



Borik asidin C6 glioma hücrelerinde glutamat eksitotoksitesine karşı koruyucu etkinliğinde oksidatif stresin rolü

Ayşegül Öztürk^{1*}, Ahmet Şevki Taşkıran², Emin Gündoğdu³

¹Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Sivas, 58140, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Sivas, 58140, Türkiye

³Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Sivas, 58140, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:

İlk gönderi 19 Temmuz 2024

Kabul 2 Ocak 2025

Online 31 Mart 2025

Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1519354

Anahtar kelimeler:

Borik asit

C6 hücreleri

Glutamat eksitotoksitesite

Oksidatif stres

ÖZET

Bu çalışma, borik asidin (BA) glutamat ile indüklenen eksitotoksitesiteye karşı glial hücrelerde meydana gelen oksidan/antioksidan sistem değişikliklerini biyokimyasal olarak incelemek amacıyla tasarlanmıştır. Bu çalışmada C6 glial hücreleri kullanılmıştır. Hücreler kontrol, glutamat (10mM), glutamat+BA(0,23; 0,46; 0,93; 1,87 ve 3,75 µg/mL) ve BA (0,23; 0,46; 0,93; 1,87 ve 3,75 µg/mL) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi yapılmamıştır. Glutamat grubundaki hücreler 24 saat boyunca 10 mM glutamat ile muamele edilmiştir. BA ise glutamat eklenmeden 1 saat önce verildi ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı XTT testi ile ölçülmüştür. Biyokimyasal analizler için ticari kitler kullanılmıştır. Anlamlılık 0.05'ten küçük olarak kabul edilmiştir. Biyokimyasal analiz ile glutamat grubunda malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), indüklenmiş nitrik oksit sentaz (iNOS), nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) ve toplam oksidant (TOS) seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı ($p<0,05$), BA ön tedavisi ile glutamat grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). SOD ve TAS seviyesi glutamat grubunda azalırken BA ön tedavisi ile artmıştır ($p<0,05$). BA, glial hücreler üzerinde glutamat maruziyetine karşı koruyucu etkiler göstermiştir. Bu nöroprotektif etkiyi antioksidan savunma mekanizmasını artırarak, oksidatif ve nitrozatif stresi azaltarak oluşturmuştur.

The role of oxidative stress in the protective effect of boric acid against glutamate excitotoxicity in C6 glioma cells

ARTICLE INFO

Article History:

Received July 19, 2024

Accepted January 2, 2025

Available online March 31, 2025

Research Article

DOI: 10.30728/boron.1519354

Keywords:

Boric acid

C6 cells

Glutamate excitotoxicity

Oxidative stress

ABSTRACT

This study designed to investigate the biochemical changes in glial cells' oxidant/antioxidant systems in response to glutamate-induced excitotoxicity of boric acid (BA). The present study employed C6 glial cells. For the study, cells were separated into 4 groups as control, glutamate (10mM), glutamate+BA (0,23; 0,46; 0,93; 1,87 and 3,75 µg/mL), and BA (0,23; 0,46; 0,93; 1,87 and 3,75 µg/mL). The control group was not treated. The cells in the glutamate group were treated with 10 mM glutamate for 24 hours. BA was administered one hour prior to the addition of glutamate and incubated for 24 hours. The viability of the cells was evaluated using an XTT assay. Commercial kits were used for biochemical analyses. Significance was set at less than 0.05. The biochemical analysis revealed that the levels of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), neuronal nitric oxide synthase (nNOS), and total oxidant status (TOS) were elevated in the glutamate group compared to the control group ($p<0.05$). It was determined that BA treatment resulted in a statistically significant reduction in these levels compared to the glutamate group. ($p<0.05$). The levels of SOD and TAS were found to decrease in the glutamate group and to increase with BA pretreatment ($p<0.05$). The results demonstrated that BA exhibited protective effects on glial cells against glutamate exposure. Furthermore, BA was observed to exert its neuroprotective effect by increasing the antioxidant defense mechanism and reducing oxidative and nitrosative stress.

1. Giriş (Introduction)

Glutamat merkezi sinir sisteminde uyarıcı etkiye sahip bir nörotransmitterdir. Glutamat, iyonotropik ve/veya metabotropik glutamat reseptörlerini aktive ederek

nöral fizyolojik süreçlerde anahtar rol oynar. Buna karşın glutamatın aşırı miktarı eksitotoksitesite denen toksik bir sürece neden olur [1]. Eksitotoksitesite, ekstrasellüler alanda yüksek konsantrasyonda bulunan glutamatın, glutamat reseptörleri aracılığıyla Ca^{2+} 'nın hücre

*Corresponding author: aysegulozturk@cumhuriyet.edu.tr

dışından hücre içine büyük bir akışı olarak tanımlanır. Bunu hücre içi depolardan Ca^{2+} salınımı takip eder ve sonuçta sitozolik serbest Ca^{2+} konsantrasyonu fazla miktarda artar [2]. Bu durum reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına ve mitokondriyal hasara neden olarak nöronal ölüm süreçlerini başlatır [1,3].

Glutamat eksitotoksitesi nöronal, oligodendroglial, astrogliyal ve retinal ganglion hücreleri dahil olmak üzere çeşitli hücre hatlarında gösterilmiştir [4,5]. Astrositler, özellikle amino asit alım metabolizmasına katılarak yapısal, metabolik, trofik ve antioksidan savunma sağlayarak nöronlarla etkileşime girerler [6]. Astrogliyal hücreler ayrıca beynin ana antioksidanı olan glutatyon (GSH) seviyelerini korumak için de gereklidir [7,8]. Bu nedenle C6 hücre hattı, hücre fonksiyonları ve hücre sinyalleşmesini incelemek için astrogliyal bir model olarak kullanılmaktadır [9,10].

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin (RNS) aşırı üretiminin bir sonucudur; bu da protein ve DNA oksidasyonu ve/veya nitrasyonuna aynı zamanda lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır [11,12]. Lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu, lipid peroksidasyon ürünü olan nitrik oksit (NO) ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonunun artmasına neden olur [13]. ROS'un aşırı üretimi nedeniyle membran ve enzim fonksiyonu zarar görebilir. Glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidanlar ROS'u detoksifiye eder [14]. OS'in artması ise GSH, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin tükenmesine neden olur [15]. Bu sonuçlarla birlikte OS'in nörodejeneratif hastalıklar ve merkezi sinir sistemi (MSS) bozukluklarında önemli bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir [16,17].

Bor, memelilerde düşük toksisiteye sahip eser bir elementtir [18]. Bu nedenle borun fizyolojik ve biyokimyasal rolü geniş çapta araştırılmaktadır. Uygun miktardaki borun hücrelerde farklılaşma ve çoğalması gibi koruyucu ve tedavi edici etkileri bulunmaktadır [19]. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarının çoğunda bor kaynağının borik asit veya boraks olduğu tespit edilmiştir [20]. Zayıf bir Lewis asidi olan borik asit (BA), suda çözünürlüğü nedeniyle biyolojik sistemlerde en fazla bulunan bor türüdür [21]. BA, oksidatif ve inflammatuar süreçlerin yanı sıra mitokondriyal membran potansiyelini düzenleyerek apoptotik süreçlerde koruyucu bir ajan olarak görev yapar [22]. İnce ve ark. tarafından yapılan bir araştırma diyetle eklenen bor takviyesi (100 mg/kg) ile lipid peroksidasyonunun azaldığını, antioksidan savunma mekanizmasının arttığını göstermişlerdir [23]. Ancak mevcut çalışmalarda BA'nın nörodejeneratif hastalıklar üzerindeki nöroprotektif etkilerini değerlendiren çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışma oksidatif ve nitrozatif strese karşı koruyucu özelliklere sahip olan BA'nın *in vitro* model sistem olan astrogliyal hücrelerde glutamat ile indüklenen nörodejeneratif hasara karşı olası nöroprotektif etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır.

2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

2.1. Hücre Kültürü (Cell Culture)

C6 Glioma (CRL107) hücre hattı glutamat kaynaklı sitotoksositeye sahip olduğu için bu çalışmada kullanıldı [4]. C6 hücreleri Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC, ABD) satın alındı. Hücreler %10 fetal sıgır serumu (FBS), %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM'de (Thermo Fisher Scientific, ABD) kültive edildi. FBS, L-glutamin ve penisilin/streptomisin Sigma-Aldrich firmasından (ABD) temin edildi. Hücreler %5 CO_2 içeren nemli ortamda $37^\circ C$ 'de inkübe edildi.

2.2. İlaç Uygulaması (Drug Administration)

Tedavi öncesinde BA ve glutamat DMEM içerisinde çözülerek stok çözeltiler hazırlandı. Borik asit (%99.5) ve glutamat Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi.

2.3. Glutamat Eksitotoksitesi (Glutamate Excitotoxicity)

Borik asitin glutamat kaynaklı sitotoksosite üzerindeki etkisini incelemek için dört hücre grubu oluşturuldu. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Glutamat grubunun hücrelerine 24 saat boyunca 10 mM glutamat verildi. Literatüre göre glial hücrelerin %50'sinin ölümüne neden olan glutamat konsantrasyonu (10 mM) seçildi [24]. Bu çalışma yapılmadan önce bir pilot deney gerçekleştirildi. Buna göre borik asit konsantrasyonları seçildi. Borik asit grubundaki hücrelere 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (0,23; 0,46; 0,93; 1,87 ve 3,75 $\mu g/mL$) borik asit verildi. Borik asit + glutamat grubunun hücreleri, 24 saat boyunca 10 mM glutamata maruz bırakılmadan önce 1 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda borik asit (0,23; 0,46; 0,93; 1,87 ve 3,75 $\mu g/mL$) ile ön işleme tabi tutuldu.

2.4. Hücre Canlılığı (Cell Viability)

Hücre canlılığını belirlemek için XTT tahlil kiti kullanıldı (Roche Diagnostic, ABD). 100 μL DMEM'de, C6 Glioma hücreleri, 96 kuyulu plakalara oyuk başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda ekildi ve borik asit ile işleme tabi tutulmadan önce gece boyunca inkübatörde bekletildi. Glutamatın neden olduğu sitotoksosite prosedürü daha önceki çalışmalar referans alınarak gerçekleştirildi [25,26]. 24 saatlik inkübasyonun ardından besi yeri uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklar, fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez yıkandı. Son aşamada her kuyucuğa 100 μL fenol kırmızısı içermeyen DMEM ve 50 μL XTT karışım solüsyonu eklenerek plakalar $37^\circ C$ 'de 4 saat bekletildi. Plakalar ELISA mikropilaka okuyucusu (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Testlerin tümü üç kez tekrarlandı ve hücre canlılığı, kontrole göre canlı hücrelerin yüzdesi olarak hesaplandı.

2.5. Hücre Homojenatlarının Hazırlanması (Preparation of Cell Homogenates)

Her grubun hücreleri steril tüplerde toplandı. Hücreler 10 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüjlendi ve sonrasında süpernatantlar çıkarıldı. Tüplerdeki hücreler, hücre süspansiyonunun PBS (pH: 7.4) ile yaklaşık 1 milyon/ml'lik bir hücre yoğunluğuna kadar seyreltilmesiyle süspansiyon edildi. İç bileşenlerin dışarı çıkmasını sağlamak için hücreler tekrarlanan donma-çözülme döngüleriyle patlatıldı. Ardından 4°C sıcaklıkta 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı. Daha sonra süpernatantlar toplandı ve biyokimyasal analize tabi tutuldu. Numunelerdeki toplam protein seviyeleri Bradford protein tahlil kiti (Merck Millipore, Almanya) kullanılarak belirlendi [27].

2.6. Hücrelerdeki iNOS, NO, nNOS, MDA, SOD ve CAT Seviyeleri Ölçümü (Measurement of iNOS, NO, nNOS, MDA, SOD and CAT Levels in Cells)

Her grup için hücrelerin süpernatantlarındaki iNOS (kat. no: SL0365Ra), NO (kat. no: QS0531Ra), nNOS (kat. no: SL1065Ra), MDA (kat. no: SL0475Ra), SOD (kat. no: SL0664Ra) ve CAT (kat. no: SL1084Ra) seviyeleri, ELISA ticari kitleri (Sunlong Biotech, Çin) kullanılarak ölçüldü. Uygulama prosedürleri için üreticinin yönergeleri takip edildi. Kısaca, standart ve hücre numuneleri plakalara yerleştirildi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Hücreler yıkandı ve ardından boyama solüsyonları eklenerek 37°C'de 15 dakika bekletildi. Absorbans, durdurma solüsyonu eklendikten sonra bir ELISA mikropilaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de ölçüldü. Numunelerin değerini belirlemek için standart eğriler çizildi. Plakaların içinde ve arasındaki varyasyon katsayıları %10'dan azdı.

2.7. TAS ve TOS Seviyelerinin Değerlendirilmesi (Assessment of TAS and TOS Levels)

Hücre süpernatantlarındaki TAS ve TOS seviyeleri, Erel tarafından tasarlanan otomatik bir test yöntemi kullanılarak belirlendi [28]. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşd/mg protein olarak ifade edilir. Numunelerdeki toplam protein seviyeleri, bir Bradford protein tahlil kiti (Merck Millipore, Almanya) kullanılarak belirlendi [29,30]. TAS seviyesi, hidrojen peroksit varlığında 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) molekülünün ABTS⁺ molekülüne okside olmasından kaynaklanmaktadır. Antioksidan varlığına göre ABTS radikali yeşil ve mavi rengini kaybeder. Mevcut renk değişimi, 660 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilebilmektedir. Örneklerdeki antioksidan konsantrasyonlarıyla orantılı olarak renk açılımı hızlanmaktadır. Sonuçlar $\mu\text{mol Trolox Eşdeğeri/mg}$ protein cinsinden ifade edilir. TOS seviyesi tayini, örneklerdeki oksitleyici maddeler tarafından Fe²⁺-o-dianisidin kompleksinin Fe³⁺ iyonuna oksidasyonuna dayanmaktadır. Asidik bir ortamda, Fe³⁺ iyonu ksilanol ile renkli bir kompleks oluşturur. Renk değişimi örneklerdeki oksitleyici moleküllerin konsantrasyonuna

orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Renk değişimi, 530 nm dalga boyunda ölçülerek değerlendirilir.

2.8. İstatistiksel Analiz (Statistical Analysis)

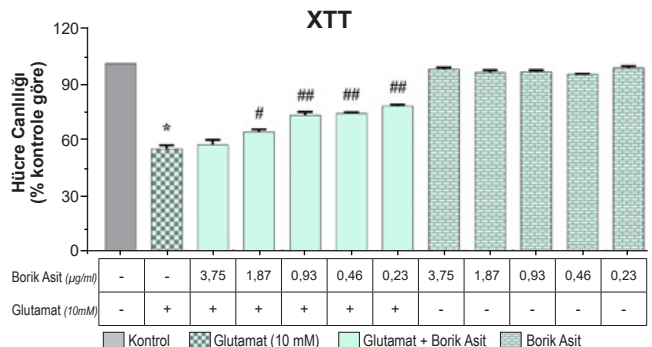
Çalışma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde IBM SPSS 23.0 for Windows (IBM, Armonk, NY, USA) paket programı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak sunuldu ve tek yönlü bir varyans analizi (tek yönlü ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Anlamlı farklılıklar elde edildiğinde post-hoc Tukey testi kullanılarak karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçlardan p<0,05 olan değerler anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular (Results)

3.1. Borik Asidin C6 Hücre Hattında Glutamat Toksisitesi Üzerine Etkisi (Effect of Boric Acid on Glutamate Toxicity in C6 Cell Line)

XTT kiti, C6 hücrelerinde glutamat tarafından indüklenen toksisiteye karşı borik asidin nöroprotektif özelliklerini değerlendirmek için kullanıldı. Bu çalışmada, ilacın hem kontrol hem de glutamatla tedavi edilen C6 hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisini test etmek için farklı konsantrasyonlarda (0,23-3,75 $\mu\text{g/mL}$) uygulandı. Hücreler ilk önce 1 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda borik asit (0,23-3,75 $\mu\text{g/mL}$) ile muamele edildi, ardından 24 saat daha 10 mM glutamat ile ya da glutamatsız inkübe edildi. C6 hücrelerinin 24 saat boyunca glutamat uygulanması, tedavi edilmemiş kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında hücre hayatta sağ kalımını önemli ölçüde azalttı (p<0,001; Şekil 1). Öte yandan 0,23; 0,46; 0,93 ve 1,87 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlardaki borik asit, glutamatla muamele edilen hücrelerle karşılaştırıldığında C6 hücrelerinde hücre canlılığını artırdı (p<0,05; Şekil 1).

Ayrıca tedavi edilmemiş kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında borik asidin tek başına herhangi



Şekil 1. BA'nın, glutamatın neden olduğu sitotoksisteden sonra C6 hücrelerinde, hücre sağ kalımı üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama $\pm$ standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. *p<0,05 tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; #p<0,05; ### p<0,01 glutamat ile tedavi edilene kıyasla (Effect of BA on cell viability in C6 cells after glutamate-induced cytotoxicity. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. *p<0.05 compared with untreated control group; #p<0.05; ### p<0.01 compared with glutamate-treated).

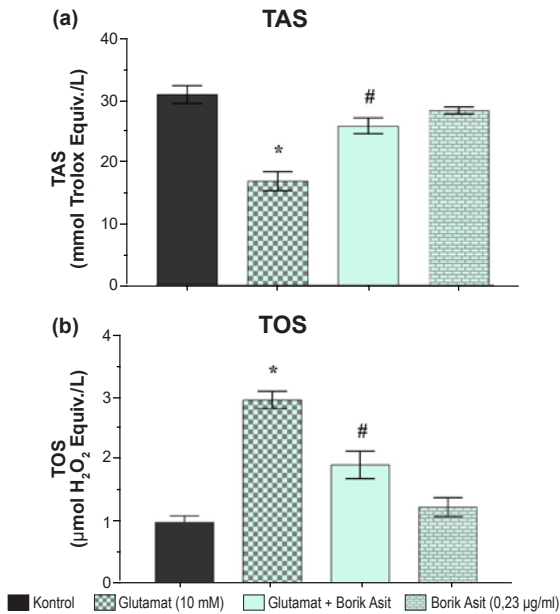
bir konsantrasyonda C6 hücrelerinin canlılığı üzerine hiçbir etkisi bulunmadı ($p>0,05$; Şekil 1).

3.2. Borik Asitin C6 Hücre Hattında Glutamatın Toksisitesi Sonrası TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi (Effect of Boric Acid on TAS and TOS Levels After Glutamate Toxicity in C6 Cell Line)

Hücreler 1 saat boyunca etkin konsantrasyon olarak belirlenen 0,23 µg/mL borik asit ile muamele edildi, sonrasında hücreler 10 mM glutamat ile ya da glutamatsız inkübe edildi ve ticari kitler kullanılarak TAS-TOS düzeyleri saptandı.

Sadece glutamat uygulanan C6 hücreleri, kontrol grubuna kıyasla TAS düzeyleri önemli ölçüde azaldı ($p<0,05$; Şekil 2a). Öte yandan hücreler 0,23 µg/mL konsantrasyondaki borik asit ile 1 saat önceden muamele edilmesi hücrelerdeki TAS seviyesini glutamat grubu hücrelerine göre artırdı ($p<0,05$; Şekil 2a).

C6 hücrelerini glutamat ile 24 saat boyunca önceden inkübe edildiğinde kontrol grubuna kıyasla TOS seviyelerini önemli ölçüde artırdı ($p<0,05$; Şekil 2b). Buna karşın 0,23 µg/mL konsantrasyondaki borik asit ile ön uygulama, glutamatla tedavi edilen hücrelere kıyasla C6 hücrelerinde TOS seviyelerini önemli ölçüde düşürdü ($p<0,05$; Şekil 2b). Tek başına 0,23 µg/mL konsantrasyonundaki borik asit, kontrole kıyasla C6 hücrelerinde TAS ve TOS düzeylerinde önemli bir değişikliğe neden olmadı ($p>0,05$; Şekil 2a ve b).



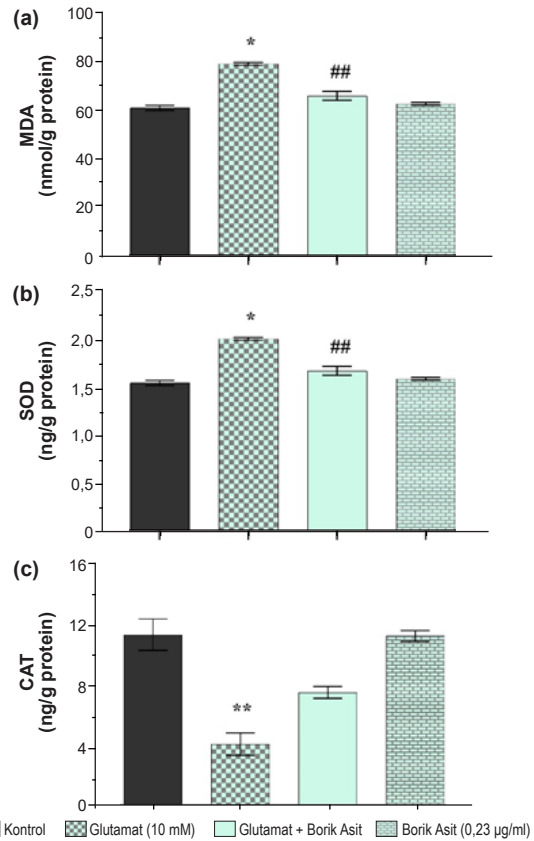
Şekil 2. C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra 0,23 µg/ml BA'nın TAS (a) ve TOS (b) seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir * $p<0,05$ tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ glutamat ile tedavi edilene kıyasla. (Effect of 0.23 µg/ml BA on TAS (a) and TOS (b) levels after glutamate-induced cytotoxicity in C6 cells. Data are expressed as mean ± standard error of the mean. * $p<0,05$ compared with untreated control group; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ compared with glutamate-treated).

3.3. Borik Asitin C6 Hücre Hattında Glutamatın Toksisitesi Sonrası MDA, SOD ve CAT Düzeylerine Etkisi (Effect of Boric Acid on MDA, SOD and CAT Levels After Glutamate Toxicity in C6 Cell Line)

C6 hücrelerine BA eklendi ve 1 saat sonra 10 mM glutamat ile ya da glutamatsız olarak hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. MDA, SOD ve CAT düzeyleri ELISA kiti ile belirlendi.

Tek başına glutamat uygulanan hücrelerde MDA düzeyi kontrol grubu hücrelerine göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05$; Şekil 3a). Borik asit ile ön muamele edilen hücrelerde ise MDA seviyesi glutamat grubuna göre azaldı ($p<0,05$; Şekil 3a).

C6 hücrelerine 24 saat süresince glutamat uygulanması, hücrelerin SOD seviyesinde anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur ($p<0,05$; Şekil 3b). Ancak hücrelere 1 saat önce BA uygulanması SOD seviyesini glutamat grubuna göre artırmıştır ($p<0,05$; Şekil 3b).



Şekil 3. C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksiteden sonra 0,23 µg/ml BA'nın MDA (a), SOD (b) ve CAT (c) seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ glutamat ile tedavi edilene kıyasla (Effect of 0.23 µg/ml BA on MDA (a), SOD (b) and CAT (c) levels after glutamate-induced cytotoxicity in C6 cells. Data are expressed as mean ± standard error of the mean. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ compared with untreated control group; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ compared with glutamate-treated).

Tek başına BA uygulaması ile SOD seviyesinde kontrol grubuna göre herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır ($p>0,05$; Şekil 3b).

Glutamat ile muamele edilen hücrelerin CAT seviyeleri kontrol grubuna göre azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$; Şekil 3c). Bununla birlikte 0,23 µg/mL BA ile ön işleme tabi tutulan hücrelerde glutamat grubuna kıyasla CAT seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$; Şekil 3c).

3.4. Borik Asitin C6 Hücre Hattında Glutamatın Toksisitesi Sonrası NO, iNOS ve nNOS Düzeylerine Etkisi (Effect of Boric Acid on NO, iNOS and nNOS Levels After Glutamate Toxicity in C6 Cell Line)

BA uygulanan hücrelerin glutamatlı ya da glutamatsız NO, iNOS ve nNOS seviyelerini biyokimyasal olarak analiz etmek amacıyla ELISA testi kullanıldı.

ELISA testi sonuçlarına göre C6 hücrelerinde sadece glutamata maruz kalan hücrelerin NO seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artış gösterirken hücrelerin 1 saat önce BA muamele edilmesi NO seviyesini azaltmıştır ($p<0,05$; Şekil 4a). Ancak sadece BA uygulanan hücrelerin NO seviyesi kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir ($p>0,05$; Şekil 4c).

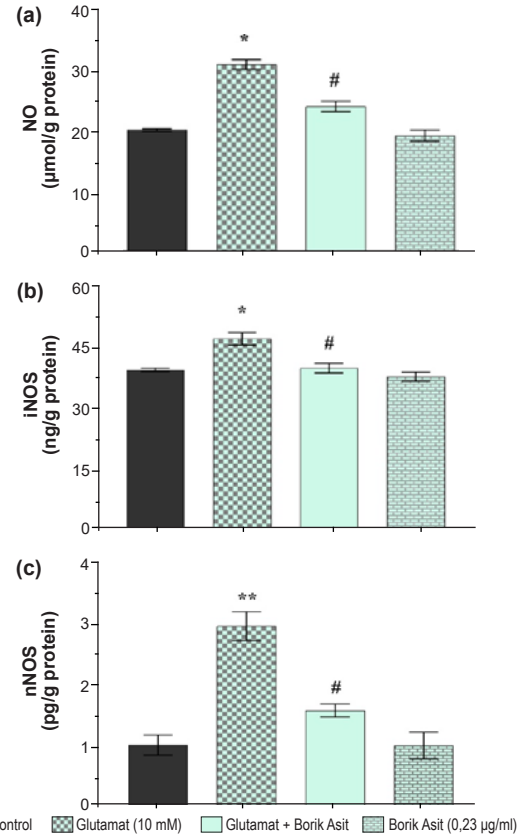
Hücrelerin glutamat ile 24 saat boyunca önceden inkübe edilmesi kontrol grubuna kıyasla iNOS seviyesini önemli ölçüde artırmıştır ($p<0,05$; Şekil 4b). BA ile 1 saat ön muamele edilen C6 hücrelerinde ise iNOS düzeyi glutamat grubuna göre arttığı saptanmıştır ($p<0,05$; Şekil 4b).

nNOS seviyesi tek başına glutamat uygulanan grupta kontrole kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$; Şekil 4c). Buna karşın 0,23 µg/mL BA ile ön işleme tabi tutulan hücrelerde nNOS seviyesi glutamat grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($p>0,05$; Şekil 4c).

4. Tartışma (Discussion)

Bu çalışma, BA ön uygulamasının, C6 astroglial hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksisteye karşı antioksidan etkiler gösterdiğini ortaya koyan ilk çalışmadır. C6 hücre hattında, BA ön uygulaması ile glutamat kaynaklı sitotoksisteye hücre sağ kalımı artmıştır. Veriler, BA'nın glial hücrelerin glutamat kaynaklı sitotoksisteye sonrası hücre ölümünü ve oksidatif ve nitroaktif stresi azalttığını göstermiştir. Çalışmanın sonucunda borik asit ön uygulaması iNOS, nNOS, NO, MDA ve TOS düzeylerini düşürmüş, TAS, CAT ve SOD düzeylerini ise artırmıştır. Böylelikle glutamatın neden olduğu sitotoksisteye karşı BA'nın antioksidan özellikler gösterdiği tespit edilmiştir.

Bor içeren bileşikler, nöronal süreçlerin düzenlenmesinde nöroprotektif etkilere sahiptir. Bunlar arasında nöronal ateşleme, nörotrofik faktörlerin



Şekil 4. C6 hücrelerinde glutamatın neden olduğu sitotoksisteden sonra 0,23 µg/mL BA'nın NO (a), iNOS (b) ve nNOS (c) seviyeleri üzerindeki etkisi. Veriler, ortalama ± standart hata ortalaması olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ tedavi edilmemiş kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ glutamat ile tedavi edilene kıyasla (Effect of 0.23 µg/mL BA on NO (a), iNOS (b), nNOS (c) and levels after glutamate-induced cytotoxicity in C6 cells. Data are expressed as mean ± standard error of the mean. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ compared with untreated control group; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ compared with glutamate-treated).

üretimi, oksidatif belirteçlerin kontrolü ve davranışsal kontrol mekanizmaları bulunur. Bor bu etkilerini, iyon kanalları, G-proteinine bağlı reseptörler veya nöronal davranış üzerinde değişiklik yapan diğer reseptörler aracılığıyla gerçekleştirmektedir [31-33]. Ayrıca, inflamasyon veya oksidatif süreçlerin modülasyonunda da etkilidir [20].

BA'nın nöroprotektif etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, sıçanlarda alüminyum klorid enjeksiyonu ile hasar oluşturulan beyin dokusunun değişen seviyelerde BA konsantrasyonlarına nasıl tepki verdiği araştırılmıştır. Deney sonucunda, düşük dozdaki BA'nın (3,25 mg/kg) nöronlarda koruyucu etkisinin olduğu, yüksek dozların (36 ve 58,5 mg/kg) ise beyin dokusunda daha fazla hasara yol açtığı gösterilmiştir [34]. BA ve C6 glioblastoma hücrelerinin etkileşimine dair yapılan bir çalışmada BA'nın yüksek konsantrasyonlarda (0,39-25 mM) ferroptoz, apoptoz ve semaforin sinyal yolunu düzenleyerek tümör ilerlemesini önlediğine dair kanıt sağlamıştır [35]. Kızılay ve ark. ise yaptıkları çalışmada, siyatik sinir yaralanmasını takiben sıçanlara 100 mg/kg dozunda

borik asit verilmesinin miyelin ve aksonlardaki hasarı önemli ölçüde azalttığını ve yaralanan sinirin elektriksel fonksiyonunu iyileştirdiğini göstermiştir. Oksidatif parametrelerden biri olan NF- κ B seviyesinin siyatik sinir yaralanması sonucu arttığı buna karşın BA uygulaması ile azaldığı immunohistokimyasal boyama yöntemi ile belirlenmiştir. Bu iyileşme muhtemelen oksidatif stres reaksiyonlarının azalmasından kaynaklanmaktadır [36].

Nörodejeneratif hastalıklar, psikiyatrik bozukluklar ve sinir dokusu yaralanmalarında gözlemlenen yaygın bir bulgu, ROS ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif streştir. Enzimler, kofaktörler ve peptitler gibi hücre antioksidan mekanizmalarındaki değişiklikler, ROS ve serbest radikallerin stabilize edilmesini oldukça zor hale getirir. Nöronlar ve glial hücreler içindeki artan olumsuz süreç, proteinler, lipitler ve nükleik asitlerle etkileşime girmeye başladıkça oksidanların miktarında daha fazla bir artışa yol açar ve bu durum hücrelerde fonksiyon bozukluğu ve ölümle sonuçlanır. Bu bağlamda, antioksidan etki gösterebilecek bir mekanizmaya sahip bor içeren bir bileşik olmasa da, besin maddesi olarak borun çeşitli hücre tiplerinde sistemik oksidatif stresi iyileştirdiğine dair kanıtlar mevcuttur [37-39]. Özellikle BA'nın lipid peroksidasyonu, oksidatif stres ve bu oksidatif süreçlerle ilgili inflamatuvar yanıtı karşı etkili olduğu kanıtlanmıştır [40,41]. Ataizi ve ark. kapalı kafa travması geçiren sıçanların beyin dokularındaki CAT ve MDA aktivitesindeki değişiklikleri ve ayrıca bu sıçanlarda BA'nın potansiyel nöroprotektif etkisini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda travmalı sıçanların beyin dokusunda CAT düzeyi azalırken BA uygulaması ile arttığı, MDA düzeyi artarken BA arttığı tespit edilmiştir [42]. Yavuz ve ark., Wistar-albino sıçanlarda yaptıkları Parkinson modelinde BA ve kuersetinin oksidatif stres belirteçleri ve davranış testleri üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada beyin doku örneklerinde glutatyon, MDA ve aynı zamanda TAS seviyelerini incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları BA ve kuersetin kombine olarak uygulandığında lipid peroksidasyon seviyelerinin azaldığı ileri sürülmüştür. Bu sonuç BA'nın gıda takviyesi olarak kullanılabileceğini anlamlı kılmaktadır [43]. Benzer şekilde nöronal hücrelerin uzun süreli glutamata maruz kalması ile oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir [44]. Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda, glutamat uygulanan grupta MDA seviyesinin arttığı, CAT ve SOD seviyesinin azaldığı, BA ön uygulaması ile artan MDA seviyesinin azaldığı, CAT ve SOD seviyesinin ise arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar bozulan antioksidan mekanizmanın BA uygulaması ile düzelebileceğini göstermektedir.

ROS oluşumu ve lipit peroksidasyonu (LP), uyarıcı glutamat ve aspartatın salınmasına, hücreye kalsiyum akışına yol açar. Bu durum hücre zarı geçirgenliğini bozar ve ikincil hücre hasarına neden olur. Çeşitli çalışmalar oksijensiz radikallerin ikincil hasarlarda anahtar rol oynadığını ve nörotoksisiteye yol açtığını göstermiştir [26,45-47]. İkincil beyin hasarının önemli bir kısmı, antioksidan mekanizmalar, ROS

seviyeleri ve RNS arasındaki dengenin bozulması ve bunun sonucunda LP'nin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Antioksidanların MSS üzerinde olumlu etkisi daha önce gösterilmiştir[48,49]. Şahin ve ark. bir besin takviyesi olarak BA'nın, oksidatif strese karşı ana hücre mekanizmalarından biri olan Nrf2 yolunu aktive ettiğini ileri sürmüşlerdir. Bu yolun aktivasyonu antioksidan özelliklere sahip proteinlerin ekspresyonuna yol açmaktadır [50]. Hazman ve ark. sıçanlarda sisplatin toksikasyonu sonrası artan oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun farklı dozlarda BA ve boraks tedavileri ile azaltılabileceği bildirmişlerdir [51]. Benzer olarak bizim çalışmamızda glutamat sonrası artan TOS seviyesinin BA ön uygulaması ile azaldığı, azalan TAS seviyesinin ise BA uygulaması sonrası arttığı bulunmuştur. Hacıoğlu ve ark. nöronal iletim ve nörodejeneratif süreçlerin araştırılmasında ex vivo model sistem olan sinaptozomlar üzerinde A β 1-42 kaynaklı nörodejeneratif hasara karşı BA ve kurkuminin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Deney verilerinde BA tedavisinin LP, MDA ve NO düzeylerini azalttığını tespit etmişlerdir [52]. Çalışmamızın sonuçları BA uygulaması ile glutamat kaynaklı nitroztatif stresi inhibe ederek iNOS, nNOS ve NO seviyelerini azalttığını gösteren önceki çalışmalarla tutarlıdır.

5. Sonuçlar (Conclusions)

BA'nın oksidatif ve nitroztatif süreçlerde etkili olan proteinler üzerinde çok yönlü etkisi olduğu bulunmuştur. Bu bakımdan BA takviyesi nörodejeneratif hastalıklar üzerinde önleyici bir role sahip olabilir. Ayrıca, bor atomunun rolü, özellikleri ve kimyasal yapısal çekirdeklerin tanımlanması, nörodejenerasyona karşı yenilikçi bor içeren aktif ilaçlar için potansiyel farmakoforlar olarak seçilebilir ve önerilebilir.

6. Teşekkürler (Acknowledgements)

Bu çalışma TUBİTAK 2209-A (Proje no: 1919B012004287) projesi kapsamında yapılmıştır. Çalışmada gerekli olanakları sağladığı için Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'ne (CÜTFAM) teşekkür ederiz.

7. Yazar Katkısı Beyanı (Author Contribution Statement)

Ayşegül Öztürk: Kavramsallaştırma, metodoloji, veri analizi, yazım analizi, orijinal taslak yazma.

Ahmet Şevki Taşkıran: Proje yönetimi, yazım analizi, denetim, grafiksel tasarım.

Emin Gündoğdu: Metodoloji, grafiksel tasarım.

Kaynaklar (References)

- [1] Wang, Y., & Qin, Z. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15(11), 1382-1402. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0481-0>
- [2] Daniele, S. G., Trummer, G., Hossmann, K. A., Vrselja, Z., Benk, C., Gobeske, K. T., ... & Sestan, N. (2021).

- Brain vulnerability and viability after ischaemia. *Nature Reviews Neuroscience*, 22(9), 553-572. <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00488-y>
- [3] Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379-387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- [4] Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate-induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>
- [5] Felek, H., Çatal, T., Yulak, F., Filiz, A. K., & Karabulut, S. (2024). The effect of myostatin on glutamate excitotoxicity induced in SH-SY5Y cell line. *Health Sciences Student Journal*, 4(1), 1-6. Erişim Adresi: <https://ojs.healthssj.com/index.php/panel/article/view/15>
- [6] Barbeito, L. H., Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M. R., Peluffo, H., Viera, L., ... & Beckman, J. S. (2004). A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Research Reviews*, 47(1-3), 263-274. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.05.003>
- [7] Hertz, L. (2006). Glutamate, a neurotransmitter-and so much more. *Neurochemistry International*, 48(6-7), 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.021>
- [8] Pope, S. A., Milton, R., & Heales, S. J. (2008). Astrocytes protect against copper-catalysed loss of extracellular glutathione. *Neurochemical Research*, 33(7), 1410-1418. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9602-3>
- [9] Quincozes-Santos, A., & Gottfried, C. (2011). Resveratrol modulates astroglial functions: Neuroprotective hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1215(1), 72-78. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05857.x>
- [10] Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., & Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, 161(3839), 370-371. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.370>
- [11] Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>
- [12] Karademir M., Öztürk, A., Yulak, F., Özkaraca, M., & Taskiran, A. S. (2024). Unveiling the protective potential of sugammadex against ptz-induced epileptic seizures in mice: A comprehensive study on oxidative stress, apoptosis, and autophagy. *Neurochemical Journal*, 18(2), 338-347. <https://doi.org/10.1134/s1819712424020181>
- [13] Azimullah, S., Meeran, M. F., Ayoob, K., Arunachalam, S., Ojha, S., & Beiram, R. (2023). Tannic acid mitigates rotenone-induced dopaminergic neurodegeneration by inhibiting inflammation, oxidative stress, apoptosis, and glutamate toxicity in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 9876. <https://doi.org/10.3390/ijms24129876>
- [14] Brocardo, P. S., Gil-Mohapel, J., & Christie, B. R. (2011). The role of oxidative stress in fetal alcohol spectrum disorders. *Brain Research Reviews*, 67(1-2), 209-225. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2011.02.001>
- [15] Javed, H., Azimullah, S., Haque, M. E., & Ojha, S. K. (2016). Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00321>
- [16] Ergül, M., & Taşkıran, A. Ş. (2021). Thiamine protects glioblastoma cells against glutamate toxicity by suppressing oxidative/endoplasmic reticulum stress. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 69(9), 832-839. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00169>
- [17] Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 360(1), 201-205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- [18] Nielsen, F. H. (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Reviews*, 66(4), 183-191. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00023.x>
- [19] Qiu, L., Zhu, C.-L., Wang, X.-Y., & Xu, F.-L. (2007). Changes of cell proliferation and differentiation in the developing brain of mouse. *Neuroscience Bulletin*, 23(1), 46-52. <https://doi.org/10.1007/s12264-007-0007-0>
- [20] Barrón-González, M., Montes-Aparicio, A. V., Cuevas-Galindo, M. E., Orozco-Suárez, S., Barrientos, R., Alatorre, A., ... & Soriano-Ursúa, M. A. (2023). Boron-containing compounds on neurons: Actions and potential applications for treating neurodegenerative diseases. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 238, 112027. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2022.112027>
- [21] Barranco, W. T., & Eckhert, C. D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *British Journal of Cancer*, 94(6), 884-890. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603009>
- [22] Sogut, I., Oglakci, A., Kartkaya, K., Ol, K. K., Sogut, M. S., Kanbak, G., & Inal, M. E. (2014). Effect of boric acid on oxidative stress in rats with fetal alcohol syndrome. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(3), 1023-1027. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2164>
- [23] Ince, S., Kucukkurt, I., Cigerci, I. H., Fatih Fidan, A., & Eryavuz, A. (2010). The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 24(3), 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.01.003>
- [24] Yousefzadehmoghaddam, R., Hassanpour, M., Öztürk, A., & Karabulut, S., (2023). Investigation of the effect of galium aparine extract on glutamate excitotoxicity induced in C6-glioma cell line. *Health Sciences Student Journal*, 3(1), 8-18. Retrieved from <https://journals.indexcopernicus.com/api/file/viewByFileId/1773565>
- [25] Taskiran, A. S., & Ergul, M. (2021). The effect of salmon calcitonin against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 cell line and the roles the inflammatory and nitric oxide pathways play. *Metabolic Brain Disease*, 36(7), 1985-1993. <https://doi.org/10.1007/s11011-021-00793-6>
- [26] Dirik, H., & Joha, Z. (2023). Investigation of the effect of sugammadex on glutamate-induced neurotoxicity

- in C6 cell line and the roles played by nitric oxide and oxidative stress pathways. *Fundam Clin Pharmacol*, 37(4), 786-793. <https://doi.org/10.1111/fcp.12890>
- [27] Gömeç, M., İpek, G., Öztürk, A., & Şahin İnan, D. (2022). Effect of wheat germ oil on wound healing: An *in vitro* study in fibroblast cells. *Turkish Journal of Science and Health*, 3(3), 230-235. <https://doi.org/10.51972/tfsd.1128533>
- [28] Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry*, 37(2), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.10.014>
- [29] Taşkiran, A. Ş., & Topçu, A. (2023). Investigation of the protective role of quercetin on oxidative stress and endoplasmic stress pathway in 4-aminopyridine-induced neuronal damage. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 11(1), 2505-2511. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v11i1s1.2505-2511.6413>
- [30] Filiz, A. K., Joha, Z., & Yulak, F. (2021). Mechanism of anti-cancer effect of β -glucan on SH-sy5y cell line. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 16(4), 122-128. <https://doi.org/10.3329/bjpp.v16i4.54872>
- [31] Gavande, N., Kim, H.-L., Doddareddy, M. R., Johnston, G. A., Chebib, M., & Hanrahan, J. R. (2013). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of fluorescent and biotinylated antagonists of p1 GABAC Receptors. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 4(4), 402-407. <https://doi.org/10.1021/ml300476v>
- [32] Soriano-Ursúa, M. A., Bello, M., Hernández-Martínez, C. F., Santillán-Torres, I., Guerrero-Ramírez, R., Correa-Basurto, J., ... & Trujillo-Ferrara, J. G. (2018). Cell-based assays and molecular dynamics analysis of a boron-containing agonist with different profiles of binding to human and guinea pig beta2 adrenoceptors. *European Biophysics Journal*, 48(1), 83-97. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1336-9>
- [33] Vernekar, S. K., Hallaq, H. Y., Clarkson, G., Thompson, A. J., Silvestri, L., Lummis, S. C., & Lochner, M. (2010). Toward biophysical probes for the 5-HT3 receptor: Structure-activity relationship study of granisetron derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5), 2324-2328. <https://doi.org/10.1021/jm901827x>
- [34] Çolak, S., Geyikoğlu, F., Keles, O. N., Türkez, H., Topal, A., & Unal, B. (2011). The neuroprotective role of boric acid on aluminum chloride-induced neurotoxicity. *Toxicology and Industrial Health*, 27(8), 700-710. <https://doi.org/10.1177/0748233710395349>
- [35] Kar, F., Hacıoğlu, C., & Kaçar, S. (2022). The dual role of boron *in vitro* neurotoxication of glioblastoma cells via SEMA3F/NRP2 and ferroptosis signaling pathways. *Environmental Toxicology*, 38(1), 70-77. <https://doi.org/10.1002/tox.23662>
- [36] Kizilay, Z., Erken, H., Çetin, N., Aktaş, S., Abas, B., & Yılmaz, A. (2016). Boric acid reduces axonal and myelin damage in experimental sciatic nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 11(10), 1660. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.193247>
- [37] Zafar, H., & Ali, S. (2013). Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 529(2), 66-74. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.11.008>
- [38] Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., Acaroz, D. A., Akbel, E., & Cigerci, I. H. (2014). Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere*, 108, 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.038>
- [39] Ayhanci, A., Tanriverdi, D. T., Sahinturk, V., Cengiz, M., Appak-Baskoy, S., & Sahin, I. K. (2019). Protective effects of boron on cyclophosphamide-induced bladder damage and oxidative stress in rats. *Biological Trace Element Research*, 197(1), 184-191. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01969-z>
- [40] Coban, F. K., Ince, S., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., & Hazman, O. (2014). Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(4), 391-399. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.974109>
- [41] Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Kucukkurt, I., Demirel, H. H., ... & Zhu, K. (2018). The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 745-752. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.029>
- [42] Ataizi, Z. S., Ozkoc, M., Kanbak, G., Karimkhani, H., Burukoglu Donmez, D., Ustunisik, N., & Ozturk, B. (2019). Evaluation of the neuroprotective role of boric acid in preventing traumatic brain injury-mediated oxidative stress. *Turkish Neurosurgery*, 31(4). <https://doi.org/10.5137/1019-5149.jtn.25692-18.4>
- [43] Yavuz, E., Çevik, G., Çevreli, B., & Serdaroğlu Kaşıkçı, E. (2023). Effect of boric acid and quercetin combination on oxidative stress/ cognitive function in parkinson model. *Journal of Boron*, 8(3), 85-91. <https://doi.org/10.30728/boron.1215949>
- [44] Filiz, A. K., Öztürk, A. (2021). The effect of carbamazepine against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 cell line. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 7(8). <https://doi.org/10.7176/jstr/7-08-09>
- [45] Yıldızhan, K., & Öztürk, A. (2022). Quipazine treatment exacerbates oxidative stress in glutamate-induced HT-22 neuronal cells. *The European Research Journal*, 8(4), 521-528. <https://doi.org/10.18621/eurj.1027423>
- [46] Çakır Çanak, T., Akpınar, S., & Serhatlı, E. (2017). Homopolymerization and synthesis of a new methacrylate monomer bearing a boron side group: Characterization and determination of monomer reactivity ratios with styrene. *Turkish Journal of Chemistry*, 41, 209-220. <https://doi.org/10.3906/kim-1603-106>
- [47] Şahin, B., & Karabulut, S. (2022). Sugammadex causes C6 glial cell death and exacerbates hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Cumhuriyet Medical Journal*, 44(1), 22-27. <https://doi.org/10.7197/cmj.1069629>
- [48] Dohi, K., Satoh, K., Nakamachi, T., Yofu, S., Hiratsuka, K., Nakamura, S., ... & Aruga, T. (2007). Does Edaravone (MCI-186) act as an antioxidant and a neuroprotector in experimental traumatic brain injury? *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(2), 281-287. <https://doi.org/10.1089/>

ars.2007.9.281

- [49] Topal Canbaz, G., Keskin, Z. S., Yokuş, A., & Aslan, R. (2023). Biofabrication of copper oxide nanoparticles using solanum tuberosum L. var. Vitelotte: Characterization, antioxidant and antimicrobial activity. *Chemical Papers*, 77(8), 4277-4284. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02776-6>
- [50] Sahin, N., Akdemir, F., Orhan, C., Aslan, A., Agca, C. A., Gencoglu, H., ... & Sahin, K. (2012). A novel nutritional supplement containing chromium picolinate, phosphatidylserine, docosahexaenoic acid, and boron activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects the brain against oxidative stress in high-fat-fed rats. *Nutritional Neuroscience*, 15(5), 42-47. <https://doi.org/10.1179/1476830512y.0000000018>
- [51] Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., & Çelik, S. (2018). The effect of boric acid and borax on oxidative stress, inflammation, er stress and apoptosis in cisplatin toxication and nephrotoxicity developing as a result of toxication. *Inflammation*, 41(3), 1032-1048. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0756-0>
- [52] Hacıoglu, C., Kar, F., Kar, E., Kara, Y., & Kanbak, G. (2020). Effects of curcumin and boric acid against neurodegenerative damage induced by amyloid beta (1-42). *Biological Trace Element Research*. 199, 3793-3800. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02511-2>