulunan, tez yöneticisi, kıymetli hocam Doç. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU' na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Farmakoloji ABD'nin kapılarını sonuna kadar açan bölüm başkanı saygıdeğer hocam, Prof. Dr. Fatma GÖÇER'e,

Tez çalışmalarım esnasında desteklerini gördüğüm hocalarım Doç. Dr. Halis SÜLEYMAN, Doç. Dr. Zekâî HALICI ve Yrd. Doç. Dr. İsmail KARA' ya,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen Uz. Dr. Ecz. Elif ÇADIRCI, Uz. Beyzagül POLAT ve Ecz. Fatih SARUHAN'a,

Yardımlarını esirgemeyen Eczacılık Fakültesinde görevli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Fehmi ODABAŞOĞLU, Araşt. Gör. Dr. Mesut HALICI ve Oktm. Dr. Yasin BAYIR' a,

Ve son olarak çalışma sırasında destek ve ilgisini eksik etmeyen aileme en içten ve en candan teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Abdullah Caner GÜVEN

Kasım 2009

**BORİK ASİTİN YENİ DOĞAN SIÇAN BEYİN HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE GLUTAMATLA OLUŞTURULAN NÖROTOKSİSİTEYE
ETKİSİ**

ÖZET

Beyindeki en önemli eksitatör nörotransmitter olan glutamat, memeli merkezi sinir sisteminde sinaptik plastisite, öğrenme, bellek fonksiyonlarını da içine alan bir çok fizyolojik olaydan sorumlu bir maddedir. Glutamatın hücre içi ve hücre dışı konsantrasyonları normal işleyişe sahip merkezi sinir sisteminde sürekli bir denge halindedir. Gerek oksidan maddelerin artışı, gerek fizyolojik ve/veya patolojik bir hasar, gerek genetik yatkınlık ve gerekse dışarıdan kimyasal bir müdahale nedeni ile bu denge bozulduğunda glutamatın konsantrasyonunda meydana gelen değişiklikler bir dizi fizyopatolojik olayı tetikler ve sonuçta hücre ölümüne neden olan nörotoksositeye neden olur.

Bor özellikle yurdumuz için oldukça büyük önem arzeden, dünya genelindeki rezervlerin çok büyük bir kısmı yurdumuzda bulunan, kullanım alanı oldukça geniş bir elementtir. Bu çalışmada, bugüne kadar sağlık ile ilgili bir çok alanda tedavi rejimlerinde yer alan bu element ve bileşiklerinin glutamat nörotoksitesi üzerine etkileri araştırılmıştır.

Araştırma esnasında yenidoğan sıçan yavrularının beyin korteks hücrelerinin ko-kültürü yapılmış, bu kültürler üzerinde en yüksek oranda Nörotoksosite yapan glutamat konsantrasyonu tayin edilmiştir. (10^{-5} M Glutamat) Elde edilen değer literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bulunan konsantrasyondaki glutamat ile muamele

edilmiş hücre kültürlerine değişen konsantrasyonlardaki Borik Asit uygulanmış ve MTT tekniği ile boyama yapılarak spektrofotometrik olarak canlılık oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 10^{-5} M glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye karşı borik asit 1,2.5,5,7.5,10 mg/L dozlarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak etkili bulunmuş, nörotoksisiteyi azaltmıştır. Borik Asitin 7,5-10 mg/L dozları en etkili bulunmuştur.

15,20 ve 30 mg/L dozlarındaki borik asit nöroprotektif özelliği istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Borik asitin bu özelliğinin altta yatan mekanizmalarının net olarak ortaya konulabilmesi içinse çok daha ileri teknikler ve araştırmalar gereklidir.

Anahtar kelimeler: Glutamat; Nörotoksisite; Bor; Borik Asit, Beyin Hücre Kültürü; Sıçan.

THE EFFECT OF BORIC ACID ON GLUTAMATE INDUCED NEUROTOXICITY ON NEWBORN RAT BRAIN CELL CULTURES

SUMMARY

Glutamate is one of the most important excitatory neurotransmitters which is responsible for a bunch of important physiological issues like synaptic plasticity, learning, memory functions. In- and out-cell concentrations of glutamate is in a continuous balance in a normal working cell in central nervous system. Increase of oxidant materials, physiological or pathologic damage, genetic factors or a foreign substance can break down this balance and changes of the glutamate concentration can trigger a series of physiopathologic events and causes neurotoxicity which ends with cell death.

Bor is an important element especially for our country with a wide variety of usage and an important part of global bor reserves are in our country. In this study the effect of the element and its compounds which is being used in a lot of therapeutic therapies was studied on the perspective of their glutamate neurotoxicity.

The co-culture of brain cortex cells of newborn rats was made and the glutamate concentration rates which have the highest neurotoxicity determined.

VII

Results are same as literatures results (10^{-5} M glutamate). After MTT manipulation the used concentration of glutamate was 10^{-5} M and we gave in increasing doses of Boric Acid on these cell cultures. According to our results the doses 1,2.5,5,7.5,10 mg/L of boric was statistical significant on 10^{-5} M glutamate induced neurotoxicity; and decreased neurotoxicity.

In the doses of 15,20 and 30 mg/L boric is not statistical significant on 10^{-5} M glutamate neurotoxicity.

Detailed studies and techniques require for showing the full mechanisms of neuroprotective property of boric acid.

Key Words: Glutamate; Neurotoxicity; Boron; Boric Acid; Neuron Cell Culture; Rat

1. GİRİŞ

Glutamat beyindeki en önemli nörotransmitter madde olmakla birlikte aynı zamanda nörotoksik bir maddedir.

Beyinde meydana gelen bir takım hasarlar nedeni ile konsantrasyonlarında meydana gelecek değişiklikler nörotoksisiteye ve dolayısı ile hücre ölümüne yol açmaktadır. Beyindeki hücre ölümleri geri dönüşümsüz olduğundan meydana gelen hasar ve hasarın sonuçları da sıklıkla kalıcı ve geri dönüşümsüzdür.

Sağlık alanında oldukça geniş bir kullanım alanına sahip olan Borun glutamatın nörotoksik etkisi karşısında koruyucu etkisi bugüne kadar araştırılmamıştır.

Bu çalışmada öncelikle glutamatın, hücre kültürlerinde anlamlı nörotoksisiteye neden olduğu konsantrasyonların tespit edilmesi ve ardından belirlenen bu konsantrasyonlarla oluşturulan nörotoksik modele karşı Borun koruyucu etkisinin farklı Bor konsantrasyonlarında ölçülmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glutamat ve Nörotoksisite

2.1.1 Glutamat

Beyindeki uyarıcı iletimin %75' inden sorumlu olan glutamat beyindeki en önemli eksitator nörotransmitter olup; memeli MSS' de sinaptik plastisite, öğrenme ve bellek fonksiyonlarını da içeren çeşitli fizyolojik olayları düzenlemek gibi önemli rolleri de bulunan bir moleküldür. ¹⁻⁵

Merkezi sinir sisteminde hem nöronlar hem de glia hücreleri glutamat içermektedir. Glutamat, Krebs döngüsü ara ürünlerinden α -keto glutaratın indirgeyici aminasyonu ile oluşmaktadır. Tepkime geri dönüşümlüdür ve daha sonraki metabolizma sitrik asit döngüsü ile meydana gelmektedir. Glutamaterjik nöronlar bilginin şifre edilmesi, belleğin oluşumu ve kullanılması, uzaysal tanıma ve bilincin sürdürülebilmesi gibi birçok hayati görevi bulunmaktadır. Glutamat aynı zamanda önemli bir nörotoksindir. Hipoksik hasar, hipoglisemi, inme ve epilepsi ile ilişkili durumlarda glutamat reseptörlerinin aşırı uyarımı söz konusudur. Hasar ve glutamat reseptörlerinin aşırı uyarılması arasında oldukça güçlü bir bağlantı vardır. Glutamaterjik sistemin depresyonda rolü olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. ^{1, 7-11}

2.1.2. Glutamat ve Reseptörleri:

4 farklı tipte glutamat reseptörü ayırt edilmiştir.

A. NMDA

B. Kainat

C. AMPA (alfa-amino 3-hidroksi-5-metilisokzasole-4-propionik asit)

D. Metabotropik glutamat reseptörleri

Bu reseptörler kendi aralarında eksitatör ve inhibitör reseptörler olarak da gruplandırılabilirler. NMDA, kainat ve AMPA eksitatör etkiler oluştururlar. AP-4 ise inhibitör otoreseptör olarak gözükmetedir. ACPD ile aktive olan 5. reseptör inozitol fosfat metabolizmasını düzenler ve metabotropik glutamat reseptörü (mGluR) adını alır. Bunların içerisinde en fazla dikkati NMDA reseptör alttipi çekmiştir. Hafıza oluşumu, gelişimsel plastisite, epilepsi ve beyin iskemisinin nörotoksik etkileri gibi nörofizyolojik ve patolojik süreçlerde önemi ortaya konmuştur.

A. NMDA reseptörü: Ligant kapılı iyon kanallı iki farklı protein subüniti olan NMDAR1 ve NMDAR2 (NR 2A,2B, 2C, 2D) subunitlerinden oluşur. Farelerde bu reseptörler E1, E2, E3, E4 adını alırlar (12). Bu reseptörler beyin ve omurilikte yaygın olarak dağılmışlardır. Özellikle hipokampus ve serebral kortekste yüksek yoğunlukta bulunurlar. Aşırı veya uzamış NMDA reseptör aktivasyonu hedef nöronları eksitotoksisite sürecinde öldürür.

NMDA reseptöründe:

- Na^+ ve Ca^{+2} un hedef hücrelere girişini sağlayan yüksek iletimli bir kanal mevcuttur.
- Glisin bağlanma bölgesi: Yeni antiepileptik ilaçlar ve ajanlar için bağlanma bölgesidir. İskemik beyin hasarında önemlidir.
- Fensiklidin ve non-kompetitif antagonistlerin (ketamin, MK 801) bağlanma bölgesi: Bu antagonistler en fazla reseptör aktifken etkilidir.
- Voltaj bağımlı- Mg^{+2} bağlanma bölgesi mevcuttur.

- Voltaj bağımsız blok yapan 2 değerlikli katyon bölgesi: Zn^{+2} bağlar.
- Poliamin düzenleyici bölgesi: Spermin ve spermidinin bağlandığı bölge bulunmaktadır.

B. AMPA Reseptörleri: GluR1, GluR2, GluR3, GluR4.

C. Kainik Asit Reseptörleri: GluR5, GluR6, GluR7, KA1, KA2

- AMPA ve Kainik asit (KA) resöptörleri hızlı eksitator sinaptik iletim ile ilişkilidir. AMPA ve KA, NMDA'ya göre birbirlerine çok benzerler. AMPA ve Kiskalat AMPA reseptör agonistidir. Kainat ve Domeat KA reseptörleri için tercih edilen agonistlerdir.

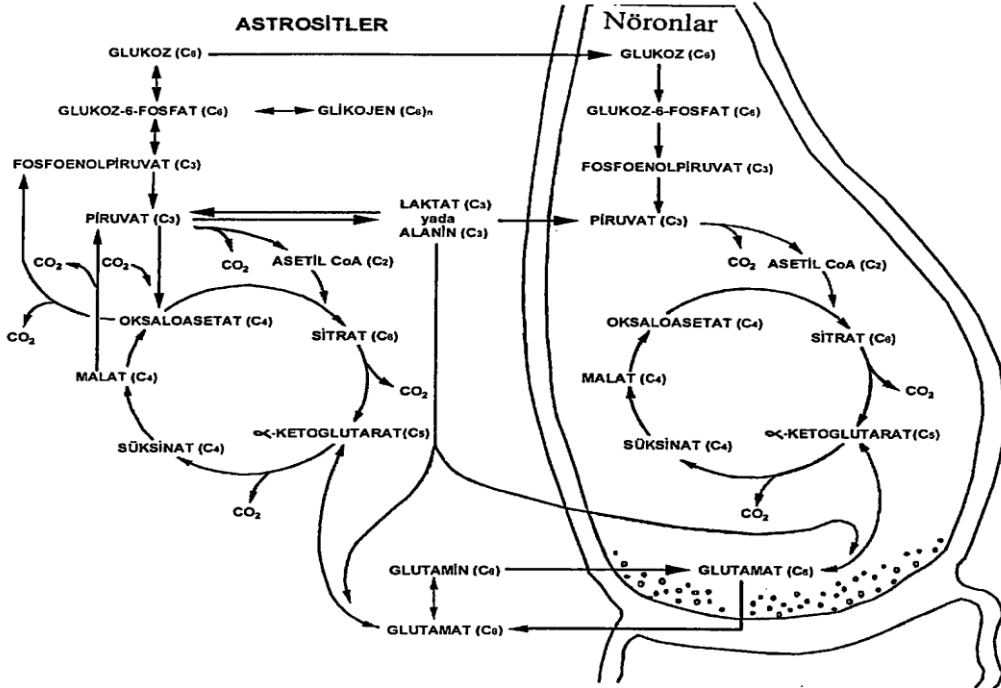
- GluR2 AMPA resöptörlerinin kalsiyum iyonlarına çok düşük geçirgenliği vardır. Bu yüzden GluR2 AMPA yoğunluğu düşükse, bu durum nöronları glutamat resöptörü aktivasyonu sonrası kalsiyum toksisitesine yatkın hale getirir.

D. Metabotropik Glutamat Resöptörleri: Yavaş sinaptik cevap oluşturur. Bu katyon spesifik iyon kanallarına bağlanıp hızlı eksitator sinaptik cevap oluşturan iyonotropik glutamat resöptörlerinden farklıdır. İyonotropik glutamat reseptörlerinin aksine metabotropik glutamat reseptörleri (mGluRs) G proteinle kenetlidir ve yaygın biyolojik fonksiyonları vardır. Bu reseptörün uyarımının NMDA ile oluşan nörotoksisiteyi azalttığı bildirilmiştir¹³. Reseptör grupları;

- GrupI: mGluR1, mGluR5
- GrupII: mGluR2, mGluR3: Adenilil siklazla negatif kenetli
- GrupIII: mGluR4, mGluR6,7,8: Adenilil siklazla negatif kenetli

2.1.3. Glutamat Sentezi:

Kan-beyin engeli, beyni kandan ayırarak beynin hücre dışı ortamının içeriğini kontrol altında tutmaktadır. Beynin damar endotel hücreleri birçok katı parçacığa geçirgen değildir ve aktif taşıma mekanizmaları da çok sınırlıdır. Normal yetişkinlerde sistemik dolaşımda yüksek oranda bulunan glikoz tek enerji kaynağıdır ve kolayca kan-beyin engelini geçebilmektedir. Serumda bulunan glutamat ise merkezi sinir sistemine giremez. Bunun sonucu olarak, merkezi sinir sisteminde bulunan tüm glutamat burada sentezlenmektedir. Nöron ve astrositlerin her ikisi de glikozu glikoliz olayı ile piruvata dönüştürebilmektedir. Sonra piruvattan asetil Co-A elde edilmektedir. Asetil Co-A tri-karboksilik asit (TCA) döngüsü ile CO_2 ve H_2O ya kadar indirgenebilir. TCA döngüsü sırasında oluşan α -keto glutarat alanin ile transamine edilerek glutamat elde edilmektedir.¹



Şekil 1. Nöron ve astrositlerdeki glutamat sentezi (HERTZ, L., 1990)

2.1.4. Astrositlere Glutamatın Taşınması:

Glutamaterjik kavşaklarda hücre dışı boşluktan nörotransmitterin geri alınmasında astrositler önemli rol oynamaktadır. Sinaptik vesiküllerde depolanan glutamat, Ca^{+2} bağımlı ekzositoz ile presinaptik terminallerden salınmaktadır. İlk önce, postsinaptik AMPA/Kainat reseptörlerini aktive ederek ilgili katyon kanallarını açmakta ve uyarıcı bir potansiyele neden olmaktadır. Bu başlangıç depolarizasyonu ile NMDA reseptörlerinde Mg^{+2} un neden olduğu voltaj bağımlı blok kaldırılmakta ve Ca^{+2} un hücre içine girişi ile daha ileri depolarizasyon gerçekleştirilmektedir. Glutamat, reseptörü ile etkileştikten sonra sinaptik aralıktan uzaklaştırılmalıdır, çünkü reseptörün aşırı uyarılması (özellikle de NMDA reseptörünü) nöronal hasara neden olmaktadır. Glutamatın geri alınımı, hücreler arasına difüzyonu, nöron ve astrositlerin zarlarında bulunan taşıyıcı proteinler ile gerçekleştirilmektedir.

Astrositlere alınan glutamat, glutamine dönüştürülerek salınmakta; nöron uçları ve astrositler tarafından geri alınmaktadır. Nöronda glutamin tekrar glutamata çevrilerek nörotransmitterin veziküler havuzu yeniden doldurulmaktadır. Bu döngü glutamat/glutamin mekiği adını almaktadır. Glutamat hücrelere Na^{+} ile birlikte alınır.

Beyin kılcal damarları ile bağlantı kurmuş astrositik son uçlardan alınan glukoz, laktata çevrilerek salınır ve sonuçta ATPye dönüştürülmektedir.

Astrositlerde, sinaptik olarak salınan glutamat nöronal reseptörlerin yanı sıra, astrositlerde bulunan AMPA ve metabotropik reseptörleri aktive etmektedir. Bu reseptörlerin birlikte aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} artmasına ve ardından astrositlerden glutamat salınmasın neden olmaktadır.^{1,14,15}

2.1.5. Glutamatın Neden Olduğu Astrogliyal Hücre Şişmesi:

Glutamatın hücre içi konsantrasyonu astrositlerde 50 μM iken, glutamaterjik nöronlarda 10 μM dır. Normal glutamaterjik iletimin gerçekleştirilmesi ve eksitotoksisteden korunabilmesi için hücre dışı glutamat konsantrasyonu yaklaşık 1-3 μM düzeyinde tutulmaktadır.

Hücre dışı glutamat miktarındaki artış astrogliyal hücre şişmesinde son derece önemli bir etkidir. Beyindeki kan dolaşımı ile ilgili olarak gerçekleşen herhangi bir sorunun ardından, bu durumdan etkilenen bölgedeki astrositlerin hücre hacimleri kısa bir süre içinde artar. Hücre dışı ortamın hacminin çok küçük olması nedeniyle astrogliyal şişme nöroaktif maddelerin miktarında değişimlere neden olmaktadır. Bu değişim ise nöronal fonksiyonu bozmaktadır. Astrositlerin depolarizasyonu hem glutamatın salınmasına hem de hücre dışı boşlukta glutamatın alınma yeteneğinin azalmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda normal olmayan glutamaterjik ileti ve nörotoksiste gelişmektedir. Astrositlerin şişmesi aynı zamanda lezyon bölgesinden glutamatın difüzyonunu da engellemektedir. Hücre hacmindeki artış hasar görmüş dokuda metabolik bozulmayla sonuçlanmakta ve bu durum nöronlara zarar vermektedir. Bunun sonucunda astrositler de hasara uğrayabilir. Glutamat ile astrositlerin şişmesi hücre içinde aminoasitlerin birikimlerine neden olmaktadır. Glutamatın neden olduğu astrogliyal şişmenin altında yatan mekanizmayı ortaya koymak amacıyla yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Fakat bunların hiçbirisi olayı tam olarak açıklamaya yeterli değildir. ^{1,14, 16}

Hücre zarında glutamatın taşınması ve hücre hacim değişimleri arasında bir ilişki bulunmaktadır. Glutamatın hücre içine alınması 3 Na⁺ ve 1 H⁺ iyonu ile kotransport şeklindedir ve bir Na⁺ iyonu hücre dışına verilmektedir.

Glutamat taşıyıcıları için genler klonlanmıştır ve 5 alt-tip ayırt edilmiştir. Glutamat/aspartat taşıyıcısı (GLAST=EAAT1), glutamat taşıyıcısı 1 (GLT-1=EAAT2), eksitatör aminoasit taşıyıcısı 3 (EAAC1=EAAT3), eksitatör aminoasit taşıyıcısı 4 (EAAT4) ve EAAT5. Glutamat taşıyıcılarının uptake inhibitörü threo-beta-benzyloxyaspartate (TBOA) sinaptik aralıkta glutamat artışına yol açarak, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu sonucu nörotoksik etki oluşturur fakat gliotoksik değildir. TBOA, ciddi nekrotik nörodejenerasyona yol açmıştır. Glutamat taşıyıcılarının nekrotik ölüme karşı önemli koruyucu etkileri görülmüştür. Bu etki glutamat reseptör antagonistleri ile bloke edilebilmiştir. İlave olarak TBOA, sıçan hipokampusunda iskemi oluşturmuştur.

GLT1 hipokampus ve serebral kortekste en yüksek düzeyde bulunmakta iken GLAST öncelikle serebellumun moleküler tabakasında bulunmaktadır. Yetişkin beynindeki astrositik zarlarda glutamat taşıyıcılarının oranı yüksektir. Bu durum sinaptik iletiden sonra glutamatın hücre dışı boşluktan alınımında astrositik taşıyıcıların önemli olduğunu düşündürmektedir. Glutamatın uyardığı astroglial şişmenin, glutamat taşıyıcılarının inhibe edilmesi ile kısmen azalıyor olması glutamat taşıyıcıları ile hücre hacminin düzenlenmesi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Glutamat klerensi ve nörodejenerasyonun engellenmesinde astrositik taşıyıcıların rolünü göstermeye çalışan araştırmalarda, sıçanda GLT1 ve GLAST gliyal taşıyıcılarının azalmasının hücre dışı glutamat miktarını yükselttiği ve nörodejenerasyona yol açtığı saptanmıştır. ⁶

GLT-1'i genetik olarak ortadan kaldırılan farelerde azalmış glutamat taşınımı aktivitesi sonucu nöbetler ve nörotoksisiteye yatkınlık gözlenmiştir. Glutamat taşınımı aktivitesinde değişiklikler saptanan hastalıklar arasında ALS (Amyotrofik lateral skleroz), Huntington, Parkinson ve Alzheimer Hastalığı sayılabilir. Glutamat disfonksiyonu patojenezde katkı mı yapıyor yoksa hastalık patolojisinin bir sonucu mu bilinmemektedir. Ama nörodejenerasyonun başlangıcında glutamat taşıyıcı aktivitede değişimler başlar. ⁶

2.1.6. Nörolojik Fonksiyon Bozukluğunda Astrositler ve Glutamat:

Merkezi sinir sistemindeki travmatik ya da iskemik hasar sonrası glutamatın nöronlar ve astrositlerden patolojik salınımı söz konusudur. Bu salınım daha yoğun eksitotoksik nöronal dejenerasyona neden olmaktadır. Hücre dışı glutamat miktarının artması, hem iGluR hem de mGluR'lerinin kontrolsüz uyarımı sonucu eksitotoksik kaskadın oluşumuna neden olmaktadır. Bu toksik etkilerin arkasında yatan moleküler mekanizmalar bilinmemekle beraber, hücre içi Ca^{+2} artışının ve Na^{+} un hücre içine girişinin etkisi olduğu düşünülmektedir. Astrositler, beyin dokusunda dış uyaranlara yanıt verebilen, nöronlar ve diğer glial hücrelerle iyon konsantrasyonlarını modüle ederek oluklu bağlantılar (gap junction) yoluyla haberleşebilen hücrelerdir. Bu özellikler astrositlerin sinir sisteminde birçok girdiye yanıt verdiğini düşündürmektedir. Eksitotoksik değişimler ile astrositler homeostazisi sağlama yeteneğini kaybedebilmekte ve hasarı daha da ileriye götürebilmektedir. Glutamat alınımı, K^{+} 'un tamponlanması, substrat üretimi ve serbest radikallerin elimine edilmesi gibi koruyucu görevleri azalmakta veya tersine dönebilmektedir. Sonuçta, hücre içi ATP miktarı azaldığı zaman glutamat

alınımı azalmaktadır. İskemi veya anokside beyin ATP miktarının azalması Na^+/K^+ ATPaz pompasının yavaşlamasına ve Na^+ , K^+ gradientlerinin tersine dönmesine neden olmaktadır. Bu değişim, glutamat taşıyıcılarının tersine çalışmasına ve hücre dışında glutamat miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu artışın sonucunda hasara bağlı olarak nöron ölümü gerçekleşir.

Astroglial şişme glutamat ve K^+ gibi maddelerle suyun sekonder olarak alınımı nedeniyle oluşmaktadır. Şişme iki olaya neden olmaktadır:

1) Beyin içi basıncın artması ve damar perfüzyonunun azalması; Böylece hücre dışına salınan glutamat miktarı artmaktadır. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive ederek eksitotoksositeye katılmaktadır.

2) İskemik durumların astroglial Ca^{+2} miktarında artışa neden olması; Hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artışa yanıt olarak astrositler glutamat salgılamaktadır. Salınan glutamat komşu nöronları depolarize ederek, NMDA reseptörlerinin fazla uyarılmasına neden olmaktadır. Bu durum astrositlerin nöronal hasardaki fonksiyonlarını göstermektedir. ^{1,17}

Kültürdeki astrositlerde L-glutamatın toksik etkisi iki safhada gerçekleşir:

1) L-glutamat ve uygulanmasının ardından 4-6 saat içinde mikroskopik olarak gözlenebilen hücre şişmesi; Bu dönemde hücreler morfolojik yapılarını korurlar, fakat çekirdekte değişim söz konusudur. Çekirdekler şişmiştir, çekirdekçikler göze çarpar ve çekirdek zarı belirgindir.

2) Hücre ölümü; Hücre ölümünün morfolojik ya da biyokimyasal işaretleri daha sonra başlamakta (16-18 saat) ve L-glutamat uygulanmasından 24-30 saat sonra hemen hemen tüm hücreler ölmektedir. ^{1,18}

2.1.7. Glioma hücrelerinde glutamat toksisitesi:

Glia hücreleri, nöronlardan farklı olarak postnatal dönemde bölünme yeteneklerini sürdürmektedirler. Glial çoğalma, reaktif gliosis, beyinin travmaya cevabı ve glial hücrelerin malignant transformasyonunda görülmektedir. Glial kökenli tümörler toplu olarak glioma şeklinde isimlendirilmektedir. Gliomaların çoğunluğu astrositik hücrelerde görülürler. Transforme hücreler hala astrositlerle aynı özellikleri paylaşmaktadır. Örneğin, glial fibriller asidik protein (GFAB), S100 ve büyüme faktör reseptörlerini içermektedir. Bu durum özellikle düşük dereceli astrositomalar için doğrudur. Gliadan glioma oluşumunu sağlayan faktörler iyi anlaşılamamıştır. Bununla birlikte bu dönüşüm çok sayıda genetik değişimler, gen delesyonları ve gen amplifikasyonları ile birlikte olmaktadır.

C6 sıçan glioma hücre serisinin glial hücre özelliklerinin araştırılması ve kültürdeki glia hücrelerinin cevaplarının belirlenmesi, ayrıca glutamatın neden olduğu gliotoksistide hücresel olayların anlaşılması için uygun bir model oluşturduğu gösterilmiştir. Kato ve arkadaşları, C6 glioma hücrelerinde glutamat toksisitesinin mekanizmasını ortaya koymak için yaptıkları çalışmada,

- i. Glutamatın etkili konsantrasyonunun milimolar düzeyde ve çok yüksek olduğu,
- ii. Hücrelere NMDA ya da AMPA değil quisqualatın toksik olduğu, iii. toksisitenin glutamat reseptör antagonisti ya da glutamat alımın inhibitörü ile azaltılamadığı sonucuna vararak, glutamat toksisitesinin glutamat reseptörleri ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

- iii. Ayrıca C6 hücrelerinde glutamatın oluşturduğu hücre ölümünün önce anti porter sistem yolu ile sistin alımının baskılanması, ardından glutatyon eksikliğinin oksidatif strese neden olması ile meydana geldiğini ortaya koymuşlardır. Lipoksijenaz tarafından oluşturulan peroksitler GSH' sı azalmış hücrelerde ölüme neden olmaktadır.^{1, 19-21}

2.1.8. Hücre Ölümü

Organizmadaki hücrelerde iki tip hücre ölümü tanımlanmıştır. Akut bir hasar sonucu kaza ile ölen hücrelerin genellikle önce şiştiği ve ardından parçalandığı bildirilmiştir. Ayrıca içeriklerini hücre dışı ortama salarak inflamasyona neden olmaktadır. Bu şekilde meydana gelen ölüm nekroz olarak adlandırılmaktadır. Programlı hücre ölümü ise embriyonik gelişimde ve ergin dokuların devamlılığında önemli rol oynayan, hücre ölümünün fizyolojik şeklini ifade etmektedir. Yetişkinlerde programlı hücre ölümü, hücre döngüsü devam eden dokularda sabit hücre sayısının sürdürülmesi ve hücre çoğalmasının dengelenmesinden sorumludur. Örneğin, insanda günlük $5 \cdot 10^{11}$ kan hücresi elimine edilmekte ve kemik iliğindeki üretimi ile toplam hücre sayısı dengelenmektedir. Ayrıca programlı hücre ölümü ile hasar görmüş ve zarar oluşturabilecek hücreler yok edilerek, organizmanın bir bütün olarak korunması sağlanmaktadır. Virüs ile enfekte hücreler sıklıkla programlı hücre ölümü altında bulunmaktadır. DNA hasarı geçirmek sureti ile, potansiyel olarak zararlı mutasyonlar taşıyan hücreler yok olmaktadır. Programlı hücre ölümünün diğer iyi tanımlanmış örneği ise memeli sinir sisteminde bulunmaktadır. Organizmada

nöronlar çok fazla sayıda üretilmekte ve %50' den fazlası programlı hücre ölümü ile yok edilmektedir. Hücrelerin akut bir hasar ile ölümünden farklı olarak programlı hücre ölümü aktif bir olaydır ve apoptoz olarak bilinen morfolojik bir değişiktir. Apoptoz sırasında DNA genellikle parçalanmakta, kromatin yoğunlaşmakta ve çekirdek apoptotik cisimler denilen zar ile çevrelenmiş parçalara ayrılmaktadır. Apoptoz geçiren hücreler ve hücre parçaları böylece kolayca tanınmakta ve fagositoz yolu ile elimine edilmektedirler. ^{1,18}

2.1.9. Nörotoksisite:

Doğal veya yapay toksik maddelerin sinir sisteminin normal aktivitesini olumsuz yönde değiştirmesi nörotoksisite olarak adlandırılır. Bu değişiklik bazen nöron ölümüne kadar gidebilir. Nörotoksik maddeler eksojen veya endojen kaynaklı olabilir.

Nörotoksisite vücutta oluşan endojen nörotoksik ajanlarla da oluşabilir. Buna en önemli örnek glutamattır. Glutamat aynı zamanda nörotransmitterdir. Glutamat konsantrasyonu bir nöronun çevresinde kritik düzeye erişirse, nöron apoptozis ile ortadan kalkabilir. Glutamat dışında endojen nörotoksik ajanlar arasında histamin, kinolik asit, NO ve bilirubin de gösterilebilir.

Nörotoksisiteye neden olan eksojen kaynaklara şunlar örnek gösterilebilir:

- Karbon monoksit gibi zararlı gazlar,
- İlaç tedavisi,

- Radyoterapi,
- Ağır metaller (civa, kurşun gibi),
- Böcek ilaçları,
- Çözücüler,
- Kozmetikler,
- Çeşitli yiyecekler (midyede domoik asit bulunması gibi)
- Doğal olarak bulunan çok çeşitli maddeler (bazı nohutlarda bulunan L-BOAA, bazı bitkilerde bulunan L-BMAA gibi) nörotoksik etki oluşturabilir. ⁶

2.1.10. Nörotoksisite tipleri:

- Nöronopati: Nöron hücre ölümü. Hücreler yerine konamaz.
- Aksonopati: Akson dejenerasyonu. Geri dönüşümlüdür. Hekzan, akrilamid gibi maddeler bu tip nörotoksisiteye neden olurlar.
- Myelinopati: Myelin yapıda hasar. Kurşun ve heksaklorofen bu tip hasara neden olan ajanlara örnek gösterilebilirler.
- İletim toksisitesi: Nörotransmisyon bloke olur. Organofosfat zehirlenmesinde olduğu gibi.

2.1.11. Nörodejeneratif hastalıklarda glutamatın rolü:

- Huntington Hastalığı: NMDA agonisti kinolinat injeksiyonu bu hastalığın semptomları taklit edebilir.

- AIDS Demansı (HIV ile ilişkili kognitif-motor kompleks): Bu hastalıktaki nöron ölümü NMDA antagonistleri ile deneysel çalışmalarda geri çevrilebilmiştir.

- Nöropatik Ağrı Sendromu: NMDA antagonistleri ve NOS inhibitörleri ağrıyı azaltmıştır.

- Parkinsonizm: Nöronları glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye yatkın hale getirir.

- Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) : Primer hasarın süperoksit dismutaz geninde olduğu düşünülmektedir. Bu hastalıkta glutamat geri alım aktivitesi azalarak, motor nöronları glutamatla oluşan hasara yatkın hale getirir.

- Homosistinüri, Hiperprolinemi: Zayıf glutamat reseptör agonisti gibi davranırlar.

- Kurşun Ensefalopatisi

- Alzheimer Hastalığı: Beta-amiloid proteini birikimi nöronları glutamat toksisitesine yatkın hale getirir. Glutamat taşıyıcı ekspresyonu azalmıştır.

- Tourette sendromu: Bazal ganglionlardaki hasarın sorumlusunun glutamat olduğu düşünülmektedir.⁶

2.1.12. Glutamat nörotoksisitesi üzerine daha önce yapılan çalışmalar:

Daha önce glutamatın neden olduğu nörotoksisite üzerine farklı kimyasallarla yapılan çalışmalarda:

- Salisilik asitin glutamat nörotoksisitesi hususunda koruyucu etkisi olduğu ortaya konulmuştur.⁶⁰

- Dantrolenin tek başına veya nimodipin ile kombine olarak kullanıldığında glutamat nörotoksitesisi hususunda dantrolenin tek başına koruyucu etkisi olduğu, bununla birlikte, dantrolenin koruyucu etkisinin nimodipin ile beraber kullanıldığında bu etkisinin potansiyelize olduğu ortaya konulmuştur.⁶¹

- Bir antioksidan olan Melatoninin birçok farklı konsantrasyondaki dozlarında glutamat nörotoksitesisine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.⁵⁹

- Antioksidan etkili *Lavandula angustifolia* bitkisinin çiçeklerinin sıvı ekstraktının doza bağlı olarak glutamat nörotoksitesisi üzerine önleyici etkisi olduğu gösterilmiştir.⁶²

2.1. Bor

2.1.1. Bor

Bor, periyodik tabloda B simgesiyle gösterilen, metalle ametal arası yarı iletken özelliklere sahip kimyasal bir elementtir. Periyodik cetvelin 3A grubunun ilk ve en hafif üyesidir. Bor doğada serbest olarak değil, başka elementlerle bileşikler halinde bulunur. Tabiatta yaklaşık 230 çeşit bor minerali bulunmakta olup teknolojik gelişmelerle birlikte yeni bileşiklerin de keşfedilmesi beklenmektedir. Bor mineralleri bileşimlerinde bulunan kalsiyum, sodyum, magnezyum gibi metallerin oranlarına, içerdikleri su miktarına ve kristal yapılarına göre değişik isimler alırlar.²²⁻²⁴

Bor elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Bor Elementinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellik

Atom numarası: 5

Atom Ağırlığı: 10.811 ± 0.005 g/mol

Atom çapı: 1.78 Å

Yoğunluğu: 2.84 gr/cm³

Ergime noktası: 2300°C

Kaynama noktası: 3660°C

Buharlaştırma ısı: 128 kcal/g atom

Elektronegatifliği: 2.0

Oksidasyon sayısı: 3

İyonlaşma enerjisi: 191 kcal/g atom

Sertliği: 9.3 Mohs

2.1.2. Bor Bileşiklerinin Kullanım Alanları

Bor, içinde yaşadığımız bilim ve uzay çağında, nükleer sanayiden ilaç sanayine, gübre sanayinden otomobil sanayine kadar 400 den fazla alanda kullanılmakta olup, kullanım alanları her geçen gün artmaktadır. Mevcut kullanım alanları göz önüne alındığında bor dünyanın en stratejik madeni konumundadır. Türkiye dışındaki bor rezervlerinin ömrü yaklaşık 50 yıl iken, bor rezervlerinin %72'sine sahip olan ülkemiz tüm dünyanın 450-500 yıllık ihtiyacını karşılayabilecek durumdadır.²⁵

İlaç sanayi: Mikrop öldürücü özelliğinden dolayı dezenfektan, diş macunu, göz yıkama solusyonları, ağız gargaraları, irrigan solusyonların içeriğinde yer almakta; bazı antiseptiklerin yapımında bor tercih edilmektedir.

Kozmetik sanayi: Kolonya, şampuan, bebek pudrası ve parfüm imalatında bor kullanılmaktadır.

Tıp alanında: Borla nötron yakalama terapisi (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT) olarak bilinen kanser tedavisinde bor kullanılmaktadır. Özellikle beyin kanserinin tedavisinde hasta hücrelerin seçilerek imha edilmesini mümkün kılması ve sağlıklı hücrelere zararının minimum düzeyde olması sebebiyle tercih sebebidir. Bunun yanı sıra, osteoporoz ve menopoz tedavisinde, alerjik hastalıklarda, psikiyatride ve manyetik rezonans (MR) cihazlarında da bor kullanılmaktadır.

Besin olarak: Bor, bitki gelişimi için önemli 16 temel bitki besininden biridir. Bor bitkilerde fotosentez miktarını, köklerin büyümesini ve havadan emilen CO₂ miktarını artırmaktadır. Bor eksikliği hücre duvarını inceltici etki yapmaktadır. Fakat, bor'un çok yüksek konsantrasyonlarda bulunması toksik etkilere de yol açabilmektedir.

2008 yılında Cao J. tarafından yapılan bir çalışmaya göre borik asitin anti enflamatuvar özelliği gösterilmiştir. Borun bu özelliğini TNF- α oluşumunu indükleyen lipopolisakkarit salınımını önleyerek gerçekleştirdiği savunulmuştur. Yine aynı çalışmada bir antioksidan olan N-Asetil Sistein de lipopolisakkaritin indüklediği TNF- α oluşumunu borik asite yakın düzeylerde azaltmıştır.³⁰

Borrelly, J.'nin 1996'da yaptığı çalışmaya göre %2 lik Borik asit solüsyonunun derin yaraları iyileştirdiği gösterilmiştir. Hunt C.D. 1999da borun

diyetle alınmasının normal inflamatuvar cevaba katkısının olduğunu göstermiştir. Borik asit uygulamasının kıkırdak hücrelerinden TNF- α salınımını artırdığı gösterilmiştir.²⁶⁻²⁸

Önceki çalışmalar Borun, vücuttaki glutatyon ve derivelerinin depolarını ve ROS nötralize eden ajanları artırarak oksidatif hasarı sınırladığını göstermiştir.²⁸ Sıçanlarda serin-borat kompleksinin GSH miktarını artırdığı bildirilmiştir. Bunu GSH'nın metabolize edilmesini inhibe ederek gerçekleştirdiği gösterilmiştir.²⁹ Yara iyileşmesinde önemli olan fibroblastın kültür ortamlarında TNF- α ve mRNA seviyeleri bor tedavisi sonrası yükselmiş bulunmuştur.³¹

2.1.3. Bora Maruziyet

Bor karasal ve sucul bitkilerde bulunmakta olup besin zinciri yoluyla biyolojik birikimi söz konusu değildir. Pek çok populasyon için bor'a en büyük maruziyet besinler yoluyla olmaktadır. İnsanlar tarafından alınan günlük bor miktarları ile beslenmelerinde yer alan çeşitli besin gruplarının miktarları arasında doğru bir orantı mevcuttur.³²⁻³⁴ Meyveler, yeşil zebzeler, mantarlar, baklagiller ve kabuklu yemişler bor bakımından zengin besinlerdendir. Balık, et ve süt ürünleri ise borca fakir besinler arasında yer almaktadır.^{28,35}

2.1.4. İnsanlarda ve Laboratuvar Hayvanlarında Bor'un Absorpsiyonu, Dağılımı, Metabolizması ve Eliminasyonu

2.2.4.1. Absorpsiyonu

Borun gastrointestinal bölgeden genellikle borik asit olarak, hızlı ve tamamına yakın (>90) emildiği çeşitli farmakokinetik çalışmalarla ortaya

konmuştur.³⁶ Culver (1994), insanlar üzerinde yapmış olduğu araştırmasında, 3.3-18 mg/m³ boraksa maruz kalmış bireylerde, borun solunum yoluyla organizma içerisine alındığını göstermiştir. Bu bireylerde yapılan analizler sonucu, bireylerin kan ve idrarlarındaki bor miktarlarının belirgin bir şekilde yükseldiği tespit edilmiştir.³⁷ Çocuklar, yetişkin insanlar, tavşanlar ve ratlar üzerinde yapılan pek çok araştırma ile borun sağlam deri (hasar görmemiş) yoluyla emiliminin olmadığı ortaya konmuştur. Ancak, borik asitin yırtılmış veya hasar görmüş deriden kolayca emildiği rapor edilmiştir.³⁸⁻⁴¹

2.2.4.2. Dağılımı

Besinler ve içme suları ile bor alımının normal bir sonucu olarak, insan dokularında ve vücut sıvılarında bor bulunmaktadır. Yumuşak dokularda bulunan bor, kan düzeyine yakın seviyededir. Bor kemiklerde birikim yapabilmektedir. Kas dokusu, kalp, akciğer ve barsak daha az miktarlarda bor içermektedir.^{32,42} Dünya Sağlık Örgütü 1998 yılında yayınladığı raporda insanlar ve ratlarda içme suları, diyet yoluyla ve kaza eseri alınan borun kandaki seviyelerini karşılaştırmıştır. Kan ve doku örneklerindeki bor dağılımının insan ve rat türü için de benzer oluşu, bor kinetiğinin insan ve ratlarda aynı olabileceği düşüncesini doğurmuştur.⁴³

Yüksek dozda maruz kalma sonucu kan dokusunda ve paralelinde diğer dokularda bor seviyesinin hızla yükseldiğinin bilinmesine karşın bor'un kan ve dokularda biriktiğine dair geçerli bir bulgu elde edilememiştir.³⁷

2.2.4.3 Metabolizması

Boratların metabolize edilebilmesi, bor-oksijen arasındaki bağların kırılmasını gerektirmektedir. Ancak bu bağların koparılabilmesi için aşırı

miktarda enerjiye (523 kJ/mol) ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, başta borik asit olmak üzere pek çok bor bileşiği (özellikle boratlar) biyolojik sistemlerde metabolize edilemezler.⁴⁴

Düşük konsantrasyonlarda inorganik boratlar, emilimleri esnasında mukozal yüzeylerde ve fizyolojik pH derecesinde borik asite dönüştürülür. İnsanlar ve laboratuvar hayvanları üzerinde yapılmış çok sayıda araştırma, organizmaya alınan boratların % 90'dan fazlasının borik asit formunda organizmadan uzaklaştırıldığını ortaya koymuştur.⁴³⁻⁴⁵ Borik asidin doza bağlı olarak farklı biyolojik moleküller ile kompleksler oluşturabileceği rapor edilmiştir. Bu konuda gerçekleştirilmiş olan deneysel çalışmalar borik asidin hidroksil, amino ve tiyol gruplarına karşı ilgisini ortaya koymuştur.⁴³

2.2.4.4. Eliminasyonu

Bor bileşiklerinin eliminasyonlarının insanlarda ve hayvanlarda benzer oldukları bildirilmektedir. Organizma içerisine alınış yoluna bağlı olmaksızın, borun eliminasyonu başlıca glomerular filtrasyon yoluyla gerçekleştirilmektedir.⁴⁶ Glomerular filtrasyonun ratlarda insanlara oranla 3-4 kat daha hızlı olduğu, ayrıca insanlarda çeşitli yollarla organizma içerisine alınmış olan borun % 90'dan fazlasının ilk 24 saat içerisinde idrar yoluyla uzaklaştırıldığı rapor edilmiştir.^{47,48} Ağız yoluyla alınan bor, intravenöz yolla alınan bora oranla % 66 oranında daha iyi elimine edilmektedir. Alınan borun yaklaşık % 99'luk bir kısmı 120 saat sonunda elimine edilmektedir.⁴⁸

2.2.5. İnsanlarda Borun Fizyolojik Etkileri

1980'lerden günümüze yapılmış olan pek çok araştırmanın sonuçları Borun insanlarda esansiyel olabileceğini göstermektedir.⁴⁹ Borun insanlarda esansiyel

olarak tanımlanmayışı bu elementin biyokimyasal fonksiyonlarının ayrıntılı olarak bilinmemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte insanlar üzerinde yapılan sınırlı çalışmalar Borun kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glukoz ve trigliseritler gibi yaşam sürecinde önemli olan pek çok bileşenin kullanılması ve metabolizmasında etkin roller üstlendiğini ortaya koymaktadır. Bu rollerinden dolayı çeşitli vücut bölümlerinin (iskelet, beyin ve kan) yapılarını ya da fonksiyonlarını etkileyebilmektedirler.⁴³ Nielsen VD (1987 ve 1991) ile, Hunt ve Herbel (1993) yapmış oldukları araştırmalarla bor ve bor bileşiklerinin enerji, azot, makromineral ve reaktif oksijen metabolizmalarını, bazı enzim (oksidoredüktazlar, ksantin oksidaz, aldehid dehidrojenaz, laktat dehidrojenaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve hormon seviyelerini (kalsitonin, 17 β - estradiol), serum glukoz, üre, trigliserit ve kreatin düzeylerini ayrıca eritrosit ve trombosit yapımını da etkileyebildiklerini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, borun vitamin D sentezini artırıcı rol oynadığı da bilinmektedir. Borlu bileşiklerin yukarıda sıralanan rolleri nasıl üstlendikleri konusunu açıklamaya yönelik iki farklı hipotez önerilmiştir.⁵⁰⁻⁵²

Bunlardan birincisi borun hücre membranı fonksiyonu, stabilitesi veya yapısında önemli görevleri olduğunu savunmaktadır. Düzenleyici anyon ve katyonların transmembranal taşınmasını ve membranlar arası haberleşmeyi sağlaması ile hormonal aktivitelere duyarlı olması sonucu bu görevleri gerçekleştirebilmektedir. Buna benzer bir hipotez borun bitkilerdeki fonksiyonel rollerini açıklamak amacıyla da önerilmiştir.^{53,54}

İkinci hipotez ise borun metabolik yollarda bazı anahtar enzim reaksiyonlarını yarışmalı inhibisyon yoluyla etkileyen negatif bir regülator olduğunu savunmaktadır.⁵⁴

Fransa’da yetişkin sağlıklı bir insanın günde 7 mg kadar bor aldığı saptanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü insanın günlük aldığı bor miktarını uzun yıllar 1-3 mg ile sınırlamıştı, ama son yıllardaki çalışmalara dayanarak bu miktarı yükseltmiştir.⁵⁵ Dünya sağlık örgütü en son 1996’da yayınlanan insan sağlığı ve beslenmesinde iz elementler başlıklı raporda yetişkin bir bireyin ortalama bazal bor ihtiyacı 0.375 mg/gün ve günlük kabul edilebilir ve güvenilir ortalama alım miktarının da 1-13 mg/gün olduğu kaydedilmiştir.

2.2.5.6. İnsanlarda Bor Toksisitesi

İnsanlar için borik asitin öldürücü dozunun ağız yoluyla maruziyette 640 mg/kg, deri yoluyla maruziyette 8600 mg/kg ve intravenöz enjeksiyon yoluyla maruziyette ise 29 mg/kg olduğu kaydedilmiştir.⁵⁶ Çocukların yetişkinlere kıyasla bor bileşiklerine daha duyarlı olduğu belirtilmiş, ayrıca potansiyel öldürücü dozun çocuklar için genellikle 3-6 g, yetişkinler için de 15-20 g olduğu rapor edilmiştir.

48

Ülkemizde farklı bölgelerde yaşayan insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada borun üreme sistemi üzerine etkilerini araştırılmıştır. Toprak ve içme sularının bor muhtevalarının birbirlerinden oldukça farklı olduğu iki bölgede yaşayan toplam 4687 birey üzerinde yapılan araştırmada, bora daha fazla maruz kalan bireylerin verimlilik oranları ile diğer bölge insanların verimlilik oranları arasında herhangi bir farklılık bulunmadığı rapor edilmiştir.⁵⁵ Buna karşın, Rusya’da yapılan bir çalışma sonucu bor işçilerinde (n=28) seksüel aktivitenin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca, ilginç olarak A.B.D’de bor işçileri üzerinde yapılan çalışmada, kız çocuk doğumunda erkek çocuğa oranla artış olduğu belirlenmiştir.⁴² Bor minerallerinin kullanıldığı sektörlerde çalışan işçiler üzerinde bu mineralin muhtemel toksik etkilerini belirlemek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmış ve

işçilerde sıklıkla burun kanaması, göz ve burun bölgelerinde kaşınma, boğaz ağrısı, göğüs ağrısı, öksürük, nefes darlığı ve çeşitli cilt problemlerinin görüldüğü rapor edilmiştir. Kronik bor maruziyeti ile ilgili olarak yapılan çalışmada işçilerde üriner bor konsantrasyonunu ve kan bor konsantrasyonunu karşılaştırmışlardır. Bora (3.3 mg/ m^3 ve 18 mg/m^3) maruz kalan işçilerin ($n=14$) kan bor konsantrasyonlarının $0.11-0.26 \text{ µg/ mg}$, üriner bor konsantrasyonlarını ise $3.16-10.72 \text{ µg/ mg}$ arasında olduğu tesbit edilmiştir. (37) Bor ve bor bileşiklerinin insanlardaki karsinogenik ve mutajenik potansiyelleri hakkında literatürde kayıtlı herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. U.S. Ulusal Toksikoloji Programı (N.T.P. 1987), bu konuda herhangi bir çalışma bulunmadığından dolayı hayvan (fare ve sıçan) deneylerini temel alarak bor bileşiklerinin insanlarda kanserojen olmadığını rapor etmiştir. ⁵⁷

2.2.5.7. Deney Hayvanlarında Bor Toksisitesi

Bir seferde verildiğinde belli bir süre içinde (24 saat ile 2 hafta arasında) ölüme yol açabilen madde miktarı öldürücü doz olarak tanımlanmaktadır. Öldürücü doz da, hayvanları öldüren en küçük öldürücü doz, %50'sini öldüren öldürücü doz (ÖD50 veya medyan öldürücü doz) ve %100'ünü öldüren öldürücü doz (ÖD100 veya fatal doz) diye alt gruplara ayrılmaktadır. Toksikoloji çalışmalarında bir maddenin zehirliliğinin ölçüsü olarak genellikle ÖD50'den yararlanılır. ÖD50 değerlerine göre kimyasal maddelerin sınıflandırılması Çizelgedeki gibi yapılmaktadır (Anonymus 1995).

Çizelge 1.2 Bazı bor bileşiklerinin (borik asit ve boraks) ÖD50 değerleri

Maruz kalma biçimi Bileşik Organizma grubu Bileşik ÖD50 değeri

Ağız Yoluyla Borik asit Fare 3450

Ağız Yoluyla Boraks Sıçan 4980

Ağız Yoluyla Borik asit Sıçan 3160

Subkütanoz Borik asit Fare 1740

Subkütanoz Borik asit Guinea-pigs 1200

İntravenöz Borik asit Fare 1780

İntravenöz Borik asit Sıçan 1330

3. MATERYAL VE METOD

Materyaller:

- Yenidoğan sıçan, 0-2 günlük
- Steril cam petri kabı, 100ml , 2 adet
- Steril plastik petri kabı , 2 adet
- %95 etanol
- Poly-D- lysine
- HBSS (Hanks'ın dengeli tuz solüsyonu)
- PBS (fosfat buffer solüsyonu)
- DNase Tip 1 (Deoksiribonükleaz Tip 1)
- FCS (fetal kalf serumu)
- Tripsin-EDTA
- Tripan mavisi
- Forseps (büyük, orta açılı)
- Makas (büyük, küçük)
- Glutamat
- Borik Asit
- Neurobasal Medium

Poli D-Lizin, 30000-70000 MW'dur. 0,1mg/ml poli-D-lizin alınır ve deneye başlamadan 24 saat önce fosfat buffer solusyonunda çözülür (Diaz-Trelles 2000). 24-48li flasklarda hazır kaplama mevcut olduğu için yapılan çalışmalarda Poli D-Lizin kaplamaya gerek kalmamıştır. Flasklar, laminar flow setinde veya etüvde bir gece süre ile kurumaya bırakılır. ⁶⁰

Poli D-lizin (25 mg/total), tripsin-EDTA (%0,25'lik 100 ml), Fetal kalf serumu 100 ml şeklinde temin edilmiştir.

HBSS Çözeltisinin Hazırlanışı:

<u>İçeriği:</u>	<u>g/L</u>
Kalsiyum Klorid	0.185
Magnezyum Sülfat	0.097
Potasyum klorid	0.4
Potasyum Fosfat monobasik	0.06
Sodyum Klorid	8.0
Sodyum fosfat dibazik	0.047
D-Glukoz	1.0
Fenol Kırmızısı	0.011

Her bir litrelik su için 9,8 gr toz HBSS kullanılır. Sigma firmasından temin edilen HBSS'de HCO_3 bulunmadığından, bu çözeltiye 0.35gr HCO_3 eklenir.

Solüsyon, 2-8 C°'de karanlıkta bekletilir. Bu solüsyon her kullanımdan önce ;

- pH değişimi
- Presipitasyon ve parsipitasyonlar
- Bulanıklaşma ve renk değişimi ve infeksiyonlar açısından kontrol edilir.

Deneyde kullanılan hayvanlar:

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD bünyesindeki Deneysel Hayvan Laboratuvarından temin edilen yenidoğan Spraque-Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır.

Kullanılan antibiyotikler ve dozları:

Hücre kültürlerinde önerilen profilaktik antibiyotik kullanımı olan;

- penisilin 100000 ü/ml,
- streptomisin 10mg/ml,
- amfoterisin B 0.025 mg/ml,

şeklinde ilk gün flasklara eklenerek kültürler korunmaya çalışılmıştır.

Deneyde kullanılan metod, sıçan serebral korteks dokularına, sıçan gelişiminin erken evrelerinde uygulanır. Tek hücre süspansiyonunun filizlendiği gözlenen kültürlerde, hücreler 5-10 gün yaşar. Halbuki hücrelerin küçük agregatları filizlenirse daha uzun sürvi (ömür) elde edilir.

Öncelikle, yenidoğan sıçan derisi %95 etanol ile yıkanır. Sonra, 100 ml'lik boş bir plastik petri kabına konularak ve büyük makas kullanılarak dekapite edilir. Diğer yenidoğan hayvanlar için de bu işlem tekrarlanır. Eğimli forsepsle baş tutulurken, deriyi kesmek için küçük makas kullanılır. Makaslarla Y şeklinde kesim yapılır ve halen kıkırdak halde olan kafatası kesilir. Beyne zarar verilmeden nazikçe disseke edilir. Eğilmiş forsepsle bütün kranyal sinirler uzaklaştırılır. Korteks çıkartılır.

Daha önce steril petri kabına konmuş olan 5 ml lik HBSS üzerine serebral korteks konur ve iki bistüri ucu ile makro parçalama yapılır. Bu bileşim, steril bir enjektöre çekilerek 5 ml HBSS + 2 ml Tripsin-EDTA şeklinde 25-30 dk 37°'de muamele edilir. Bu çözeltiye 8,5-9 mikrolitre DNase tip 1 (120u/ml, Sigma, St

Louis, USA) eklenerek 1-2 dakika muamele edilir. 3 dk süre ile 800 RPM'de santrifüje edilir. Süpernatant atıldıktan sonra, mevcut tortuya 31,5 ml NBM 3,5 ml FCS eklenir. Daha önce PBS'de çözündürülmüş poly-D-lysine ile kaplanmış olan 10 flaskın herbirine 3,5 ml gelecek şekilde ekim yapılır.

Flasklar ventil pozisyonunda, 37°C'de %5 CO₂ içeren etüv ortamına bırakılır. Flasklar üç günde bir, bünyelerindeki hücreler mikroskop altında dallanma gösterip belli bir olgunluğa erişene kadar, hacimlerinin 1/2 oranında taze medyumla değiştirilir. ⁷

Deneyde kullanılacak olan ilaçlar, mikroskop altındaki sayımdan 16 saat önce flask içine uygulanarak flasklar etüve geri konur. Borik asit 5, 10, 15 mg/L dozda verilir; glutamat da bu çalışmada 10⁻⁵-10⁻⁶ M konsantrasyonlarda, iki farklı doz şeklinde kullanılmıştır. Uygulanan borik asit sonrası yarım saat beklenmiş ve kültür ortamında bahsedilen dozlarda glutamat ilave edilmiştir. 16 saat beklendikten sonra ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi için MTT kiti kullanılır. 570 nm dalga boyunda Microquant okuyucuda spektral olarak hücre değerlendirilmesi yapıldı.

Gruplar:

Deney I:

Glutamatın nöron kültürlerinde hangi dozlarda ne kadar toksisite oluşturduğunu görmek için 10⁻³ - 10⁻⁸ dozları arasında yeni doğan nöron kültürlerinde denendi.

Deney II:

1. İlaçsız kontrol
2. 10⁻⁵ M Glutamat
3. B1(1 mg/L Borik Asit) + 10⁻⁵ M Glutamat

4. B2(2,5 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
5. B3(5 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
6. B4(7,5 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
7. B5 (10 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
8. B6 (15 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
9. B7 (20 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat
10. B8 (30 mg/L Borik Asit) + 10^{-5} M Glutamat

4. BULGULAR

Tablo 1: L-glutamatın 10^{-3} M- 10^{-8} M konsantrasyonları arasında oluşturduğu toksisite değerlerinin MTT canlılık testi sonrası oluşan canlılık ortalama değerleri

Kullanılan sıçan sayıları	L-glutamat dozları						
	Kontrol (n=6)	10^{-8} (n=6)	10^{-7} (n=6)	10^{-6} (n=6)	10^{-5} (n=6)	10^{-4} (n=6)	10^{-3} (n=6)
Canlı hücre ortalamaları	0.082 ± 0.002	0.086 ± 0.007	0.078 ± 0.005	$0.065 \pm 0.006^*$	$0.046 \pm 0.009^*$	$0.067 \pm 0.002^*$	0.076 ± 0.004

** $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.*

Yukardaki sonuçlara göre yenidoğan sıçan korteks kültürleri glutamata maruz kaldığında kontrol grupları ve glutamat uygulanan gruplar arasında canlılık açısından farklılıklar oluşmuştur. Yukardaki verilere göre en toksik glutamate dozu 10^{-5} M konsantrasyon olarak gözükmemektedir. 10^{-6} M 2. en toksik doz, 10^{-4} M 3. en toksik doz olarak bulunmuştur. Diğer dozlar olan 10^{-3} , 10^{-7} ve 10^{-8} M glutamat konsantrasyonları yenidoğan sıçan korteks hücrelerinde anlamlı bir toksisite oluşturmamıştır.

Bu sonuçlara dayanarak en toksik doz olarak bulunan 10^{-5} M glutamat konsantrasyonuna karşı bor elementinin nasıl etkiler oluşturacağı test edildi.

Tablo 2: L-glutamatın 10^{-5} M konsantrasyonundaki dozuna karşı Borik Asit verilmesini takiben MTT canlılık testine göre oluşan canlılık ortalama değerleri

Gruplar	Canlı Hücre Ortalamaları	10^{-5} glutamata göre p değeri
10-5 Glutamat	53,8±7,5	
B 1 mg/L	75,0±11,5	0,042*
B 2,5 mg/L	76,2±19,7	0,040*
B 5 mg/L	75,2±21,1	0,049*
B 7,5 mg/L	80,8±18,7	0,014*
B 10 mg/L	84,0±22	0,006*
B 15 mg/L	69,2±19,6	0,153
B 20 mg/L	64,6±13,4	0,290
B 30 mg/L	70,1±13,6	0,113
Kontrol	86,6±21,5	-

* $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Bu sonuçlara göre 10^{-5} M glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye karşı borik asit 1,2,5,5,7,5,10 mg/L dozlarında etkili bulunmuş, nörotoksisiteyi azaltmıştır. Borik Asitin 7,5-10 mg/L dozları en etkili bulunmuştur.

15,20 ve 30 mg/L dozlarındaki borik asit nöroprotektif özelliği istatistiksel olarak anlamlı değildir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, glutamatin çeşitli dozlarının yeni doğan sıçan beyin korteks hücreleri üzerinde oluşturduğu nörotoksik etkileri ve Borik Asitin çeşitli konsantrasyonlardaki dozlarının bu toksik etkileri geri çevirebilme yeteneği araştırılmıştır.

Aynı ilacın farklı dozlarının farklı özellikler gösterebileceği ilkesinden yola çıkarak Borik Asitin farklı konsantrasyonlarındaki dozları çalışılmıştır. Bunu yaparken Borik Asitin istatistiksel olarak en anlamlı sonuçlarını değerlendirmek için glutamatin, en yüksek, nörotoksisite yaptığı konsantrasyonuna karşı bu etki araştırılmıştır.

Deney sonuçlarımızdan elde ettiğimiz verilere göre yenidoğan sıçan korteks kültürleri glutamata maruz kaldığında kontrol grupları ve glutamat uygulanan gruplar arasında canlılık açısından farklılıklar oluşmuştur. En toksik glutamat dozu 10^{-5} M konsantrasyon olarak gözükmektedir. 10^{-6} M 2. en toksik doz, 10^{-4} M sonraki en toksik doz olarak bulunmuştur. Diğer dozlar olan 10^{-3} , 10^{-7} ve 10^{-8} M glutamat konsantrasyonları yenidoğan sıçan korteks hücrelerinde anlamlı bir toksisite oluşturmamıştır.

Bu sonuçlara göre glutamatin daha yüksek konsantrasyonu olan 10^{-3} M daha az toksik bulunmuştur. Hatta 10^{-4} M konsantrasyon toksik olmasına rağmen 10^{-5} M konsantrasyon kadar toksik bulunmamıştır. Bu durumu izah için literatürde de çeşitli yorumlar bulunmaktadır. Bu yorumlardan en güçlüsü glutamat taşıyıcı aktivitedeki değişimlerdir. Sinaptik aralıktaki glutamat düzey değişimleri glutamat taşıyıcı aktivitenin hangi konsantrasyondan sonra tetikleneceğini ve hangi aktivitede çalışacağını belirleyen en önemli faktördür.

Merkezi Sinir Sisteminde glutamat seviyeleri, glutamat salınımı ve geri alınımı arasında dengelenir. Bazal hücre dışı glutamat nöron hücrelerinden salınım ve astrosit ve nöronlarca geri alınımıyla sürdürülür. Eksojen glutamat alım ve geri alım mekanizmaları ile uzaklaştırılır. Bu olay glutamat toksisitesinde önemli bir rol oynar.

1998de Araquae ve arkadaşları astrosit stimülasyonunun astrosit ve nöron kültürü içeren karma kültürlerdeki presinaptik metabotropik glutamat reseptörlerinin seçici aktivasyonu ile eksitator ve inhibitör iletimi azalttığını göstermiştir. Biz de bu çalışma neticesinde glutamat konsantrasyonunun bir eşik değerini geçtiğinde astrositik glutamat taşıyıcılarının aktiflendiğini ve fizyolojik nöron iletimi için temel olan hücre dışı glutamat konsantrasyonunun azaldığını düşünmekteyiz. Astrosit fonksiyonlarındaki hasar beyin yaralanma fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar.⁶³ Takasaki ve arkadaşları beyindeki yaralanma bölgesinde glutamat seviyelerinin 10^{-4} M seviyelerine çıktığını görmüştür. Fakat yaralanan bölgenin 3 mm uzağında glutamat değerleri, 10^{-5} M altında bulunmuştur. Ve glutamat düzeylerindeki normale dönüş 200 dakika alırken, 3 mm uzaktaki bölgede glutamat seviyeleri 25 dakikada geriye dönmüştür.⁶⁴ Hasarlı bölgede glutamatın uzaklaştırılmasının uzun sürmesi; ve seviyelerin daha yüksek seyretmesi nörotoksite oranını artırmıştır.

Sistin glutatyon sentezi için gerekli bir aminoasittir ve hücre dışı glutamat ile seviyesi azalır. Glutamat-sistin antiporterleri sistini hücre içerisine ve glutamati hücre dışına taşır.⁶³ Glutamat-sistin antiporterleri astrosit ve meningeal hücreler gibi non-nöronal hücrelerden glutamat atılımını artırarak, nöroproteksiyon sağlar.

Astrosit içeren nöron kültürlerinde glutamatın daha az toksik olduğu gösterilmiştir.⁶⁵ Sagara ve Schubert 10^{-4} M konsantrasyondaki glutamatın, nöron

hücre kültürlerinde sistin geri alımını tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bu konsantrasyon felç ve travmadaki hücre dışı glutamat seviyelerinden daha düşüktür. Bizim çalışmamızdaki toksisite sistindeki azalmadan kaynaklanmamaktadır. Çünkü 10^{-4} M'ın altındaki glutamat konsantrasyonlarında toksisite gözlemledik. Sagara ve bizim çalışmamız arasında herhangi bir zıtlık yoktur; çünkü Sagara' nın çalışmasında astrosit yoktur ve sinaptik aralıkta astrositlere bağlı bir glutamat alımı söz konusu değildir. Ayrıca Sagara, çalışmalarında en toksik glutamat doz olarak 10^{-4} M glutamatı göstermiş ve sistin geri alımının azalışını göstermişlerdir. Bu açıklamalara göre bizim çalışmamızda glutamat toksisitesine sistinin etkisi yoktur. Çünkü bizim kültürlerimiz ko-kültürdür ve astrosit hücreleri içermektedir. Bizim hipotezimize göre astrositlerin geri alım aktivitesi 10^{-4} M glutamat konsantrasyonunda başlamaktadır.

İki ayrı yolak glutamatın oluşturduğu nörotoksisite için bildirilmiştir. Bunlar eksitotoksik yolak ve oksidatif yolaktır. Eksitotoksik yolak, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna ve sonuçta hızlı ve yavaş sitotoksik olayların her ikisinin de tetiklenmesine yol açar.

Eksitotoksik yolaktaki hızlı etkiler, N-metil-D-Aspartat Reseptörünün (NMDAR) aktivasyonu sonrası zararlı olan Ca^{+2} elementinin yüksek konsantrasyonda hücre içine girişine yol açar. Yavaş etkiler ise daha çok metabotropik glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişir.

Oksidatif yolak, glutamat-sistin antiport sistemini bozar, glutatyon seviyelerini azaltır ve nörotoksik olan aşırı reaktif oksijen oluşumuna yol açar.

Hücre içi Ca^{+2} un aşırı miktarları nöronal disfonksiyon ve hücre ölümüne yol açabilir. Nöronal Ca^{+2} artışı ATPaz, fosfolipazlar, proteazlar, endonukleazlar

gibi bir çok enzimi aktive edebilir. Bu enzimlerin aktivitesindeki artış geri dönüşümsüz nöronal hasara yol açar.

Glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişen kalsiyum artışı; protein kinaz, fosfolipaz, NO sentezi, mitokondriyal fonksiyon bozulması ve serbest radikal oluşumuna yol açar. Kalsiyumun artışı, bu sayılan öldürücü süreçlerin birini veya birkaçını aktive edebilir. Bazı araştırmacılara göre serbest kalsiyum artışı, membran bütünlüğünün bozulması sonrası gelişen bir olaydır ve oksidanların indüklediği hücre ölümüne katkısı yoktur. Fakat diğer bir görüşe göre hücre içi kalsiyum seviyelerindeki erken yükselmenin oksidatif stresi oluşturduğu, mitokondrilere zarar verdiği ve kalsiyum bağımlı sindirici enzimleri aktiflediği, mitokondri ve iskeleti hasara uğrattığı ve sonuçta oksidanların indüklediği hücre ölümlerinde merkezi bir rol oynadığı savunulmuştur.

Endoplazmik retikulum (ER) kalsiyumun hücre içindeki major depo yeridir ve hücresel kalsiyum homeostazisini sağlar. Oksidanlar, sulfidril aktif ajanlar ve serbest radikaller kalsiyum-ATPazı inhibe eder. ER'den kalsiyum salar. Bu durum ER kalsiyumunun oksidan toksisitesinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Dantrolen, sarkoplazmik retikulum ve ER'den kalsiyum salınımını inhibe eder. Dantrolen ile yapılan bir çalışmada glutamat toksisitesi nedeniyle oluşan hücre ölümünü önlemiş, nimodipinle beraber daha da etkili olmuş fakat kontrol değerine çekememiştir. Bu sonuçta, sodyum/klor bağımlı glutamat toksisite komponenti rol oynayabilir. Metabotropik glutamat agonistleri ile hücre kültürlerinde oluşan astrosit şişmesi, dantrolen tarafından azaltılmıştır.

Nimodipin, kainatın indüklediği nörotoksitede de doz-bağımlı nöroproteksiyon yapmaktadır. Salisilik Asit (SA), OH⁻ radikali yakalayıcı olarak

Kainik Asit toksisitesinde çok etkili bulunmuştur. Bu durum NMDA gibi KA'nın da serbest radikal oluşturarak hücre ölümü yaptığını göstermektedir.

Serbest oksijen radikalleri; süperoksid dismutaz enzimlerinin, katalazın ve glutatyon peroksidazın sıkı kontrolü altındadır. Buna rağmen serbest radikal oluşumundaki artış ve antioksidan savunmadaki azalma oksidatif stresin oluşmasına neden olur. Serbest radikallerin ana üreticisi mitokondridir. Oksijen radikalleri hücre, doku ve organ hasarı oluşumuna katkı yaparlar. Serbest oksijen radikalleri glutamat geri alım inhibisyonu yapabilir. Ayrıca NMDA reseptör aktivasyonu yaparak, süperoksit salınımına, hücre içi kalsiyum artışına ve NO oluşumuna yol açabilir. Borik asidin de antioksidan etki oluşturduğu düşünülmektedir.

Çalışmalar, antioksidanların nöropatik ağrıda analjezik etkili olduklarını göstermiştir. Bu durum, serbest oksijen radikallerinin doku yaralanmasının oluşturduğu ağrıda rolünün olduğunu göstermektedir. Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu ağrı glutamat reseptör aktivasyon artışından kaynaklanabilir. Bir çalışmada Birinci santral sinapsta glutamat arttığı, Glutamat taşıyıcılarının hücre dışı glutamatı dengede tutmaya çalıştığı, Serbest oksijen radikallerinin glutamat taşınımını zayıflattığı görülmüş ve sonuçta glutamatın arttığı NMDA'nın fazla uyarıldığı düşünülmüştür. Bu ancak glutamatın o bölgede belirlenmesiyle mümkün olan kesinleştirilememiş bir durumdur. Fakat son zamanlarda glutamat artışı in vitro voltametri teknikleriyle ortaya konulabilmektedir.

Duyusal ağrı yolağının 1. sinapsında glutamat, major eksitatör nörotransmitterdir. Antikanser ilaçlardan olan paklitakselin oluşturduğu nöropatik ağrının da bu bölgedeki artmış glutamat salınımından kaynaklandığı ortaya konmuştur. Burada in vivo voltametriyle glutamat artışı gösterilmiştir.

Akut eksitotoksisitenin postsinaptik membranın aşırı depolarizasyonu sonucu geliştiğini savunanlar vardır. Bu durumda Cl^- 'un hücre içine girişine sinirin eksitotoksisiteye akut cevabı olarak bakılmaktadır. Bu girişin katyon bağımlı Cl^- transport protein $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ kotransporter izoform-1 (NKCC1) yoluyla olduğu düşünülmektedir. NKCC1 serebral iskemideki iyon homeostazisinin bozulmasında rol oynar.

Na^+ , Cl^- ve su hücre içine girer, Ca^{+2} artışı görülür, sonuçta lizis oluşur. NMDA reseptör aktivasyonu sonrası hücre içi oluşan Na^+ ve Cl^- birikimi Bumetanidle inhibe edilmiştir. NKCC1'in blokajı NMDA reseptör aktivasyonu sonrası oluşan hücre şişmesini önemli derecede azaltmıştır.

NMDA ve KA reseptör aktivasyonunun serebellar parçalarda argininden NO sentezini indüklediği gösterilmiştir.

NO serebral iskemide ikili rol oynar; nöroproteksiyon ve nörotoksisite. Nörotoksin olarak NO, glutamat salınımını ve NMDA reseptörlerin aşırı aktivasyonu ile iskemik eksitotoksik beyin hasarını artırır. Diğer taraftan serebral iskeminin erken basamaklarında iskemik bölgenin kanlanmasını artırır.

Bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan 7-nitroindazolün, NMDA'nın intrastriatal injeksiyonu ile oluşturulan hasarı azalttığı fakat KA veya AMPA'yla oluşturulan hasara etkisi olmadığı gösterilmiştir. Nitrik oksit bir çok beyin fonksiyonunda (hafıza ve öğrenme gibi) NMDA reseptörünün etkisine eşlik eder.

Bir çalışmada SNP hidroksil radikal oluşumuna neden olmuştur. Bu çalışmada nimodipin ve dantrolen SNP'nin oluşturduğu nörotoksisiteyi önlemede başarısız olmuştur.⁶

Bu durumda kalsiyumun oksidan hücre ölümünün sebebi değil, sonucu olduğu yaklaşımına güç vermektedir. Fakat NMDA reseptör aktivasyonunda tersi

durum söz konusuydu. SNP'nin indüklediği nörotoksisitede kalsiyum salınımı muhtemelen nöronların membran bütünlüğünün bozulmasından kaynaklanmaktadır. Fakat NO sentezi için hücre içi kalsiyumun gerekliliği de bir başka önemli noktadır.

NO'nın, glutamat nörotoksisitesinde NMDA reseptör kenetli iyon kanallarını kapatarak koruyucu rol oynadığı, fakat NO'nın artan konsantrasyonlarının, oksijen radikal oluşumuyla ilişkili olduğu ve toksik hale gelmeye başladığı, retinal nöron kültürlerinde gösterilmiştir. ⁶

Ekstraselüler glutamatın, iyonotropik glutamat reseptörleri, metabotropik glutamat reseptörleri uyarımından sonra 3. hedefi glutamat/sistin antiportu Xc-'nin inhibisyonudur. Bu bir çeşit oksidatif stres oluşumuna ve oksidatif glutamat toksisitesi ile hücre ölümüne yol açar. Glutamat/sistin antiportu sistini hücre içine, glutamati hücre dışına taşır. 10^{-4} M'lık ekstraselüler glutamat konsantrasyonunda sistin alımı tamamen durur. Sistin, glutatyon (GSH)'un sentezi için gereklidir. GSH, ekstraselüler glutamat tarafından tüketilirse hücreler bir çeşit programlı hücre ölümüyle ölebilirler. Bu tip hasar antioksidanlarla bariz şekilde azaltılabilir.

Elde edilen bulgulara göre 10^{-5} M glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye karşı borik asit 1,2.5,5,7.5,10 mg/L dozlarında etkili bulunmuş, nörotoksisiteyi azaltmıştır. Borik Asitin 7,5-10 mg/L dozları en etkili bulunmuştur. Borik Asidin 10 mg/L dozlarının üstünde koruyucu bulunmaması bu konuda yapılmış olan çalışmalarla örtüşmektedir. Etkili bulunan konsantrasyonların beyin hücreleri üzerine olan etkileri yine diğer hücreler üzerinde yapılmış olan çalışmalarla benzer koruyucu sonuçları doğurmuştur.

Bu konuda yapılmış olan çalışmalar dikkate alındığında; glutamatın nörotoksisite oluşumunda hangi mekanizmaları ne ölçüde kullandığı ve borik

asidin bunu nasıl önlediğini kesin olarak ortaya koyabilmek için daha ileri araştırmalara gerek olduğu gerçeği ortaya çıkmaktadır.

Destekleyen Kurumlar:

Bu çalışma Tübitak 107S 067 ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi No:

2005/160 projeleri tarafından desteklenmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Kabadere S. Glutamat toksisitesi oluşturulmuş glioma hücre dizilerinde MgSO₄ ve lazaroid U-83836E' nin hücre yaşam oranına etkisi. Doktora Tezi. Eskişehir; 2002.
2. Bannerman, D.M., Good, M.A., butcher, S.P., Ramsay, M., Morris, R.G. (1995) Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature*, 378: 182-186.
3. Collingridge, G.L., (1994) Long-term potentiation. A question of reliability, *Nature*, 371: 652-653.
4. Collingridge, G.L ve Bliss, T.V. (1995) Memories of NMDA receptors and LTP, *Trends Neurosci*, 18: 54-56.
5. Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Matyash, M., Nolte, C., Kettenmann, H., Kirchhoff, F.: Astrocytes of the Mouse neocortex Express functional N-methyl-D-aspartate receptors, *Faseb J*. 15: 1270-1272, (2001).
6. Hacımuftuoğlu, A., Nörotoksisite ve Glutamat İlişkisi, 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 24-27 Ekim 2007, Trabzon
7. Daikhin, Y., Yudkoff, M., Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia, *J. Nutrition* 130(4): 1026S-1031S (2000).
8. Petrie RX, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol Ther*. 2000 Jul;87(1):11-25. Review.
9. Schiffer HH. Glutamate receptor genes: susceptibility factors in schizophrenia and depressive disorders? *Mol Neurobiol*. 2002 Apr;25(2):191-212. Review.

10. Zarate CA, Quiroz J, Payne J, Manji HK. Modulators of the glutamatergic system: implications for the development of improved therapeutics in mood disorders. *Psychopharmacol Bull.* 2002 Autumn;36(4):35-83.
11. Zarate CA Jr, Du J, Quiroz J, Gray NA, Denicoff KD, Singh J, Charney DS, Manji HK. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Nov;1003:273-91. Review.
12. Gepdiremen, A., Hacımüftüoğlu, A., Düzenli, S., Öztaş, S., Süleyman, H.: Effects of dantrolone alone or combination with nimodipine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell cultures of rats pups, *Pharmacological Research*, Vol. 43, No. 3, 241-244, (2000).
13. Gepdiremen A, Hacımüftüoğlu A, Büyükokuroğlu ME, Süleyman H. Nitric oxide donor sodium nitroprusside induces neurotoxicity in cerebellar granular cell culture in rats by an independent mechanism from L-type or dantrolene-sensitive calcium channels. *Biol Pharm Bull.* 2002 Oct;25(10):1295-7.
14. Nicholls, D., Attwell, D.: The release and uptake of excitatory amino acids, *Pharmacol. Trends. Sci.*, 11: 462-468, (1990).
15. Vesce, S., Bezzi, P., Volterra, A.: The highly integrated dialogue between neurons and astrocytes in brain function, *Science Progress.*, 82 (3):. 251-270, (1990).
16. Hansson, E., Muyderman, H., Leonova, J., Allansson, L., Sinclair, J., Blomstrand, F., Therlin, T., Nilsson, M., Rönnback, L., Astroglia and

- glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication, *Neurochem. Int.*, 37:317-329, (2000).
17. Chan, P.H., Chu, L. Chen, S.; Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary culture, *J. Neurosci. Res.*, 25: 87-93, (1990).
 18. Ganong, W.F.: *Review of Medical Physiology* 19th ed., Appleton & Lange Stanford, Connecticut, (1997).
 19. Bordey, A., Sontheimer, H.: Electrophysiological properties of human astrocytic tumor cells in situ: enigma of spiking glial cells, *J. Neurophysiol.*, 79: 2782-2793, (1998).
 20. Kato, S., Higashida, H., Higuchi, Y., Hatakenaka, S., Negishi, K.: Sensitive and insensitive states of cultured glioma cells to glutamate damage, *Brain Res.* 303: 365-373, (1984).
 21. Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., Packer, L.: Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants, *Am. Physiol. Soc.*, 273: R1771-R1778, (1997).
 22. Sınırkaya M., 1999. Boraks atıklarından borun geri kazanılması. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum.
 23. Çinkı, M., 2001. Ulusal Maden Varlığımız ve Bor Gerçeği, Ankara Ticaret Odası, Ankara.
 24. Yılmaz, A., 2002. Her derde deva hazinemiz bor. *Tübitak-Bilim ve Teknik Dergisi*, Ankara, Mayıs sayısı.
 25. Çalık, A., 2002, Türkiye'nin bor madenleri ve özellikleri. *Mühendis ve Makine.*, s.508.

26. Benderdour M, Hess K, Gadet MD, Dousset B, Nabet P, Belleville F.
Effect of boric acid solution on cartilage metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 May 8;234(1):263-8. PubMed PMID: 9169000.
27. Borrelly J, Sebbag H, Vignaud JM. [False empyema after artificial pneumothorax. An original entity: type B non Hodgkin malignant lymphoma]. *Ann Chir*. 1996;50(5):405-8. French. PubMed PMID: 8761112.
28. Meacham, S. L. and Hunt, C. D., 1998. Dietary boron intakes of selected populations in the United States. *Biol Trace Elem Res*, 66, 65–78.
29. Bellis SL, Kass-Simon G, Rhoads DE Partial characterization and detergent solubilization of the putative glutathione chemoreceptor from hydra. *Biochemistry*. 1992 Oct 13;31(40):9838-43.
30. Cao J, Jiang L, Zhang X, Yao X, Geng C, Xue X, Zhong L.J Trace Boric acid inhibits LPS-induced TNF-alpha formation through a thiol-dependent mechanism in THP-1 cells. *Elem Med Biol*. 2008;22(3):189-95. Epub 2008 Jun 5.
31. Benderdour M, Hess K, Dzondo-Gadet M, Nabet P, Belleville F, Dousset B. Boron modulates extracellular matrix and TNF alpha synthesis in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 May 29;246(3):746-51. PubMed PMID: 9618283.
32. Naghii, M.R. and Saman, S., 1996. The effect of boron supplementation on the distribution of boron in selected tissues and on testosterone synthesis in rats. *J Nutritional Biochemistry*, 7, 507–512.
33. EGVM, Expert Group on Vitamins and Minerals, 2003. Report on safe upper levels for vitamins and minerals. London. May 2003.

34. EGVM, Expert Group on Vitamins and Minerals., 2002. Revised Review of Boron. EVM, 99/23, P.Revised a U2002.
35. Anderson, D. L., Cunningham, W. C. and Lindstrom, T. R., 1994. Concentrations and intake of H, B, S, K, Na, Cl and NaCl in foods. J Food Compos Anal., 7, 59-82.
36. Jansen, J. A., Schou, J. S. and Aggerbeck, A., 1984a. Gastrointestinal absorption and *in vitro* release of boric acid from water-emulsifying ointments. Food Chem Toxicol., 22, 49-53.
37. Culver, B. D., Shen, P. T., Taylor, T. H., Lee-Feldstein, A., Anton-Culver, H. And Strong, P. L., 1994. The relationship of blood- and urine-boron to boron exposure in borax-workers and the usefulness of urine-boron as an exposure marker. Environ Health Perspect, 102 (7), 33-137.
38. Friis-Hansen, B., Aggerbeck, B. and Jansen, J. A., 1982. Unaffected blood boron levels in newborn infants treated with a boric acid ointment. Food Chem Toxicol., 20, 451-454.
39. Stuttgen, G., Siebel, T. H. and Aggerbeck, B., 1982. Absorption of boric acid through human skin depending on the type of vehicle. Arch Dermatol Res., 272, 21-29.
40. Draize, J. H. and Kelley, E. A., 1959 The urinary excretion of boric acid preparations following oral administration and topical applications to intact and damaged skin of rabbits. Toxicol Appl Pharmacol., 1, 267-276.
41. Nielsen, G. H., 1970. Percutaneous absorption of boric acid from boron-containing preparations in rats. Acta Pharmacol Toxicol., 20, 413-424.

42. Kocatürk, P. A., 1998. Rat Testis Dokusu Üzerine Akut Borik Asit Uygulamasının 181 Fizyopatolojik ve Histopatolojik Etkileri. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
43. World Health Organisation., 1998. International Programme On Chemical Safety (I.P.C.S), Environmental Health Criteria, Boron, 204.
44. Emsley, J., 1989. The elements. Oxford, Clarendon Press, pp 32.
45. U.S.E.P.A., 2004. Toxicological review of boron and compounds. Environmental Protection Agency, EPA 635/04/52, Washington, D.C.
46. Murray, F. J., 1998. A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. Biol Trace Elem Res., 66, 331-341.
47. Nielsen FH, Shuler TR, Zimmerman TJ, Uthus EO. Dietary magnesium, manganese and boron affect the response of rats to high dietary aluminum. Magnesium. 1988;7(3):133-47. PubMed PMID: 3185013.
48. Litovitz, T. L., Klein-Schwartz, W., Oderda, G. M. and Schmitz, B. F., 1988. Clinical anifestation of toxicity in a series of 784 boric acid ingestions. Am J Emerg ed., 6, 209-213.
49. Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. Crit Rev Food Sci Nutr. 2003;43(2):219-31. Review. PubMed PMID: 12705642
50. Nielsen, F. H., Hunt, C. D., Mullen, L. M. and Hunt, J. R., 1987. Effect of dietary boron on mineral, estrogen and testosterone metabolism in postmenopausal women. FASEB J, 1: 394-397.
51. Nielsen, F. H., Mullen, L. M. and Nielsen, E. J., 1991. Dietary boron affects blood cell counts and hemoglobin concentrations in humans. J Trace Elem Exp Med., 4, 211- 223.

52. Hunt, C. D. and Herbel, J. L., 1993. Trace elements in man and animals--TEMA 8. Proceedings of the Eighth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals, Gersdorf, Germany, Verlag Media Touristik, pp 714-718.
53. Parr, A. J. and Loughman, P. C., 1983. Boron and membrane function in plants. *Annu Proc Phytochem Soc Eur.*, 21, 87-107.
54. Blevins, D. G. and Lukaszewski, K. M., 1994. Proposed physiologic functions of boron in plants pertinent to animal and human metabolism. *Environ Health Perspect*, 102 (7), 31-33.
55. Şaylı, B.S, 2000. İnsan Sağlığı ve Bor Minareleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Eti Holding Araştırma Projeleri.
56. Stokinger, H. E., 1981. Boron. In: Clayton GD & Clayton FE ed. *Patty's industrial hygiene and toxicology--Volume 2B: Toxicology*, 3rd ed. New York, John Wiley and Sons, pp 2978-3005.
57. N.T.P., 1987. Toxicology and carcinogenesis studies of boric acid (CAS No. 10043-35-3) in B6C3F1 mice (feed studies). Research Triangle Park, North Carolina, US Department of Health and Human Services, National Toxicology Program (NTP TR No. 324).
58. Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., Robinson, S.R.: Astrocytes: glutamate producers for neurons, *J. Neurosci. Res.*, 57: 417-428, (1990).
59. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacimüftüoğlu A, Bulucu D, Süleyman H. The effects of melatonin in glutamate-induced neurotoxicity of rat cerebellar granular cell culture. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Dec;84(4):467-9.

60. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacimüftüoğlu A, Bulucu D, Süleyman H.
The effects of melatonin in glutamate-induced neurotoxicity of rat cerebellar granular cell culture. *Jpn J Pharmacol.* 2000 Dec;84(4):467-9.
61. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacimüftüoğlu A, Süleyman H, Öztaş S.
The effects of dantrolene alone or in combination with nimodipine in glutamate-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell cultures of rat pups. *Pharmacol Res.* 2001 Mar;43(3):241-4.
62. Büyükokuroğlu ME, Gepdiremen A, Hacimüftüoğlu A, Oktay M. The effects of aqueous extract of *Lavandula angustifolia* flowers in glutamate-induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rat pups. *J Ethnopharmacol.* 2003 Jan;84(1):91-4.
63. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 1998 Jun;10(6):2129-42.
64. Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T: Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. *J Neurosci*, 2008, 28, 4995–5006.
65. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2001 Feb 15;30(4):433-46.