

Farklı Bor Bileşiklerinin CCL 62 (HeLa Kontaminant) İnsan Amniyotik Epitelyal Hücre Hatlarında Olası Sitotoksik ve Genotoksik Etkilerinin Araştırılması

Erkan Kahraman¹, İsmet Deliloğlu Gürhan², Mehmet Korkmaz¹

¹Tıbbi Biyoloji ABD, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye

²Biyomühendislik Bölümü, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, İzmir, Türkiye

Özet

Epidemiyolojik ve in vitro çalışmalarında bor bileşiklerinin anti karsinojenik olabilecekleri gösterilmiştir. Sitogenetik yönden stabil olan hücre hatlarında kromozom aberasyonları, kardeş kromatit değişimi gibi testlerle yapılan çalışmalarda borun herhangi bir genotoksik etkisi ortaya konulmamıştır. Bu çalışmada ise farklı bor bileşikleri olan BA (borik asit), BP (boraks pentahidrat) ve DPD (disodyum pentaborat dekahidrat)' in 250, 500 ve 1000µM dozlarında uygulanmasıyla, sitogenetik olarak stabil olmayan CCL 62 (He La kontaminant) hücre hattındaki arında var olan sitogenetik bozulma üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla hücre hatlarına bor bileşikleri uygulamasını takiben sitotoksisite için hücre canlılık testi (MTT) ve genotoksisite için kromozom aberasyonu (KA) ve mikroçekirdek (MÇ) testleri uygulanmış ve bor bileşiklerinin her bir dozunda meydana gelen KA'larının ve MÇ'lerin frekansları hesaplanmıştır. Tür, doz ve süreye bağlı olarak bor bileşiklerinin CCL-62 (insan amniyotik epitelyal) hücre hatlarının proliferasyonunu etkilediği görülmüştür. KA ve MÇ analizi verilerine göre ise; herhangi bir bor bileşiği uygulanmayan kontrol grubu hücrelerle, bor bileşikleri uygulanan hücrelerin KA ve MÇ sayıları karşılaştırıldığında kontrol grubu ve bor bileşiklerinin uygulandığı gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak bileşik türü, doz ve süreye bağlı olarak BA, BP ve DPD' nin CCL 62 hücre hatlarının proliferasyonunu etkilediği, diğer taraftan bu hücre hatlarında var olan sitogenetik bozulma üzerine arttırıcı ya da azaltıcı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Bor, borik asit, boraks pentahidrat, disodyum pentaborat dekahidrat, sitotoksisite, genotoksisite,

(Rec. Date: Oct 18, 2012 - Accept Date: Nov 13, 2012)

Yazışma adresi: Mehmet KORKMAZ, Ph.D. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, Manisa, Türkiye
E-mail: korkmaz1@yahoo.com

Investigation of Possible Genotoxic and Cytotoxic Effects of Differential Boron Compounds in CCL 62 (Hela Contaminant) Human Amniotic Epthelial Cell Line

Erkan Kahraman¹, İsmet Deliloğlu Gürhan², Mehmet Korkmaz¹

¹ Medical Biology Department of Faculty of Medicine, Celal Bayar University, Manisa, Turkey

² Department of Bioengineering of Faculty of Engineering, Ege University, Izmir, Turkey

Abstract

Epidemiological and in vitro studies have showed that boron may have anti-carcinogenic properties. Chromosome aberrations assay and sister chromatid exchange assays have showed that boron has no genotoxic effects on cytogenetically stable cell lines. Aim of this investigation is determine to effects of different boron compounds which are boric acid (BA), borax pentahydrate (BP) and disodium pentaborate decahydrate (DPD)) on exist cytogenetic disruption with variable doses (250, 500 and 1000 μ M) on cytogenetically unstabel CCL 62 (HeLa Contaminant) cell line. In order to test this hypothesis, following the boron treatment on the cell lines for cytotoxicity was performed using MTT that cell viability assay. For genotoxicity was used chromosome aberrations assay (CAs) and micronucleus assay (MN), CAs and MN frequency calculated in each boron dose. Boron compaunds effected proliferation of CCL 62 (human amniotic ephitelial) cell lines in a time, species and dose dependent manner. According to data obtained from CAs and MN assays, no significant difference was found between control groups which were not treated any of boron compaund with boron treated groups ($p>0,05$). In conclusion, we established that BA, BP, and DPD effected proliferation of CCL 62 cell lines in a time, compaund and dose dependent manner, however no evidence was observed suggesting these compounds cause an increase or decrease in the level of existing cytogenetic defects in these cell lines.

Key Words: Boron, Boric Acid, borax pentahydrate, disodium pentaborate decahydrate, cytotoxicity, genotoxicity

(Rec. Date: Oct 18, 2012 - Accept Date: Nov 13, 2012)

Corresponding Author: Mehmet KORKMAZ, Ph.D. Medical Biology Department of Faculty of Medicine, Manisa, Turkey
E-mail: korkmaz1@yahoo.com

Giriş

Periyodik cetvelin 5. elementi olan bor 3A grubu içerisinde yer alan tek metal olmayan elementtir. Metal ve ametal arasında bir özellik taşır ve doğada elementer olarak bulunur. Atom numarası 5 atom ağırlığı 10.81 olan bor ^{10}B (%19.78) ve ^{11}B (%80.22) izotoplarının karışımı şeklinde bulunur. Oda ısısında katı haldedir ve kimyası karışıktır [1- 2].

Yapılan çalışmalar borun hücreler ve canlılar üzerinde herhangi bir karsinojenik ya da mutajenik bir etkisinin olmadığını ortaya koymaktadır [3,4]. Bor minerali açısından zengin bir bölgede yaşayan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda bu elementin her hangi bir genotoksik etkisine rastlanmadığı gibi genetik hasara karşı koruyucu bir etkisinin olabileceği de öne sürülmüştür [5]. Yapılan başka bir çalışmada ise *in vitro* olarak borun insan periferik kan kültürlerine uygulanması sonucu meydana gelen genotoksik etkileri araştırılmış ve bora bağlı gelişen herhangi bir genotoksik etkiye rastlanmamıştır [6]. Deneysel olarak kanser hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite çalışmalarında borun hücreler üzerine doz ve maruziyet süresine bağlı olarak antiproliferatif bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur [7]. Diğer taraftan, borik asitin doza bağımlı bir anti proliferatif etkisinin ancak yüksek dozlarda ortaya çıktığı tespit edilmiş ve $500\mu\text{M}$ 'lık dozlarda mitojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [8]. Çeşitli epidemiyolojik ve hücresele çalışmalarda borun bazı kanser türlerine karşı koruyucu özellikte olabileceği ileri sürülmüş özellikle prostat kanseri hücrelerinde bor uygulanmasıyla doz ve maruziyet süresine bağlı olarak bu hücre hatlarının proliferasyonunda düşüşler tespit edilmiştir [9,10]. Bor yönünden zengin bölgede yaşayan insanların bu kanser türleri açısından bor yönünden fakir bölgede yaşayan insanlardan daha az kanser insidansı taşıdığı saptanmıştır [7,11,12]. Korkmaz (2007) ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bor yönünden zengin bölgede yaşayan 472 ve bor yönünden fakir bölgede yaşayan 587, toplam 1059 sosyoekonomik düzeyi düşük kadından servikal smear alınmış ve bor yönünden zengin bölgede yaşayan kadınlarda servikal kanser için herhangi bir sitopatolojik bulguya rastlanamamışken bor yönünden fakir bölgede yaşayan 15 kadında sitopatolojik bulgulara saptanmıştır [12].

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında bu çalışmada iki temel amaç belirlenmiştir: 1- Farklı bor bileşikleri olan BA (borik asit), BP (boraks pentahidrat) ve DPD (disodyum pentaborat dekahidrat)' nin $250\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$ ve $1000\mu\text{M}$ dozlarda kanser hücre hattı olan insan amniyotik epitelyal CCL-62 hücrelerine uygulanmasıyla bu hücre hatlarında meydana gelen proliferatif

değişikliklerin saptanması. 2- Söz konusu bor bileşiklerinin, aynı dozlar ve aynı hücrelere uygulanması sonucu olası sitogenetik etkilerinin, kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MÇ) testleri aracılığı ile saptanmasıdır. Bu amaçla sitogenetik olarak stabil olmayan CCL 62 (HeLa kontaminant) kanser hücre hattı seçilmiştir.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü

CCL-62 HeLa kontaminant FL hücreleri, (ATCC, ABD) besin ortamı [%90 Eagle's MEM (HyClone, ABD), %10 fetal sığır serumu (HyClone, ABD), 50µg/ml gentamisin (10mg/ml, HyClone, ABD)] ile T-25 hücre kültürü flasklarında ve 37°C' de inkübe edildi. Hücrelerin besiyeri haftada 3 defa olacak şekilde değiştirildi ve % 80-90 monolayer olduklarında pasaj işlemi uygulandı.

CCL-62 Hücre Hattının Üreme Kinetiğinin Belirlenmesi

Kültürde bulunan CCL-62 hücrelerinden iki tane T-25 lik flask tripsinize edilerek hücreler kaldırıldı, Neubauer lamında sayıldı, besin ortamı içerisinde 4.5×10^4 hücre/ml olacak şekilde homojenize edildi ve 33 adet 9 cm² yüzeyli doku kültürü petrilere 2ml/petri olacak şekilde ekimi yapılarak %5 CO₂'li rutubetli inkübatöre yerleştirildi. 24 saat aralıklarla, 11 gün süre ile tripsin muamelesi sonucu yüzeyden kaldırılan hücreler (3 petri/gün) sayılarak zamana karşı ortalama hücre üremesi saptandı.

Platelerin hazırlanması

CCL-62 hücreleri besin ortamı içerisinde 5×10^4 hücre/ml yoğunlukta hazırlanandı ve hücre süspansiyonu 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarına 200µl/kuyucuk (10.000 hücre/kuyucuk) dağıtıldı. Bu plakalarda BA, BP ve DPD' in her bir dozu için ayrı ayrı üç adet kuyucuk kullanıldı. Ayrıca, 3 kuyucuk ise bor bileşiği kontrol grubu (bor bileşiği eklenmemiş) olarak kullanıldı. Böylece her bir doku kültürü plakası üzerindeki 30 kuyucuğa (3 kuyucuk x 9 bor konsantrasyonu + 3 kontrol grubu olmak üzere) hücre ekimi yapılmış oldu. Bu şekilde 1. 3. ve 5. gün sitotoksisite (MTT) ölçümleri için ayrı ayrı 3 adet 96 kuyucuklu plaka hazırlanarak 37°C de, %5 CO₂'li ve %99 rutubetli inkübatörde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

Bor bileşiklerinin uygulanması

24 saatlik inkübasyon sonunda kuyucuklardaki besiyeri değiştirilip her bir kuyucuğa 90µl taze besin ortamı + 10µl bor içerikli besin ortamı (BA, BP ve DPD' nin 2500 µM,5000 µM, 10000 µM' lık stok çözeltilerinin her bir dozajı için ayrı ayrı olarak üç farklı kuyucuğa) eklendi. Böylece her bir bileşiğin kuyucuklardaki dozu sırasıyla 250, 500 ve 1000 µM olarak elde edildi (Bor bileşikleri Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir). Kontrol grubu olarak kullanılacak olan kuyucuklardaki hücrelere her hangi bir bor bileşiği uygulanmayıp sadece besin ortamı değiştirildi. Daha sonra plakalar 37°C de CO₂'li inkübatöre alınarak inkübasyona devam edildi.

MTT [3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide] analizi

MTT analizi için (CellTiter 96 non-radioactive cell proliferation assay,Promega, G5421) kit kullanıldı. Bor içerikli besiyeri eklendikten 24 saat sonra 96 kuyucuklu doku kültürü plakalarından bir tanesi alınarak her bir kuyucuk içerisine kit içerisinde bulunan boya solüsyonundan 15µl/kuyucuk eklendi ve 4 saat 37°C de CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa kit içerisinde bulunan reaksiyonu durdurma solüsyonu 100µl/kuyucuk eklendi ve 1 saat daha 37°C de CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Bu inkübasyon işleminden sonra plaka, mikroparka okuyucu spektrofotometre (Molecular Devices, Spectramax 190) ile 570nm dalga boyunda okutuldu ve CCL-62 hücre hattının 1. gün MTT absorbans değerleri elde edildi. CCL-62 hücre hattının 3. 5. gün MTT analizleri ise geride kalan diğer iki adet 96 kuyucuklu dokukültürü plakaları kullanılarak yukarıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi. Canlılık oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\frac{\text{Bor bileşiği uygulanan kuyu absorbans ortalaması}}{\text{Kontrol grubu kuyularının absorbans ortalaması}} \times 100 = \text{canlılık oranı}$$

Mikroçekirdek analizi

Mikroçekirdek analizi Fenech tarafından verilen yöntemle göre uygulandı [13]. Kısaca; Hücreler logaritmik faza girmesi için 24 saat 37°C CO₂'siz inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücrelerin besin ortamı dökülerek yerine 3,6ml taze besin ortamı ve 0,4ml bor içerikli besin ortamı eklendi. Bor içerikli besi yerleri eklendikten sonraki 44. saatte her bir flaska sitokalsin-B son konsantrasyonu 6µg/ml olacak şekilde eklendi ve tekrar 37°C

CO₂'siz inkübatörde 28 saat daha inkübasyona bırakıldı. Bor içerikli ortamların eklenmesini izleyen 72. saatte hücreler tripsinize edildi. Soğuk hipotonik (0,075M, KCL) uygulamasını takiben hücreler fiske edilerek (3 kısım metanol: 1 kısım asetik asit) soğuk lamlara yaymaları yapıldı. Lamlar kuruduktan sonra 25 dk Giemsa boyasında bekletilerek boyama işlemleri gerçekleştirildi ve lamlar kapama ortamı (Entellan, Merck) ile kapatılarak uzun süreli saklamaya uygun hale getirildi. Bor bileşiklerinin her bir dozu için 1000 adet binükleotitli hücre mikroskop altında (10x100 büyütme) sayıldı ve bu hücreler içerisindeki MÇ miktarı belirlendi. Değerlendirmeye sadece binükleotit hücre içerisindeki MÇ'ler alındı.

Kromozom aberasyonlarının belirlenmesi

Kromozom Aberasyonları analizi Freshney 2005'de verilen protokol baz alınarak gerçekleştirildi [14]. Kısaca; hücreler 24 saat 37°C'de CO₂'siz inkübatörde inkübe edildi. 24 saat sonra hücrelerin besin ortamı dökülerek yerine 3,6ml taze besin ortamı ve 0,4ml bor içerikli besin ortamı eklendi. Flasklar ağızları filtresiz kapakla sıkıca kapatılarak 37°C'de CO₂'siz inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Bor içerikli besiyeri uygulamasından 70 saat sonra hücrelere stok kolşisin çözeltisinden (10µg/ml) son konsantrasyonu 0,25µg/ml olacak şekilde her flaska 100µl eklenerek 2 saat daha 37°C'de CO₂'siz inkübatörde inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonra hücreler tripsinize edildi. 37°C de bekletilmiş olan 5ml 0,075M hipotonik KCl uygulamasını takiben fiksasyon (3 kısım metanol: 1 kısım asetik asit) işlemi gerçekleştirilerek soğuk lamlara yaymaları yapıldı. Lamlar 3 gün oda sıcaklığında yaşlandırılmaya bırakıldı. 3 günün sonunda lamlar Giemsa boyasında 30 dakika bekletilerek boyama işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra lamlar kapama ortamı (entellan, Merck) ile kapatılarak uzun süreli saklamaya uygun hale getirildi.

Bor bileşiklerinin her dozunda 50 metafaz plağı değerlendirmeye alındı. KA değerlendirmesinde metafazlardaki kromozom sayı ve şekil anomalileri (kromozom kırıkları, kromozom gapları, kromatin kırıkları, kromatin gapları) kaydedildi.

İstatistiksel değerlendirme

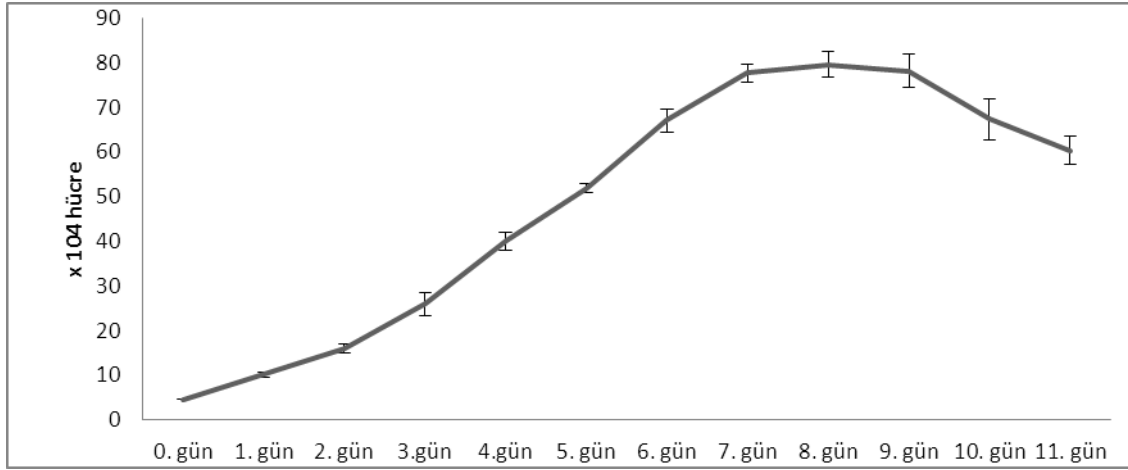
Mikroçekirdek ve kromozom aberasyonlarının saptanması için uygulanan testlerin sonuçları kontrol grubu ve deney grubu arasında p=0,05 güven düzeyinde istatistiksel

olarak anlamlı olup olmadığı SPSS 16.0 programında χ^2 testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sitotoksosite testi sonuçları ise üremeyi baskılama oranları (%) verilerek hesaplandı.

Bulgular

CCL-62 Hücre Üreme Kinetiği

Grafik 1 de CCL-62 hücrelerinin üreme kinetiği zamana karşı absorbands olarak verilmiştir. Buna göre CCL - 62 nin hücre fazları: Latent faz: 0-2. gün, Üreme fazı: 2-7 gün arası, Durma fazı: 7-9 günler, Ölüm fazı: 9. gün ve sonrası şeklinde belirlenmiştir.

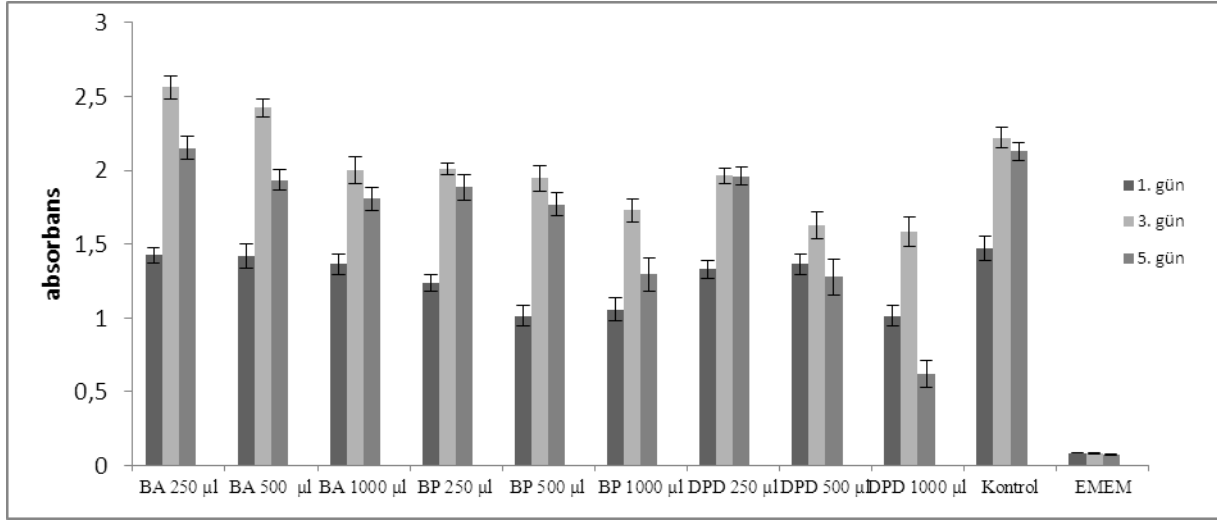


Grafik 1 . CCL-62 hücre hattının üreme kinetiği.

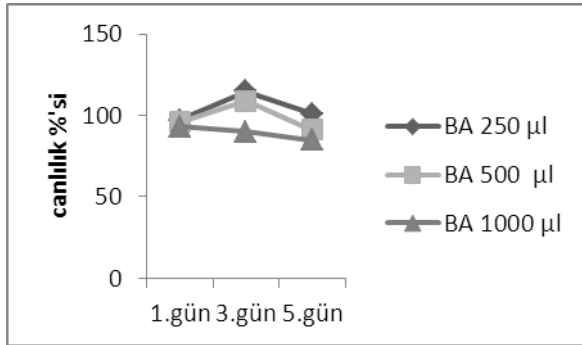
Bu verilere göre CCL-62 hücre hattında sitotoksosite ve genotoksosite testleri yapmak için 2 ile 7. günler arası en uygun zamanlar olarak belirlenmiştir. Bu hücre hattında gerçekleştirilen bütün uygulamalar bu günler içerisinde yapılmıştır.

Farklı Bor Bileşiklerinin CCL-62 Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkileri

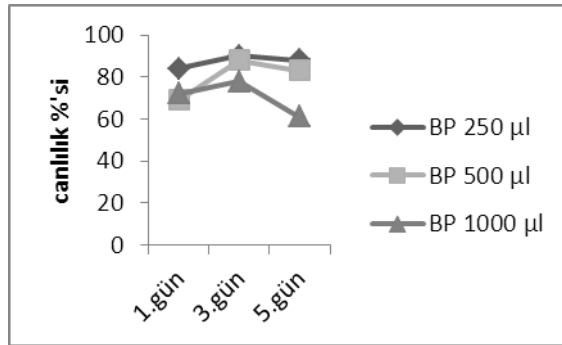
Bor bileşikleri olan BA, BP, DPD' nin 250 μ M, 500 μ M, 1000 μ M dozları CCL-62 hücre hatlarına uygulanmış ve 1., 3.ve 5. günlerde MTT analizi uygulanarak bu bileşiklerin hücre proliferasyonunu ne kadar baskıladığı hesaplanmıştır. Grafik 2 de MTT analizi sonucu elde edilen absorbands değerleri, Grafik 3, 4 ve 5'te ise hesaplanan canlılık oranları (%) verilmiştir.



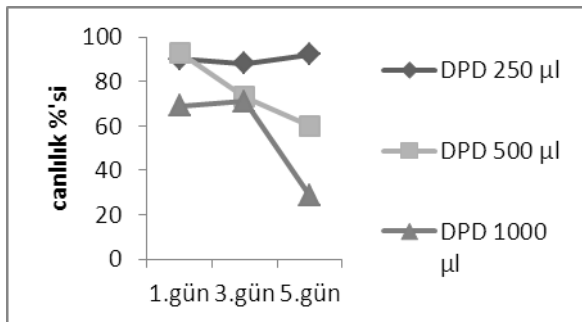
Grafik 2. CCL-62 hücre hattına bor bileşiklerinin uygulanması sonrası MTT testi sonucu 570 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerleri



Grafik 3. CCL-62 hücrelerine BA uygulanması sonrası saptanan canlılık oranları (%).



Grafik 4. CCL-62 hücrelerine BP uygulanması sonrası saptanan canlılık oranları (%).

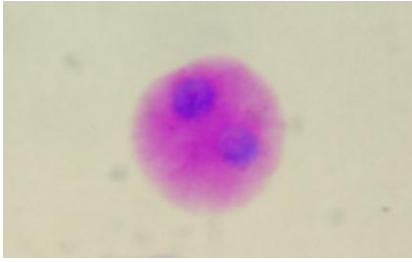


Grafik 5. CCL-62 hücrelerine DPD uygulanması sonrası saptanan canlılık oranları (%).

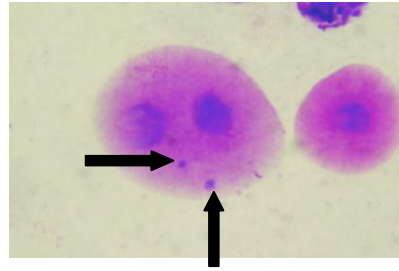
BA'in CCL-62 hücrelerinin proliferasyonunu baskılamadığı hatta bazı gün ve dozlarda arttırdığı, BP'nin ise proliferasyonu kısmen baskıladığı hatta 5. gün 1000 μ M dozda canlılık oranını %60' lara kadar düşürdüğü, DPD'nin ise 250 μ M dozda canlılığı belirgin bir şekilde azaltmadığı fakat 500 μ M'lık dozun 3.ve 5. günde, 1000 μ M dozun ise, özellikle 5. gün olmak üzere canlılığı %30' lara kadar azalttığı saptanmıştır.

Mikroçekirdek Analizi Sonuçları

Mikroskop altında (10x100 objektif) her bir bor dozajı ve kontrol grubun için 1000 adet binükleotitli (BN) hücre taranmış ve bu BN hücrelerdeki Mikronükleus miktarı belirlenmiştir (Tablo 1).



Şekil 1. Değerlendirmeye alınan binükleotid hücre görüntüsü



Şekil 2. Değerlendirmeye alınan binükleotid hücre içerisindeki mikroçekirdek görüntüsü

Tablo 1. CCL-62 hücre hattına bor bileşikleri uygulanması sonucu gözlemlenen mikronükleus miktarları

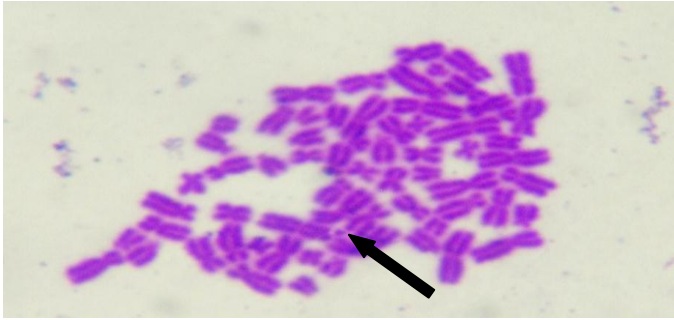
Bor Bileşikleri	Mikronükleus Sayısı (1000 adet BN hücrede)	Kontrol Grubu Karşısında "p" Değeri
Borik asit, 250µM	72	0,324
Borik asit, 500µM	67	0,584
Borik asit, 1000µM	65	0,713
Boraks pentahidrat, 250µM	69	0,468
Boraks pentahidrat, 500µM	64	0,782
Boraks pentahidrat, 1000µM	52	0,383
Disodyum pentaborat dekahidrat, 250µM	63	0,853
Disodyum pentaborat dekahidrat, 500µM	55	0,566
Disodyum pentaborat dekahidrat, 1000µM	62	0,926
Kontrol	61	

Kontrol grubu ile tüm grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen bütün p değerlerinin $p>0.05$ olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak BA, BP ve DPD'in 250µM, 500µM, 1000µM dozlarında CCL-62 hücre hatlarına uygulanması ile mikronükleus sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kromozom Aberasyonları Analizi Sonuçları

CCL-62 hücre hattı HeLa (servikal karsinoma) kontaminant hücre hattı olması nedeniyle, yapılan kromozom analizinde çok sayıda sayısal kromozom düzensizliklerine rastlanmıştır. Mikroskop altında (10x100 objektifle) toplamda 500

adet metafaz plağı sayılmış, ortalama metafaz başına düşen kromozom sayısı $72,42 \pm 2,843$ olarak hesaplanmıştır. Bor bileşiklerinin her bir dozu için 50 adet metafaz incelenmiştir. Bor uygulanmış hücrelerle kontrol grubu hücrelerin kromozom aberasyonları sayılarının SPSS 16.0 programında χ^2 testi ile karşılaştırılmasıyla elde edilen "p" değerleri Tablo 2 de verilmiştir. Kontrol grubu ile tüm grupların karşılaştırılması sonucu elde edilen bütün p değerleri $p > 0.05$ olarak hesaplanmıştır.



Tablo 2. CCL-62 hücre hattına bor bileşikleri uygulanması sonucu gözlemlenen Kromozom Aberasyonları miktarları

Bor Bileşikleri	Kırıklar		Gaps		Toplam	
	Kromozom ve kromatit	Kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu "p" değeri	Kromozom ve kromatit	Kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu "p" değeri	Kırık ve gap	"p" değerleri
BA 250µM	12	1.000	8	0.372	20	0.534
BA 500µM	12	1.000	5	1.000	17	1.000
BA 1000µM	14	0.648	8	0.372	22	0.305
BP 250µM	9	0.461	8	0.372	17	1.000
BP 500µM	9	0.461	8	0.372	17	1.000
BP 1000µM	8	0.317	7	0.538	15	0.668
DPD 250µM	12	1.000	11	0.102	23	0.221
DPD 500µM	12	1.000	11	0.102	23	0.221
DPD 1000µM	14	0.648	12	0.062	26	0.069
Kontrol	12		5		17	

Sonuç olarak BA, BP ve DPD' nin 250µM, 500µM, 1000µM dozlarında CCL-62 hücre hatlarına uygulanması ile kromozomal aberasyon sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tartışma

Deneysel insan çalışmaları borun yaşam içerisinde metabolizmaya ya da yarar sağlayıcı kalsiyum, bakır, magnezyum, azot, glukoz, trigliserit, reaktif oksijen ve östrojen süreçleri gibi ciddi yaşamsal faaliyetlere etki edebildiğini göstermiştir [1]. Alınan borun fazlası insanlarda ve hayvanlarda vücuttan atılması sebebiyle ancak yüksek dozlarda bor alındığı zaman toksik etki gözlemlenebilmektedir [15]. Ayrıca, hücresel ve epidemiyolojik olarak yapılan çalışmalarda borun karsinogeniteyi arttırmadığı ortaya konmuş ve bazı kanser türlerine karşı koruyucu olabileceği de öne sürülmüştür [9,10,12,16]. Bu çalışma ile farklı bor bileşiklerinin CCL-62 hücre hatlarına uygulanması sonucu meydana gelen sitotoksik ve genotoksik etkiler saptanmıştır. Çalışmamızda kullanılan CCL-62 hücre hattının genomik kararsızlığı ATCC tarafından karakterize edilmiştir.

Borun HeLa hücreleri üzerine uygulandığı bir çalışmada 100-500µM dozlarda borik asit uygulamasının bu hücrelere mitojenik bir etki göstererek proliferasyonlarının üst seviyeye çıkardığı, ancak borik asitin 1000µM doz ve üzerinde uygulanmasıyla HeLa hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiş ve bora bağlı hücre büyümesi ve üremesinin baskılanması, borun hücre büyümesiyle bağlantılı sinyal yollarına etki edebileceğini ortaya koymuştur [17]. Yapılan deney koşullarına göre BA'ın belirgin bir şekilde hücre üremesini baskılamadığı hatta bazı günler ve dozlarda proliferasyonu arttırdığı, BP'nin doz ve maruziyet süresine bağlı olarak CCL-62 kanser hücre hattının proliferasyonunu kısmen baskıladığı fakat DPD' in özellikle 500µM, 1000µM dozlarının maruziyet süresiyle orantılı olarak hücrelerin proliferasyonunu etkin bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur.

Literatür tarandığında gerek insan çalışmalarında gerekse laboratuvar çalışmalarında borun her hangi bir genotoksik etkisinin olmadığı hatta genotoksisiteye karşı koruyucu bir özellik taşıdığı bulgularına rastlanmaktadır [4,5,6,16]. Özellikle diyetle alınan borun prostat kanseri görülme riskini azaltabileceği ileri sürülmektedir [7,18]. Hatta yüksek düzeyde bor maruziyetinin prostat hiperplazisi ve karsinogenitesinin hücresel süreçleriyle ilgili bir gösterge olabileceği öne sürülmüştür [19]. Bor bileşiklerinin olası genotoksisitenin tespit edilmesi için yapılan mikronukleus analizinde CCL-62 hücre hatlarına BA, BP ve DPD 250 µM, 500µM, 1000µM dozlarında uygulanmış ve kontrol grubu hücrelerde ortaya çıkan mikroçekirdek miktarları ile karşılaştırıldığında ortaya çıkan mikroçekirdek miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05). Diğer bir genotoksisite analizi olan

kromozom aberasyonları analizinde ise kırık (kromozom ve kromatit) ve gap (kromozom ve kromatit) sayıları ayrı ayrı değerlendirilmiş ve BA, BP ve DPD' in 250µM, 500µM, 1000µM dozlarında CCL-62 hücre hatlarına uygulanması ile ortaya çıkan kromozom aberasyon miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Sonuç olarak bu çalışma ile farklı bor bileşikleri olan BA (borik asit), BP (boraks pentahidrat) ve DPD (disodyum pentaborat dekahidrat) 250µM, 500µM, 1000µM dozlarda kanser hücre hattı olan CCL-62 hücrelerine uygulanmış ve bu bileşiklerin, tür, doz ve maruziyet süresine bağlı olarak hücre üremesi üzerine etkili olduğu fakat bu hücre hatlarında var olan sitogenetik anomalilerin sıklığı üzerine herhangi bir arttırıcı ya da azaltıcı etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Kaynaklar

1. IPCS Environmental Health Criteria for Boron, vol. 204. World Health Organization, Geneva, 1998.
2. U.S.EPA. Toxicology review of boron and compounds in support of information on integrated risk information (IRIS). National Center for Environmental Assessment, Washington DC, 2004. Erişim: [http://www.epa.gov/iris].
3. ECETOC Technical Report, Reproductive and general toxicology of some inorganic borates and risks assessment for human beings. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, No. 63, Brussels, Belgium, 1995.
4. Dieter MP. Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 Mice. Environ Health Perspect. 1994;102(Suppl. 7):93-7.
5. Uçkun Z. Bor maruziyetinin insanlar üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.
6. Türkez H. Bazı bor bileşiklerinin in vitro şartlarda periferel insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2007.
7. Barranco WT, Hudak PF, Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). Cancer Causes Control. 2007;18:71-7.
8. Park M, Li Q, Shcheynikov N, Muallem S, Zeng W. Borate transport and cell growth and proliferation. Cell Cycle. 2005;4:24-6.

9. Gallardo-Williams MT, Maronpot RR, Wine RN, Brunssen SH, Chapin RE. Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid. *The Prostate*. 2003;54:44-9.
10. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters*. 2004;216:21-9.
11. Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, Dong YQ, Eastham C, Forman MR. Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *Am J Epidemiol*. 2008;167:1070-80.
12. Korkmaz M, Uzgören E, Bakırdere S, Aydın F, Ataman OY. Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environ Toxicol*. 2007;22:17-25.
13. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*. 2000;455:81-95.
14. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5th ed. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, 2005;262-3.
15. Hunt CD, Boron. In: Macrae, R, Robinson RK, Sadler MJ, eds, *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. London: Academic Press. 1993;440-7.
16. Geyikoğlu F, Türkez H. Boron compounds reduce vanadium tetraoxide genotoxicity in human lymphocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2008;26:342-7.
17. Park M, Li Q, Shcheynikov N, Zeng W, Muallem S. NaBC1 is a ubiquitous electrogenic Na⁺-Coupled borate transporter essential for cellular boron homeostasis and cell growth and proliferation. *Mol Cell*. 2004;16:331-41.
18. Henderson K, Stella SL, Kobylewski S, Eckhert CD. Receptor activated Ca²⁺ release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *Plos One*. 2009;4(6):e6009.
19. Müezzinoğlu T, Korkmaz M, Neşe N, Bakırdere S, Arslan Y, Ataman OY, Lekili M. Prevalence of prostate cancer in high boron-exposed population: a community-based study. *Biological Trace Element Research*. 2011;144(1-3):49-57.