

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**BORİK ASİT VE BAZI TÜREVLERİNİN *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEHRA MOLLAOĞLU

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI



**BORİK ASİT VE BAZI TÜREVLERİNİN *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEHRA MOLLAOĞLU

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimleri (PAUBAP) tarafından 2021FEBE007 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

ZEHRA MOLLAOĞLU

ÖZET

BORİK ASİT VE BAZI TÜREVLERİNİN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ZEHRA MOLLAOĞLU

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞRETİM ÜYESİ BERNA KAVAKCIOĞLU
YARDIMCI)

DENİZLİ, TEMMUZ - 2021

Bor, biyolojik önemi tartışılmaz ve yaygın kullanımı ile en önemli elementlerden biridir. Bor elementinin en çok çalışılan türevleri borik asit ve tuzlarıdır. Bu çalışma kapsamında, borik asit ve lityum tuzu lityum metaboratın *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 suşunun canlılık, enzimatik antioksidan savunma sistemi, lipid hasarı, hücre yüzey morfolojisi ile bazı pro- ve anti-apoptotik gen ekspresyonları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışılan tüm derişimleri için borik asit *S. cerevisiae* mayasına karşı toksik etki gösterirken, lityum metaborat en yüksek derişimde bile hücre canlılığını etkili bir şekilde inhibe edememiştir. Ayrıca lityum metaboratın kullanılan derişimine bağlı olarak maya hücre proliferasyonu ve metabolik aktivitesi üzerinde zıt etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Borik asit muamelesi sonucunda maya süperoksit dismutaz ve glutatyon S-transferaz aktiviteleri önemli ölçüde indüklenmiştir. Ancak bu indüksiyonlar, hücreleri borik asit kaynaklı lipid peroksidasyonundan koruyamamıştır. Lityum metaborat muamelesi sonucu indüklenen tek enzim glutatyon S-transferaz iken mutant suşlar ile yapılan deneyler glutatyon sentaz ve tiyoredoksin-disülfid redüktaz enzimlerinin de lityum metaborata karşı hücreyi koruduğuna işaret etmiştir. Sırasıyla borik asit ve lityum metaborat ile muamele edilen maya hücrelerinde nekrotik ve erken apoptotik mekanizmaların tipik morfolojileri taramalı elektron mikroskopisi ile görüntülenmiştir. Her iki ajan için, ekspresyon düzeyleri incelenen genlerden pro-apoptotik *AIF1* ve *NDII* ile anti-apoptotik *BIR1*'in ekspresyonlarında kontrole kıyasla artışlar belirlenmiştir. Sonuç olarak sunulan tez çalışması, bor ve türevlerine karşı oldukça toleranslı olduğu bilinen *S. cerevisiae* mayası üzerinde yürütülen sınırlı sayıdaki araştırma sonuçlarına önemli yeni bulgular eklemektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Borik asit, Lityum metaborat, *Saccharomyces cerevisiae*, enzimatik antioksidan sistem, apoptotik hücre ölümü.

ABSTRACT

**BIOCHEMICAL EFFECTS OF BORIC ACID AND SOME DERIVATIVES
ON SACCHAROMYCES CEREVISIAE
MSC THESIS
ZEHRİ MOLLAOĞLU
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY
(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. BERNA KAVAKCIOĞLU YARDIMCI)
DENİZLİ, JULY 2021**

Boron is one of the most important elements with its indisputable biological importance and widespread use. The most studied derivatives of boron are boric acid and its salts. In this study, the effects of boric acid and its lithium salt lithium metaborate on viability, enzymatic antioxidant defense system, lipid damage, cell surface morphology and some pro- and anti-apoptotic gene expressions of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 strain were investigated. For all concentrations studied, boric acid was toxic to *S. cerevisiae* yeast, while lithium metaborate could not effectively inhibit cell viability even at the highest concentration. In addition, it was observed that lithium metaborate had an opposite effect on yeast cell proliferation and metabolic activity, depending on the studied concentration. As a result of boric acid treatment, yeast superoxide dismutase and glutathione S-transferase activities were significantly induced. However, these inductions failed to protect cells from boric acid-induced lipid peroxidation. While the only enzyme induced by lithium metaborate treatment was glutathione S-transferase, experiments conducted with mutant strains indicated that glutathione synthase and thioredoxin-disulfide reductase enzymes also protected the yeast cell against lithium metaborate. Typical morphologies of necrotic and early apoptotic mechanisms were visualized by scanning electron microscopy in yeast cells treated with boric acid and lithium metaborate, respectively. For both agents, increases were determined in the expression levels of pro-apoptotic *AIF1* and *NDII*, and anti-apoptotic *BIR1* genes compared to the untreated control group. As a result, the thesis presents important new findings to the limited number of studies conducted on the effects of bor and its derivatives on yeast *S. cerevisiae*, which is known to be highly tolerant to these agents.

KEYWORDS: Boric acid, Lithium metaborate, *Saccharomyces cerevisiae*, enzymatic antioxidant system, apoptotic cell death.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
SEMBOL LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgi.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 Bor Elementi Ve Türevlerine Genel Bakış.....	3
2.1.1 Bor ve Türevlerinin Başlıca Kullanım Alanları.....	5
2.1.2 Bor ve Türevlerinin Yüksek Ökaryotlardaki Biyolojik Önemi.....	5
2.1.3 Bor ve Türevlerinin Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri.....	13
2.2 Ökaryotik Model Organizma: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Hücre Yapısı, Kültürlenme Koşulları ve Önemi.....	16
2.3 Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemler.....	22
2.3.1 Serbest Radikaller.....	22
2.3.2 Antioksidan Sistemler.....	24
2.3.2.1 Enzimatik Antioksidan Sistemler.....	25
2.3.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler.....	29
2.3.2.3 Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Zararları.....	30
2.4 Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz.....	32
2.4.1 Apoptoza Genel Bakış ve Apoptozun Morfolojisi.....	32
2.4.2 Kaspazlar ve Bcl-2 Protein Ailesi.....	33
2.4.3 Apoptotik Hücre Ölüm Yolakları.....	34
2.4.3.1 Ekstrinsik (Dış Sinyaller Aracılı) Yolak.....	36
2.4.3.2 İntrensik (Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı) Yolak.....	37
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mayasında Apoptoz.....	38
3. MATERYAL VE METOD.....	44
3.1 Materyal.....	44
3.2 Metod.....	44
3.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının rutin bakım koşulları.....	44
3.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suşlarının büyüme ve stres koşulları.....	44
3.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücrelerinin proliferasyon ve metabolik aktivitelerinin belirlenmesi.....	45
3.2.4 Biyokimyasal analizler için <i>Saccharomyces cerevisiae</i> hücrelerinin ham ekstraktlarının hazırlanması.....	46
3.2.5 Biyokimyasal Analizler.....	46
3.2.5.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	46
3.2.5.2 Glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	47
3.2.5.3 Membran lipit peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi.....	47
3.2.5.4 Toplam protein seviyelerinin belirlenmesi.....	48
3.2.5.5 Taramalı elektron mikroskobu analizi (SEM).....	48

3.2.5.6	<i>YCA1, AIF1, NDII, NUC1, BIR1</i> ve <i>NMA111</i> Genlerinin Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	49
3.2.5.6.1	Primer Dizaynı:	49
3.2.5.6.2	RNA İzolasyonu:	50
3.2.5.6.3	cDNA Sentezi:	51
3.2.5.6.4	RT-PCR:	52
3.2.6	İstatistiksel Analiz:	52
4.	BULGULAR	53
4.1	Vahşi Tip ve Mutant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Suşlarının Büyüme Eğrisi	53
4.2	Vahşi Tip <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Hücre Canlılığı ve Metabolik Aktivitesi Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri ...	54
4.3	Sitozolik Katalaz T, Tiyoredoksin-Disülfid Redüktaz ve Glutasyon Sentaz Enzimlerinin Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri Üzerindeki Potansiyel Koruyucu Özelliklerinin Delesyonlu Mutant Suşlar Kullanılarak Araştırılması	56
4.4	Vahşi Tip <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Superoksit Dismutaz ve Glutasyon-S-transferaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri	58
4.5	Vahşi Tip <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Malondialdehit Düzeyleri Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri	60
4.6	Vahşi Tip <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Hücre Morfolojisi Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri	62
4.7	Borik Asit ve Lityum Metaborata Maruz Kalan Vahşi Tip <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4741 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölüm Belirteçlerinden <i>YCA1, AIF1, NDII, NUC1, BIR1</i> ve <i>NMA111</i> Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-PCR ile Belirlenmesi	63
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	67
6.	KAYNAKLAR	71
7.	ÖZGEÇMİŞ	96

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Borik asit formülünün iki ve üç boyutlu gösterimi.	3
Şekil 2.2 : Maya hücre yapısı.....	17
Şekil 2.3 : Doğal suş <i>S. cerevisiae</i> BY4741 hücrelerinin taramalı elektron mikroskopu (SEM) (5K X büyütme) görüntüsü.....	19
Şekil 2.4 : Haploid suş <i>S. cerevisiae</i> mayasının basitleştirilmiş yaşam döngüsü diyagramı.	20
Şekil 2.5 : Hücresel oksidatif stres seviyeleri ve bunların farklı etkileri..	24
Şekil 2.6 : Tiyoredoksin sisteminin enzimatik reaksiyonları	28
Şekil 2.7 : ROS'a bağlı oluşan LPO ürünleri.....	31
Şekil 2.8 : Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik gösterimi.	36
Şekil 3.9 : Superoksit dismutaz aktivite tayininin şematik gösterimi.....	46
Şekil 4.10: <i>S. cerevisiae</i> mayasının büyüme eğrisi.....	53
Şekil 4.11: Değişen derişimlerde BA ve LMB'nin vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri.	54
Şekil 4.12: Değişen derişimlerde BA ve LMB'nin vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 hücre metabolik aktivitesi üzerindeki etkileri.....	55
Şekil 4.13: Vahşi suşa kıyasla GSH2 ve TRR2 mutantlarının 12 saatlik %0,25 LMB uygulaması sonucu proliferasyon yüzdeleri.....	57
Şekil 4.14: Vahşi suşa kıyasla CTT1, GSH2 ve TRR2 mutantlarının 12 saatlik %0,25 LMB uygulaması sonucu metabolik aktivite yüzdeleri.	58
Şekil 4.15: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 SOD aktivitesi üzerindeki etkileri.	59
Şekil 4.16: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 SOD aktivitesi üzerindeki etkileri.	60
Şekil 4.17: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 MDA düzeyleri üzerindeki etkileri.....	61
Şekil 4.18: Vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 hücrelerinin BA ve LMB uygulamaları öncesi ve sonrası taramalı elektron mikrografileri (15K X büyütme)	63
Şekil 4.19: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip <i>S. cerevisiae</i> BY4741 apoptoz genlerinin ekspresyon düzeyi üzerindeki etkileri.....	65

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: B ve türevlerinin yüksek ökaryotlardaki bazı biyolojik etkileri.	6
Tablo 2.2: Memeli apoptotik proteinler ve fonksiyonlarının mayadaki ortologları	41
Tablo 3.3: Primer dizileri, erime sıcaklıkları ve guanin-sitozin yüzdeleri.	49
Tablo 3.4: cDNA sentezi için reaksiyon ortamının bileşen ve hacimleri.	51
Tablo 3.5: RT-PCR için reaksiyon ortamının bileşen, hacim ve son derişimleri.	52
Tablo 3.6: RT-PCR protokolü.	52

SEMBOL LİSTESİ

Mg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
dk	:	Dakika
kg	:	Kilogram
g	:	Gram
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
L	:	Litre
°C	:	Santigrat derece
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
M	:	Molar
mM	:	Milimolar
µM	:	Mikromolar
nm	:	Nanometre
U	:	Ünite
kDa	:	Kilodalton

ÖNSÖZ

Bu çalışma konusunu yüksek lisans tezi olarak öneren, araştırma ve çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Dr. Öğretim Üyesi Berna KAVAKCIOĞLU YARDIMCI'ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarım sırasında RT-PCR yöntemine ait uygulamalar için fizyoloji laboratuvarını açarak desteğini esirgemeyen Sayın Ar. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ'a teşekkür ederim.

Desteğiyle hep yanımda olan değerli arkadaşım Ayşenur GÜLER'e teşekkür ederim.

2021FEBE007 no'lu Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümündeki tüm kıymetli hocalarıma bana olan katkıları için teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden Dr. Duygu TAKANOĞLU BULUT, Rümeysa SÖNMEZOĞLU ve Nilüfer AYDINLIK'a SEM analizinde yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Her konuda beni destekleyen hayat arkadaşım, eşim Alper MOLLAOĞLU ve oğullarım Mesut MOLLAOĞLU ile Altay MOLLAOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme ve desteklerini esirgemeyen anneme ve kardeşlerime teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgi

Bor (B), giderek yaygınlaşan kullanım alanlarına paralel olarak önemi de her geçen gün artan bir elementtir. Ülkemiz B rezervlerinin zenginliği ile dünyada ilk sırada yer almaktadır. B ve türevleri genel olarak; cam, çimento, tekstil, demir-çelik, temizlik, kozmetik, ilaç endüstrileri, tarım, eczacılık, tıp alanları ve savunma sanayi tarafından kullanılmaktadır. B, doğada saf halde değil; genellikle oksijenli bileşikleri halinde bulunmaktadır. En önemli B bileşiği olan borik asit (BA) ise hem doğal olarak bulunabilmekte hem de farklı B bileşiklerinin rafine edilmesiyle üretilmektedir. BA ve türevlerinin, yüksek ökaryotlardan prokaryotlara kadar değişen canlı türleri üzerinde geniş bir etki mekanizması vardır. Mikroorganizmalar üzerinde hücreler arası sinyalizasyon, büyüme, üreme gibi fizyolojik etkilerinin yanında mikrobiyotik ve mikrobiyostatik etkileri de gözlenmektedir. Bu etkilerin doza bağımlı olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiş fakat etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. BA'nın etkili olduğu mikroorganizmalardan biri de tek hücreli bir ökaryot olan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) mayasıdır. Fırıncı mayası veya bira mayası olarak da bilinen bu tür, adından da anlaşılacağı gibi tarih öncesi çağlardan beri alkollü içecek ve ekmek üretiminde kullanılmaktadır. Farklı suşlarının izole edilerek kültürlenmesi, kullanım alanlarını da genişletmiş ve bu mayayı hem model organizma olarak hem de fermentasyon mayası olarak daha da popüler hale getirmiştir. Ancak *S. cerevisiae* aynı zamanda bir gıda kirleticisidir ve gıda ürünlerindeki popülasyon yoğunluğunun kontrol altında tutulması gerekmektedir. Bu da ancak gıdaya koruyucu katkı maddeleri ilavesiyle mümkündür. Ancak birçok maya türünün gıda koruyucu olarak kullanılan zayıf asitlere direnç geliştirdiği de bilinen bir gerçektir.

Sunulan tez çalışması kapsamında BA ve lityum metaborat (LMB) tuzunun *S. cerevisiae* mayası üzerindeki etkileri antioksidan sistem ve apoptotik belirteçler açısından ilk kez incelenmiştir. Bu bağlamda çalışmada belirtilen ajanların değişen

değişimleri kullanılarak 12 ve 36 saat süre ile maruziyet sonucunda hücre proliferasyonu, metabolik aktivitesi, enzimatik antioksidan sistem, lipid peroksidasyon düzeylerinin yanı sıra hücre yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikler irdelenmiştir. Ayrıca, maya apoptozunda rol aldığı bilinen önemli bazı genlerin ekspresyon düzeyindeki değişimler tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen araştırma sayesinde, pek çok kullanım alanı olan ve ülkemizde oldukça bol bulunan bu iki B türevinin tek hücreli ökaryotik maya modeli üzerindeki etkileri ilk kez ortaya konulmuştur.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Bor Elementi ve Türevlerine Genel Bakış

Periyodik cetvelin 3A grubunda bulunan bir metalloid olan ve önemli organik gruplarla kompleks oluşturma yeteneğine sahip B elementi, yüksek oksijen affinitesi nedeniyle doğada saf halde değil oksijenli bileşikleri halinde bulunur. Ayrıca biyolojik önemi olan fonksiyonel grupların oksijen ve azot atomları ile kovalent bağ yapabilir (Kot 2009; Uluşık ve diğ. 2018). BA, B'un en önemli bileşiğidir ve $B(OH)_3$ veya H_3BO_3 olarak formülize edilir (Woods 1994; Kot 2009; Yiğit ve diğ. 2013). Doğada sassolit olarak bulunan BA; üleksit ve hidroklorik asit, tinkal ve sülfürik asit, kolemanit ve sülfürik asit veya tinkal ve nitrik asit gibi ham materyaller kullanılarak rafine olarak üretilebilir (Becker ve diğ. 2011; Demirel ve diğ. 2015).



Şekil 2.1: Borik asit formülünün iki ve üç boyutlu gösterimi.

BA; renksiz, kokusuz şeffaf kristal, beyaz granül veya toz halinde bulunur. Su, alkol, gliserol, eter, metanol ve sıvı amonyak gibi çözücülerde iyi, asetonda ise az çözünür (Yavuz ve Denizli 2007; Demirel ve diğ. 2015).

BA'in çözeltilerinde iyon veya molekül halinde bulunması çözeltinin derişimine ve pH'ına bağlıdır. Seyreltik sulu BA çözeltileri yalnızca $B(OH)_3$ molekülünü ve borat anyonunu ($B(OH)_4^-$) bulundurmaktadır. Yüksek pKa değeri ile zayıf bir inorganik asit olan BA'in fizyolojik pH 7,4 de ağırlıklı olarak (~%96) $B(OH)_3$ ve oldukça az miktarda $B(OH)_4^-$ türlerini içerdiği tahmin edilmektedir (Woods 1994; Bolanos ve diğ. 2004).

BA'in biyomoleküller ile olan ilişkisi yeni organoboron bileşiklerinin üretilmesiyle ilgili çalışmaları gündeme getirmiştir. BA türevi bu bileşiklere ilgi giderek artmaktadır ve BA'e göre daha toksik olduğu belirlenen boronatların terapötik etkisinden yararlanılabileceği öne sürülmektedir (Benderdour ve diğ. 2000). BA'in yükseltgenmesiyle oluşan türevi boronik asitle diol arasında oluşan kovalent ürüne boronat ester adı verilmektedir. Bu etkileşimler, tetrahedral boronat esterinin olduğu bazı pH aralıklarında desteklenmekle birlikte, pH'a bağlı olarak kompleks oluşturabilmekte ve değişiklik gösterebilmektedir (Çalışır 2019). Boronik asit türevlerinin cis-hidroksil gruplarla etkileşimini temel alan ve bu asitlerin fonksiyonel gruplarını taşıyan destek malzemelerinin kullanıldığı boronat affinite kromatografisi ile karbohidratlar, nükleozidler, nükleik asitler ve glikoproteinler gibi birçok bileşik izole edilebilmekte veya saflaştırılabilmektedir. İmmobilize boronatların affinite ligandı olarak kullanıldığı boronat affinite kromatografisi genellikle yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yürütülmekte ve glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (Adamek ve diğ. 1992, Singhal ve diğ. 1992, Turkova 1993). Organoboron bileşikleri, birçok farklı fonksiyonel grupla bağlanabilmesi ve yüksek verimle dönüşümleri nedeniyle organik sentezde çok yönlü yapı taşlarından biri haline gelmiştir. Özellikle alkenilboronatlar, Suzuki-Miyaura çapraz eşleşme reaksiyonlarında çok reaktif substratlar olarak dikkat çekmektedir (Carreras ve diğ. 2019).

Dünyada B rezervi açısından en zengin ülke, toplam rezervin %72'sini bulduran Türkiye'dir. Ülkemizde Kütahya, Balıkesir ve Eskişehir, B cevherlerinin en yoğun işlendiği yerlerdir (Yavuz H. ve Denizli A. 2007; Tosun ve diğ. 2018). Ülkemizde 1865 yılında kalsiyum borat pandemitinin çıkarılmasıyla başlayan borat (BA türevleri olarak değerlendirilen, B oksianyonlarını oluşturan oksijenli B bileşikleri) endüstrisi, bugün rafine boraks dekahidrat, boraks pentahidrat, susuz boraks ve BA ihracatıyla dünyanın en büyüğüdür. Ayrıca, daha önce belirtildiği gibi rafine BA üretiminde kullanılan tinkal, kolemanit ve üleksit gibi minerallerin de ihracatı yapılmaktadır (Woods 1994; <http://en.etimaden.gov.tr>, 2019 Bor Sektör Raporu). Amerika, Arjantin, Rusya, Şili, Çin ve Peru da B rezervi açısından zengin diğer ülkeler arasındadır (Yiğit ve diğ. 2013).

2.1.1 Bor ve Türevlerinin Başlıca Kullanım Alanları

BA, fiberglas üretimi, gözlük camı yapımı, seramik işleri, ateşe dayanıklı ve hava geçirmez kumaş üretimi, ahşapta alevlenmeyi geciktirici, deterjan ve sabun üretimi, nikel kaplama banyoları, çeliğin sertleştirilmesi, kaynak eritme, bakırın pürünlendirilmesi ve borat üretimi başta olmak üzere oldukça çeşitli endüstriyel alanlarda kullanım alanı bulmaktadır. BA, nükleer uygulamaları içeren kimya endüstrisinde ve sodyum borohidrit yapımında da kullanılmaktadır. Sodyum borohidritin, artan temiz enerji ihtiyacı ile ortaya çıkan ve geleceğin alternatif enerji kaynağı olarak görülen hidrojenin depolanmasında, yüksek depolama kapasitesi ve gerektiğinde kolayca hidrojen elde edilebilmesi avantajlarıyla oldukça iyi bir seçenek olduğu belirtilmelidir (Demirel ve diğ. 2015; Yılmaz ve Şevik 2017). Ayrıca gübrelerde mikro besin olarak, gıda koruyucusu olarak, turuncgillerde mantar kontrolünde, insektisit olarak, kozmetik endüstrisinde, orta dereceli antiseptik olarak merhem ve göz banyolarında da kullanılmaktadır (Yavuz ve Denizli 2007; Tosun ve diğ. 2018). Eski bir çalışmada, BA'nın polialkollerle tepkimesi sonucu oluşan halkalı esterlerinden hekzilen glikol, borik anhidrit ve 1,3-bütillen glikol biborat bileşikler karıştırılarak, *Cladosporium resinae* mantarı ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bakterisi gibi türlere karşı yakıt tanklarında jet mikrobiyositi olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Woods 1994). Günümüzde, BA'nın yüksek konsantrasyonlarda geniş spektrumlu toksik etkisinden yararlanılarak günlük hayatta kullanılan antiseptik, antifungal hatta antiviral uygulamalarına da rastlanmaktadır (Pointer ve diğ. 2015; Tosun ve diğ. 2018).

2.1.2 Bor ve Türevlerinin Yüksek Ökaryotlardaki Biyolojik Önemi

B ve türevlerinin farklı canlılar üzerindeki biyolojik önemi uzun yıllardan beri araştırılmaktadır. Genel olarak hem BA hem de boratın organizmalar için çok önemli olan riboflavin (vitamin B2), adenzin monofosfat (AMP), piridoksin (vitamin B6), pirimidin nükleotidler, askorbik asit (C vitamini), bazı pentozlar ve polisakkaritler gibi biyomoleküller ile tersinir kompleksler oluşturdukları bilinmektedir. Borat ayrıca hayvanlarda nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) 'ye

bağlanır ve işlevlerini etkiler (Woods 1994; Uluşık ve diğ. 2018). Aşağıda verilen Tablo 2.1’de B ve türevlerinin yüksek ökaryotlardaki biyolojik etkileri, son 20 yılda yapılan çalışmalardan bazıları özetlenerek sunulmuştur.

Tablo 2.1: B ve türevlerinin yüksek ökaryotlardaki bazı biyolojik etkileri.

Bor Bileşiği	Organizma	Etki	Referans
Trietanolaminborat, N-dietil-fosforamidat-propilboronik asit, 2,2 dimetilheksil-1, 3-propandiol-aminopropilboronat, 1,2 propandiol-aminopropilboronat	Cıvciv embriyo kıkırdağı İnsan fibroblast hücresi	Proteoglikanlar ve proteinler gibi ekstrasellüler matriks makromoleküllerinin derişimlerinde azalış, İntra ve ekstrasellüler proteazların aktivitesinde artış.	Benderdour ve diğ. 2000
Borik asit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Lipit bileşimi bakımından farklılık gösteren mutant suşlarda; Vahşi tür ile karşılaştırıldığında, daha düşük sterol oranına sahip <i>chs1-1</i> mutantında, %30 daha yüksek bor alımı, Vahşi tür ile karşılaştırıldığında, daha uzun yağ asitlerinin yüzdesinde artış olan <i>act1-1</i> mutantında %35 daha düşük bor alımı.	Dordas ve Brown 2000
Borik asit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	İki alellik L-fukoz eksikliği olan ve hücre duvarı pektik polisakkarit rhamnogalakturonan II yapısı değişmiş cüce <i>mur-1</i> mutantlarında, çapraz bağın oluşum hızı ve stabilitesinin azalma defektinin ekzojen sulu borat ile giderilmesi	O’Neil ve diğ. 2001
Borik asit	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Çinko ve bor içermeyen koşullarda yetiştirilen bitki tohum-yumrularının, 8 mM borik asit ile muamelesi sonucunda; indol-3-asetik asit içeriği (IAA) ve IAA/sitokinin seviyelerinde artış,	Puzina 2004

		yumru büyümesi sonucu yumru ağırlığında artış.	
Borik asit	<i>Aedes albopictus</i> , <i>Culex nigripalpus</i> , <i>Ochlerotatus taeniorhynchus</i>	Bitki yaprak, kök ve diğer yüzeylerine %1'lik borik asit içeren tuzak şeker çözeltisinin püskürtülmesi ile 48 saat maruziyet sonunda belirtilen türlerde en az %80 oranında mortalite.	Xue ve diğ. 2006
Borik asit	Hamile fareler	Gebeliğin 8. günü teratojenik doz borik asit uygulaması sonucunda embriyolarda histon deasetilaz enzim inhibisyonu ve histon hiperasetilasyonu.	Di Renzo ve diğ. 2007
Borik asit, Boraks	Sprague Dawley erkek sıçanlar	28 gün süreyle standart kemirgen diyeti ile beslenen kontrol gruba kıyasla 100 mg/kg bor bileşiği içeren diyet ile beslenen deney gruplarında; LPO düzeylerinde düşüş, antioksidan savunma sistemi ve vitamin statüsünde indüksiyon.	Ince ve diğ. 2010
Borik asit	Iris bitkisi	Kültürlemenin 45 ve 60. günlerinde 0-5 ppm borik asitin tek başına ya da 0-4,5 g/L çinko sülfat ile kombinasyon halinde yapraklara püskürtülmesi şeklinde uygulanması sonucu kontrole kıyasla; Büyüme parametreleri, çiçek özellikleri, soğancık sayısı ve verimde önemli ölçüde artış, Yapraklardaki karbohidrat ve pigment düzeyleri ile N, P, K, Fe, Mn, Zn ve bor içeriklerinde, çiçeklerde ise karbohidrat ve yağ yüzdelerinde artış.	Khalifa ve diğ. 2011

Borik asit Sodyum borat	İnsan	B ürünlerine mesleki ve çevresel olarak sırasıyla doğrudan ve dolaylı yoldan yüksek oranda maruz kalan bireylerin kan örneklerindeki bor seviyelerinin toksik olmayan seviyelerde olması.	Duydu ve diğ. 2012
Borik asit	Yeni Zellanda tavşanı	Standart diyetle beslenen kontrol grubuna kıyasla 31,25, 62,5 ve 125 mg/kg BA takviyeli diyetle 5 hafta beslenen deney gruplarda; Serum alkali fosfataz enzim aktivitesi ve fosfor düzeylerinde artış, 62,5 ve 125 mg/kg borik asit takviyeli diyetle beslenen gruplarda ise alkali fosfataz ve fosfora ek olarak çinko ve bor düzeylerinde artış.	Yiğit ve diğ. 2013
Borik asit	Etlik piliç	Standart diyetle beslenen kontrol grubuna kıyasla, 42 günlük diyetin tamamında, ilk 21 ve son 21 gününde 60 mg/kg borik asit takviyeli diyetle beslenen grupların kaval kemiğinde kalsiyum ve fosfor depolanmasında artış.	Yıldız ve diğ. 2013
Borik asit	Sprague Dawley sıçanı	Bazal kemirgen diyeti ile beslenen kontrol grubuna kıyasla 40; 80; 160; 320 ve 640 mg/L borik asit takviyeli diyetle 60 gün beslenen gruplarda; Düşük konsantrasyonda (40 mg/L) dalağın dokusu ve yapısı, organ indeksleri ve antioksidan kapasitesi üzerinde olumlu etkiler, Yüksek konsantrasyonda (80 mg/L üzeri konsantrasyonlarda)	Hu ve diğ. 2014

		dalağın yapısı, ağırlığı, organ indeksleri ve antioksidan kapasitesi üzerinde doza bağlı olumsuz etkiler, Daha yüksek dozlarda (özellikle 640 mg/L konsantrasyonunda) dalak gelişiminin önemli ölçüde inhibisyonu ve toksik etki.	
Borik asit Boraks	Sprague Dawley erkek sıçanlar	28 gün standart kemirgen diyetiyle beslenen kontrol grubuna kıyasla 100 mg/kg borik asit veya boraks ile beslenen gruplarda; Vücut ağırlığı, leptin ve insülin seviyelerinde düşüş, plazmadaki triiyodotironin (T3) seviyelerinde ve dolayısıyla metabolik aktivitede artış, Hormonal durum üzerinde özellikle boraks uygulaması sonucu daha anlamlı etki.	Kucukkurt ve diğ. 2015
Borik asit	İnsan adipoz kaynaklı kök hücreleri	81,9 µM ve 819,6 µM olmak üzere düşük ve yüksek konsantrasyonlarda borik aside maruziyet sonucunda; Farklılaşmanın 4. gününde miyojenik gen ekspresyon düzeylerinde artış, Yüksek konsantrasyonlarda ise farklılaşmanın 21. gününde miyojenik ilişkili gen ve protein seviyelerinde düşüş.	Apdik ve diğ. 2015
Borik asit	İnsan primer epitel hücre hattı	İrinotekan, etopozid, doksorubisin ve H ₂ O ₂ ile birlikte toksik olmayan derişimde borik asit uygulaması sonucu DNA çift zincirinde görülen	Tepedelen ve diğ. 2016

		kırıklarda azalmalar ve yara iyileşme prosesinde hızlanma.	
Borik asit	Sıçan	10-640 mg/L veya 1-96 mg/kg borik asitin 60 gün süreyle oral yoldan verildiği sıçanlarda kontrol grubuna göre; Düşük derişimlerde borik asit takviyesi alan gruplarda hücresel bağışıklık fonksiyonlarında önemli ölçüde artış, 320 mg/L (48 mg/kg) derişiminin üzerindeki borik asit takviyesi alan grupların bağışıklık fonksiyonlarında inhibisyon hatta toksik etki.	Jin ve diğ. 2017
Borik asit	Erkek Swiss albino Fare	0,1-0,3 mg/gün borik asitin 60 gün süreyle oral yoldan verildiği sıçanlarda kontrol grubuna göre; Canlı vücut ağırlığında kademeli artış, Artan borik asit derişimi ile alanin aminotransferaz aktivitesinde düşüş, laktat dehidrogenaz aktivitesinde artış, Glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artış.	Kurtoglu ve ark. 2018
Borik asit	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Danio rerio</i>	9,3 µM borik asit içeren normal kültürlerle kıyasla borik asit içermeyen besi yerinde kültürlen ve büyütülen bitkiler ve zebra balığı embriyolarında; N-glikozizasyon metabolizmasında düzensizlikler, hücre farklılaşması ve organogenezde başarısızlık.	Reguera ve diğ. 2019

Boraks	Gökkuşığı alabalığı	500-1000 mg/kg bakır indüklü böbrek hasarına karşı 1,25-5 mg/kg boraks uygulaması sonucu; Glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerinde ve gen ekspresyonlarında artış, Sitokrom P450 1A ve ısı şok proteini 70 gen ekspresyonlarında artış, Oksidatif DNA hasarı, kaspaz-3 ve malondialdehit seviyelerinde düşüş.	Alak ve diğ. 2019
Borik asit	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	%0,01-0,2 borik asit katkıli diyetle beslenen grubun serum örneklerinde kontrol grubuna kıyasla; Hemoglobin ve hematokrit değerlerinde azalma, Artan bor seviyesi ile karaciğer enzimlerinin aktivitelerinde artış.	Öz ve diğ. 2020a
Borik asit	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	%0,01-0,2 borik asit katkıli diyetle beslenen grupta kontrol grubuna kıyasla; borik asit miktarı ile orantılı olarak karaciğer parankiminde hidropik ve vakuolar dejenerasyonlar, solungaçlarda lameller ödem, böbreklerde hiyalin birikimi, kaslarda dejenerasyon, dalakta nekroz ve beyinde hiperemi.	Öz ve diğ. 2020b
Borik asit Borat Kolemanit Üleksit	İnsan	Çeşitli bor türevleri ile bor kaynaklarına çok düşük, düşük, orta, yüksek ve çok yüksek düzeyde maruz kalan bireylerin kan örneklerinde; Kadın bireylerde, orta ve	Başaran ve diğ. 2020

		<p>yüksek düzeyde maruziyet sonrası, glutatyon-S-transferaz aktivitesinde düşük maruziyet grubuna göre anlamlı artış; interlökin-8 seviyelerinde düşük düzeyden yüksek düzey maruziyete geçiş ile düşüş.</p> <p>Erkek bireylerde, yüksek düzeyde maruziyet sonrası, glutatyon-S-transferaz aktivitesinde çok yüksek düzeyde maruziyet grubuna göre anlamlı artış; orta, yüksek ve çok yüksek düzeyde maruziyet sonrası glutatyon peroksidaz aktivitesinde ise düşük düzeyde maruziyet grubuna göre anlamlı artış,</p> <p>Erkek bireylerde, yüksek düzeyde maruziyet sonrası malondialdehit seviyelerinde diğer gruplara göre artış,</p> <p>Erkek bireylerde, yüksek ve çok yüksek düzeyde maruziyet sonrası nükleer faktör kappa B seviyelerinde orta düzeyde maruziyet grubuna göre düşüş,</p> <p>Erkek bireylerde, çok yüksek düzeyde maruziyet sonrası interlökin-8 seviyelerinde yüksek düzeyde maruziyet grubuna göre düşüş.</p>	
Üleksit	Yetişkin Zebra Balığı	<p>96 saat boyunca 5-40 mg/L üleksite maruz kalan yetişkin zebra balıklarında; 40 mg/L'lik uygulamada kan örneklerinde</p>	Alak ve diğ. 2020

		genotoksik hasar, karaciğer dokusunda oksidatif stres, oksidatif DNA hasarı ve apoptoz, 5-20 mg/L'lik uygulamada karaciğer dokularında antioksidan sistem indüksiyonu sonucu DNA hasarı ve apoptoz seviyelerinde düşüş.	
--	--	---	--

2.1.3 Bor ve Türevlerinin Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkileri

B ve türevlerinin mikroorganizmalar üzerinde hem fizyolojik hem de toksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Örneğin, prokaryotlar sınıfında yer alan bakterilerin birçok türü tarafından üretilen ve yapısında furasonil borat diester bulunduran otomatik indükleyici-2 (AI-2) molekülü, B'un bakteriyel iletişimde rolü olabileceğini göstermektedir (Coulthurst ve diğ. 2002). Bolanos ve diğ. (2002) tarafından yürütülen bir çalışmada, aktinorhizal bitkilerle nitrojen sabitleyici bir simbiyoz oluşturan aktinobakteri *Frankia* BCU110501 suşunun büyümesinin B'dan yoksun ortamlarda azot varlığı ve yokluğuna bağlı olarak sırasıyla geciktiği ya da tamamen inhibe olduğu ortaya konulmuştur. Diğer yandan, yapılan çalışmalar özellikle B'un en yaygın türevi olan BA'in, oldukça uzun yıllardan beri *Salmonella pullorum*, *Brucella abortus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter* ve *Citrobacter spp.*, *Morganella*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Aiwoffii ps*, *Streptococcus B* ve *D* türü bakteriler ve *Candida mantarları* gibi üriner patojen türlerin proliferasyonlarının engellenmesi amacıyla kullanılabilceğini göstermektedir. %10-40 g/L aralığında BA çözeltilisinin yukarıda belirtilen türler üzerinde proliferatif etkisi belirlenmiştir. 10 g/L BA, bazı *A. calcoaceticus* ve *P. aeruginosa* suşları için zayıf bakteriyosidal, ancak daha yüksek konsantrasyonları bakteriyostatiktir. Grup B streptokoklar için 10-20 g/L ve üstü derişimlerde BA bakteriyostatik, 40 g/L'de ise tamamen bakterisidialdir (Porter ve Brodie 1969; Lauer ve diğ. 1979; Meers ve Chow 1990; Abubakar 2009; Rowlands ve diğ. 2011). Ortakulak enfeksiyonuna neden olduğu bilinen *Mycobacterium abscessus/bolletii/massiliense* türü bakterilere karşı 1 aylık

toz BA uygulamasının etkili olduğu belirlenmiştir (Lefebvre ve diğ. 2015). BA'in yaygın görülen bakteri türleri *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkileri araştırılmış ve minimum bakterisidal konsantrasyonlar sırasıyla 1,93 ve 3,80 mg/mL olarak tespit edilmiştir (Uluisik ve diğ. 2018; İlhan ve diğ. 2019). BA'in asma patojeni *Eutypa lata* fungusunun misel gelişimine karşı maksimum etkili konsantrasyonunun yarı değeri (EC50) 125 µg/mL, askospor çimlenmesini önlemek için gereken derişimi ise 475 µg/mL olarak bulunmuştur (Rolshausen ve Gubler 2005). %0,05-1 potasyum tetraborat (K₂B₄O₇) tuzunun patojen mantar *Botrytis cinerea*'nın spor çimlenmesini, germ tüpünün uzamasını ve misel yayılmasını güçlü şekilde inhibe ettiği, %1'lik uygulamada ise anormal spor oluşumuna ve membran bütünlüğünün kaybına neden olduğu belirlenmiştir (Qin ve diğ. 2010). Yapılan bir diğer çalışmada, 20 mM K₂B₄O₇ tuzunun patojen bir mantar olan *Colletotrichum gloeosporioides* türünde reaktif oksijen türlerinin üretimine ve mitokondriyel hasara neden olarak spor gelişimi ve misel oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Shi ve diğ. 2012). Mavi küfe neden olan *Penicillium expansum* mantarına karşı antagonistik maya *Cryptococcus laurentii*'nin etkinliğinin K₂B₄O₇ varlığında değerlendirildiği bir çalışmada, %0,5 derişimindeki bor tuzunun maya proliferasyonunu etkilemezken %0,25'lik derişiminin mitokondriyal hasarı indükleyerek fungal misel yayılımını tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir (Cao ve diğ. 2012). Yine patojen bir fungus olan *Fusarium sulphureum* türüne karşı K₂B₄O₇ ve boraksın efektif dozları sırasıyla 2,1 ve 2,4 g/L ve türün misel oluşumuna karşı efektif dozlar 2,8 ve 3,2 g/L olarak belirlenmiş olup hiflerdeki morfolojik değişimler görselleştirilmiştir (Li ve diğ. 2012). Ayrıca, insanlarda hastalık oluşturan ve çoklu ilaç direnci gösteren patojenik *Candida* türlerine karşı da BA'nın kullanılabilirliği uzun yıllardan beri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Sobel ve Chaim 1997; Sobel ve diğ. 2003; Larsen ve diğ. 2018). BA'in, vahşi ve hif sinyal yolları kusurlu mutant *Candida albicans* (*C. albicans*) şuşlarındaki etkisinin araştırıldığı çalışmada, %0,2'lik BA'e 15 dk. maruziyetin hif büyümesi ve bütünlüğünü tersinir olarak engellediği belirlenmiş ve sitoskeletal değişiklikler görselleştirilmiştir (Pointer ve diğ. 2015).

Yukarıda verilen örneklerden de anlaşılacağı üzere uzun yıllardan beri yürütülen toksisite çalışmalarına rağmen, BA'in canlılar, özellikle de mantarlar üzerindeki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Swate ve Weed, 1974;

Van Slyke ve diğ. 1981; Sobel ve Chaim 1997; Sobel ve diğ. 2003; Beach ve diğ. 2016). Bazı araştırmacılar BA'in toksik etkisinin ortamın/besi yerinin pH değerine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu etkinin araştırılmasına yönelik yürütölen bir çalışmada, derişimleri aynı olan BA, sodyum borat ve 6 farklı organik asit bileşiği çeşitli mantar ve bakteri türlerine 24 saat uygulanmış, sonuç olarak pH değeri daha düşük asitlerde koloni sayısının daha fazla olabildiği fakat pH değeri 9,2 olan sodyum borat ile inkübe edilen mikroorganizmaların çok daha düşük sayıda üredikleri belirlenmiştir (De Seta ve diğ. 2009). Yine aynı çalışmada, BA toksisitesi üzerinde oksijen yokluğunun koruyucu etkisi olduğu ve *C. albicans*'ın virulans mekanizmasının bir parçası olan hif büyümesinin 10-50 mg/L BA tarafından 18 saatlik muamele ile kontrol altında tutulduğu da gösterilmiştir.

Bira mayası ya da fırıncı mayası olarak da bilinen model organizma *S. cerevisiae* gelişim için B'a ihtiyaç duyan tek hücreli düşük ökaryotik mikroorganizmalardan biri olup 80 mM üzerindeki derişimlerde, B metabolizmasında düzenleyici olduğu belirlenen Bor1p, Dur3p ve Fps1p membran proteinlerinin yanı sıra B dışa atım pompası olarak işlev gösteren ve B toleransı için gerekli olduğu belirlenen *ATRI* geni sayesinde hayatta kalabilir (Nozawa ve diğ. 2006; Kaya ve diğ. 2009). Ayrıca *S. cerevisiae*'nin normal BA direncinin yüksek ozmolarite gliserol sinyalinin işleyişine, trehaloz sentez yoluna ve bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu, Zn-SOD) enzim aktivitesine bağlı olduğu sonucu bulunmuştur (Schmidt ve diğ. 2012). Bahsi geçen BA toleransı *S. cerevisiae*'yı, B'un etkilerini hücrenel olarak incelemek için kullanışlı bir model haline getirmiştir (Ulusik ve diğ. 2018).

2.2 Ökaryotik Model Organizma: *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae; tek hücreli, mantar veya küf olarak sınıflandırılan, ökaryotik bir mayadır (Mortimer 2000). Fırıncı mayası veya bira mayası olarak da bilinen *S. cerevisiae* birçok yiyecek ve alkollü içecek üretiminde kritik öneme sahip bir mikroorganizmadır (Stewart 2016). Mayalar doğada, üzüm bağlarında bol miktarda bulunur, aynı zamanda meşe ağaçlarının kabukları, olgun meyvelerin ve bitkilerin yüzeyleri (yapraklar, çiçekler, meyveler) veya ağaç özsuları; sıcakkanlı hayvanların,

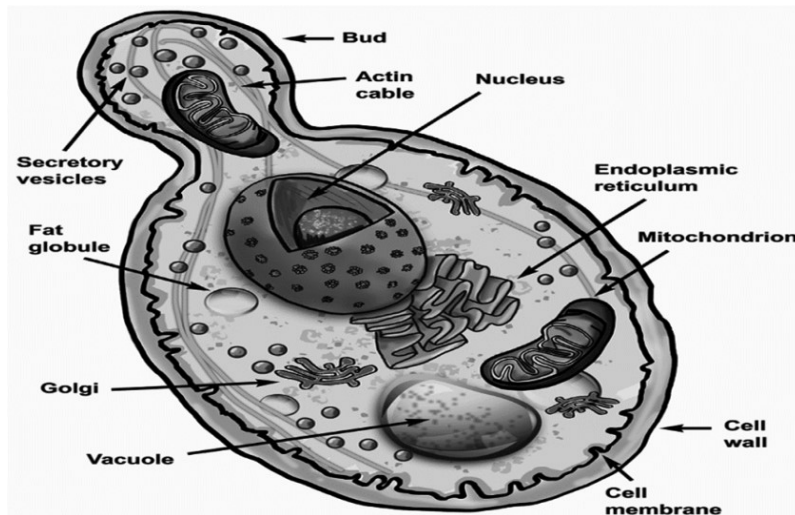
böceklerin veya kabukluların vücut yüzeyleri ve sindirim sistemleri; mağara çamuru, farklı iklim bölgelerindeki topraklar; tatlı veya tuzlu sular gibi birçok ortamda koloni oluşturabilirler (Martini 1993; Greig ve Leu 2009).

7000 yıldan daha uzun süredir kullanıldığı bilinse de *Saccharomyces* suşları 1891 yılında Hansen tarafından karışık başlangıç kültürlerinden izole edilmiş ve *S. cerevisiae* suşu ise deneysel model organizma olarak, 1930'lu yıllarda Winge tarafından yürütülen genetik araştırmalar sırasında kullanılmaya başlanmıştır (Hansen 1891; Winge 1935; Mortimer 2000). 1978 yılına kadar kullanışlı fakat sıradan bir mikroorganizma olarak görülen *S. cerevisiae*, genetik manipülasyona yatkınlığının keşfedilmesi ile önde gelen bir model organizma olarak diğer suşlardan ayrılmıştır (Duina ve diğ. 2014). Bu suşun, ilk genom dizisi 1996 yılında yayınlanmış olup *Saccharomyces* genom veri tabanında düzenli olarak güncellenmektedir (Engel ve diğ. 2014). Günümüzde, *S. cerevisiae* genomunun, 12 156 677 baz çifti ve 16 kromozom üzerinde organize edilmiş 6275 genden oluştuğu bilinmektedir (Sherman 2002; Engel ve diğ. 2014; Kurban 2019). *S. cerevisiae*, genomu tamamen dizilenen ilk ökaryotik canlıdır ve bu özelliğiyle biyokimya, moleküler biyoloji ve sistem biyolojisi çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır (Duina ve diğ. 2014). 1930'lardan bugüne kadar olan evrimsel olarak kısa zaman aralığında, değişik alanlarda kullanılan yüzlerce *S. cerevisiae* suşu, ilgili endüstriler tarafından kültürlenmiş, seçilmiş ve saf hale getirilmiştir. Bu suşların farklı özellikler gösterdiği ve birbirinin yerine kullanılamayacağı unutulmamalıdır (Mortimer 2000).

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*: Hücre Yapısı, Kültürlenme Koşulları ve Önemi

S. cerevisiae ökaryotik hücre yapısına sahip yani bir çekirdek, endomembran sistemi ve mitokondri gibi membrana bağlı organeller içeren bir organizmadır (Şekil 2.2) (Duina ve diğ. 2014). *S. cerevisiae*; hücreye şeklini veren, elastik yapısıyla hücreyi mekanik yaralanmalardan ve turgor basıncından koruyan, büyük moleküllerin hücreye girişini engelleyen, aynı zamanda gözenekli yapısı sayesinde madde alışverişine de olanak sağlayan hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarının

işlevleri arasında tomurcuk büyümesi, çiftleşme, sporülasyon, psödohif/yalancı hif oluşumu sırasında hücre şeklini belirlemek ve yapışkan glikoproteinleri diğer maya hücrelerine sunmak bulunmaktadır (Orlean 2012). *S. cerevisiae* hücre duvarı, invertaz, asit fosfataz ve kitinaz gibi sindirim enzimleri ve metabolizma için düzenleyici enzimleri içerir (Arnold 2018). Hücre duvarı, elektron geçirgen bir iç katmana ve elektron yoğun bir dış katmana sahip katmanlı bir yapıdır. İç katman, glukan polimerleri ve kitinden (N-asetilglukozamin polimerleri) oluşmaktadır (Levin 2005). Duvarın mekanik sağlamlığını büyük ölçüde sağlayan ayrıca duvarın dış tabakasındaki proteinler için bağlantı yerleri sağlayan kısım hücre duvarının iç tabakasıdır (Klis ve diğ. 2002). Hücre duvarının dış katmanı ise yüksek oranda mannoproteinlerden oluşmuş, iç katmanı bozucu enzimlerden koruyan bir kafestir (Levin 2005). Hücre duvarı bileşimi dış koşullara, hücre gelişimine ve hücre duvarı stresine yanıt olarak değişmektedir (Levin 2005; Orlean 2012).



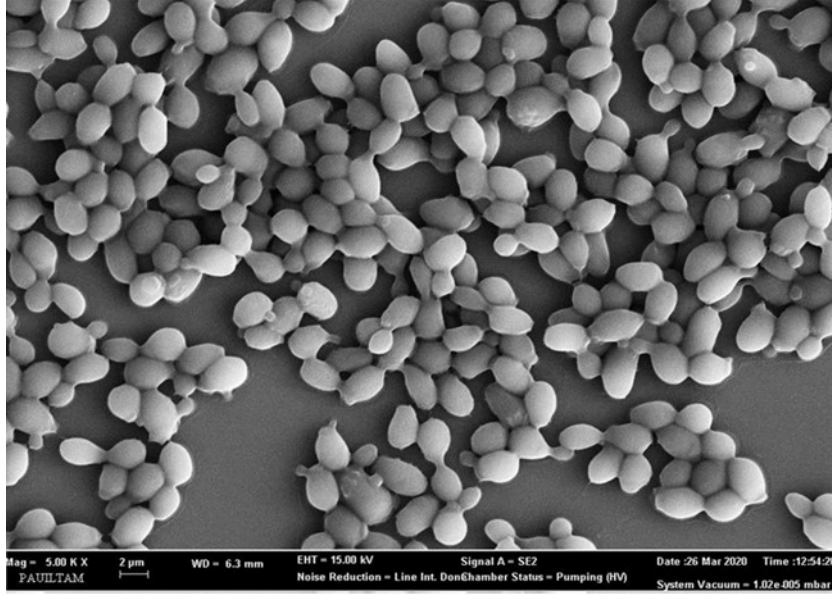
Şekil 2.2 : Maya hücre yapısı (Walker ve Stewart 2016)

Maya hücre duvarının altında 7,5 nm kalınlığında çift lipit tabakasından oluşmuş plazma zarı/sitoplazmik membran bulunmaktadır. Zar, hidrofilik ve hidrofobik etkileşimler ile yönetilen, polar lipitler ve asimetric (içsel ve dışsal) konumda proteinlerin yer aldığı kısmen hareketli bir yapıdır. Plazma zarında bulunan proteinler; çözünen maddelerin taşınması, sinyal iletimi, hücre iskeletinin bağlanması ve dış zar bileşenlerinin sentezinde görev almaktadırlar. Plazma zarının içerdiği başlıca lipit sınıfları gliserofosfolipidler, sfingolipidler ve sterollerdir. Steroller, polar bir hidroksil grubuna sahip kompakt, katı hidrofobik moleküllerdir (Van der Rest ve diğ. 1995). Kolesterolün en bol sterol olduğu yüksek ökaryotların aksine, maya

plazma zarı esas olarak ergosterol ve az miktarda zimosterol içerir. Plazma membranı ve salgı keseciklerinin sertliği yapılarındaki lipitlerin ergosterol içeriğinin fazla olmasına bağlanabilmektedir (Zinser ve diğ. 1991). Ökaryot hücre organellerinden olan mitokondri metabolik enerji oluşumunda rol alırken, endoplazmik retikulum (ER) protein sentezinde ve metabolizma için gerekli maddelerin taşınmasında ve golgi cisimciği ise protein ve lipit sentezinde rol oynamaktadır. Benzer şekilde, mayalarda birden fazla sayıda bulunan vakuol ve ER'dan kopup kendi kendine bölünerek çoğalan peroksizomal membranlar özel metabolik ve sindirim fonksiyonlarını yerine getirmektedirler (Van Der Rest ve diğ. 1995; Kurban 2019).

Fakültatif bir canlı olan *S. cerevisiae*; normal şartlarda anaerobik bir yaşam sürmekte (örn: alkolik fermentasyon) ancak aerobik şartlarda da hayatta kalabilmekte hatta çoğalabilmektedir (Kireççi 2018). Aerobik organizmaların yaptığı gibi solunumla piruvatı, O₂ (oksijen) varlığında CO₂'ye (karbondioksit) dönüştürmesinin yanında hızlı enerji üretimi için fermentasyonla glukozu etil alkole metabolize etmektedir. Aerobik ortamda, glukoz konsantrasyonu 0,8 mM.'ı aştığında ise karışık bir respirofermantatif metabolizmaya geçmekte ve solunum enzimlerini baskılayıp fermentasyon enzimlerini aktif hale getirirerek etil alkol üretmektedir (Verduyn ve diğ. 1984; Bekatorou ve diğ. 2006). Bu nedenle *S. cerevisiae* esasen ortamdaki glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak, solunum veya fermentasyon metabolizmalarından birini tercih etmektedir (Kappeli 1986).

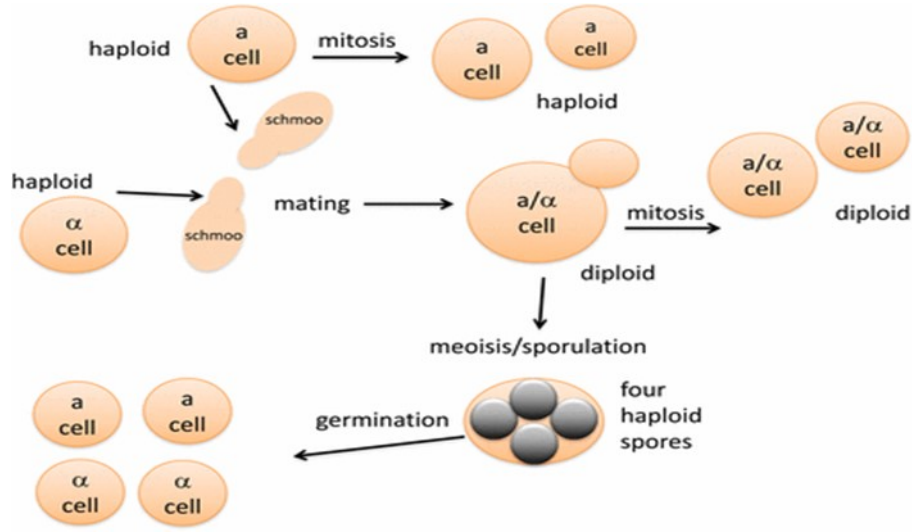
S. cerevisiae mayasının, 28-30 °C sıcaklık, hafif asidik pH, yeterli besin kaynaklarının bulunduğu besi yeri ve yaklaşık 180 rpm'lik ajitasyon gibi optimum koşullar olarak nitelendirilebilecek koşullar altında oldukça hızlı bir şekilde kültürlenebildiği bilinmektedir. Mikrobiyal büyümenin eksponansiyel fazında, yaklaşık 90 dk. gibi bir sürede, yeast ekstrakt, pepton, dekstroz (YPD) besi yerinde kültürlenmiş maya hücrelerinin sayısı iki katına çıkmakta (Sherman 2002), YPD agarlarında ise 48-72 saatlik inkubasyon periyodunun sonunda düz, pürüzsüz, nemli, parlak, krem veya mat renkte ve çıplak gözle gözlemlenebilen koloniler (Şekil 2.3) oluşmaktadır (O'Kennedy ve Reid 2008).



Şekil 2.3: Doğal suş *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) (5K X büyütme) görüntüsü (Pamukkale Üniversitesi, İleri Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, İLTAM tarafından çekilmiştir).

S. cerevisiae tomurcuklanarak veya askospor oluşturarak üreyen bir mayadır. Haploid maya hücreleri MATa veya MAT α türü gamet hücrelerinden oluşmaktadırlar. Bu hücreler, yavru hücreler üreterek tomurcuklanma yoluyla mitotik hücre bölünmesine uğrayabilmektedir (Duina ve diğ. 2014). Tomurcuklanarak çoğalmada maya hücrelerinin bir tarafında oluşan tomurcuk giderek büyümekte; sırasıyla nükleer bölünme ve sitoplazmik bölünmenin ardından anne-kız hücre arasında sadece bir kanal kalmakta ve hücre duvarının da oluşmasıyla bu kanal kapanarak bölünme gerçekleşmektedir. Her bir ana hücre genellikle 20-30 tomurcuktan daha fazlasını oluşturamamakta ve yaşı, hücre duvarında kalan tomurcuk izlerinin sayısına göre belirlenebilmektedir (Sherman 2002). Eşeyli çoğalmada ise; iki hücre türü kendine özgü feromonları (α , a) salgılamakta, schmoların (hücrelerin feromonlara tepki olarak oluşturdukları çıkıntılı görüntü çizgi film karakteri Schmo'ya benzediği için böyle adlandırılmaktadırlar) oluşumunu ve ardından çiftleşmeyi başlatmakta ve sonuçta kararlı bir diploid MATa/MAT α (a/α hücresi) oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Diploid hücreler ayrıca genetik olarak özdeş yavru hücreler üretmek için tomurcuklanarak mitotik olarak bölünmektedirler. Zayıf bir karbon kaynağı varlığında nitrojen açlığına yanıt olarak, diploitler, mayoz bölünmeyle iki MATa hücresine ve iki MAT α hücresine filizlenebilen, içinde dört

haploid çekirdek bulunduran askospor oluşturmaktadırlar (Şekil 2.4) (Neiman 2011; Duina ve diğ. 2014).



Şekil 2.4: Haploid suş *S. cerevisiae* mayasının basitleştirilmiş yaşam döngüsü diyagramı. (Duina ve diğ. 2014).

Sporlar çevresel koşullara karşı oldukça dirençlidir ve yeterli besin ortamında tekrar çimlenerek dört haploid hücre olarak büyümeye devam etmektedirler (Landry ve diğ. 2006). Yaşlı anne hücrelerin genç yavru hücrelere göre boyutları daha büyüktür ve ayrıca aktin hücre iskeletinde çökmeler, hücre duvarında kıvrılmalar gibi morfolojik farklılıklar gözlemlenmektedir. Bahsi geçen morfolojik özellikler hücre ölüm markerleri arasındadır ve yaşlanmanın yarattığı oksidatif stres sonucu indüklenmektedir (Dickinson ve Schweizer 2004).

S. cerevisiae, ekonomik ortamlarda büyük popülasyonlarının hızlı ve kolay yetiştirilebilmesi; %15 (v/v) gliserol ortamında -80 °C sıcaklıkta süresiz olarak ya da dondurulup kurutularak oda sıcaklığında yıllarca saklanabilmesi; genlerin aşırı ekspresyonu veya delesyonu sayesinde kolayca manipüle edilebilmesi; haploid olarak var olabilmeleri nedeniyle resesif mutasyonların tanımlanmasının ve karakterizasyonunun büyük ölçüde basit olması sayesinde biyokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi ve sistem biyolojisi alanlarında oldukça kullanışlı ökaryotik model organizma haline gelmiştir (Cherry ve diğ. 2012; Duina 2014; Petranoviç ve diğ. 2010; Sherman 2002). Ayrıca, yüksek ökaryotlar olan memeli hücrelerinin filogenetik olarak çok uzağında olmasına rağmen lipid, enerji ve protein

metabolizması (Petranoviç ve diğ. 2010), katlanmamış protein yanıtı (Goeckeler ve Brodsky 2010), mitokondriyal metabolizma (Rinaldi ve diğ. 2010), prion gelişimi (Bharadwaj ve diğ. 2010), yaşlanma (Barros ve diğ. 2010) gibi birçok metabolik yolak *S. cerevisiae* mayasında da korunmuştur. *S. cerevisiae* model organizma olarak kullanılmasının yanı sıra, endüstriyel olarak da çok yaygın kullanılan oldukça önemli bir türdür. Gıda ve farmakoloji sektörlerinde kullanımında “genel olarak güvenli” statüsüne sahip olmasına rağmen maya tabletlerinin probiyotik besin takviyesi olarak yutulması, fırıncılık sektöründe maya ile temas edilmesi ve bu sektörde çalışanlarla yakın temas gibi yollarla çok sayıda sistemik ve yüzeysel klinik enfeksiyon vakasının ortaya çıktığı bilinmektedir Bu nedenle *S. cerevisiae* patojenik olmayan bir maya değil, fırsatçı ve düşük virulanslı bir patojen olarak değerlendirilmelidir (Murphy ve Kavanagh 1999).

Mayaların sorumlu olduğu gıda bozulmaları ve bunların neden olduğu ekonomik kayıplara dair raporlar mevcuttur (Loureiro ve Querol 1999). Mayaların neden olduğu gıda bozulmaları, metabolik faaliyetlerinin bir sonucu olarak gıdanın fiziksel ve duyuşal özelliklerinin gözle görülür veya tespit edilebilir şekilde değişmesinden oluşmaktadır. Şekerli veya şekeriz asitli içeceklerde meydana gelen ve en çok bilinen değişiklikler: ambalajları deforme edebilen veya patlatabilen yoğun gaz üretimi, bulanıklık, tortu ya da üzerinde ince tabaka oluşumu, hafif bir fermentasyon kokusu (alkol, karbondioksit ve esterler) ve lezzet değişikliğidir (Loureiro ve Querol 1999). Fakat üretilen metabolitlerin ürünlerin tadı ve aromasına katkıda bulunduğu fermente gıdalarda/içeceklerde (ör. şaraplar, geleneksel biralar, siyah zeytinler, soya sosu) maya bozulması kolay belirlenmemektedir. Uygun imalat koşullarına göre işlenmiş ve paketlenmiş gıdaların bozulmasının büyük çoğunluğunun aralarında *S. cerevisiae*'nin da bulunduğu yalnızca 10-12 maya türü nedeniyle olduğu raporlanmıştır (Pitt ve Hocking 1997). Ökaryotik organizmalar olan mayalar, çoğu bakteriden daha yavaş çoğalırlar ve bu nedenle, bakterileri destekleyen ortamlarda, yani nötre yakın pH değerlerinde veya çok yüksek sıcaklıklarda rekabet edememektedirler. Diğer yandan, birçok maya türü asit koşullarına toleranslıdır (Pitt ve Hocking 2009). Yasal olarak gıda koruyucusu olarak belirlenmiş ve EC (The European Council-Avrupa Konseyi) mevzuatı dahilinde gıdalarda kullanılmak üzere onaylanmış sorbik asit, benzoik asit, propiyonik asit ve sülfiterin de dahil olduğu bazı zayıf asitlere karşı direncin araştırılmasında da yine

büyük ölçüde *S. cerevisiae* mayası kullanılmaktadır (Whitehouse 2002; Stratford ve diğ. 2013).

2.3 Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistemler

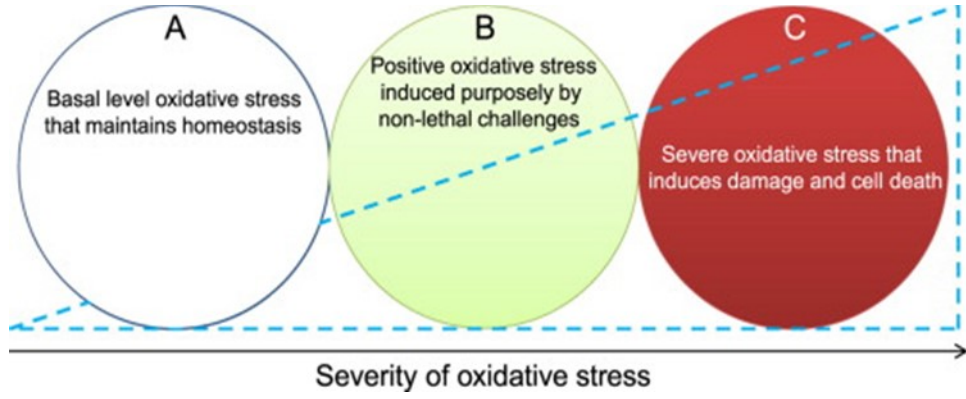
Oksidatif stres; oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve yeni dengenin, biyolojik sistemlerde meydana getirdiği hasar onarım mekanizmasındaki bozulma olarak tanımlanmaktadır (Tvrdá ve diğ. 2011; Sies 2019). Anaerobik organizmalar için az miktarda bile toksik olan oksijen aerobik organizmalar için enerji üretimi sırasında mitokondride meydana gelen oksidatif fosforilasyon ve takiben adenzin tri fosfat (ATP) oluşumu için gereklidir. Ancak enerji üretimi sırasında oksijenin enzimatik olarak indirgenmesi basamağında hücrede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır ve aşırı ROS üretimi oksidatif strese, hücre fonksiyonlarının kaybına ve nihayetinde apoptoza veya nekroza yol açabilmektedir. Sonuç olarak yüksek miktarda enerji üretimi için gerekli olan oksijen, aerobik canlılar için bile toksik olabilmektedir (Nordberg ve Arner 2001; Valko ve diğ. 2007; Tvrdá ve diğ. 2011; Ortiz ve diğ. 2017). ROS, serbest radikal ve radikal olmayan türlerden oluşmaktadır. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil (OH^{\bullet}), hidroperoksil ($HO_2^{\bullet-}$), alkoksil (LO^{\bullet}), peroksil (LO_2^{\bullet}) radikal türler iken hidrojen peroksit (H_2O_2), organik peroksit (ROOH), hipoklorik asit (HOCl), ozon (O_3), singlet oksijen (1O_2), lipid hidroperoksit (LOOH) radikal olmayan oksijen türevleridir (Genestra 2007). Ayrıca azotun da radikal ve radikal olmayan reaktif türevleri bulunmaktadır. Bu türler sırasıyla; nitrik oksit (NO^{\bullet}), nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet-}$) ve alkoksil peroksinitrit (LOONO), dinitrojen tetroksit (N_2O_4), nitroz asit (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$) olarak sayılabilmektedir (Tvrdá ve diğ. 2011; Chandrasekaran ve diğ. 2017).

2.3.1 Serbest Radikaller

Son yörüngesinde eşleşmemiş bir veya daha fazla elektronu bulunan, oldukça reaktif ve kararsız atom veya moleküller serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya nötr

olabilmektedirler. Üzerinde iki tane eşleşmemiş elektronu bulunan moleküler oksijen, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilmektedir (Cheeseman ve Slater 1993). Biyolojik sistemlerde karbon (C), kükürt (S) ve halojen kaynaklı serbest radikaller olsa da en önemlileri oksijen türevi serbest radikaller ve bunların metabolitleridir (Miller ve diğ. 1990). Serbest radikaller bir elektron kazanarak temel hale geri dönmek için yakınlarındaki biyomolekülleri oksitlemekte ve bu molekülleri serbest radikal haline çevirerek çevredeki doku ve organların yıkımıyla sonuçlanan bir zincir başlatmaktadır. Serbest radikal zincir reaksiyonları mitokondride üretilen süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) ve nitrik oksit (NO^{\bullet}) tarafından başlatılmaktadır. Bu reaksiyonlar mitokondriyal membranlara, proteinlere ve DNA'ya zarar verebilen bir dizi reaktif oksijen ve nitrojen türü tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde hasar alarak işlevsiz hale gelen mitokondri, lizozomal sindirim ve apoptoz için hücre içi sinyaller üretmektedir (Navarro ve Boveris 2004).

Serbest radikal oluşumu; ksenobiyotikler, sigara, radyasyon, hava kirliliği, ilaç, diyet gibi ekzojen faktörler yanında doku hasarı, kronik hastalıklar, yaşlılık, stres gibi endojen süreçler tarafından da indüklenebilmektedir (Cheeseman ve Slater 1993; Tremellen 2008). Endojen süreçlerde, serbest radikaller elektron transport zinciri sırasında oksijene elektron sızıntısı ile ortaya çıkabilmekte veya biyolojik sistemler tarafından doğrudan üretilmektedirler. Bunun nedeni, serbest radikaller bazal sınırdaki tutulursa (düşük/orta konsantrasyonlarda) proliferasyon ve programlanmış hücre ölümü (PCD), hücre içi taşıma, hücre hareketliliği, zar bütünlüğü ve bağışıklık tepkisi gibi hücre için yaşamsal süreçlerin regülasyonunda yer alabilmektedirler (Şekil 2.5) (Finkel 1998; Janssen-Heininger ve diğ. 2008; Yan 2014). Örneğin; ribonükleotid redüktaz gibi bazı enzimlerin aktif bölgelerinde serbest radikal bulunmakta, ayrıca aktif fagositozlar bakteriyosidal etkilerinin parçası olarak süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) üretmektedirler. Hücre içi sinyal sisteminde yer alması ve mitojenik yanıtın indüklenmesi de ROS'nin yararlı etkileri arasında gösterilebilmektedir (Cheeseman ve Slater; Valko ve diğ. 2007; Rajendran ve diğ. 2014).



Şekil 2.5: Hüresel oksidatif stres seviyeleri ve bunların farklı etkileri. (A) hücrenin hayatta kalması ve homeostaz için gerekli olan bazal seviye oksidatif stres; (B) genellikle protein oksidatif modifikasyonlarını indükleyen çeşitli ölümcül olmayan tehditler tarafından indüklenebilen pozitif oksidatif stres; (C) Hasara neden olan şiddetli oksidatif stres ve hücre ölümü (Yan 2014).

Serbest radikaller, kendilerini eşleşmemiş elektronlarından kurtarıp kararlı yapıya ulaşmak için, lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonu ile sonuçlanan zincirleme kimyasal reaksiyonlar başlatmaktadırlar (Tremellen 2008). Oksidatif stres şiddetli olduğunda hasarlı makromoleküller hücre ölümü ötesinde doku hasarını bile indükleyebilmektedirler (Yan 2014).

2.3.2 Antioksidan Sistemler

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olduğu sürece organizma, serbest radikal kaynaklı hasara uğramamakta, bu dengenin bozulması ise doku hasarına yol açabilmektedir (Sies 1991; Halliwell ve Whiteman 2004). Prokaryotlardan memelilere kadar tüm organizmalar, kendilerini ROS ve diğer reaktif türlerin zararlı etkilerinden korumak için çok ayrıntılı ve dikkat çekici savunma yöntemleri geliştirmişlerdir (Janssen-Heininger ve diğ. 2008). Enzimatik ve enzimatik olmayan yollar üzerinden gerçekleşen bu yöntemler, genel olarak antioksidan sistemler olarak adlandırılmaktadır. Antioksidan sistem radikal önleyici, radikal süpürücü ve radikal kaynaklı hasar onarımı basamaklarından oluşmakta ve antioksidan moleküller farklı basamaklarda etki göstermektedir (Ighodaro ve Akinloye 2018).

2.3.2.1 Enzimatik Antioksidan Sistemler

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSHPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST) antioksidan sistemde rol oynayan enzimlerden en önemlileridir. Hüresel içeriklerinin ve lokalize oldukları organ ve hücre altı bölgelerin spesifikliğı yanında yapılarında bulunan metaller (bakır, çinko, manganez, demir, selenyum) yoluyla karakterize edilmektedirler (Sies 1991).

SOD (EC 1.15.1.1), süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$) 'nun hidrojen peroksit (H_2O_2) ve suya dönüşümünü katalizlemektedir.



Antioksidan savunma mekanizmasının ilk basamağı olan bu kritik tepkime sonucunda süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) radikalinin potansiyel zararları azaltılmış olmaktadır (Tibell ve diğ. 1996).

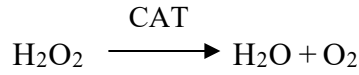
Metalloenzim olan SOD'lar yapılarında bulunan metal atomuna göre 3'e ayrılırlar;

1. Prokaryotlarda ve bazı bitkilerin kloroplastlarında yaygın olarak bulunan demir-süperoksit dismutaz (Fe-SOD veya SOD1)
2. Ökaryotların mitokondrilerinde ve prokaryotlarda bulunan mangan-süperoksit dismutaz (Mn-SOD veya SOD2)
3. Ökaryotlarda bulunan bakır/çinko süperoksit dismutaz (Cu,Zn-SOD veya SOD3). Bu enzim genellikle sitozolde lokalizedir, aynı zamanda kloroplast ve peroksizomlarda da bulunabilmektedir (Ighodaro ve Akinloye 2018). Memeli hücrelerinde hücre içi ve hücre dışı form (EC-SOD) olmak üzere iki farklı Cu,Zn-SOD türü üretilmektedir (Tibell ve diğ. 1996).

Ökaryotik maya *S. cerevisiae* 'da *SOD1* geni tarafından ekspresse edilen büyük kısmı sitoplazmik, küçük bir miktarda da mitokondrinin zarlar arası boşluğunda lokalize Cu,Zn-SOD ve *SOD2* geni tarafından ekspresse edilen mitokondriyal membranda lokalize Mn-SOD enzimleri bulunmaktadır. *SOD1* geni delesyonu ile oluşturulan mutant suşlarla yapılan çalışmada Cu,Zn-SOD eksikliğinin,

oksijen toksisitesine duyarlılığı arttırdığı fakat *SOD1* geninin yeniden eklenmesiyle hücrelerin oksijen direncinin normale döndüğü belirtilmektedir (Birmingham-McDonogh ve diğ. 1988). Mitokondriyal Mn-SOD, oksidatif strese karşı hücreyi korumada kilit rol oynar (Longo ve diğ.1996).

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6); içerdiği kofaktör ve hangi hücrede bulunduğuna bağlı olarak ağırlığı farklılık gösteren bir enzimdir ve memeli formu yaklaşık 240 kilodalton (kDa) ağırlığında, dört benzer subunitten oluşan tetramerik bir proteindir. Yapısında hem grubu bulunduran CAT'ın herbir polipeptit subuniti bir tane ferriprotoporfirin içermektedir. Enzimde kofaktör olarak demir veya manganez bulunmaktadır. CAT, oksijen kullanan tüm canlılarda bulunan yaygın bir enzimdir ve özellikle peroksizomlarda lokalizedir (Yarsan 1998; Ighodaro ve Akinloye 2018). Bu enzim, ana kaynağı SOD'un enzimatik aktivitesi olan hidrojen peroksit molekülünü (H_2O_2), suya indirgerken oksijeni de moleküler haline yükseltmektedir.



CAT ayrıca metanol, etanol, formik asit gibi hidrojen donörlerine karşı peroksidaz ve oksidaz aktivitesine sahiptir. Bu moleküllerle iki basamak üzerinden gerçekleşen bir reaksiyona girmektedir (Chelikani ve diğ. 2004).



S. cerevisiae'da H_2O_2 , CAT ve sitokrom c peroksidaz (CCP) tarafından katabolize edilmektedir. *S. cerevisiae* mayası sırasıyla *CTAI* ve *CTTI* genleri tarafından kodlanan peroksizomal CAT (CAT A) ve sitozolik CAT (CAT T) olmak üzere iki CAT'a sahiptir. CAT normal koşullar altında maya hücreleri için gerekli olmamasına rağmen, bu hücrelerin oksidatif strese adaptif yanıtında ve oksidatif strese tolerans kazanmalarında önemli bir rol oynamaktadır (Izawa ve diğ. 1996; Grant ve diğ. 1998).

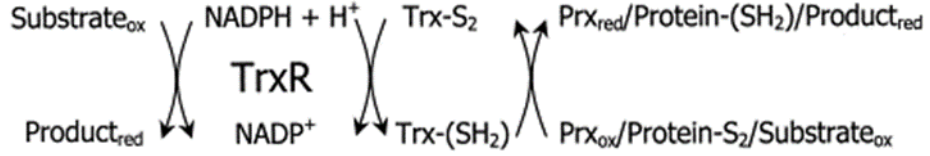
Glutatyon-S-Transferaz (GST) (EC 2.5.1.18), detoksifikasyon amacıyla ksenobiyotik substratlara indirgenmiş glutatyonun (GSH) konjugasyonunu

katalizlemektedir. Genel olarak ksenobiyotik detoksifikasyonu; reaktif fonksiyonel grup bağlanarak ksenobiyotiklerin aktif hale getirilmesi, kimyasal bileşiklere konjuge edilerek nötralize edilmeleri ve aşağı akış yoluyla metabolize edilerek hücrelerden pompalanıp elimine edilmeleri aşamalarından oluşmaktadır. GST'ler sitozolik 2. aşama enzimleridir (Sheehan ve diğ. 2001). GST'ler, çeşitli substratlar üzerindeki elektrofilik merkezlere GSH'nin sülfhidril grubu (-SH) üzerinden konjugasyonunu katalizleyerek, bu elektrofilik bölgeleri nötralize etmekte ve zararlı bileşikleri suda daha iyi çözünür hale getirmektedirler (Gülçin ve diğ. 2016). Böylece suda çözünmeyen ksenobiyotikler organizmadan fizyolojik sıvılar yoluyla daha kolay uzaklaştırılabilmektedir. Mitokondriyal, sitozolik ve mikrozomal olmak üzere üç aileye ayrılan GST'ler bazı prokaryotlarda ve bütün ökaryotlarda bulunmaktadır (Türkan 2015).

S. cerevisiae'da ilaç direncinde önemli rolü olduğu bilinen GST enzimlerini kodlayan genler, *GTT1* ve *GTT2* olarak belirlenmiştir. *GTT1* ekspresyonu, ozmotik stres ve ksenobiyotikler tarafından ve en önemlisi, diauxic kaymadan sonra indüklenmektedir. *GTT1* ve *GTT2* hücre için yaşamsal değildir, ancak bu enzimlerin birinden veya her ikisinden yoksun *gtt1Δ*, *gtt2Δ* ve *gtt1Δgtt2Δ* mutant suşları, durağan fazda sıcaklık artışına duyarlı hale gelmekte ve 39 °C'de sınırlı büyüme sergilemektedirler (Choi ve diğ.1998). *S. cerevisiae* ' da bulunan Ure2 proteini GST ile yapısal homolojiye sahiptir ve ksenobiyotikler ve GSH'a bağlanmaktadır. Ure2 metal detoksifikasyonunda merkezi bir role sahiptir. Ancak *S. cerevisiae* için bilinen GST'lar (*Gtt1* ve *Gtt2*) veya GST aktivitesine de sahip olan glutaredoksinler (*Grx1* ve *Grx2*) ağır metal detoksifikasyonunda rol almamaktadır (Rai ve Cooper 2005).

Tiyoredoksin redüktaz enzimi (*TrxR*) (E.C 1.6.4.5), tiyoredoksin sisteminin parçasıdır. Bu sistem tiyoredoksin (*Trx*) ve tiyoredoksin redüktaz (*TrxR*) olmak üzere iki antioksidan protein ile Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADPH) 'tan oluşmaktadır. Homodimerik yapıda bir flavoenzim olan *TrxR*; oksidoredüktaz sınıfı enzimlerdendir ve monomerleri bir Flavin Adenin Dinükleotit (FAD) kofaktörü (prostetik grup), bir NADPH bağlanma bölgesi ve bir redoks-aktif disülfid bağı bulunduran aktif bölge içermektedir (Mustacich ve Powis 2000). *Trx* aktif bölgesinde iki tane redoks aktif sistein bulundurmakta, disülfid bağı oluşturan bu aktif bölge sisteinleri, *TrxR* tarafından NADPH'a bağlı olarak redükte edilmektedir (Nordberg

ve Amer 2001). Elektronlar FAD yoluyla NADPH molekülünden TrxR'nin aktif bölge disüflitlerine aktarılmakta, substrat böylece indirgenmektedir. (Şekil 2.6) (Williams 1992; Sandalova ve diğ. 2001). Trx ve TrxR, hücre içi redoks ortamını kontrol ederek, hücre sel büyüme ve apoptoz gibi süreçlerin kontrolünde çok önemli bir rol oynayan redoks aktif proteinlerdir (Tandoğan ve Ulusu 2011).

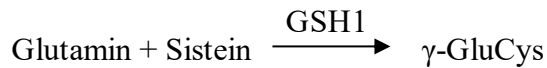


Şekil 2.6: Tiyoredoksin sisteminin enzimatik reaksiyonları (Nordberg ve Amer 2001).

Memeli TrxR'de her subunit 55-65 kDa, prokaryotların, bitkilerin veya mayaların TrxR ağırlığı 35 kDa ile karşılaştırılabilir büyüktür. Fakat, memeli TrxR'ının saflaştırılması ve karakterizasyonu ile katalitik özelliklerde alt organizmalarinkinden farklı olduğu açıkça anlaşılmıştır (Nordberg ve Amer 2001). Trx enziminin temel özellikleri, özellikle aktif bölgesi evrim sırasında korunmuştur fakat, memeli TrxR enzimleri yapı ve özellikler bakımından bakteri, mantar ve bitkilerdeki enzimlerden çok farklıdır (Draculic ve diğ. 2000; Sandalova ve diğ. 2001).

Maya da memelilerde olduğu gibi, fonksiyonu ROS'ne karşı hücreyi korumak olan, Trx ve TrxR'ın birlikte yer aldığı bir tioredoksin sistemi içermektedir ve bu sistem memelilerdekine benzer redoks potansiyellerine sahiptir (Kritsiligkou ve diğ. 2018)

Glutasyon sentaz (GSH2) (EC 6.3.2.3), GSH sentezinde katalizör olarak rol almaktadır. GSH sentezi, aminoasitlerden (glutamin, sistein ve glisin) ATP'ye bağımlı iki basamaklı tepkime sonucunda gerçekleşmektedir. İlk basamak, γ -glutamilsistein sentaz'ın (GSH1) katalizör olarak rol aldığı, glutamin ve sisteinden dipeptid γ -glutamilsistein (γ -GluCys) oluşumudur.



İkinci basamak ise glutasyon sentaz'ın (GSH2) katalizör olarak rol aldığı glisin ile dipeptid γ -GluCys ligasyonudur (Grant 2001).



Oluşan GSH miktarı, ortamda bulunan substrat ve enzim konsantrasyonuna bağlıdır. Hücreler glutamat ve glisinden zengin, fakat sınırlı miktarlarda sistein içermektedir. Sistein miktarı ve GSH1, GSH2 derişimindeki artış, sentezlenen GSH miktarını arttırmaktadır (Aksoy 2002). GSH oluşumunda ilk basamak hız sınırlayıcı basamaktır ve böylece GSH birikimiyle geri tepkime engellenmektedir (Grant 2001).

GSH1 enziminin *S. cerevisiae*'daki ekspresyonunun, mayadaki oksidatif stres tepkisi transkripsiyon faktörü Yap1p tarafından yukarı regüle edildiği bilinmektedir. Ayrıca GSH2 ekspresyonu da oksidatif stres kaynaklı koşullar altında Yap1p tarafından düzenlenmektedir. Oksidatif stres koşullarına ek olarak, yüksek sıcaklıklara maruz kalan hücrede oksijenli solunum hızı artmakta ve bunun sonucunda hücre içi oksidasyon seviyeleri artışı ile Yap1p'ye bağlı bir şekilde ısı şok stresi tarafından GSH1 ve GSH2 ekspresyonu indüklenmekte ve hücre içi GSH seviyesi yükselmektedir (Sugiyama ve diğ. 2000).

2.3.2.2 Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistemler

Enzimatik aktive göstermeyen fakat antioksidan özellik gösteren bileşikler de antioksidan sistemin çeşitli basamaklarında yer alarak oksidatif stresi önlemeye yardımcı olmaktadır. Bu bileşiklerden bazıları; A, C ve E vitaminleri, karoten, albumin, piruvat, ürik asit, askorbat ve GSH'dur (Ahmad 2017).

GSH, üç aminoasit içeren düşük molekül ağırlıklı bir peptittir ve tüm canlı aerobik hücrelerde bulunan tiyol bazlı intrasellüler bir antioksidandır. Asıl işlevi sülfhidril tamponu olmasıdır. Bununla birlikte GSH, GST'lar tarafından katalizlenen konjugasyon reaksiyonları yoluyla veya GPx tarafından katalizlenen reaksiyon aracılığıyla bileşikleri detoksifiye etmektedir. Bu sırada oluşan oksitlenmiş glutatyon (GSSG), NADPH'ye bağlı flavoenzim GR tarafından redükte edilmektedir (Akşit ve diğ. 2015). Ayrıca GSH, oksidatif stres sonucu, membran lipitlerinin hasar

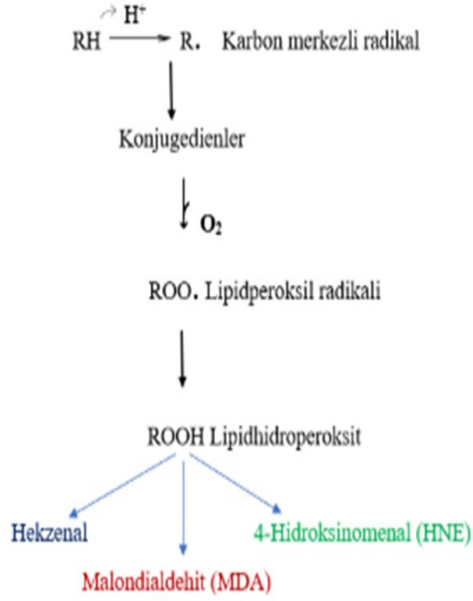
görmesiyle oluşan lipit peroksidasyonunun (LPO) kontrol altında tutulması için güçlü bir faktördür (Güven ve diğ. 2003).

Mayada GSH, serbest radikallerle reaksiyona girerek ayrıca glutatyon peroksidaz (GPX1-3) enziminin veya GTT1 ve GTT2 enzimlerinin rol aldığı reaksiyonlarla okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmektedir. GSH, glutatyon redüktaz (GLR1) tarafından katalize edilen, NADPH'ye bağlı bir reaksiyonla yeniden üretilmektedir. Mayaların ROS başa çıkma mekanizmasının durumunu gösteren kritik faktör, GSH/GSSG oranının değeridir. Bu oran için bazal değer 6'dır (Cui ve diğ. 2020).

2.3.2.3 Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Zararları

Önceki bölümlerde belirtildiği gibi reaktif türler tarafından; hücredeki lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitlerin oksidasyonu sonucu; hücresel hasar, hücre ölümü hatta doku hasarı meydana gelebilmektedir.

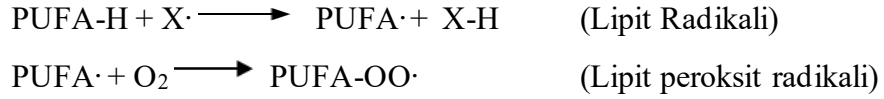
Normal koşullarda metabolizma için doğal bir süreç olan lipit peroksidasyonu (LPO), oksidatif stres ile membran lipitlerinin başlıca yapıtaşı olan çoklu doymamış yağ asitlerinde (PUFA) bağların kopması ile başlayan otokatalitik bir zincir reaksiyona neden olmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu ile hidroperoksitleri oluşmakta ve parçalanmış hidroperoksitler, epoksitler, aldehitler ve alkanlar gibi yan ürünlere dönüşmektedir (Şekil 2.7). Bu ürünlerden bazıları çok reaktiftir ve biyomolekülleri hasara uğratarak serbest radikal olaylarını arttırmaktadır (Costa ve Ferreira 2001). Hücresel hasarın bir diğer şekli de PUFA zincirlerinin parçalanması ile hücre membranının akışkanlığında, seçiciliğinde ve geçirgenliğinde bozulmalar meydana gelmesidir. (Yarsan 1998).



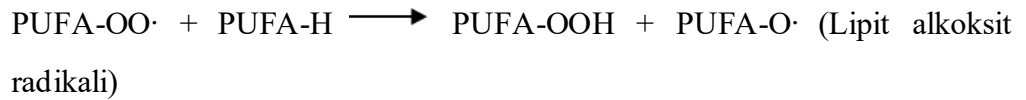
Şekil 2.7: ROS'a bağlı oluşan LPO ürünleri (Özcan ve diğ. 2015).

LPO başlama, uzama ve bitiş olmak üzere üç aşamada gerçekleşmektedir (Yarsan 1998). Bu aşamalar aşağıda gösterilmiştir.

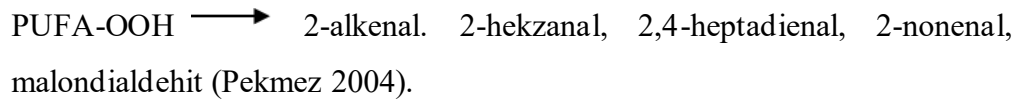
Başlama:



Uzama:



Bitiş:



LPO'nun son ürünü olarak oluşan malondialdehit (MDA) oksidatif hasarın belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çünkü MDA, diğer LPO ürünlerine göre daha karardır ayrıca hücre membranlarının geçirgenliğini etkileyerek kolayca sitoplazmaya geçip burada birikebilmektedir (Tekeli ve Bildik 2016).

2.4 Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz

2.4.1 Apoptoza Genel Bakış ve Apoptozun Morfolojisi

Apoptoz; çok hücreli organizmalar ve ökaryotlarda normal doku ve organ homeostazı (hücrelerde sayısal denge hali) için gerekli olan, çekirdekli hücre kromozomunda genetik olarak kodlanmış enerji bağımlı programlanmış bir hücre intihar sürecidir (O'Brien ve Kirby 2008; White 2011; Kam ve Ferch 2000). Sağlıklı dokularda apoptozis (ölüm) ve mitozis (yeniden yapım) dinamik bir denge halindedir. Hücre ölüm süreçleri fizyolojik ve patolojik olabilmektedir. Fizyolojik apoptoz; embriyo gelişiminde fetuse ait el ve ayak parmakları arasındaki dokuda, kadınlarda menstrual döngüde endometriumun (rahim iç tabakası) dökülmesinde, kurbağalarda metamorfoz sürecinde ve granulasyon dokusunun skar dokusuna dönüşmesinde kilit rol oynamaktadır (Moulton 1994, Chowdhury ve diğ. 2006). Ayrıca varlığı potansiyel tehlike oluşturan lenfositler, tümörler, viral enfeksiyonlar ve mutasyonlar sonucu onarılamaz şekilde hasar görmüş hücrelerde de devreye girmektedir (Kam ve Ferch 2000; Fuchs ve Steller 2011). Homeostazı bozan fazla sayıda, hasar görmüş veya yaşlanmış hücrelerin apoptotik süreç ile ortadan kaldırılması memelilere zarar vermeyecek şekilde düzenlenmiştir (Elliott ve Ravichandran 2010).

İnme (serebrovasküler olay), AIDS, kanser ve nörodejeneratif (sinirsel) hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington) aşırı ya da yetersiz apoptoz ile karakterize edilmektedir. Çoğu kanser türlerinde yetersiz apoptoz ya da apoptozdan kaçış görülmektedir. Araştırmalar antitümör ilaçların hedeflerine apoptotik hücre ölümünü indükleyerek ulaştığını göstermektedir (Jilani ve Lang 2013; Lopez ve Tait 2015). Nörodejeneratif hastalıklar, miyokard infarktüs (MI), serebrovasküler inme, miyelodisplastik sendromlar (MDS) gibi çeşitli hastalıklarda ise aşırı apoptoz gerçekleşmektedir (Halonen, 2015; Kam ve Ferch 2000; Misra ve diğ. 2016).

Apoptotik süreç; sitotoksik ajanlar, serbest radikalik türler, viral enfeksiyonlar, UV/Gama ışınları, kalsiyum artışı, inflamatuvar yaralanma, onkogenler ve bazı kemoterapötik ilaçlar ile indüklenebilirken; tümör promotörleri, farmakolojik ajanlar

(enzim inhibitörleri) ve çeşitli viral genetik ürünler tarafından baskılanabilmektedir (Orrenius ve diğ. 2011).

Apoptoz, hücrelerde meydana gelen bazı morfolojik değişiklikler ile karakterizedir. Bu değişiklikler; hücre zarı sitozolünde bulunan fosfatidilserinin hücre yüzeyine eksternalizasyonu (Martin ve diğ. 1995), DNA'nın nükleozomlar arasında bölünmesi (Wyllie ve diğ. 1980), apoptozun en karakteristik özelliği olan nükleer çekirdeğin iç kısmında başlayan kromatin yoğunlaşması (piknoz) (Clifford ve diğ. 1996; Elmore 2007), geniş plazma zarı kabarcıklaşmasını (zeiosis) takiben çekirdek parçalanması (karyoreksis) ve son olarak hücre parçalarının zarla çevrili apoptotik cisimciklere ayrılması (Clifford ve diğ. 1996; Elmore 2007) şeklinde özetlenebilmektedir. Apoptotik cisimcikler, bir nükleer fragman içeren veya içermeyen sıkıca paketlenmiş organellere sahip sitozolden oluşmaktadır (Elmore 2007). Bu apoptotik cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından, apoptotik hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserinler ve yutan hücrenin reseptörlerinin bağlanması ile fagosite edilmektedirler (Madeo ve diğ. 1997; Akşit ve Bildik 2008). Apoptotik hücreleri sarmalayan ve sindiren makrofajlara "yapışkan vücut makrofajları" adı verilmektedir (Kavakcioğlu Yardımcı 2017). Apoptotik hücreler hücresel içeriklerini kendilerini çevreleyen interstisyel dokulara yaymamaktadırlar. Bu durum, apoptozu deneyimleyen hücrelerin çevrelerindeki hücre veya dokulara zarar vermeden ve inflamatuvar yanıtı neden olmadan, komşu hücrelerle olan bağlantıları kesilerek yok edilmesini sağlamaktadır (Redza-Dutordoir ve Averill-Bates 2016). Tüm bu morfolojik değişikliklerin belirlenmesinde ışık ve elektron mikroskobu kullanılmaktadır (Hacker 2000; Hongmei 2012).

2.4.2 Kaspazlar ve Bcl-2 Protein Ailesi

Oldukça iyi düzenlenmiş bir süreç olan apoptoz, merkezinde evrimsel olarak korunmuş kaspaz (sistein bağımlı aspartat spesifik proteaz) ve Bcl-2 (B-hücre lenfoma 2) protein aileleri üyelerini ihtiva etmektedir (Madeo ve diğ. 1997; Li ve Yuan 2008; Wyllie 2010; Hongmei 2012). Aktif bölgesinde sistein proteaz bulunan kaspazlar hedef proteinleri aspartat kalıntılarından sonraki bölümlerden parçalayarak aktiflik göstermektedir. Zimojen formda sentezlenen ve prokaspaz adı verilen yapılar proteolitik yolağın etkinleşmesiyle aktif formu olan kaspazlara dönüşmektedirler

(Schulze-Osthoff ve diğ. 1998; Wickremasinghe ve Hoffbrand 1999). Apoptotik sinyal yolağındaki yerleri ve N-ucu uzantılarındaki prodomain uzunluklarına bağı olarak kaspazlar, başlatıcı kaspazlar (kaspaz -1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12) ve efektör kaspazlar (kaspaz -3, 6, 7) olarak sınıflandırılmaktadır (Li ve Yuan 2008). Uzun prodomaine sahip başlatıcı kaspazlar, ölüm bölgesi (death domain) ve kaspaz aktivasyonu güçlendirme alanından (CARD) birini içermekte ve yolağın ilk basamaklarında etkili olmaktadır. Kısa prodomaine sahip efektör kaspazlar ise hücrel substratların parçalanması gibi yolağın son basamaklarında aktivite göstermektedir (Li ve Yuan 2008; Shalini ve diğ. 2015; McArthur ve Kile 2018). Kaspazlar belirli uyarılar tarafından aktive edildiklerinde proteolitik kaspaz kaskadı oluşturmaktadırlar.

Apoptozun regüle edilmesinde önemli role sahip olan Bcl-2 protein ailesinin *BCL-2* geni ilk olarak insan B-Hücreli Foliküler Lenfomada tanımlanmıştır. Mitokondriyal dış membranda bulunan ve iyon değişimini düzenleyen Bcl-2 ailesi proteinlerinin bir kısmı apoptozu indüklerken diğeri kısmı apoptozu bloke etmektedir. Memelilerde bilinen en az 17 üyesi bulunan Bcl-2 ailesi fonksiyonlarına göre; dört BH alanına sahip anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1), BH1, BH2 ve BH3 alanına sahip pro-apoptotik (Bax, Bak ve Bok) ve sadece BH3 alanına sahip BH3-only (Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa ve Puma) alt ailelerine ayrılmaktadır. Bu üç alt ailenin üyeleri arasındaki etkileşimler stres altındaki hücrede yaşam/ölüm kararının verilmesinde önem arz etmektedir (Willis ve Adams 2005; Moldoveanu ve diğ. 2006).

Apoptoz esnasında; mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP), kaspazların aktivasyonu ve hücredeki birçok biyolojik makromolekülleri parçalayan katabolik hidrolazların aktifleşmesi gibi çeşitli biyokimyasal değişiklikler gözlenmektedir (Marino ve diğ. 2014).

2.4.3 Apoptotik Hücre Ölüm Yolakları

Apoptotik sinyallerin kaynaklandığı yer ve yapısına bağı olarak hücrede farklı yolakları aktifleştirdiği bilinmektedir (Şekil 2.8).

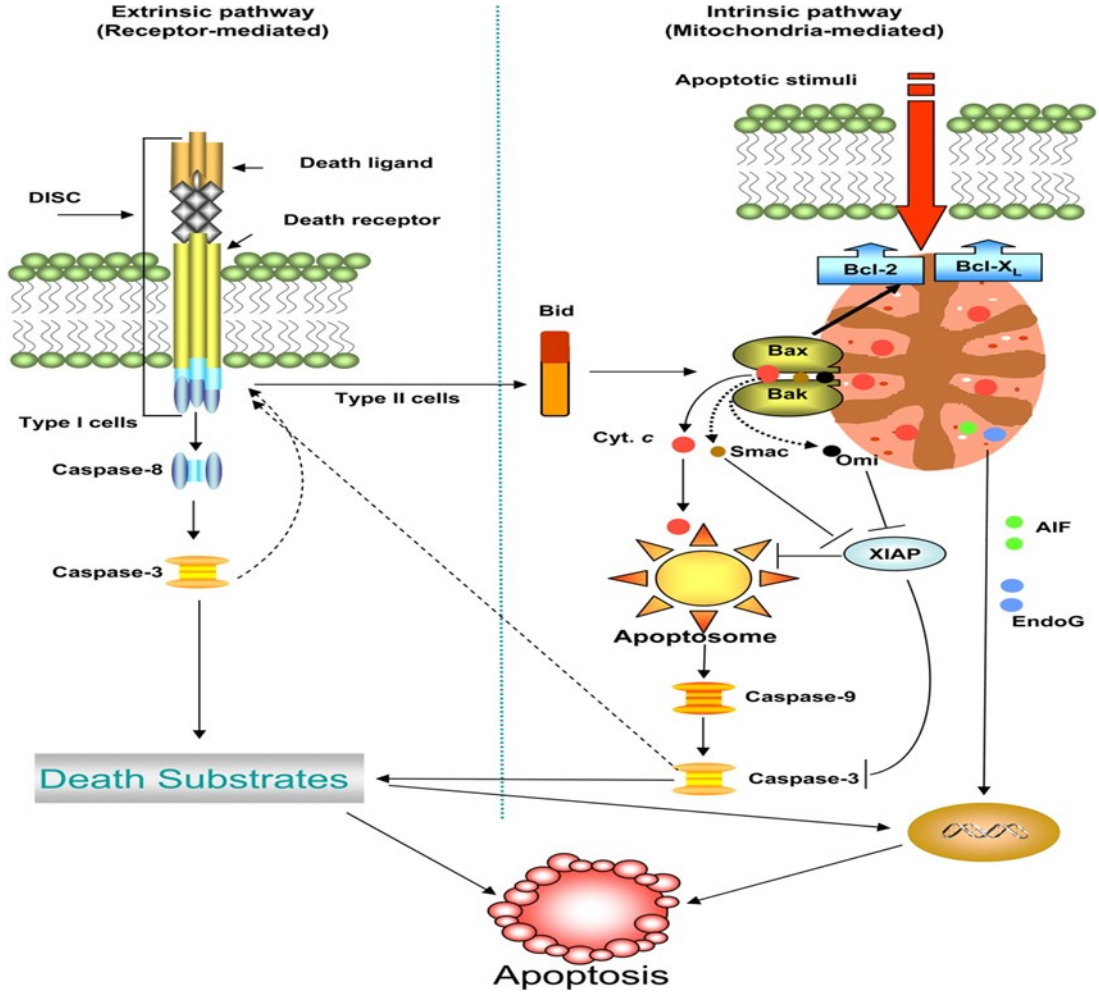
Apoptozun indüklenmesinde etkili olan ve en yaygın bilinen temel iki yolak vardır:

1. İntrensik (Mitokondri/Sitokrom-c Aracılı İçsel) Yolak
2. Ekstrinsik (Dış Sinyaller Aracılı/Dışsal) Yolak

Bu iki farklı yolak farklı mekanizmalar tarafından uyarılmalarına rağmen birbirinden tamamen bağımsız değildirler. Bazı aracı proteinlerle etkileşimleri mevcuttur ve belirli bir noktada ortak proteaz kaskadlarını kullanabilmektedirler (Muñoz-Pinedo 2012).

Bu temel iki yolağın dışında; DNA hasarları sonucu p53 ile aktifleşen kaspaz-2 bağımlı yolak, direkt kaspaz aktivasyonu ile granzim-B yolağı ve DNA'nın fragmentasyonu sonucu etkinleşen granzim-A yolağı da bulunmaktadır (Grilo ve Mantalaris 2019).

Apoptozu indükleyen hücre içi uyaranlar; hipoksi, hücre içi Ca^{+2} seviyesindeki artış, pH'ta azalma, DNA hasarları, hücre döngüsü/metabolik bozukluklardır. Hücre dışı uyaranlara ise ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (TNF-TNF α , FAS-FASL aracılı apoptoz), üreme/büyüme faktörlerindeki yetersizlik, sitotoksik T-lenfositler, dış etkenler (toksik ajanlar, iyonlaştırıcı radyasyon, iskemi, kemoterapötik/antikanser ilaç kombinasyonları) örnek verilebilmektedir. Hücre içi uyaranlar içsel apoptotik yolağı aktiveleştirirken hücre dışı uyaranlar dışsal apoptotik yolağı etkinleştirmektedir. Apoptozun düzenlenmesinde; moleküller (seramid), genler (c-myc), iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve mitokondri gibi organeller görev almaktadır (Danial ve Korsmeyer 2004; Kroemer ve diğ. 2007; Smaili ve diğ. 2000).



Şekil 2.8: Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yollarının şematik gösterimi (Orrenius ve diğ. 2011).

2.4.3.1 Ekstrinsik (Dış Sinyaller Aracılı) Yolak

Dışsal (ekstrinsik) yolakta süreç; makrofajlar, NK (Natural Killer) hücreler ve aktifleşmiş T hücrelerin hedef hücre membranındaki ölüm reseptörlerine tutunmasıyla başlamaktadır. Bu reseptörler, FAS ve TNF (Tümör Nekrozis Faktörü) adı verilen integral proteinlerdir. FASL ve TNF α tamamlayıcı ölüm aktivatörleri reseptörlerine bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma işlemi sonucu trimerik hal alan reseptör, ölüm bölgesi (death domain) aracılığıyla adaptör moleküller ve prokaspaz-8 ile birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) denilen bir yapıyı oluşturmaktadır. Bu kompleks sayesinde aktif halde olmayan prokaspaz-8 kesim işlemi sonucunda aktif kaspaz-8'e dönüşmektedir. Bu durum kaspaz kaskadının aktifleşmesini sağlamaktadır. Kaspaz-8 ve Kaspaz-10 efektör kaspazlardan kaspaz 3,

ve 7'yi aktifleştirerek hücreyi ölüme götürmektedir (Pfeffer ve Singh 2018; Choo ve diğ. 2019).

2.4.3.2 İntrensik (Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı) Yolak

Mitokondri odaklı ve reseptör bağımsız intrinsik yolakta hücre içi sinyaller rol oynamaktadır. DNA hasarları, toksik ajanlar, serbest radikalik türlerin bulunması, viral enfeksiyonlar, endoplazmik retikulum (ER) stresi, hormon/sitokin türevlerinin hücrelere erişememesi, iyonlaştırıcı radyasyon gibi birçok stres indükleyici faktörler sonucu içsel yolak aktifleşebilmektedir (Elmore 2007; Tait ve Green 2010).

Pro ve antiapoptotik fonksiyonlara sahip olan Bcl-2 protein ailesi içsel yolağın mitokondri odaklı apoptoz sürecinde hücrelerin yaşam/ölüm kararının verilmesinde önem arz eden düzenleyici proteinlerdir. Apoptotik süreçten sorumlu en önemli BH alanı BH3'tür. BH alanlarının (BH1, BH2, BH3, BH4) tümüne sahip antiapoptotik proteinler (Bcl-XL, Mcl1, Bcl-W, A1) mitokondri zarındaki Bax ve Bad gibi proapoptotik proteinlerin işlevlerini durdurarak apoptozu engelleyebilmektedirler. Üç BH alanına (BH1, BH, BH3) sahip proapoptotik proteinler (Bax, Bok, Bak) mitokondri dış zar geçirgenliğini artırarak apoptotik belirteçlerin sitoplazmaya geçişini kolaylaştırabilmektedirler. Sadece BH3 domaini içeren Bim, Bid, Noxa, Puma gibi proapoptotik proteinler ise mitokondriyal membrandaki Bax/Bak ile etkileşerek bazı yapısal değişimler sonucu mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu değişikliğe uğratabilmektedirler (Kale ve diğ. 2018).

Hücre içi sinyalleri vasıtasıyla apoptotik stimulantlar alındıktan sonra Bid gibi proapoptotik proteinler antiapoptotik proteinlerden Bcl-2'yi inaktifleştirirken, Bax ve Bok proteinlerini aktifleştirmektedirler. Bu durum mitokondri zar potansiyelini değiştirerek membranda por oluşumunu desteklemektedir (Spierings ve diğ. 2004). Mitokondriyal membran porlarından Sitokrom c, Aif1p (Apoptoz indükleyici faktör), Ca^{+2} , Endo-G (Endonükleaz G) gibi faktörler sitozole geçmektedir. Kaspaz-3 ve Kaspaz-8'in aktifleşmesini engelleyen IAF (İnhibitör apoptotik faktör) ise inhibe edilerek apoptotik süreç hızlandırılmaktadır. Porlardan sitozole geçiş yapan Aif1p çekirdeğe doğru yönelerek çekirdeği parçalarken Endo-G

DNA'yı parçalamaktadır. Mitokondride oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyan Sitokrom c'nin sitozole geçişi yine sitozolik Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktifleştirici faktör), kaspaz-9 ve ATP'nin katılımıyla apoptozom adı verilen kompleks bir yapının oluşumunu sağlamaktadır. Apoptozom oluşumu prokaspaz-3'ü aktifleşmiş kaspaz-3'e dönüştürürken bir dizi kaspaz kaskadı ile çekirdekte kromatin kondenzasyonu ve DNA'nın alt üniteler halinde fragmentasyonuna neden olmaktadır (Adams ve Cory 2001; Adrain ve Martin 2001; Strasser ve diğ. 2000; Palmer ve diğ. 2000).

2.5 *Saccharomyces cerevisiae* Mayasında Apoptoz

S. cerevisiae mayasında apoptotik sürecin nasıl işlediğine dair çok sayıda çalışma yapılmış ve pek çok ekzojen/endojen indükleyicilerin apoptozu uyardığı, kaspaz bağımlı ya da bağımsız sürece katkıda bulunan çeşitli mitokondriyal ve nükleer proteinler tarafından gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Mayada apoptoz, fiziksel ya da kimyasal stres indükleyiciler veya ölümcül sinyal iletim yollarının bir parçası olarak proapoptotik proteinlerin heterojen ekspresyonu gibi pek çok stimulant tarafından indüklenebilmektedir.

Uzun yıllar *S. cerevisiae* ve *S. pombe* gibi tek hücreli ökaryotların apoptotik süreçlere sahip olmadıkları ve apoptozun çok hücreli organizmalarla sınırlı olduğu düşünülmüştür. Ancak AAA ATPaz ailesi üyesi olan ve vezikül füzyonuna katılan, hücre bölünme geni *CDC48*'i mutasyona uğratılmış *S. cerevisiae* suşunda Annexin V boyama yöntemi kullanılarak apoptozun tipik belirteci olan fosfatidilserinin eksternalizasyonu ve terminal deoksiniükleotidil transferaz aracılı dUTP çentik uç etiketleme (TUNEL) yöntemi kullanılarak DNA fragmentasyonu ile kromatin kondenzasyonu belirlenmiş ve bu maya türünde apoptozun temel aşamalarını gerçekleştiren moleküler mekanizmaların varlığı tespit edilmiştir (Madeo ve diğ. 1997). Ayrıca *S. cerevisiae* mayasında GSH'un yükseltgenerek tükenmesi, dışarıdan uygulanan düşük dozda H₂O₂, *CDC48*'deki bir mutasyon veya memeli Bax proteinin ekspresyonu ile apoptozun indüklenebildiği ancak hipoksi ile oksijen radikallerindeki tükenme durumunda apoptozun engellendiği belirlenmiştir. Bu durum metazoan apoptozunda önemli bir bileşen olan oksijen radikallerinin evrimsel süreçte korunduğunu ortaya koymaktadır (Madeo ve diğ. 1999). H₂O₂ uygulaması yapılan maya hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve maya kaspazı olan Yca1p ile

Aif1p gibi faktörlerin süreç boyunca yer aldığı belirlenmiştir (Madeo ve diğ. 2002, Wissing ve diğ. 2004).

Memeli hücrelerindeki Bcl-2 proteinlerinin maya hücrelerine homolog veya heterolog ekspresyonları ile benzer aktiviteler gösterdiği ve maya hücrelerindeki antioksidatif savunmayı tetikleyerek hücreleri ölüme götürecektir süreçleri geciktirdiği bildirilmiştir (Longo ve diğ. 1997). Başka bir çalışmada ise maya hücrelerine ekspresye edilen BH3-only proteinlerinin hem multidomainli proapoptotik hem de antiapoptotik protein üyelerinin bir arada bulunduğu koşullarda apoptozu desteklediği bildirilmiştir. Antiapoptotik proteinlerin bulunmaması halinde BH3-only proteinlerinin apoptozu indükleyememesi, BH3-only üyelerinin antiapoptotik proteinleri inhibisyona uğratarak dolaylı şekilde Bak ve Bax proteinlerini aktifleştirdiğini düşündürmüştür (Gérecová ve diğ. 2013).

Maya apoptozu ile ilgili önemli bir diğer çalışma da memeli kaspazlarının yapısal homoloğu olan Yor197w proteininin mayada metakaspaz olarak işlev gösterdiğinin belirlenmesi ve bu proteine Yca1p (maya kaspazı-1) adı verilmesidir (Madeo ve diğ. 2002). Mayada ROS birikimi sonucu *YCA1* aktivasyonu ile indüklenen, kronolojik olarak yaşlandırılmış *S. cerevisiae* hücre ölümünün tipik apoptoz belirteçleri gösterdiği ve oksijen stresi yanıtında anahtar bir transkripsiyonel düzenleyici olan *YAP1*'in aşırı ekspresyonu ile büyük ölçüde geciktirildiği belirlenmiştir. Yca1p eksikliği olan mutant suşların daha uzun süre hayatta kaldıkları ancak bu durumun da hasar görmüş hücrelerin birikimine neden olarak klonlar için dezavantaj olduğu bildirilmiştir. Böylece apoptozun tek hücreli bir organizma için avantaj sağladığı gösterilmiştir (Herker ve diğ. 2004).

Memeli apoptozunun proteini olan ve serin proteaz aktivitesine bağlı olarak apoptozu aracılık ettiği bilinen HtrA2 proteininin homoloğu Nma111p (apoptozun nükleer mediyatörü) olarak adlandırılan pro-apoptotik proteinin, *S. cerevisiae*'da tanımlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serin-proteaz ailesinin bir üyesi olan Nma111p, hücrel stres koşulları altında ekspresyon seviyesi upregüle edilmeden çekirdeğin içinde toplanma eğilimindedir. Nma111p kümelenmesi bu proteinin proapoptotik karakteriyle ilişkilendirilmektedir. *NMA111*'deki silinme maya hücresinde apoptotik belirteçleri azaltmakta, aşırı sentezlenmesi ise hücreyi apoptozu götürmektedir. Çekirdekte bulunan Nma111p, hücreleri serin proteaz

aktivitesiyle öldürmektedir (Fahrenkrog ve diğ. 2004). Nma111p'nin, sitozole ve çekirdeğe lokalize olan apoptoz inhibitör proteini Bir1p'yi parçalayarak apoptoz oranını artırdığı ve Bir1p'nin aşırı eksprese edilmesi sonucu apoptozun baskılandığı bildirilmektedir (Walter ve diğ. 2006).

İntramitokondriyal NADH'nin oksidasyonunu katalizleyen ve mitokondri içzarına lokalize olan NADH dehidrojenaz Ndi1p, maya hücresi ölümü ile ilişkilendirilen bir başka proteindir. Ndi1p'yi kodlayan *NDII*'in delesyonunun ROS üretimini azaltarak yaşam süresini uzattığı belirtilmektedir (Li ve diğ. 2006).

Mitokondride bulunan ve apoptozu indükleyen bir diğer faktör olan Nuc1p'nin nükleaz aktivitesine sahip olduğu ve apoptotik sinyallerin alınmasıyla mitokondriyal permeabilizasyon bozulduğunda çekirdeğe taşınarak kromatinlerin parçalanmasında görev aldığı bildirilmektedir (Buttner ve diğ. 2007).

Memelilerde NADH oksidaz aktivitesine sahip bir flavoprotein olan, kaspaz bağımsız ve mitokondrinin membranlar arası boşluğunda bulunan Aifp'in, maya hücrelerinde homoloğu olduğu ve *AIF* delesyonunun, H₂O₂/asetata maruz kalma veya yaşlanma sürecinde hücrelerin sağ kalım süresini uzattığı belirtilmiştir (Wissing ve diğ. 2004).

Bir başka çalışmada ise asetik asit muamelesinin mitokondriden Sitokrom c salınımını indüklediği ve hücreyi ölüme götürdüğü tespit edilmiştir (Ludovico ve diğ. 2001; Fannjiang ve diğ. 2004). Etil alkol, yüksek konsantrasyonlarda NaCl, UV, ısı, hipokloröz asit (HOCl), demir, bakır, mangan vb. bileşiklerin toksik boyutlarda muamelesinin de apoptotik süreci başlatabileceği belirtilmiştir (Carmona-Gutierrez ve diğ. 2009). Ayrıca amonyağın maya kolonilerinde koloninin ortasında birikip yaşlı hücrelerde apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Vachova ve diğ. 2005).

Tablo 2.2: Memeli apoptotik proteinler ve fonksiyonlarının mayadaki ortologları (Kavakcıoğlu 2017).

İnsan	<i>S. cerevisiae</i>	Fonksiyonu (www.yeastgenome.org)
VCP	Cdc48p/YDL126C	ER ile ilişkili ubikitin bağımlı protein bozunma sisteminin bir parçası olan poliubikitinlenmiş proteinlerin salınmasında yer alan çeşitli multiprotein ATPaz kompleksinin bir bileşenidir. Aynı zamanda mitotik içi ayırma, otofaji, ER membran füzyonu, hücre boyunca lokalize protein transportunun bozulmasında rol oynar.
Sitokrom c (Cyt c)	Cyc1p/YJR048W	Sitokrom c'nin mitokondriyal salınımı sonucu kaspaz aktivasyonu tetiklenerek apoptoz başlatılır.
Endonükleaz G (Endo G)	Nuc1p/YJL208C	RNAz, DNA endo- ve ekzonükleolitik aktivitelere sahip majör mitokondriyal nükleazdır. Mitokondriyal rekombinasyon, apoptoz, poliploidinin sürdürülmesindeki roller, programlanmış nükleer yıkım (PND) sırasında genomik DNA'nın parçalanmasında görevli memeli EndoG ortoloğunu kodlar.

Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF)	Aif1p/YNR074C	Apoptotik uyarılara cevaben çekirdeğe transloke olan mitokondriyal hücre ölüm etkinleştiricisidir. Redüktaz olarak kabul edilen memeli apoptozis indükleyici faktör homologudur.
Apoptozis protein inhibitörü (IAP)	Bir1p/YJR089W	Bir1p genellikle apoptozis inhibitörü proteinlerinde bulunan bir protein motifi olan üç bakulovirüs IAP tekrar bölgesi içermektedir. Bir1p, kromozom stabilitesi ve apoptozda bağımsız roller oynuyor gibi görünmektedir.
Mitokondriyal serin proteaz (HtrA2/Omi)	Nma111p/YNL123W	Serin proteaz ve genel moleküler şaperonlar apoptozun gelişimi ve ısı stresine yanıt vermede rol oynarlar. Lipid homeostazisine katkıda bulunabilirler. Memeli Omi/HtrA2 serin proteaz ailesine dizi benzerliği mevcuttur.
Apoptozis İndükleyici Faktör (AIF)-Homoloğu ve Mitokondri İlişkili Protein	Ndi1p/YML120C	NADH:ubikinon oksidoredüktaz; elektronları solunum zincirinde NADH'den ubikinona aktarır. Ancak daha yüksek ökaryotik çok alt birimli solunum kompleksi 1'in aksine proton pompalamaz. Apoptotik stres üzerine mitokondride N-terminal bölünmesi ile aktive edilir, ardından apoptozu indüklemek için sitoplazmaya transloke olur.
Kaspazlar	Yca1p/Mca1p/ YOR197W	Apoptozis esnasında önemli rol oynayan Ca ²⁺ -bağımlı sistein proteazdır. Strese cevaben spesifik

substratlara bağlanır. H₂O₂ muamelesi üzerine apoptozu düzenler. Hücre döngüsü dinamikleri ve yaşam süresinin ayarlanmasını içeren otokatalitik işlemlere uğraması açısından memeli kaspazlarına benzerdir.

Sonuç olarak tüm bu veriler ışığında apoptotik sürecin sadece çok hücreli organizmalarda tanımlanan bir mekanizma olmadığı aynı zamanda *S. cerevisiae* gibi maya hücrelerinde de özellikle kolonilerin hayatta kalma adaptasyonlarından biri olduğu ve ökaryotik organizmalarda hücre ölümünün gerçekleşmesi için gerekli olan faktörlerin çoğu *S. cerevisiae*'daki homologları da yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Madeo ve diğ. 2002, Carmona-Gutierrez ve diğ. 2010, Strich 2015). Böylece yüksek ökaryotlarla mayalar arasındaki evrimsel olarak korunmuş içsel apoptotik yolların maya hücrelerinde kullanımının apoptozun hala tam olarak tanımlanamayan moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır (Madeo ve diğ. 2004). İlâveten yüksek ökaryotlar ve mayalar arasındaki evrimsel süreçte yüksek derecede korunmuş apoptoz yollarının; mayalarda programlı hücre ölümüne yönelik ilaçların taranması/geliştirilmesi için güçlü bir model organizma olabileceği, antitümör ilaçların tasarımında hücrel özgüllük sorununun üstesinden gelebileceği ve insan hücreleri için önem arz etmeyen apoptotik düzenleyicilerin mantarlara özgü hedeflenen etkin antifungal ilaçların tasarımını da mümkün kılabilceği bildirilmektedir (Almeida ve diğ. 2008).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe analitik veya daha yüksek saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından elde edilmiştir.

Saccharomyces cerevisiae suşları

Vahşi tip (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0) ve sitozolik katalaz T (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 CTT1::kanMX4), tiyoredoksin-disülfid redüktaz (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 TRR2::kanMX4) ve glutatyon sentaz (MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 GSH2::kanMX4) delesyonlu mutant *S. cerevisiae* BY4741 suşları Horizon Discovery (Cambridge, Birleşik Krallık) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının rutin bakım koşulları

Vahşi tip ve tüm mutant suşların rutin pasajlamalarında, 10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 20 g/L glukoz ve 20 g/L bakteriyolojik agar içeren YPDA besi yeri (pH:5,6) kullanılmıştır. YPDA besi yerine ekimi yapılan maya suşlarının proliferasyonu için 5 gün boyunca 30 °C'de inkubasyon gerçekleştirilmiştir.

3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* suşlarının büyüme ve stres koşulları

Vahşi tip ve tüm mutant suşların büyüme ortamı olarak 10 g/L maya ekstraktı, 20 g/L pepton, 20 g/L glukoz içeren YPD besi yeri (pH:5,6) kullanılmıştır. Mutant suşların büyüme ortamına ayrıca genetisin antibiyotiği (G418), 200 mg/L

dH₂O, ilave edilmiştir. İnokulasyon, 660 nm'deki optik yoğunluğu 0,2 olan spor süspansiyonunun 10 mL'sinin 250 mL'lik erlenlerdeki 100 mL'lik besi yerine eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Maya hücreleri erken eksponansiyel faza gelince kadar 180 rpm ajitasyonda 30 °C'de inkubasyon gerçekleştirilmiştir. Erken eksponansiyel faza ulaşan maya hücrelerinin besi yerine %0,25–1 BA ve %0,05–0,25 lityum metaborat (LMB) doğrudan ilave edilmiştir. 12 ve 36 saatlik muamele periyodunun ardından biyokimyasal analizler için hücreler uygun koşullarda saklanmıştır.

3.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin proliferasyon ve metabolik aktivitelerinin belirlenmesi

Ajan uygulanmış maya popülasyonundaki büyümekte olan/prolifere olan hücrelerin yüzdelerini belirlemek amacıyla 660 nm'de spektrofotometrik absorbans okuması yapılmıştır. Hücre proliferasyonunun inhibisyon yüzdesinin belirlenmesi amacıyla kontrol için okunan absorbans değeri %100 kabul edilip ajan uygulanmış gruplardaki yüzde hesaplanmıştır.

Hücre proliferasyon yüzdelerinin yanı sıra olası metabolik değişimlerin belirlenmesi amacıyla “Cell Counting Kit-8” (CCK-8, Abbkine, Inc. Çin) test kitinden yararlanılmıştır. Testin temel prensibi, hücresel dehidrogenazlar tarafından WST-8 tuzunun (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülföfenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu) indirgenmesine ve oluşan formazan tuzunun renginin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Hücre metabolik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yaklaşık 6×10^4 hücre içeren 100 µL'lik hücre süspansiyonu kitin içeriğinde yer alan CCK-8 solusyonunun 100 µL'si ile karıştırılmış ve 3 saat 37 °C'de inkubasyon gerçekleştirilmiştir. İnkuasyon periyodunun ardından, absorbans değerleri 450 nm'de okunmuş ve hücre metabolik aktivite yüzdeleri kontrole kıyasla hesaplanmıştır.

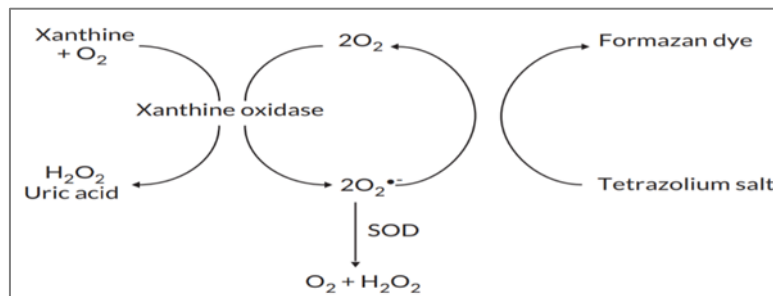
3.2.4 Biyokimyasal analizler için *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin ham ekstraktlarının hazırlanması

Maya hücre lizisi için ticari “CeLLytic Y cell lysis” reaktifi kullanılmıştır. Lizis işlemi için, maya hücreleri besi yerinden 12,000 g’de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek toplanmış ve aynı koşullar altında pH 7,4’ deki fosfat tamponlu tuz (PBS) kullanılarak 3 kez yıkanmıştır. Toplanan maya pelletinin 1 gr’ı başına 5 mL CeLLytic Y cell lysis reaktifi eklenerek hafif karıştırma ile birlikte oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkubasyon gerçekleştirilmiştir. İnkubasyon periyodunun sonunda, lizis edilen hücreler 12,000 g’de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatantlar daha ileri biyokimyasal analizler için temiz tüplere alınarak uygun koşullarda saklanmıştır.

3.2.5 Biyokimyasal Analizler

3.2.5.1 Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Kontrol ve ajan uygulanmış maya hücre süpernatantlarındaki SOD aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla kolorimetrik bir test kitinden (Cayman, Ann Arbor, Michigan) yararlanılmıştır. Testin temel prensibi, tetrazolyum tuzu (WST) ile birlikte hipoksantin ve ksantin oksidaz (XO) tarafından üretilen süperoksit radikallerinin saptanmasına dayanmaktadır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9: Süperoksit dismutaz aktivite tayininin şematik gösterimi.

Aktivite ölçümü için, 10 µl’lik maya hücre süpernatantlarına kitin içeriğinde yer alan WST ve XO solüsyonlarından sırasıyla 190 ve 20 µl eklenmiştir. Karışım, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca hafif karıştırma ile birlikte inkube edilmiştir.

İnkubasyon periyodunun ardından tüm örneklerin absorbands değerleri 450 nm’de okunmuştur. Örneklerdeki SOD aktiviteleri, standart eğrinin lineer regresyonundan elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır. 1 ünite (U) enzim aktivitesi, süperoksit anyon radikalının %50’sini sönmölemek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.5.2 Glutasyon-S-transferaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Kontrol ve ajan uygulanmış maya hücre süpernatantlarındaki GST aktivitesinin belirlenebilmesi amacıyla kolorimetrik bir test kitinden (Cayman, Ann Arbor, Michigan) yararlanılmıştır. Testin temel prensibi, GST tarafından katalizlenen reaksiyon sonucunda GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) arasındaki konjugasyon reaksiyonuna dayanmaktadır. Aktivite ölçümü için, 150 µl test tamponu, 20 µl GSH ve 20 µl maya hücre süpernatantı içeren karışıma 10 µl CDNB eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Sıfırıncı dakikadan itibaren 5 dakika boyunca her 1 dakikada 340 nm’deki absorbands değerleri kaydedilmiştir. Örneklerdeki GST aktivitesi, CDNB’nin ekstinksiyon katsayısı olan 0,00503 µM⁻¹ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. 1 ünite (U) enzim aktivitesi, 25°C’de dakika başına 1 nmol CDNB’yi GSH ile konjuge etmek için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.5.3 Membran lipit peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi

Kontrol ve ajan uygulanmış maya hücre süpernatantlarındaki lipit peroksidasyon düzeyleri Schmedes ve Hölmer (1989) tarafından geliştirilen yöntemle göre bazı ufak değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Yöntemin prensibi, lipit peroksidasyon ürünü MDA ve tiyobarbutirik asit (TBA) arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. MDA düzeylerinin tespiti için, 500 µl maya hücre süpernatantı 1250 µL, %20’lik trikloroasetik asit (TCA) ile karıştırılmış ve karışım 90°C’de 15 dakika boyunca inkube edilmiştir. İnkubasyon periyodunun sonunda, karışım 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatantlar toplanmıştır. Ardından, 1000 µl süpernatant ile 1000 µL, 0,02 M sulu TBA solüsyonu karıştırılarak 90°C’de 15 dakika boyunca inkube edilmiştir. İnkubasyon periyodunun sonunda MDA-TBA

ürününün absorbandsı 532 nm'de kaydedilmiştir. Lipit peroksidasyon düzeyleri, MDA'nın ekstinksiyon katsayısı olan $1,56 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ değeri kullanılarak gr maya hücresi başına mM MDA olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.4 Toplam protein seviyelerinin belirlenmesi

Maya hücre süpernatanlarındaki total protein miktarının belirlenebilmesi amacıyla Bradford (1976) metodundan yararlanılmıştır. Total protein miktarının belirlenebilmesi amacıyla 100 µl süpernatan 900 µl Bradford reaktifi ile karıştırılarak 2 dakikalık oda sıcaklığındaki inkubasyondan sonra 595 nm'de köre karşı absorbands ölçümü yapılmıştır. Sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılmıştır. Örneklerdeki total protein miktarları standart eğrisinin lineer regresyonundan elde edilen denklem kullanılarak ml örnek başına mg protein olarak hesaplanmıştır.

3.2.5.5 Taramalı elektron mikroskobu analizi (SEM)

Kontrol ve ajan uygulanmış maya hücrelerinin yüzey morfolojisinde meydana gelen değişimler taramalı elektron mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir (Liu ve diğ. 2010). Yöntemde, ilk olarak 3×10^7 hücre/ml yoğunluğunda hücre içeren 50 µl süspansiyon, poli-L-lizin ile kaplı lamellere yerleştirilmiş ve 40 dakika süre ile havada kurutulmuştur. Ardından, hücreler %2,5'lük glutaraldehit çözeltisi ile 7 saat boyunca fikse edilmiştir. Yıkama adımını takiben hücrelerin suyu, %30, 50, 70 ve 95'lik kademeli etanol serilerinde 1 kez ve %100'lük etanolde 2 kez yapılan 20 dakikalık inkubasyonlar ile uzaklaştırılmıştır. Tekrar havada kurutulan hücreler önce altın-paladyum parçacıkları ile püskürtme ile kaplanmış ve ardından 15,00 K X büyütmede görüntülenmişlerdir.

3.2.5.6 *YCA1*, *AIF1*, *NDII*, *NUC1*, *BIR1* ve *NMA111* Genlerinin Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

3.2.5.6.1 Primer Dizaynı:

YCA1, *AIF1*, *NDII*, *NUC1*, *BIR1* ve *NMA111* genlerinin relatif kantitasyonunda kullanılan primerler, *S. cerevisiae* türüne özgü olacak şekilde National Center for Biotechnology Information (NCBI)'dan elde edilen sekans verileri kullanılarak Primer3 programı ile ticari olarak satın alındıkları firma tarafından dizayn edilmiştir. Dizayn edilen primerlerin spesifikliği Blast ile kontrol edilmiştir. Primerler, PCR saflıkta su ile sulandırılarak 100 µM'lık stok solüsyonları hazırlanmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizileri Tablo 3.3'te verilmiştir. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için Aktin (*ACT1*) geni housekeeping gen olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.3: Primer dizileri, erime sıcaklıkları ve guanin-sitozin yüzdeleri.

Gen	Baz Dizisi (5' → 3')	Tm (°C)	%GC
<i>YCA1</i>	F: ATAATGGCTACCAACGGCCC	59	55
	R: TAAGCCATAGGGGGAGGACC	61	60
<i>AIF1</i>	F: TACTGCCGGACTCTGGGTTA	59	55
	R: AATACGTTTCGGCGAGGTGT	57	50
<i>NDII</i>	F: AGCTCTGCCCATCGTTTTGA	57	50
	R: CTTCAACTTTGGCGACAGCC	59	55
<i>NUC1</i>	F: ATGATCGAGGCCATCAAGCC	59	55
	R: AGTACTCCAAATGCGCCCAA	57	50
<i>BIR1</i>	F: GGCCTCACAGTGGTTCTCAA	59	55
	R: GCTGGAGTCGTATCGCATGA	59	55
<i>NMA111</i>	F: TTTGGCTAAGGTCGGCTCAG	59	55
	R: AACCACTTGAACCGCCAGAA	57	50
<i>ACT1</i>	F: TCGCCTTGGACTTCGAACAA	57	50
	R: CAAAGCTTCTGGGGCTCTGA	59	55

3.2.5.6.2 RNA İzolasyonu:

Kontrol ve ajan uygulanmış maya hücrelerinden total RNA izolasyonu için “GeneAll Hybrid-RTM total RNA purification kit” (Seoul, Korea) kullanılmış ve kitteki prosedür takip edilmiştir. İşlem basamakları aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. 10^7 hücre, kitin içeriğinde yer alan RiboEx solüsyonu ile vortekslenerek homojenize edilmiş ve 5 dakika süre ile oda sıcaklığında inkubasyon gerçekleştirilmiştir.
2. İnkubasyon işleminin ardından homojenat 12,000 g ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatantlar toplanmıştır.
3. 1 ml süpernatant başına 200 μl kloroform eklenmiş ve kuvvetlice 15 saniye süre ile çalkalandıktan sonra 2 dakika oda sıcaklığında tutulmuştur.
4. Karışım, 12,000 g ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek üstteki sulu faz temiz bir tüpe alınmıştır.
5. Toplanan sulu fazla aynı hacimde olacak şekilde kitin içeriğinde yer alan RBI tamponu eklenmiş ve tamamen ters çevrilerek karıştırılmıştır.
6. Karışımın tamamı, 700 μl 'lik kısımlar halinde, 10,000 g ve oda sıcaklığındaki 30 saniyelik santrifüjle kitin içeriğinde yer alan mini spin kolonundan geçirilmiştir.
7. Örneğin tamamı, mini spin kolonundan geçirildikten sonra aynı kolona kitin içeriğinde yer alan SWI tamponundan 500 μl eklenmiş ve yine aynı koşullarda santrifüjlenmiştir.

8. Santrifüj işleminin ardından mini spin kolonuna kitin içeriğinde yer alan RNW tamponundan 500 µl eklenmiş ve tekrar aynı koşullarda santrifüjlenmiştir.
9. Mini spin kolonunda geriye kalan yıkama tamponlarını uzaklaştırabilmek için 10,000 g ve oda sıcaklığındaki 1 dakikalık santrifüj işlemi yapılmıştır.
10. Mini spin kolonuna tutunmuş total RNA'ların elusyonu için kolonun merkezine 75 µl "RNase free water" eklenerek 1 dakika süreyle beklenmiştir.
11. 10,000 g ve oda sıcaklığındaki 1 dakikalık santrifüj işlemi ile RNA izolasyonu tamamlanmıştır.

3.2.5.6.3 cDNA Sentezi:

İzole edilen RNA örneklerinden cDNA sentezi için "VitaScript FirstStrand cDNA Synthesis Kit" (Procomcure, Thalgau, Avusturya) kullanılmış ve kitteki prosedür takip edilmiştir. Aşağıdaki Tablo 3.4'te reaksiyon karışımının içeriği verilmiştir.

Tablo 3.4: cDNA sentezi için reaksiyon ortamının bileşen ve hacimleri.

Bileşen	Hacim (µl)
5X VS Reaction Buffer (Kitin bileşeni)	4
VitaScript Enzyme Mix (Kitin bileşeni)	1
Total RNA	3
Nuclease-free dH ₂ O (Kitin bileşeni)	12
Toplam Hacim	20

20 µl'lik reaksiyon karışımı 42 °C'de 1 saat süreyle inkube edilmiştir. Ardından 80 °C'de 10 dakikalık ters transkriptaz inaktivasyonundan sonra reaksiyon karışımı 200 µl'ye "Nuclease-free dH₂O" ile seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.5.6.4 RT-PCR:

RT-PCR analizi için “2X Magic SYBR Mix” (Procomcure, Thalga, Avusturya) kullanılmış ve kitteki prosedür takip edilmiştir. Reaksiyon karışımının içeriği ve RT-PCR protokolü sırasıyla Tablo 3.5 ve 3.6’de verilmiştir. (Kullanılan primerlerin dizileri yukarıdaki Tablo 3.3’ de verilmiştir). RT-PCR ürünlerinin saflık kontrolü için erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanılmıştır.

Tablo 3.5: RT-PCR için reaksiyon ortamının bileşen, hacim ve son derişimleri.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Derişim
2X Magic SYBR Mix (Kitin bileşeni)	10	X
cDNA	1,5	
Forward primer (10 µM)	0,4	0,2 µM
Reverse primer (10 µM)	0,4	0,2 µM
Nuclease-free dH ₂ O	7,7	
Toplam Hacim	20	

Tablo 3.6: RT-PCR protokolü.

Basamak	Döngü	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	1	95 °C	5 dakika
		95 °C	10 saniye
Amplifikasyon	40	55-60 °C	15 saniye
		72 °C	20 saniye
Uzama	1	72 °C	2 dakika

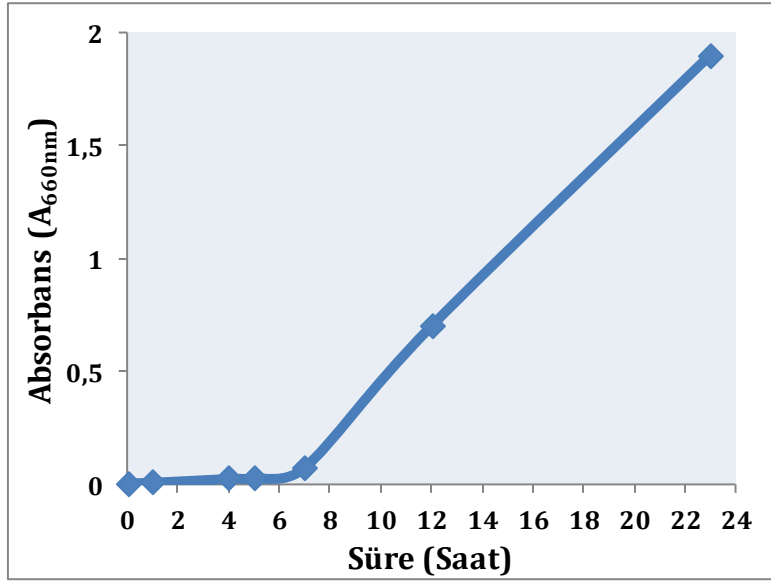
3.2.6 İstatistiksel Analiz:

Veriler, üç değerin ortalama±S.E.M olarak sunulmuştur. Varyanstaki farklılıklar, GraphPad Prism 6.0 istatistik yazılımı (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Tukey testi *post hoc* olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Vahşi Tip ve Mutant *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Suşlarının Büyüme Eğrisi

Sunulan tez çalışması kapsamında, vahşi tip ve mutant *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerinin büyüme ortamı olarak YPD besi yeri (pH: 5,6) kullanılmış ve 180 rpm ajitasyonda 30⁰C’de inkubasyon gerçekleştirilmiştir. Mutant hücrelerin büyüme ortamına ayrıca 200 mg/L derişiminde genetisin antibiyotiği ilave edilmiştir. Vahşi tip ve mutant suşların yaklaşık 24 saat süreyle izlenen büyüme eğrilerinde herhangi bir fark görülmemiş olup tüm BY4741 suşları için ortak büyüme eğrisi aşağıdaki Şekil 4.10’da verilmiştir.



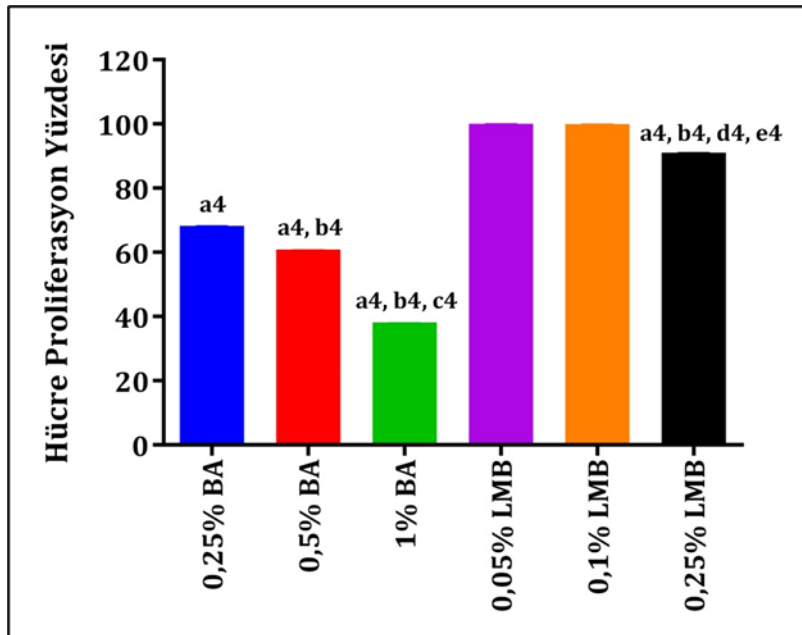
Şekil 4.10: *S. cerevisiae* mayasının büyüme eğrisi.

Maya hücreleri erken eksponansiyel fazlarına ulaştığında (OD_{660nm} = 0,4-0,6) besi yerlerine değişen derişimlerde BA ve LMB eklenerek 12 ve 36 saat süreyle inkubasyona devam edilmiştir.

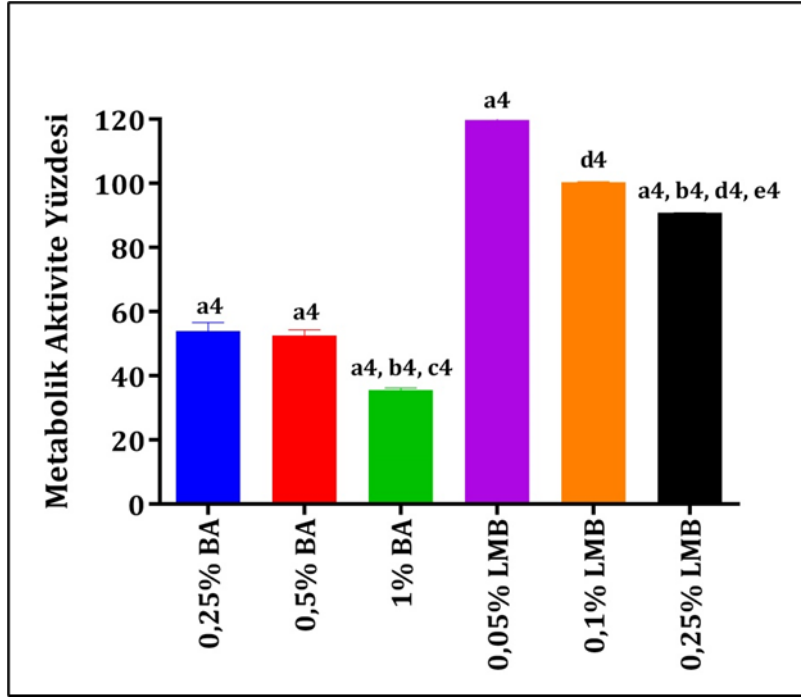
4.2 Vahşi Tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Hücre Canlılığı ve Metabolik Aktivitesi Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri

BA ve LMB'nin vahşi tip maya hücresi üzerindeki olası toksik etkileri incelemek için, hücreler erken exponansiyal faza ulaştıklarında besi yerlerine sırasıyla %0,25-1 ve %0,05–0,25 konstrasyonlarındaki ajanlar uygulanmıştır. BA dozları daha önce yayınlanmış literatür verileri temel alınarak seçilmiştir (Schmidt ve diğ. 2010). Diğer yandan LMB konsantrasyonlarına, daha önce yapılan çalışmaların olmaması sebebiyle kullanılan maya büyüme ortamındaki çözünürlüğü dikkate alınarak karar verilmiştir. LMB, %0,25'ten daha yüksek konsantrasyonlarda YPD'de çözünmemiştir.

Şekil 4.11 ve 4.12'de BA ve LMB'nin yukarıda belirtilen değişen derişimlerine 12 saat süreyle maruz kalan maya hücrelerinin sırasıyla kontrole kıyasla yüzde proliferasyonları ve metabolik aktiviteleri verilmiştir.



Şekil 4.11: Değişen derişimlerde BA ve LMB'nin vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. Hücre proliferasyon yüzdesi kontrole kıyasla hesaplanmıştır. Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre; a, kontrol ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($a4p < 0,0001$); b, %0,25 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($b4p < 0,0001$); c, %0,5 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($c4p < 0,0001$); d, %0,05 LMB ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($d4p < 0,0001$); e, %0,1 LMB ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($e4p < 0,0001$) göstermektedir.



Şekil 4.12: Değişen derişimlerde BA ve LMB'nin vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 hücre metabolik aktivitesi üzerindeki etkileri. Hücre metabolik aktivitesi kontrole kıyasla hesaplanmıştır. Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre; a, kontrol ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{a4}p<0,0001$); b, %0,25 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{b4}p<0,0001$); c, %0,5 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{c4}p<0,0001$); d, %0,05 LMB ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{d4}p<0,0001$); e, %0,1 LMB ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{e4}p<0,0001$) göstermektedir.

Elde edilen sonuçlara göre, 12 saatlik uygulama sonucu %0,25 BA'nın aynı konsantrasyondaki LMB'den daha toksik olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Ek olarak, BA'nın farklı konsantrasyonlarının muamele edildiği gruplar arasında hücre canlılıkta önemli farklılıklara neden olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,0001$). %0,05 ve 0,1 LMB uygulanmış gruplar ile LMB uygulanmamış kontrol grubu arasında hücre büyümesinde kayda değer bir fark tespit edilmemiştir. %0,25 LMB muamelesi ise maya hücre büyümesi ve metabolik aktiviteyi sırasıyla kontrolün $91,07\pm 0,11$ ve $90,81\pm 0,09$ 'una olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşürmüştür ($p<0,0001$). Şaşırtıcı şekilde %0,05 LMB'nin *S. cerevisiae* hücrelerinin metabolik aktivitesini önemli ölçüde indüklediği gözlemlenmiştir ($p<0,0001$).

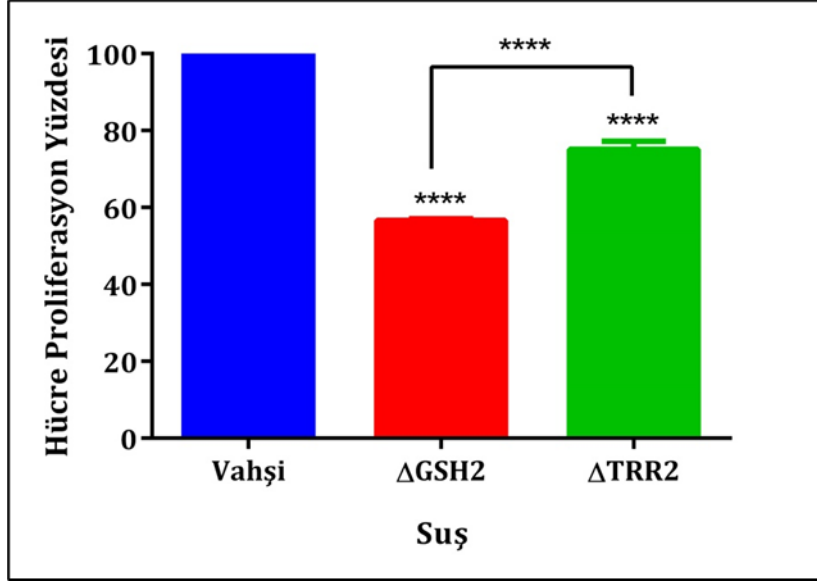
S. cerevisiae BY4741 hücreleri BA ve LMB'ye 36 saat süre ile maruz kaldıklarında ajanların toksik etkisinde herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. Aksine, %0,25 ve 0,5 BA uygulanmış örneklerin kontrol grubuna kıyasla proliferasyon

yüzdelerinde 12. saate kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı artışlar belirlenmiştir ($p < 0,0001$). Dolayısıyla maya hücrelerinin BA'in göreceli daha düşük derişimlerine muamele periyodunun uzaması ile birlikte direnç geliştirdiği söylenebilir.

4.3 Sitozolik Katalaz T, Tiyoredoksin-Disülfid Redüktaz ve Glutatyon Sentaz Enzimlerinin Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri Üzerindeki Potansiyel Koruyucu Özelliklerinin Delesyonlu Mutant Suşlar Kullanılarak Araştırılması

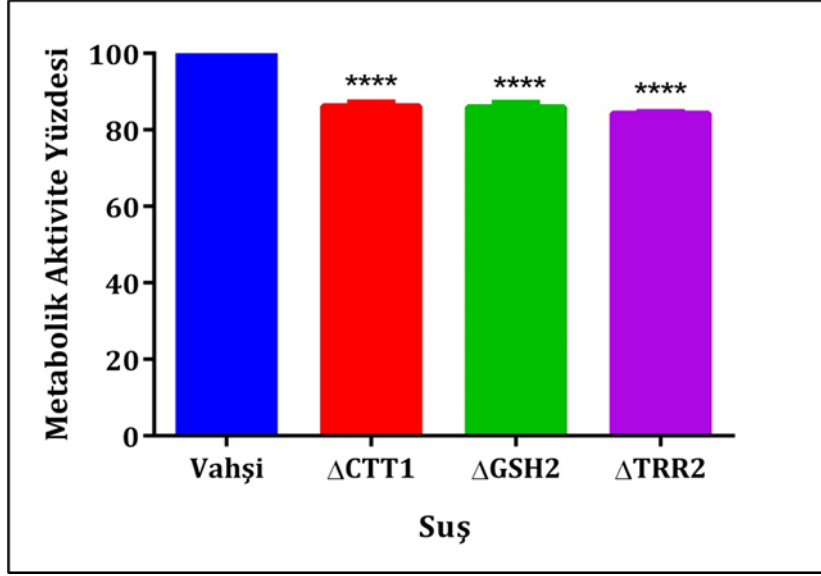
BA ve LMB'nin vahşi BY4741 suşunun canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinin ardından önemli antioksidan savunma sistemlerinden olan sitozolik CATT, TrxR ve GSS bu ajanlara karşı olası koruyucu etkileri söz konusu enzimleri ekspresse eden gen bölgelerinin silindiği delesyonlu mutantlar (sırasıyla $\Delta CTT1$, $\Delta TRR2$ ve $\Delta GSH2$ mutantları) kullanılarak araştırılmıştır. *CTT1*'in, H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif hasara karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir (Grant ve diğ. 1998). TRR2, mitokondriyal tiyoredoksin redüktaz olup yine hücrenin oksidatif strese karşı korunmasında etkilidir (Pedrajas ve diğ. 1999; Trotter ve Grant 2005; Byrne ve Wolfe 2005). GSH2 ise, oksidatif stres ve ısıl şok gibi koşullara maruziyet sonucunda hücrede indüklenen ve en önemli non-enzimatik antioksidatif savunma faktörlerinden biri olan GSH sentezini katalizler (Inoue ve diğ. 1998; Grant ve diğ. 1997; Sugiyama ve diğ. 2000).

Sunulan tez çalışması kapsamında, hücre proliferasyon ve metabolik aktivite testleri vahşi suş ile yürütülen koşullar altında belirtilen 3 mutant suş ile de tekrarlanmış olup sonuçlar vahşi tip ile kıyaslanarak bu enzimlerin BA ve LMB'nin maya hücresi üzerindeki etkileri üzerinde herhangi bir koruyucu rollerinin olup olmadığına dair bir yorum getirilmiştir. Gerek hücre proliferasyonu ve gerekse metabolik aktivite açısından istatistiksel olarak tek anlamlı sonuç %0,25 LMB uygulanan hücrelerde belirlenmiş olup bu sonuçlar aşağıdaki Şekil 4.13 ve Şekil 4.14' de sunulmuştur.



Şekil 4.13: Vahşi suşa kıyasla $\Delta GSH2$ ve $\Delta TRR2$ mutantlarının 12 saatlik %0,25 LMB uygulaması sonucu proliferasyon yüzdeleri (Vahşi suşun proliferasyonu %100 kabul edilerek hesaplamalar yapılmıştır). Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre ****p <0,0001 vahşi suş grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir.

Yukarıdaki Şekil 4.13' den görüleceği üzere, 12 saat süre ile %0,25 LMB uygulanmış örneklerde, vahşi suşa kıyasla $\Delta GSH2$ ve $\Delta TRR2$ suşlarının hücre proliferasyon yüzdeleri sırasıyla yaklaşık %57 ve 75'e anlamlı olarak düşmüştür. Bu durum her iki enzimin LMB muamelesine karşı maya hücrelerini koruyucu rollerinin olduğunu göstermektedir. Ayrıca iki mutantın hücre proliferasyon yüzdeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir. Dolayısıyla GSS koruyucu etkisinin TrxR enziminden daha baskın olduğu belirtilebilir.



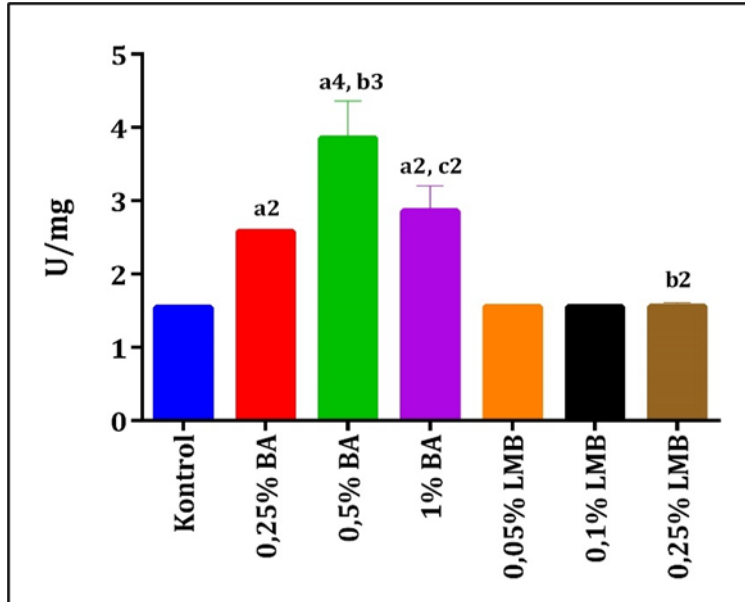
Şekil 4.14: Vahşi suşa kıyasla $\Delta CTT1$, $\Delta GSH2$ ve $\Delta TRR2$ mutantlarının 12 saatlik %0,25 LMB uygulaması sonucu metabolik aktivite yüzdeleri (Vahşi suşun metabolik aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplamaları yapılmıştır). Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre ****p <0,0001 vahşi suş grubu ile diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı göstermektedir.

12 saat süre ile %0,25 LMB uygulanmış örneklerde, vahşi suşa kıyasla $\Delta CTT1$, $\Delta GSH2$ ve $\Delta TRR2$ mutantlarının metabolik aktivite yüzdeleri ise Şekil 4.14' de sunulmuştur. Bu mutantların metabolik aktivite yüzdeleri aralarında anlamlı fark olmaksızın yaklaşık %85 olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu enzimlerin, hücre proliferasyonunun aksine maya metabolik aktivite hızını benzer şekilde etkilediği söylenebilir.

4.4 Vahşi Tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Superoksit Dismutaz ve Glutasyon-S-transferaz Enzim Aktiviteleri Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri

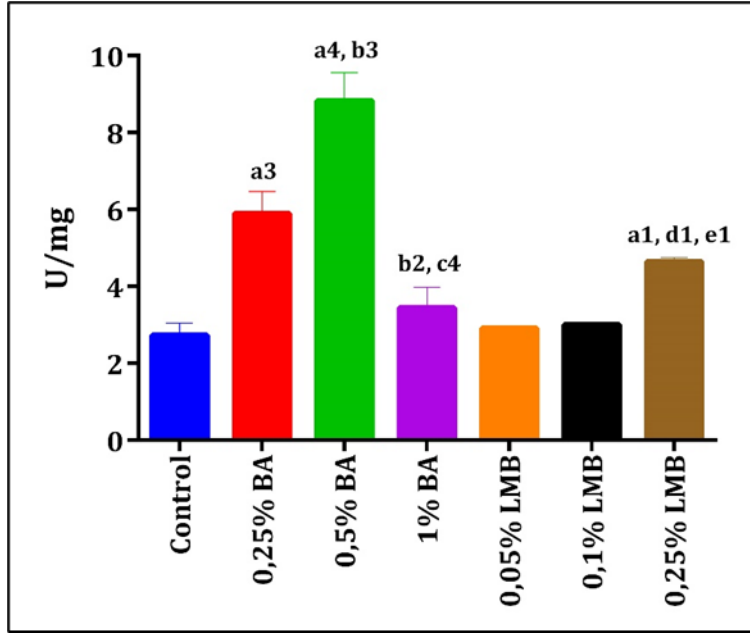
Daha önce bahsedildiği gibi canlı sistemler; hücrelerde aşırı/istenmeyen ROS'nin elimine edildiği ve endojen/ekzojen kimyasalların detoksifiye edildiği enzimatik/enzimatik olmayan molekülleri içeren çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptirler. Sunulan tez çalışması kapsamında, BA ve LMB'nin superoksit radikalının ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşümünü katalizleyen ve ROS süpürücü enzimlerden biri olan SOD enzimi üzerindeki etkileri ele alınmıştır. Aynı zamanda GST enziminin aktivitesindeki değişimler de irdelenmiştir. GST, faz 2

detoksifikasyon enzimleri arasındadır ve GSH'nin çeşitli elektrofilik bileşiklere konjugasyonunu katalizlemektedir (Townsend ve Tew 2003). Çoğu ökaryotlar gibi tek hücreli ökaryotik mayalarda da bol bulunan Cu,Zn-SOD1 ve yalnızca mitokondriyel matrikse lokalize Mn içeren SOD2 gibi iki SOD izoformu bulunmaktadır (McCord ve Fridovich 1969; Weisiger ve Fridovich 1973; Perrone ve diğ. 2008; Montllor-Albalateve diğ. 2019). Diğer yandan, sitoplazma, mitokondri ve çekirdekte lokalize olan glutaredoksinler ve sitoplazmik transkripsiyonel düzenleyici Ure2'lerin mayada GST aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (Rai ve Cooper 2005). Total maya hücre fraksiyonlarında SOD ve GST aktiviteleri sırasıyla Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da sunulmuştur. Görüldüğü gibi BA'nın %0,5'e kadar olan konsantrasyonları SOD ve GST aktivitelerini kademeli olarak indüklemiştir. %1 BA ile muamele edilen grupta her iki enzim aktivitesi de kontrol grubundan daha yüksektir. Elde edilen sonuçlar, indüksiyonların BA temelli oksidatif strese cevaben enzimatik savunma tepkisinin bir sonucu olduğu ancak BA'nın yüksek konsantrasyonlarında hücre sel direncin azaldığını göstermektedir. Ayrıca LMB muamelesi ile enzim aktivitesinde herhangi anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrol grubuna kıyasla tek anlamlı indüksiyon %0,25 LMB muamele edilmiş grubun GST aktivitesi için kaydedilmiştir.



Şekil 4.15: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 SOD aktivitesi üzerindeki etkileri. Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre; a, kontrol ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($a^2p < 0,01$; $a^4p < 0,0001$); b, %0,25 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı

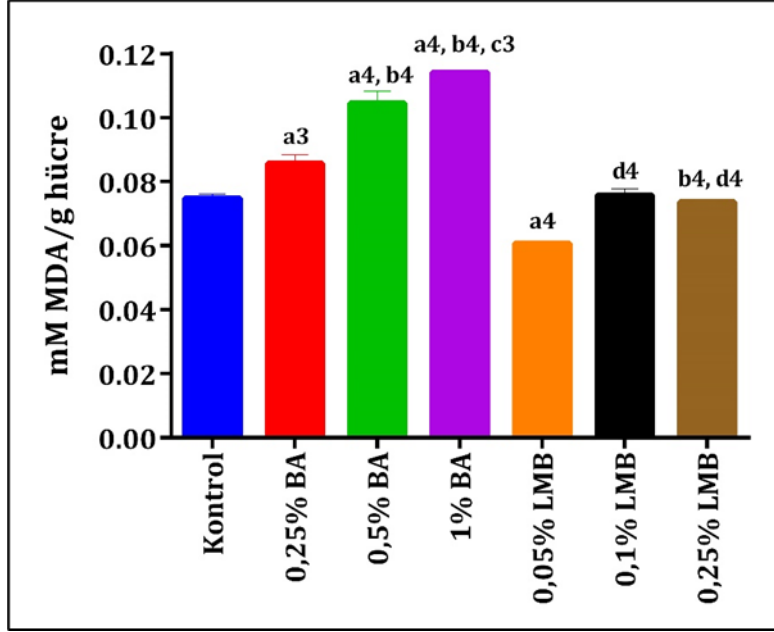
farkı ($b^2p < 0,01$; $b^3p < 0,001$); c, %0,5 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($c^2p < 0,01$) göstermektedir.



Şekil 4.16: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 GST aktivitesi üzerindeki etkileri. Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre; a, kontrol ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($a2p < 0,01$; $a4p < 0,0001$); b, %0,25 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($b2p < 0,01$; $b3p < 0,001$); c, %0,5 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($c2p < 0,01$) göstermektedir.

4.5 Vahşi Tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Malondialdehit Düzeyleri Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri

Lipit peroksidasyonu yüksek ROS seviyelerinden kaynaklanan temel oksidatif stres belirteçlerinden biridir. Sunulan tez çalışmasında, MDA seviyeleri LPO indeksi olarak ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 4.17’de sunulmuştur.

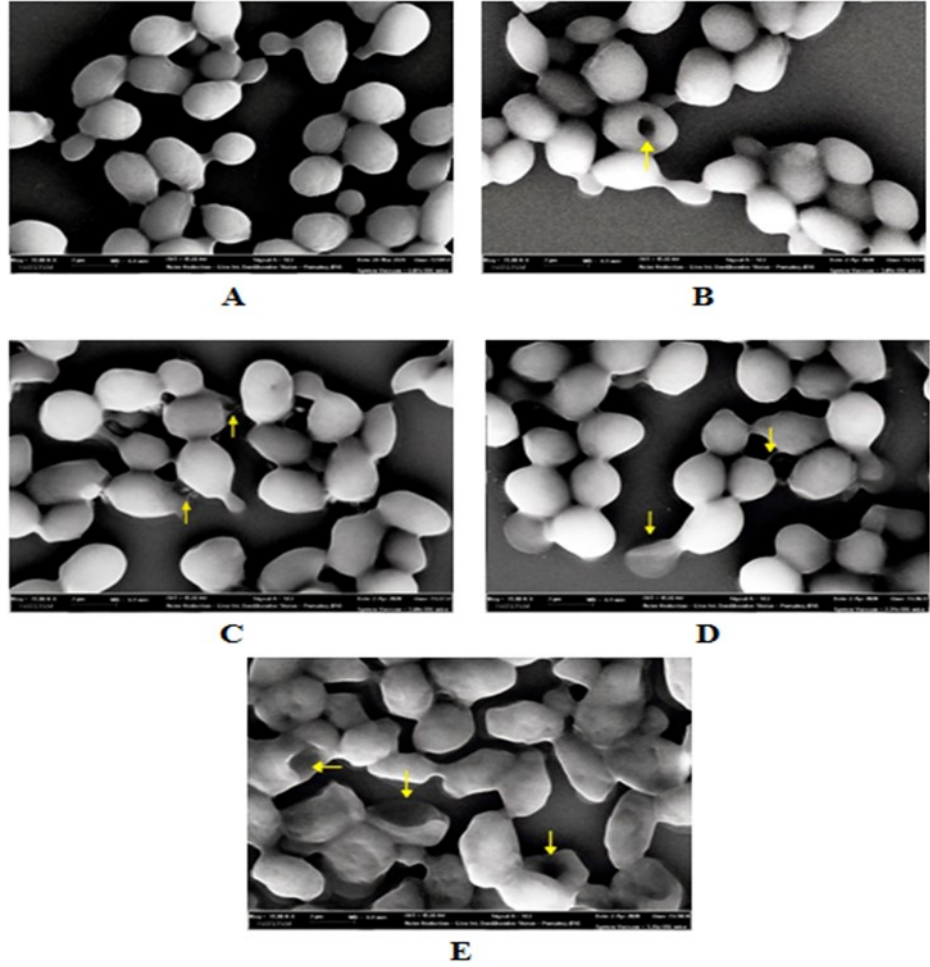


Şekil 4.17: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 MDA düzeyleri üzerindeki etkileri. Hata çubuklu veriler, 3 tekrarlı deneyin ortalaması \pm S.E.M olarak verilmiştir. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre; a, kontrol ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{a3}p < 0,001$; $^{a4}p < 0,0001$); b, %0,25 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{b4}p < 0,0001$); c, %0,5 BA ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{c3}p < 0,001$); d, %0,05 LMB ve diğer gruplar arasındaki anlamlı farkı ($^{d4}p < 0,0001$) göstermektedir.

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi tüm BA muameleleri *S. cerevisiae* hücrelerinin MDA seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlara sebep olmuştur. Ayrıca artan BA konsantrasyonları ile MDA düzeylerinde meydana gelen artışlar da anlamlıdır. %0-1 BA ile muamele edilen maya hücrelerinin MDA seviyeleri ve SOD aktiviteleri arasında orta düzeyde bir korelasyon bulunmuştur ($r = 0,757$). %0,1 ve 0,25 LMB uygulanan grupların MDA düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken %0,05 LMB uygulanan gruptaki MDA seviyesinin kontrol grubundaki değerden anlamlı olarak düşük olması bu maddenin düşük konsantrasyonda antioksidan etki gösterebileceğini yansıtmaktadır.

4.6 Vahşi Tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Hücre Morfolojisi Üzerine Borik Asit ve Lityum Metaboratın Etkileri

BA ve LMB muamelesinden kaynaklanan *S. cerevisiae*'ya ait yüzey morfolojisindeki muhtemel değişiklikler Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.18'de sunulmuştur. Kontrol grubu incelendiğinde, haploid BY4741 maya suşunun morfolojik bütünlüğün bir göstergesi olarak tipik küresel biçim ile pürüzsüz ve sağlam bir yüzey sergilediği görülebilir. Ayrıca hücreler tomurcuklanarak çoğaldıkları için gelişen yeni tomurcuklar ve yavru hücreler kolaylıkla görülebilmektedir. Öte yandan, BA muamelesi sonrası hücre şeklindeki kademeli deformasyonlar ve sayıca azalmalar bu bileşiğin *S. cerevisiae* hücreleri üzerindeki toksisitesinin mikroskobik belirtileri olarak sayılabilir. %0,25'lik BA ile muamele edilen grupta hücre yüzeyinde oyuklar gözlenmiştir. Ayrıca hücresel hasarlar daha yüksek BA konsantrasyonlarında belirginleşmiştir. %0,05 ve %0,1 LMB ile muamele edilen *S. cerevisiae* hücrelerinin yüzey morfolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiş olup bu görüntüler şekilde sunulmamıştır. %0,25 LMB ile muamele edilen maya hücrelerinde oyuk oluşumunu içeren radikal değişiklikler ile düz ve buruşuk morfoloji kaydedilmiştir.



Şekil 4.18: Vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerinin BA ve LMB uygulamaları öncesi ve sonrası taramalı elektron mikrografleri (15K X büyütme) A) Kontrol grubu; B) 0,25% BA grubu; C) 0,5% BA grubu; D) 1% BA grubu; E) 0,25% LMB grubu.

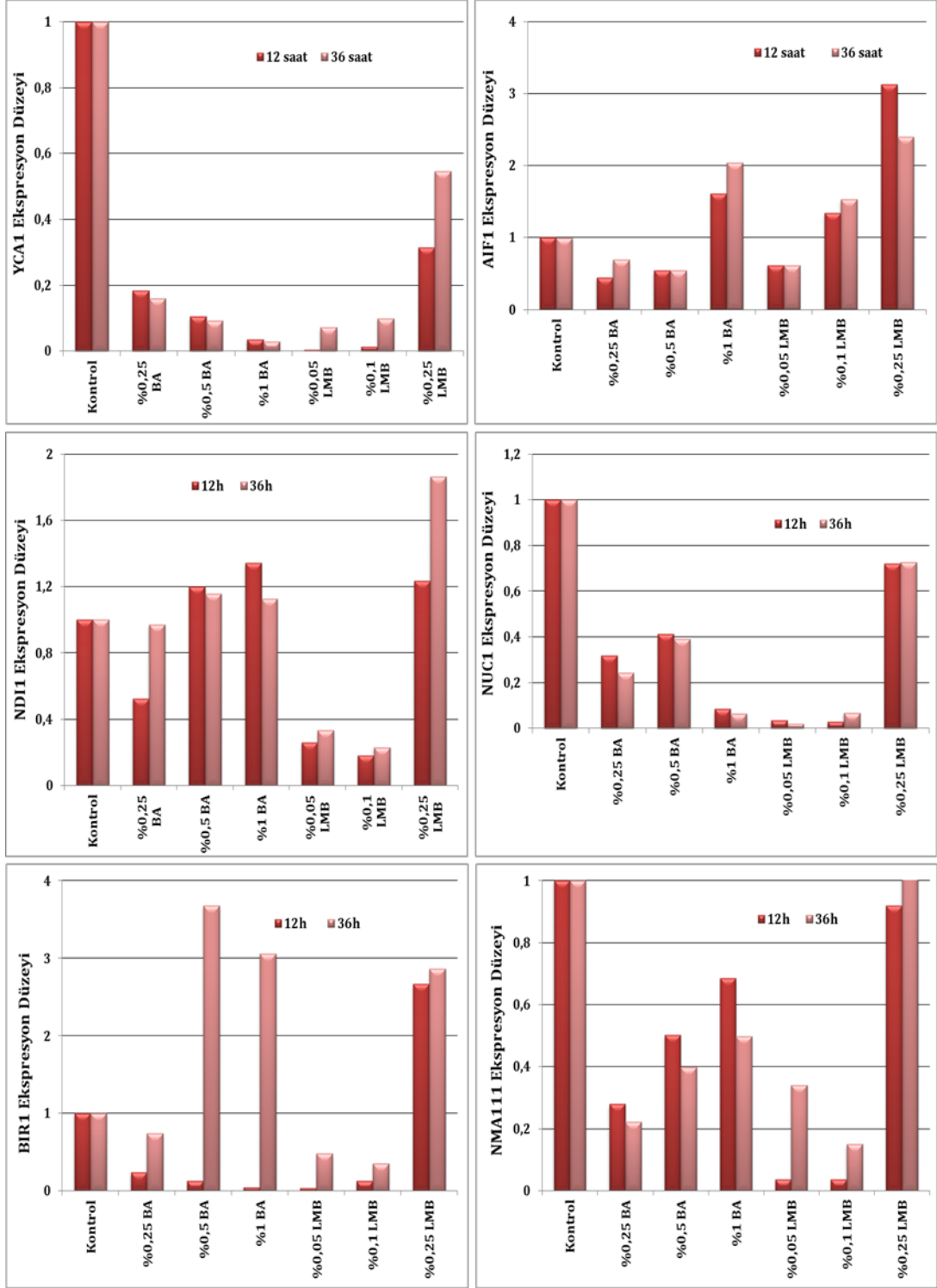
4.7 Borik Asit ve Lityum Metaborata Maruz Kalan Vahşi Tip *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölüm Belirteçlerinden *YCA1*, *AIF1*, *NDI1*, *NUC1*, *BIR1* ve *NMA111* Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-PCR ile Belirlenmesi

Sunulan tez çalışması kapsamında BA ve LMB'ye maruz kalan vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 hücrelerinde apoptotik hücre ölümünde rol oynayan önemli bazı genlerin ekspresyon düzeyleri RT-PCR ile incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.19'da sunulmuştur.

Yca1p, Ca²⁺ bağımlı bir sistein proteaz olup çeşitli uyarıcılar karşısında indüklendiğinde spesifik hücresel substratları hidrolizleyerek yıkıma uğratabilir.

Bununla birlikte gerek BA ve gerekse LMB uygulamaları sonucu bu proteinin ekspresyonundan sorumlu *YCA1* geninin seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla baskılandığı belirlenmiştir. BA derişimi arttıkça bu baskılanmanın düzeyi artarken, LMB derişimi arttıkça azaldığı görülmüştür. Ancak, genel olarak bu proteinin BA ve yüksek derişimdeki LMB indüklü toksisitede rol oynamadığı belirtilebilir.

Ekspresyon düzeyleri araştırılan genlerden diğer ikisi *AIF1* ve *NUC1* olup, her iki genin ekspresse ettiği Aif1p ve Nuc1p apoptotik bir stimulasyona cevaben mitokondriden çekirdeğe transloke olmakta ve DNA'yı degradasyona uğratmaktadırlar. Dolayısıyla hücrelerde kaspaz enzimlerinden bağımsız olarak apoptotik yolağı indüklemektedirler. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, %1 BA ile %0,1-0,25 LMB uygulamaları sonucunda *AIF1* ekspresyon seviyelerinde kontrole kıyasla artışlar belirlenmiştir. Bu nedenle ajanların ancak yüksek derişimlerinde *AIF1* geninin ekspresyonunun indüklendiği sonucuna varılmıştır. Diğer yandan, *NUC1* geninin ekspresyon seviyeleri çalışılan tüm gruplarda kontrolün altında olup baskılandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.19: Değişen derişimlerde BA ve LMB uygulamalarının vahşi tip *S. cerevisiae* BY4741 apoptotik genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkileri. Tüm sonuçlar 3 tekrarlı deneyin ortalaması olarak verilmiştir.

BA ve LMB uygulamalarına bağlı olarak ekspresyon düzeyleri araştırılan diğer genler *ND11*, *NMA111* ve *BIR1*'dir. Bir oksidoredüktaz olan Ndi1p'yi ekspresse eden *ND11* geninin ekspresyonu, ajanların çalışılan yüksek derişimlerinde kontrol

grubunun üzerinde bulunmuştur. Bir1 proteininin henüz bilinmeyen mekanizma(lar) üzerinden anti-apoptotik fonksiyon sergilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, *BIR1* geninden yoksun mutant suşların, kromatin kondenzasyonu ve fragmentasyonu, DNA tek zincir kırıkları ve hücrede ROS birikimi gibi apoptozun tipik özelliklerini sergilediğini; Bir1p proteininin aşırı ekspresyonunun ise H₂O₂ muamelesi ya da kronolojik yaşlanma sırasında indüklenen apoptotik ölüme karşı hücreyi koruduğunu göstermiştir (Walter ve diğ. 2006; Owsianowski ve diğ. 2008). Diğer yandan Nma111p proteini ise Bir1p proteininin proteolizi sayesinde apoptotik hücre ölümünü destekler (Fahrenkrog ve diğ. 2004). Elde edilen sonuçlar irdelendiğinde *NMA111* geninin ekspresyon düzeylerinde kontrole kıyasla herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. %0,5 ve 1'lik BA uygulamalarının 36. saatinde ise *BIR1* geninin ekspresyonu kontrole kıyasla anlamlı artışlar göstermiştir. Yine benzer şekilde çalışılan en yüksek derişim için LMB uygulamasının her iki saatinde bu genin ekspresyon düzeylerinin kontrole kıyasla anlamlı olarak arttığı kaydedilmiştir. Özellikle uzayan inkubasyon süresine bağlı olarak maya hücrelerinin söz konusu ajanlara gösterdiği direnç, bu antiapoptotik genin ekspresyonlarındaki artış ile ilişkilendirilebilir.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tercihen oksijen ile bağ yapan ve doğada elementel formda bulunmayan metaloid B, çeşitli süreçlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Oksijen ile yaptıkları bağlar sayesinde ya kristal borat mineralleri ya da doğal olarak oluşan BA formu halinde bulunabilmektedirler (Briggs 2000; Bolanos ve diğ. 2004). Sunulan tez çalışmasında ele alınan iki türeviden biri olan ve fizyolojik pH'ta temel hal olduğu bilinen BA'e çok sayıda farklı yaşam formu düşük miktarlarda ihtiyaç duymaktadır. Biyolojik önemi dışında BA ve tuzları yaygın olarak fiberglas, seramik sırlar ve borosilikat camların üretimi gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanım alanı bulmuşlardır (Höpfl ve diğ. 2003). Bu bileşikler yüksek dozlarda mikrobiyal büyümeyi engelledikleri için antiseptik, bakterisit, temizlik maddeleri ve gıda koruyucuları olarak kullanılmaktadırlar (Uluisik ve diğ. 2018). Diğer yandan BA'nın mikroorganizmalar özellikle de maya hücreleri üzerindeki etkileri henüz belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmada, BA ve lityum tuzu LMB'nin hücre canlılığı, antioksidan savunma sistemi, MDA seviyeleri, maya hücre yüzey morfolojisi ve bazı pro- ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerindeki doza bağımlı etkileri incelenmiştir. Yapılan literatür taramasına göre, maya hücre iskeleti BA'in doğrudan veya dolaylı hedefi gibi görünmekte iken LMB'nin etkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır (Schmidt ve diğ. 2010; Pointer ve diğ. 2015). Çalışılan tüm BA konsantrasyonlarının *S. cerevisiae* BY4741 suşuna karşı toksik özellik göstermesi daha önce yapılan maya türü mantarlar üzerindeki in vitro araştırmaları destekler niteliktedir (Schmidt ve diğ. 2010; Beach ve diğ. 2016). Ancak en yüksek LMB konsantrasyonunun maya hücre canlılığını etkin şekilde engelleyemediği ve düşük konsantrasyonlarının maya hücre metabolik aktivitesini indüklediği bulunmuştur. *S. cerevisiae* B bileşiklerine karşı toleranslı bir suş olarak kabul edildiğinden, daha yüksek LMB konsantrasyonlarının hem BY4741 hem de diğer maya suşları üzerindeki muhtemel büyüme engelleyici özellikleri araştırılmalıdır. Değişen BA derişimleri ile muamele edilmiş maya hücrelerinin kontrol grubuna kıyasla SOD ve GST enzim aktivitelerinde gözlemlenen artış, B bileşiklerine karşı maya bileşenlerinin tepki mekanizması olarak yorumlanabilir. Çalışılan konsantrasyon aralığında MDA seviyeleri ile korele olarak artan SOD

aktivitelerine rağmen, BA, membran lipitlerinde hasara neden olmuştur. Büyük olasılıkla BA muamelesi hidrojen peroksitin ayrışmasından sorumlu peroksidaz aktivitesini baskılamış ve SOD aktivitesindeki indüksiyon lipid hasarını engelleyememiştir. LMB muamelesi ile SOD aktivitesinde önemli ölçüde bir değişiklik gözlenmemiş ve sadece %0,25'lik muamelede GST'de anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca mutant suşlar kullanılarak yapılan deneyler, yine %0,25'lik LMB muamelesine karşı özellikle GSS ve TrxR enzimlerinin de maya hücre canlılığını koruyucu rollere sahip olduklarını göstermiştir. Nitekim, kontrol grubuna kıyasla LMB ile muamele edilmiş grupların MDA seviyelerinde kayda değer bir artış gözlenmemiştir. Aksine, göreceli düşük LMB konsantrasyonlarının MDA seviyelerinde anlamlı azalışlara neden olması maya yaşlanmasında muhtemel koruyucu etkilere sahip olabileceğine işaret etmesi açısından ileri çalışmalarla değerlendirilmesi gereken bir bulgudur. Tüm bu nedenlerle, radikal üretiminin sadece %0,25-1 BA indüklü antiproliferatif mekanizmada etkili olduğu söylenebilir.

Düşük miktarlarda BA'nın canlılar için gerekli olması ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterebilmesinin yanı sıra bu bileşiklerin konsantrasyona bağımlı antibakteriyel ve antifungal aktivitelere sahip olduğu iyi bilinmektedir (De Seta ve diğ. 2009; Iavazzo ve diğ. 2011; Sogut ve diğ. 2015; Sayin ve diğ. 2016). Bu çalışmada maya hücreleri üzerinde toksisite açısından antifungal aktiviteleri destekleyen sınırlı sayıda diğ. çalışmalar ile uyumlu sonuçlar edilmiştir. Ancak LMB'a yönelik maya veya herhangi başka bir mikroorganizmada üzerinde yürütülmüş herhangi bir makaleye ulaşılamamıştır. Öte yandan LMB'nin etkilerini araştırmada model olarak memeli hücreleri ve sıçanların kullanıldığı iki çalışmaya rastlanmıştır. Çelikezen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kültürlenmiş insan kan hücreleri üzerinde LMB'nin muhtemel oksidan ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır (Çelikezen ve diğ. 2016). 5-40 mg./L LMB antioksidan özellik gösterirken ajanın daha yüksek konsantrasyonlarının bu özelliği gösteremediği ifade edilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada LMB muamelesinin koruyucu etkileri hem tek başına hem de CdCl₂ indüklü oksidatif strese karşı Wistar albino erkek sıçanları üzerinde gösterilmiştir (Taşdemir ve diğ. 2020). Beş gün boyunca 15 mg/kg LMB ile muamele edilen sıçanların serum MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlar ile bu sınırlı sayıda dı. datalar birlikte değerlendirildiğinde, çalışılan hücre tipine göre değişen

LMB konsantrasyonlarının kullanımının antioksidan aktivite gösterebileceği şeklinde bir yorum yapılabilir. Düşük doz LMB'nin antioksidan aktivitesi, araştırmamızda gözlenen metabolik aktivite indüksiyonundan sorumlu olabilir. Güncel tarihli bir makalede, hücrel glukoz metabolizmasının tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi için gerekli olduğu ifade edilmektedir (Xie ve diğ. 2018). Daha basit bir ifadeyle; glukoz metabolizması sırasında üretilen indirgenmiş kofaktörler olan nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), tetrazolyum indirgenmesinde rol oynamaktadır. ROS süpürmede kullanılan GSH'ın rejenerasyonu için NADPH'nin ne kadar önemli olduğu iyi bilinmektedir. Oksidatif stres, pro-oksidanlar lehine redoks dengesizliği yarattığı ve NADPH dahil antioksidan savunma bileşenlerini azalttığı için %0,05 LMB'nin antioksidatif etkisi kontrole kıyasla NADPH'ı daha yüksek seviyelerde tutmuş ve böylece metabolik aktivitede indüksiyon gözlenmiş olabilir.

Çalışılan en yüksek derişim olan %0,25 LMB ile muamele edilen maya hücrelerinin yüzey morfolojisinde radikal değişiklikler tespit edilmiştir. Basık ve buruşuk hücre morfolojisi gibi sıra dışı değişiklikler erken apoptoz belirteci gibi görünmektedir (Panwar ve diğ. 2016). Literatür tarandığında herhangi bir organizma üzerinde LMB tarafından indüklenen ölüm türüne ilişkin bir çalışma bulunamamıştır. Buna rağmen inorganik bir tuz olan LMB'nin lityum katyonları gözlemlenen apoptoz benzeri morfolojiden sorumlu olabilir. Lityumun insan memeli hücrelerinde erken apoptozu indüklediği yakın zamanda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuş olsa da *S. cerevisiae* hücreleri üzerinde benzer bir etkiyi yorumlayabilmek için birbirini destekleyen çoklu apoptotik markerların belirlenmesi gerekmektedir (Yao ve diğ. 2018). Sunulan çalışma kapsamında, ekspresyon düzeylerindeki değişim incelenen apoptoz genlerinden pro-apoptotik *AIF1* ve *NDII* ile anti-apoptotik *BIR1* genlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı artışlar belirlenmiştir. Ancak birbirine zıt fonksiyon gösteren bu genlerin ekspresyonlarının birlikte artmış olması nedeniyle LMB indüksiyonu sonucu maya hücresinde apoptozun indüklendiğini kesin bir şekilde ifade etmek doğru olmayacaktır. Alternatif olarak, %0,25'lik lityum tuzunun olası dehidrasyon etkisi, buruşma morfolojisinin nedeni olarak gösterilebilir. Borovikova ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, dehidrasyon işlemi sonrası maya hücre yüzeylerinde benzer morfolojik değişiklikleri gözlemlenmeleri bu olasılığı destekler niteliktedir (Borovikova ve diğ. 2016). Öte

yandan BA muamelesi sonrası indüklenen hücre hasarı ile birlikte hücre membranındaki kırılmalar/kopmalar, BA-indüklü maya hücre ölümünde nekrotik mekanizmanın baskın olabileceği düşündürmektedir. Nitekim 12 saat süreli BA uygulaması sonucu sadece pro-apoptotik *AIF1* ve *NDII* genlerinin ekspresyonlarında kontrol grubuna kıyasla artışlar kaydedilmişken, inkubasyon süresi 36 saate uzatıldığında, LMB'a benzer şekilde pro-apoptotik *AIF1* ve *NDII*'in yanı sıra anti-apoptotik *BIR1* geninin ekspresyonunda anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Dolayısıyla elde edilen veriler söz konusu ajanlar tarafından apoptotik hücre ölümünün indüklendiğini belirtmek için yetersiz olup ölüm türü hakkında net bir yorum yapabilmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuç olarak, tüm bu veriler, sırasıyla %0,25-1 ve %0,05-0,25'lik konsantrasyonlarda BA ve LMB'nin pro-oksidan ve antioksidan aktivitelerinin sinyalleri olarak yorumlanabilmektedir. Sunulan çalışmanın bulguları, bor türevlerine karşı toleranslı *S. cerevisiae* mayası üzerine her iki ajanın etkilerine yönelik yeni bilgiler sunmakta ve LMB'nin olası ikili antioksidatif-oksidatif etkilerini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

Abubakar, E. M. M., “Antimicrobial susceptibility pattern of pathogenic bacteria causing urinary tract infections at the Specialist Hospital, Yola, Adamawa state, Nigeria”, *J. Clin. Med. Res.*, 1(1), 1-8, (2009).

Adamek, V., Liu, X. C., Zhang, Y. A., Adamkova, K., & Scouten, W. H., “New aliphatic boronate ligands for affinity chromatography”, *J. Chromatogr.*, 625(2), 91-99, (1992).

Adams, J. M., & Cory, S., “Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family”, *Biochem Sci.*, 26(1), 61-66, (2001).

Adrain, C., & Martin, S. J., “The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas”, *Biochem Sci.*, 26(6), 390-397, (2001).

Ahmad, S. I. (Ed.), “*Reactive oxygen species in biology and human health*”, CRC Press, (2017).

Aksoy, Y., “Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü”, *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 442-448, (2002).

Akşit, H., & Bildik, A., “Apoptozis”, *Van Vet J*, 19(1), 55-63, (2008).

Akşit, H., Akşit, D., Bildik, A., Kara, H., Yavuz, Ö., & Seyrek, K., “Effects of N-acetyl cysteine on glutathione metabolism and lipid peroxidation in the experimental hepatic intoxication”, *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 1-5, (2015).

Alak, G., Özgeriş, F. B., Yeltekin, A. Ç., Parlak, V., Ucar, A., Caglar, O., ... & Atamanalp, M., “Hematological and Hepatic Effects of Ulexite in Zebrafish”, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 80, 103496, (2020).

Alak, G., Yeltekin, A. Ç., Uçar, A., Parlak, V., Türkez, H., & Atamanalp, M., “Borax alleviates copper-induced renal injury via inhibiting the DNA damage and apoptosis in rainbow trout”, *Biol. Trace Elem. Res.*, 191(2), 495-501, (2019).

Almeida, B., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Rodrigues, F., & Ludovico, P., “Drug-induced apoptosis in yeast”, *BBA, Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res. Mol. Cell Res*, 1783(7), 1436-1448, (2008).

Apdik, H., Doğan, A., Demirci, S., Aydın, S., & Şahin, F., “Dose-dependent effect of boric acid on myogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hADSCs)”, *Biol.Trace Elem.Res.*, 165(2), 123-130, (2015).

Arnold, F. H., “Directed evolution: bringing new chemistry to life”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 57(16), 4143-4148, (2018).

Barros, M. H., da Cunha, F. M., Oliveira, G. A., Tahara, E. B., & Kowaltowski, A. J., “Yeast as a model to study mitochondrial mechanisms in ageing”, *Mech. Ageing Dev.*, 131(7-8), 494-502, (2010).

Başaran, N., Duydu, Y., Bacanlı, M., Anlar, H. G., Dilsiz, S. A., Üstündağ, A., ... & Bolt, H. M., “Evaluation of oxidative stress and immune parameters of boron exposed males and females”, *Food Chem. Toxicol.*, 142, 111488, (2020).

Beach, T., Hart, B., & Larsen, B., “Stress response in *Candida albicans* induced by boric acid”, *J. adv. med.*, 1-11, (2016).

Becker, L., Scheffczyk, A., Förster, B., Oehlmann, J., Princz, J., Römbke, J., & Moser, T., “Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates”, *Journal of Soils and Sediments (JSS)*, 11(2), 238-248, (2011).

Bekatorou, A., Psarianos, C., & Koutinas, A. A., “Production of food grade yeasts”, *Food Technol. Biotechnol.*, 44(3), (2006).

Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F., & Dousset, B., “Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation”, *J Trace Elem Med Biol*, 14(3), 168-173, (2000).

Bermingham-McDonogh, O., Gralla, E. B., & Valentine, J. S., “The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 85(13), 4789-4793, (1988).

Bharadwaj, P., Martins, R., & Macreadie, I., "Yeast as a model for studying Alzheimer's disease", *FEMS Yeast Res*, 10(8), 961-969, (2010).

Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I., & Blevins, D. "Why boron?", *Plant Physiol. Biochem.*, 42(11), 907-912, (2004).

Bolaños, L., Redondo-Nieto, M., Bonilla, I., & Wall, L. G., "Boron requirement in the *Discaria trinervis* (Rhamnaceae) and *Frankia* symbiotic relationship. Its essentiality for *Frankia* BCU110501 growth and nitrogen fixation", *Physiol. Plant.*, 115(4), 563-570, (2002).

Borovikova, D., Teparčić, R., Mrša, V., & Rapoport, A., "Anhydrobiosis in yeast: cell wall mannoproteins are important for yeast *Saccharomyces cerevisiae* resistance to dehydration", *Yeast*, 33(8), 347-353, (2016).

Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72(1-2), 248-254, (1976).

Briggs, M., "Boron oxides, boric acid, and borates", *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, <https://doi.org/10.1002/0471238961.0215181519130920.a01.pub2>, (2000).

Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Ruckenstuhl, C., ... & Madeo, F., "Endonuclease G regulates budding yeast life and death", *Mol. Cell*, 25(2), 233-246, (2007).

Byrne, K. P., & Wolfe, K. H., "The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species", *Genome Res.*, 15(10), 1456-1461, (2005).

Cao, B., Li, H., Tian, S., & Qin, G., "Boron improves the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in jujube fruit", *Postharvest Biol Tec*, 68, 16-21, (2012).

Carmona-Gutierrez, D., & Madeo, F., “Tracing the roots of death: apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*”, In *Essentials of Apoptosis* (pp. 325-354). Humana Press, Totowa, NJ, (2009).

Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., & Madeo, F., “Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines”, *Cell Death Differ.*, 17(5), 763-773, (2010).

Carreras, J., Caballero, A., & Pérez, P. J., “Alkenyl boronates: synthesis and applications”, *Asian J. Chem.*, 14(3), 329-343, (2019).

Chapin, R. E., & Ku, W. W., “The reproductive toxicity of boric acid”, *Environ. Health Perspect*, 102(suppl 7), 87-91, (1994).

Chandrasekaran, A., Idelchik, M. D. P. S., & Melendez, J. A., “Redox control of senescence and age-related disease”, *Redox Biol.*, 11, 91-102, (2017).

Cheeseman, K. H., & Slater, T. F., “An introduction to free radical biochemistry”, *Br. Med. Bull.*, 49(3), 481-493, (1993).

Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C., “Diversity of structures and properties among catalases”, *Cell. Mol. Life Sci.*, 61(2), 192-208, (2004).

Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., ... & Wong, E. D., “*Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast”, *Nucleic Acids Res.*, 40(D1), D700-D705, (2012).

Choi, J. H., Lou, W., & Vancura, A., “A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biol. Chem.*, 273(45), 29915-29922, (1998).

Choo, Z. E., Loh, A. H. P., & Chen, Z. X., “Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers”, *Cancers*, 11(11), 1623, (2019).

Chowdhury, A., Santra, A., Bhattacharjee, K., Ghatak, S., Saha, D. R., & Dhali, G. K., “Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice”, *J. Hepatol.*, 45(1), 117-126, (2006).

Clifford, J., Chiba, H., Sobieszczuk, D., Metzger, D., & Chambon, P., “RXRalpha-null F9 embryonal carcinoma cells are resistant to the differentiation, anti-proliferative and apoptotic effects of retinoids”, *EMBO J.*, 15(16), 4142-4155, (1996).

Costa, V., & Moradas-Ferreira, P., “Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases”, *Mol. Aspects Med.*, 22(4-5), 217-246, (2001).

Coulthurst, S. J., Whitehead, N. A., Welch, M., & Salmond, G. P. “Can boron get bacteria talking?”, *Trends Biochem.Sci.*, 27(5), 217-219, (2002).

Cui, N., Pozzobon, V., Guerin, C., & Perre, P., “Effect of increasing oxygen partial pressure on *Saccharomyces cerevisiae* growth and antioxidant and enzyme productions”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 104(18), 7815-7826, (2020).

Çalışır M., “Glikozillenmiş Protein Tayini için Boronat Temelli Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler”, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, (2019).

Çelikezen, F. Ç., Toğar, B., Özgeriş, F. B., Izgi, M. S., & Türkez, H., “Cytogenetic and oxidative alterations after exposure of cultured human whole blood cells to lithium metaborate dehydrate”, *Cytotechnology*, 68(4), 821-827, (2016).

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J., “Cell death: critical control points”, *Cell*, 116(2), 205-219, (2004).

De Seta, F., Schmidt, M., Vu, B., Essmann, M., & Larsen, B., “Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*”, *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(2), 325-336, (2009).

Demirel, H., Taylan, İ. N. C. E., Uysal, D., & Uysal, B., “Boric Acid Production From Sodium Metaborate With Sulfuric Acid”, *Celal Bayar Üniv. fen bilim. derg.*, 11(3), (2015).

Di Renzo, F., Cappelletti, G., Broccia, M. L., Giavini, E., & Menegola, E., “Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: a suggested mechanism to

explain boric acid-related teratogenicity”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 220(2), 178-185, (2007).

Dickinson, J. R., “Life cycle and morphogenesis”, “Eds: Dickinson, J.R., ve Schweizer, M.”, *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, 2. Baskı, Boca Raton: CRC Press, 1-19, (2004).

Dordas, C., & Brown, P. H., “Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it”, *J. Membr. Biol.*, 175(2), 95-105, (2000).

Dordas, C., Chrispeels, M. J., & Brown, P. H., “Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots”, *Plant Physiol.*, 124(3), 1349-1362, (2000).

Draculic, T., Dawes, I. W., & Grant, C. M., “A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Mol. Microbiol.*, 36(5), 1167-1174, (2000).

Duina, A. A., Miller, M. E., and Keeney, J. B., “Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system”, *Genetics*, 197(1), 33-48, (2014).

Duydu, Y., Başaran, N., & Bolt, H. M., “Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant”, *J Trace Elem Med Biol*, 26(2-3), 161-164, (2012).

Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S., “Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease”, *J. Cell Biol.*, 189(7), 1059-1070, (2010).

Elmore, S., “Apoptosis: a review of programmed cell death”, *Toxicol. Pathol.*, 35(4), 495-516, (2007).

Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., ... & Cherry, J. M., “The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now”, *G3: Genes Genomes Genet.*, 4(3), 389-398, (2014).

Fahrenkrog, B., Sauder, U., & Aebi, U., “The *S. cerevisiae* HtrA-like protein Nma111p is a nuclear serine protease that mediates yeast apoptosis”, *J. Cell Sci*, 117(1), 115-126, (2004).

Fannjiang, Y., Cheng, W. C., Lee, S. J., Qi, B., Pevsner, J., McCaffery, J. M., ... & Hardwick, J. M., “Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast”, *Genes Dev*, 18(22), 2785-2797, (2004).

Finkel, T., “Oxygen radicals and signaling”, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10(2), 248-253, (1998).

Fuchs, Y., & Steller, H., “Programmed cell death in animal development and disease”, *Cell*, 147(4), 742-758, (2011).

Genestra, M., “Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants”, *Cell. Signal.*, 19(9), 1807-1819, (2007).

Gérecová, G., Kopanicová, J., Jaká, P., Běhalová, L., Juhásová, B., BhatiaKiššová, I., ... & Mentel, M., “BH3-only proteins Noxa, Bik, Bmf, and Bid activate Bax and Bak indirectly when studied in yeast model”, *FEMS Yeast Res*, 13(8), 747-754, (2013).

Goeckeler, J. L., & Brodsky, J. L., “Molecular chaperones and substrate ubiquitination control the efficiency of endoplasmic reticulum-associated degradation”, *Diabetes Metab Syndr Obes*, 12, 32-38, (2010).

Grant, C. M., “Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions”, *Mol. Microbiol.*, 39(3), 533-541, (2001).

Grant, C. M., MacIver, F. H., & Dawes, I. W., “Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine”, *Mol Biol Cell*, 8(9), 1699-1707, (1997).

Grant, C. M., Perrone, G., & Dawes, I. W., “Glutathione and catalase provide overlapping defenses for protection against hydrogen peroxide in the yeast

Saccharomyces cerevisiae”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253(3), 893-898, (1998).

Greig, D., & Leu, J. Y., “Natural history of budding yeast”, *Curr.*, 19(19), R886-R890, (2009).

Grilo, A. L., & Mantalaris, A., “Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective”, *Biotechnol. Adv.*, 37(3), 459-475, (2019).

Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Koksal, Z., Turkan, F., Çetinkaya, S., ... & Alwasel, S. H., “Rosmarinic acid inhibits some metabolic enzymes including glutathione S-transferase, lactoperoxidase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase isoenzymes”, *J ENZYM INHIB MED CH*, 31(6), 1698-1702, (2016).

Güven, A., Güven, A., & Gülmez, M., “The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues”, *J Vet Med.*, 50(8), 412-416, (2003).

Häcker, G., “The morphology of apoptosis”, *Cell Tissue Res.*, 301(1), 5-17, (2000).

Halliwell, B., & Whiteman, M., “Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?”, *Br. J. Pharmacol.*, 142(2), 231-255, (2004).

Halonen, S. K., “Modulation of host programmed cell death pathways by the intracellular protozoan parasite, *Toxoplasma gondii*—implications for maintenance of chronic infection and potential therapeutic applications”, *Cell Death-Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, (Ed) Ntuli T.M, 373-393, In Teck, Croatia, (2015).

Hansen, E.C., “Undersøgelse over Alkoholgjaersvampenes Fysiolog Vii”, *Medd. Carlsberg Lab.* 3: 53, (1891).

Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Fröhlich, K. U., Wissing, S., ... & Madeo, F., “Chronological aging leads to apoptosis in yeast”, *J. Cell Biol.*, 164(4), 501-507, (2004).

Hongmei, Z., “Extrinsic and intrinsic apoptosis signal pathway review”, *In Apoptosis and medicine*, InTechOpen, (2012).

Höpfel, H., Budzelaar, P. H. M., Hutchinson, A. R., Linton, D. J., Schubert, D. M., Talarico, G., ... & Zhang, Y., “Group 13 Chemistry III: Industrial Applications”, *Springer Science & Business Media*, (2003).

Hu, Q., Li, S., Qiao, E., Tang, Z., Jin, E., Jin, G., & Gu, Y., “Effects of boron on structure and antioxidative activities of spleen in rats”, *Biol. Trace Elem. Res.*, 158(1), 73-80, (2014).

Iavazzo, C., Gkegkes, I. D., Zarkada, I. M., & Falagas, M. E., “Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence”, *J. Women's Health*, 20(8), 1245-1255, (2011).

Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A., “First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid”, *Alexandria J. Med.*, 54(4), 287-293, (2018).

Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fidan, A. F., & Eryavuz, A., “The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats”, *J Trace Elem Med Biol*, 24(3), 161-164, (2010).

Inoue, Y., Sugiyama, K. I., Izawa, S., & Kimura, A., “Molecular identification of glutathione synthetase (GSH2) gene from *Saccharomyces cerevisiae*”, *Gene Structure and Expression. Biochim.*, 1395(3), 315-320, (1998).

Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A., “Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*”, *Biochem. J.*, 320(1), 61-67, (1996).

İlhan, Z., Ekin, İ. H., & Gülaydın, Ö., “Antimicrobial Activity of Boric Acid Solution Against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*”, *Van Vet. J.*, 30(3), (2019).

Janssen-Heininger, Y. M., Mossman, B. T., Heintz, N. H., Forman, H. J., Kalyanaraman, B., Finkel, T., ... & van der Vliet, A., "Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises", *Free Radic. Biol. Med.*, 45(1), 1-17, (2008).

Jilani, K., & Lang, F., "Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane", *Toxins*, 5(4), 703-716, (2013).

Jin, E., Li, S., Ren, M., Hu, Q., Gu, Y., & Li, K., "Boron affects immune function through modulation of splenic T lymphocyte subsets, cytokine secretion, and lymphocyte proliferation and apoptosis in rats", *Biol. Trace Elem. Res.*, 178(2), 261-275, (2017).

Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W., "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death", *Cell Death Differ.*, 25(1), 65-80, (2018).

Kam, P. C. A., & Ferch, N. I., "Apoptosis: mechanisms and clinical implications", *Anaesthesia*, 55(11), 1081-1093, (2000).

Käppeli, O., "Cytochromes P-450 of yeasts", *Microbiol. Rev.*, 50(3), 244, (1986).

Kavakcıoğlu Yardımcı, B., "The investigation of the clotrimazole induced apoptosis mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*", Doktora tezi, *Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2017).

Kaya, A., Karakaya, H. C., Fomenko, D. E., Gladyshev, V. N., & Koc, A., "Identification of a novel system for boron transport: Atr1 is a main boron exporter in yeast", *Mol. Cell. Biol.*, 29(13), 3665-3674, (2009).

Khalifa, R. K. H. M., Shaaban, S. H. A., & Rawia, A., "Effect of foliar application of zinc sulfate and boric acid on growth, yield and chemical constituents of iris plants", *Ozean J. Appl. Sci.*, 4(2), 129-144, (2011).

Kireçci, O.A., “Mn, Cd, Fe ve Mg Metallerinin *Saccharomyces cerevisiae* Mayasında Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi”, *KSÜ Tar Doga Derg.*, 21(4), 520, (2018).

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S., “Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(3), 239-256, (2002).

Kot, F. S., “Boron sources, speciation and its potential impact on health”, *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8(1), 3-28, (2009).

Kritsiligkou, P., Rand, J. D., Weids, A. J., Wang, X., Kershaw, C. J., & Grant, C. M., “Endoplasmic reticulum (ER) stress–induced reactive oxygen species (ROS) are detrimental for the fitness of a thioredoxin reductase mutant”, *J. Biol. Chem.*, 293(31), 11984-11995, (2018).

Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C., “Mitochondrial membrane permeabilization in cell death”, *Physiol. Rev*, 87(1), 99-163, (2007).

Kucukkurt, I., Akbel, E., Karabag, F., & Ince, S., “The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats”, *Toxicol. Ind. Health*, 31(3), 255-260, (2015).

Kurban, M., “*Saccharomyces cerevisiae* DNA Barkodunun Belirlenmesi ve Veri Tabanının Oluşturulması”, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara, (2019).

Kurtoglu, V., Kurtoglu, F., & Akalin, P. P., “The effects of various levels of boron supplementation on live weight, plasma lipid peroxidation, several biochemical and tissue antioxidant parameters of male mice**: effects of boron on performance, antioxidant and some metabolites of mice”, *J Trace Elem Med Biol*, 49, 146-150, (2018).

Landry, C. R., Townsend, J. P., Hartl, D. L., & Cavalieri, D., “Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Mol. Ecol.*, 15(3), 575-591, (2006).

Larsen, B., Petrovic, M., & De Seta, F., “Boric acid and commercial organoboron products as inhibitors of drug-resistant *Candida albicans*”, *Mycopathologia*, 183(2), 349-357, (2018).

Lauer, B. A., Reller, L. B., & Mirrett, S., “Evaluation of preservative fluid for urine collected for culture”, *J. Clin. Microbiol.*, 10(1), 42-45, (1979).

Lefebvre, M. A., Quach, C., & Daniel, S. J., “Chronic suppurative otitis media due to nontuberculous *mycobacteria*: a case of successful treatment with topical boric acid”, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, 79(7), 1158-1160, (2015).

Levin, D. E., “Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(2), 262-291, (2005).

Li, J., & Yuan, J., “Caspases in apoptosis and beyond”, *Oncogene*, 27(48), 6194-6206, (2008).

Li, W., Sun, L., Liang, Q., Wang, J., Mo, W., & Zhou, B., “Yeast AMID homologue Ndi1p displays respiration-restricted apoptotic activity and is involved in chronological aging”, *Molecular biology of the cell*, 17(4), 1802-1811. (Eds), Alberts B. ve diğ., W. W. Norton & Company, (2006).

Li, Y., Yang, Z., Bi, Y., Zhang, J., & Wang, D., “Antifungal effect of borates against *Fusarium sulphureum* on potato tubers and its possible mechanisms of action”, *Postharvest Biol Tec*, 74, 55-61, (2012).

Liu, M., Dong, F., Yan, X., Zeng, W., Hou, L., & Pang, X., “Biosorption of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and surface interactions under culture conditions”, *Bioresour. Technol.*, 101(22), 8573-8580, (2010).

Longo, V. D., Ellerby, L. M., Bredesen, D. E., Valentine, J. S., & Gralla, E. B., “Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast”, *J. Cell Biol*, 137(7), 1581-1588, (1997).

Longo, V. D., Gralla, E. B., & Valentine, J. S., “Superoxide Dismutase Activity Is Essential for Stationary Phase Survival in *Saccharomyces cerevisiae*:

Mitochondrial Production Of Toxic Oxygen Species In Vivo”, *J. Biol. Chem.*, 271(21), 12275-12280, (1996).

Lopez, J., & Tait, S. W. G., “Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within”, *Br. J. Cancer*, 112(6), 957-962, (2015).

Loureiro, V., & Querol, A.,” The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages”, *Trends Food Sci Technol.*, 10(11), 356-365, (1999).

Ludovico, P., Sousa, M. J., Silva, M. T., Leão, C., & Côrte-Real, M., “*Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid”, *Microbiology*, 147(9), 2409-2415, (2001).

Madeo, F., Fröhlich, E., & Fröhlich, K. U., “A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis”, *J. Cell Biol*, 139(3), 729-734, (1997).

Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S. J., Wolf, D. H., et al., “Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast”, *J. Cell Biol*, 145(4), 757-767, (1999).

Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., ... & Fröhlich, K. U., “A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast”, *Mol. Cell*, 9(4), 911-917, (2002).

Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T., & Fröhlich, K. U., “Apoptosis in yeast”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 7(6), 655-660, (2004).

Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., & Kroemer, G., “Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 15(2), 81-94, (2014).

Martin, S., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., Van Schie, R. C., LaFace, D. M., & Green, D. R., “Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl”, *J. Exp. Med.*, 182(5), 1545-1556, (1995).

Martini, A., “Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Wine Res.*, 4(3), 165-176, (1993).

McArthur, K., & Kile, B. T., “Apoptotic caspases: multiple or mistaken identities?”, *Trends Cell Biol.*, 28(6), 475-493, (2018).

McCord, J. M., & Fridovich, I., “Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)”, *J. Biol. Chem.*, 244(22), 6049-6055, (1969).

Meers, P. D., & Chow, C. K., “Bacteriostatic and bactericidal actions of boric acid against bacteria and fungi commonly found in urine”, *J. Clin. Pathol.*, 43(6), 484-487, (1990).

Miller, D. M., Buettner, G. R., & Aust, S. D., “Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions”, *Free Radic. Biol. Med.*, 8(1), 95-108, (1990).

Misra, A., Rai, S., & Misra, D., “Functional role of apoptosis in oral diseases: An update”, *J Oral Maxillofac Pathol*, 20(3), 491, (2016).

Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., & Gehring, K., “The X-ray structure of a BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site”, *Mol. Cell*, 24(5), 677-688, (2006).

Montllor-Albalade, C., Colin, A. E., Chandrasekharan, B., Bolaji, N., Andersen, J. L., Outten, F. W., & Reddi, A. R., “Extra-mitochondrial Cu/Zn superoxide dismutase (Sod1) is dispensable for protection against oxidative stress but mediates peroxide signaling in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Redox Biol.*, 21, 101064, (2019).

Mortimer, R. K., “Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome”, *Genome Res.*, 10(4), 403-409, (2000).

Moulton, B. C., “Transforming growth factor-beta stimulates endometrial stromal apoptosis in vitro”. *Endocrinology*, 134(3), 1055-1060, (1994).

Muñoz-Pinedo, C., “Signaling pathways that regulate life and cell death: evolution of apoptosis in the context of self-defense”, López-Larrea, C. (Ed.), *Self and Nonself*, 124-143, DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1680-7>, (2012).

Murphy, A., & Kavanagh, K., “Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen: implications for biotechnology”, *Enzyme Microb. Technol.*, 25(7), 551-557, (1999).

Mustacich, D., & Powis, G., “Thioredoxin reductase”, *Biochem. J.*, 346(1), 1-8, (2000).

Navarro, A., & Boveris, A., “Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging”, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(5), R1244-R1249, (2004).

Neiman, A. M., “Sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Genetics*, 189(3), 737-765, (2011).

Nordberg, J., & Arnér, E. S., “Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system”, *Free Radic. Biol. Med.*, 31(11), 1287-1312, (2001).

Nozawa, A., Takano, J., Kobayashi, M., Von Wirén, N., & Fujiwara, T., “Roles of BOR1, DUR3, and FPS1 in boron transport and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*”, *FEMS Microbiol. Lett.*, 262(2), 216-222, (2006).

O'Brien, M. A., & Kirby, R., “Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease”, *J Vet Emerg Crit Care*, 18(6), 572-585, (2008).

O'Kennedy, K., & Reid, G., “Yeast nutrient management in winemaking”, *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.*, (537), 92-100, (2008).

O'Neill, M. A., Eberhard, S., Albersheim, P., & Darvill, A. G., “Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth”, *Science*, 294(5543), 846-849, (2001).

Orlean, P., “Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell Wall”, *Genetics*, 192(3), 775-818, (2012).

Orrenius, S., Nicotera, P., & Zhivotovsky, B., “Cell Death Mechanisms and Their Implications in Toxicology”, *Toxicol. Sci.*, 119(1), 3–19, (2011)

Ortiz, G. G., Moisés, F. P. P., Mireles-Ramírez, M., Flores-Alvarado, L. J., González-Usigli, H., Sánchez-González, V. J., ... & Rivero-Moragrega, P., “Oxidative stress: love and hate history in central nervous system”, *Adv Protein Chem Struct Biol*, 108, 1-31, (2017).

Osthoff, K. S., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E., “Apoptosis signaling by death receptors”, *Eur J Biochem*, 254, 439-459, (1998).

Owsianowski, E., Walter, D., & Fahrenkrog, B., “Negative regulation of apoptosis in yeast”, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 1783(7), 1303-1310, (2008).

Öz, M., Kardeşahin, T., Aksoy, N. H., Inanan, B. E., & Dikel, S., “Harmful effects of dietary supplementation of boron on blood parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *J Hell Vet Med Soc*, 71(2), 2227-2234, (2020).

Öz, M., Yavuz, O., & Bolukbas, F., “Histopathology changes in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) consuming boric acid supplemented fish fodder”, *J Trace Elem Med Biol*, 62, 126581, (2020).

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z., “Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri”, *JCEI*, 6 (3): 331-336, (2015).

Palmer, A. M., Greengrass, P. M., & Cavalla, D., “The role of mitochondria in apoptosis”, *Drug News Perspect.*, 13(6), 378-384, (2000).

Panwar, R., Sharma, A. K., Kaloti, M., Dutt, D., & Pruthi, V., “Characterization and anticancer potential of ferulic acid-loaded chitosan nanoparticles against ME-180 human cervical cancer cell lines”, *Appl. Nanosci.*, 6(6), 803-813, (2016).

Pedrajas, J. R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J. Å., Wright, A. P., & Spyrou, G., “Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biol. Chem.*, 274(10), 6366-6373, (1999).

Pekmez, M., “Oksidatif Stres Uygulanmış *Schizosaccharomyces Pombe*’de Moleküler Çalışmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı*, İstanbul, (2004).

Perrone, G. G., Tan, S. X., & Dawes, I. W., “Reactive oxygen species and yeast apoptosis”, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.*, 1783(7), 1354-1368, (2008).

Petranovic, D., Tyo, K., Vemuri, G. N., & Nielsen, J., “Prospects of yeast systems biology for human health: integrating lipid, protein and energy metabolism”, *FEMS Yeast Res.*, 10(8), 1046-1059, (2010).

Pfeffer, C. M., & Singh, A. T., “Apoptosis: a target for anticancer therapy”, *Int. J. Mol. Sci.*, 19(2), 448, (2018).

Pitt, J. I., & Hocking, A. D., “*Penicillium* and related genera”, In *Fungi and food spoilage* (pp. 203-338). Springer, Boston, MA, (1997).

Pitt, J. I., & Hocking, A. D., “The ecology of fungal food spoilage”, In *Fungi and food spoilage* (pp. 3-9). Springer, Boston, MA, (2009).

Pointer, B. R., Boyer, M. P., & Schmidt, M., “Boric acid destabilizes the hyphal cytoskeleton and inhibits invasive growth of *Candida albicans*”, *Yeast*, 32(4), 389-398, (2015).

Porter, I. A., & Brodie, J., “Boric acid preservation of urine samples”, *Br Med J*, 2(5653), 353-355, (1969).

Puzina, T. I., “Effect of zinc sulfate and boric acid on the hormonal status of potato plants in relation to tuberization”, *Russ J Plant Physl*, 51(2), 209-215, (2004).

Qin, G., Zong, Y., Chen, Q., Hua, D., & Tian, S., “Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action”, *Int. J. Food Microbiol.*, 138(1-2), 145-150, (2010).

Quiles-Pando, C., Navarro-Gochicoa, M. T., Herrera-Rodríguez, M. B., Camacho-Cristóbal, J. J., González-Fontes, A., & Rexach, J., “Boron deficiency

increases cytosolic Ca²⁺ levels mainly via Ca²⁺ influx from the apoplast in *Arabidopsis thaliana* roots”, *Int. J. Mol. Sci.*, 20(9), 2297, (2019).

Rai, R., & Cooper, T. G., “In vivo specificity of Ure2 protection from heavy metal ion and oxidative cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Yeast*, 22(5), 343-358, (2005).

Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... & Nishigaki, I., “Antioxidants and human diseases”, *Clin Chim Acta*, 436, 332-347, (2014).

Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A., “Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species”, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, 1863(12), 2977-2992, (2016).

Reguera, M., Abreu, I., Sentís, C., Bonilla, I., & Bolaños, L., “Altered plant organogenesis under boron deficiency is associated with changes in high-mannose N-glycan profile that also occur in animals”, *J. Plant Physiol.*, 243, 153058, (2019).

Rinaldi, T., Dallabona, C., Ferrero, I., Frontali, L., & Bolotin-Fukuhara, M., “Mitochondrial diseases and the role of the yeast models”, *FEMS Yeast Res.*, 10(8), 1006-1022, (2010).

Rolshausen, P. E., & Gubler, W. D., “Use of boron for the control of *Eutypa* dieback of grapevines”, *Plant Dis.*, 89(7), 734-738, (2005).

Rowlands, M., Blackwood, L., Mas, A., Cripps, P., Crompton, C., & Burrow, R., “The effect of boric acid on bacterial culture of canine and feline urine”, *J Small Anim Pract.*, 52(10), 510-514, (2011).

Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., & Schneider, G., “Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme”, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(17), 9533-9538, doi: 10.1073/pnas.162375999 ,(2001).

Sayin, Z., Ucan, U. S., & Sakmanoglu, A., “Antibacterial and antibiofilm effects of boron on different bacteria”, *Biol. Trace Elem. Res.*, 173(1), 241-246, (2016).

Schmedes, A., & Hølmer, G., “A new thiobarbituric acid (TBA) method for determining free malondialdehyde (MDA) and hydroperoxides selectively as a measure of lipid peroxidation”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66(6), 813-817, (1989).

Schmidt, M., Akasaka, K., Messerly, J. T., & Boyer, M. P., “Role of Hog1, Tps1 and Sod1 in boric acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiology*, 158(10), 2667-2678, (2012).

Schmidt, M., Schaumberg, J. Z., Steen, C. M., & Boyer, M. P., “Boric acid disturbs cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Int. J. Microbiol.*, 2010, (2010).

Schubert, D., Boron oxides, boric acid, and borates. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 1-68, (2000).

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E., “Apoptosis signaling by death receptors”, *Eur. j. biochem.*, 254(3), 439-459, (1998).

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S., “Old, new and emerging functions of caspases”, *Cell Death Differ.*, 22(4), 526-539, (2015).

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A., “Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily”, *Biochem. J.*, 360(1), 1-16, (2001).

Sherman, F., “Getting started with yeast”, *Meth. Enzymol.*, 350, 3-41, (2002).

Shi, X., Li, B., Qin, G., & Tian, S., “Mechanism of antifungal action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* related to mitochondrial degradation in spores”, *Postharvest Biol Tec*, 67, 138-143, (2012).

Sies, H., “Oxidative stress: eustress and distress in redox homeostasis”, In *Stress: physiology, biochemistry, and pathology* (pp. 153-163), Volume 3, Academic Press, (2019).

Sies, H., “Oxidative stress: from basic research to clinical application”, *Am. J. Med.*, 91(3), S31-S38, (1991).

Singhal, R. P., DeSilva, S. S. M., & Shyamali, M., “Boronate affinity chromatography”, *Adv Chromatogr*, 31, 293-335., (1992).

Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Youle, R. J., & Russell, J. T., “Mitochondria in Ca²⁺ signaling and apoptosis”, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 32(1), 35-46, (2000).

Sobel, J. D., & Chaim, W., “Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy”, *Clin. Infect. Dis.*, 24(4), 649-652, (1997).

Sobel, J. D., Chaim, W., Nagappan, V., & Leaman, D., “Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine”, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 189(5), 1297-1300, (2003).

Sogut, I., Oglakci, A., Kartkaya, K., Ol, K. K., Sogut, M. S., Kanbak, G., & Inal, M. E., “Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome”, *Exp. Ther. Med.*, 9(3), 1023-1027, (2015).

Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., ... & de Jong, S., “Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors”, *J. Histochem. Cytochem.*, 52(6), 821-831, (2004).

Stewart, G. G., “*Saccharomyces* species in the Production of Beer”, *Beverages*, 2(4), 34, <https://doi.org/10.3390/beverages2040034>, (2016).

Strasser, A., O'Connor, L., & Dixit, V. M., “Apoptosis signaling”, *Annu. Rev. Biochem.*, 69(1), 217-245, (2000).

Strateji Geliştirme Dairesi Başkanlığı., 2019 Bor Sektör Raporu, (Erişim tarihi: 20. 06. 2021), <http://en.etimaden.gov.tr>, (2020)

Stratford, M., Nebe-von-Caron, G., Steels, H., Novodvorska, M., Ueckert, J., & Archer, D. B., “Weak-acid preservatives: pH and proton movements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Int. J. Food Microbiol.*, 161(3), 164-171, (2013).

Strich, R., “Programmed cell death initiation and execution in budding yeast”, *Genetics*, 200(4), 1003-1014, (2015).

Sugiyama, K. I., Izawa, S., & Inoue, Y., “The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Biol. Chem.*, 275(20), 15535-15540, (2000).

Swate, T. E., & Weed, J. C., “Boric acid treatment of vulvovaginal candidiasis”, *Obstet. Gynecol.*, 43(6), 893-895, (1974).

Tait, S. W., & Green, D. R., “Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond”, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(9), 621-632, (2010).

Tandogan, B., & Ulusu, N. N., “Thioredoxin reductase”. *Hacettepe J. Biol. & Chem*, 39(1), 87-92, (2011).

Taşdemir, M., Çelikezen, F. Ç., Oto, G., & Özbey, F., “The effects of pretreatment with lithium metaborate dihydrate on lipid peroxidation and Ca, Fe, Mg, and K levels in serum of Wistar albino male rats exposed to Cd”, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27(7), 7702-7711, (2020).

Tekeli, H., & Bildik, A., “Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Karaciğer Hasarında Glutatyon (Gsh) Ve Glutatyon S-Transferaz (Gst) Aktivitesi Üzerine N-Asetil Sisteinin Etkisi”, *Balikesir Sağlık Bil Derg*, (2016).

Tepedelen, B. E., Soya, E., & Korkmaz, M., “Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process”, *Biol. Trace Elem. Res.*, 174(2), 309-31, (2016).

Tibell, L. A., Skärfstad, E., & Jonsson, B. H., “Determination of the structural role of the N-terminal domain of human extracellular superoxide dismutase by use of protein fusions”, *Biochim Biophys Acta Protein Struct Mol Enzymol*, 1292(1), 47-52, (1996).

Tosun, M., Aladağ, T., Gökalp, E., & Gökçe, G. “Boraks Kullanımına Bağlı Kan-Testis Bariyerinde Görülen Değişikliklerin Histolojik Değerlendirilmesi”, *Kocatepe Tıp Derg*, 19(4), 139-144, (2018).

Townsend, D. M., & Tew, K. D., “The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance”, *Oncogene*, 22(47), 7369-7375, (2003).

Tremellen, K., “Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective”, *Hum. Reprod. Update*, 14(3), 243-258, (2008).

Trotter, E. W., & Grant, C. M., “Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, *Eukaryot. Cell*, 4(2), 392-400, (2005).

Turkova J., Bioaffinity Chromatography, Elsevier, Germany, (1993).

Türkan, F., “Karayemiş Meyvesinden (*Prunus Laurocerasus* L.) Glutatyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı*, Erzurum, (2015).

Tvrda, E., Kňazická, Z., Bárdos, L., Massányi, P., & Lukáč, N., “Impact of oxidative stress on male fertility—A review”, *Acta Vet. Hung.*, 59(4), 465-484, (2011).

Ulusik, I., Karakaya, H. C., & Koc, A., “The importance of boron in biological systems”, *J Trace Elem Med Biol*, 45, 156-162, (2018).

Váchová, L., & Palková, Z., “Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia”, *J. Cell Biol.*, 169(5), 711-717, (2005).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J., “Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease”, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(1), 44-84, (2007).

Van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., & Konings, W. N., “The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis”, *Microbiol. Rev.*, 59(2), 304-322, (1995).

Van Slyke, K. K., Michel, V. P., & Rein, M. F., “The boric acid powder treatment of vulvovaginal *candidiasis*”, *J Am Coll Health*, 30(3), 107-109, (1981).

Verduyn, C., Zomerdijk, T. P., van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A., “Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19(3), 181-185, (1984).

Walker, M., and Stewart, G. G., “*Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages Graeme”, *Beverages* 2016, 2, 30; doi:10.3390/beverages2040030, (2016).

Walter, D., Wissing, S., Madeo, F., & Fahrenkrog, B., “The inhibitor-of-apoptosis protein Bir1p protects against apoptosis in *S. cerevisiae* and is a substrate for the yeast homologue of Omi/HtrA2”, *J. Cell Sci*, 119(9), 1843-1851, (2006).

Weisiger, R. A., & Fridovich, I., “Mitochondrial superoxide dismutase site of synthesis and intramitochondrial localization”, *J. Biol. Chem*, 248(13), 4793-4796, (1973).

White, S. R., “Apoptosis and the airway epithelium”, *Journal of allergy*, 2011, <https://doi.org/10.1155/2011/948406>, (2011).

Whitehouse, B., “Food additives, other than colours and sweeteners”, Ed: Watson D., *Food chemical safety*, 2, 249-282, Woodhead Publishing, Washington D.C., (2002).

Wickremasinghe, R. G., & Hoffbrand, A. V., “Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies”, *Am. J. Hematol.*, 93(11), 3587-3600, (1999).

Williams, C. H., “Lipoamide dehydrogenase, glutathione reductase, thioredoxin reductase, and mercuric ion reductase a family of flavoenzyme

transhydrogenases”, *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Vol III*, 121-211, CRC Press, (1992).

Willis, S. N., & Adams, J. M., “Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis”, *Curr. Opin. Cell Biol*, 17(6), 617-625, (2005).

Winge, Ø., “On haplophase and diplophase in some *Saccharomycetes*”, *Comptes Rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Sér. Physiol*, Hagerup in Komm, (1935).

Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Büttner, S., Engelhardt, S. M., Decker, T., ... & Madeo, F., “An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast”, *J. Cell Biol.*, 166(7), 969-974, (2004).

Woods, W. G., “An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry”, *Environ. Health Perspect.*, 102(suppl 7), 5-11, (1994).

Wyllie, A. H., ““Where, O death, is thy sting?” A brief review of apoptosis biology”, *Mol Neurobiol.*, 42(1), 4-9, (2010).

Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. R., “Cell death: the significance of apoptosis”, *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, (1980).

Xie, L.; Dai, Z.; Pang, C.; Lin, D.; Zheng, M., “Cellular Glucose Metabolism is Essential for the Reduction of Cell-Impermeable Water-Soluble Tetrazolium (WST) Dyes”, *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 14, 1535, (2018)

Xue, R. D., Kline, D. L., Ali, A., & Barnard, D. R., “Application of boric acid baits to plant foliage for adult mosquito control”, *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 22(3), 497-500, (2006).

Yan, L. J., “Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance”, *Redox Biol.*, 2, 165-169, (2014).

Yao, R.; Sun, X.; Xie, Y.; Liu, L.; Han, D.; Yao, Y.; Li, H.; Li, Z.; Xu, K., “Lithium Chloride Inhibits Cell Survival, Overcomes Drug Resistance, and Triggers Apoptosis in Multiple Myeloma via Activation of the Wnt/b-Catenin Pathway”, *Am. J. Transl.*, 10(8), 2610, (2018).

Yarsan, E., “Lipid peroksidasyon olayı ve önlenmesine yönelik uygulamalar”, *Van Vet J*, 9(1), 89-95, (1998).

Yavuz H., ve Denizli A., “Bor ve Bor Bileşikleri”, *Kimya ve Sanayi Dergisi*, Ocak 2007, 33,34,35, (2007)

Yılmaz, A., & Şevik, S., “Sodyum borhidrür (NaBH₄) destekli bir hidrojen/hava PEM yakıt hücresi ile elektrik üretiminin deneysel analizi”, *Batman univ. yaşam bilim. derg.*, 7(2/2), 216-227, (2017).

Yiğit, P., Eren, M., Sarıca, Z., & Şentürk, M., “Tavşanlarda borik asidin kan kimyasına etkisi”, *Erciyes üniv Vet Fak Derg.*, 10(2), (2013).

Yildiz, G., Koksall, B. H., & Sızmaç, O., “Effects of dietary boric acid addition on growth performance, cholesterolemia, some carcass and tibia characteristics in different rearing periods in broiler chickens”, *Revue Med Vet*, 164(4), 219-224, (2013).

Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C. D., Fasch, E. V., Kohlwein, S. D., Paltauf, F. & Daum, G., “Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*”, *J. Bacteriol.*, 173(6), 2026-2034, (1991).