



# BOR DERGISI

## JOURNAL OF BORON

<https://dergipark.org.tr/boron>



## 4-hidroksi fenilboronik asidin lipopolisakkarit ile indüklenmiş karaciğer hasarı üzerine muhtemel koruyucu etkilerinin incelenmesi

Zafer Bayraktutan <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, 25100, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

#### Makale Geçmişi:

İlk gönderi 13 Ocak 2022  
Kabul 24 Şubat 2022  
Online 29 Mart 2022

#### Araştırma Makalesi

DOI: 10.30728/boron.1057322

#### Anahtar kelimeler:

4-hidroksi fenilboronik asit  
Bor  
BRL 3A  
LPS  
Karaciğer hasarı

### ÖZET

Bor ürünleri sağlık alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Medikal anlamda ilk kez kanser tedavisinde kullanılan bor ürünleri yıllar içinde kardiyovasküler sağlık, kemik sağlığı, yara iyileşmesi ve immün sistem üzerine olan olumlu etkileri sebebiyle medikal tedavilerde yerini almıştır. Boronik asitler ise son zamanlarda medikal araştırmalarda oldukça popüler olarak incelenen bir bor bileşeni grubudur. Boronik asitler 100 yıldan daha uzun bir süredir sahip oldukları anti mikrobiyal etki ile bilinmiyorlardı. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar boronik asitlerin sadece antimikrobiyal etkiye değil aynı zamanda anti enflamatuvar etkiye sahip olduklarını göstermiştir. Bu etkileriyle birçok enflamatuvar hastalıkta kullanılabilirler. Karaciğer hasarı da enflamasyonun görüldüğü hastalıklardan biridir. Son yıllarda, kanser, kemoterapiler, antiviral ilaçların kullanımı, artan hepatik steatoz ve yanlış bitkisel takviyelerin kullanımı sebebiyle karaciğer hasarı insidansı artmıştır. Bu sebeple karaciğer hasarının tedavi edilmesi günümüzde artık daha büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada bir boronik asit türevi olan 4-hidroksi fenilboronik asidin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenmiş karaciğer hasarındaki rolü incelenmiştir. Sonuçlara bakıldığında 4 hidroksi fenilboronik asit tedavisinin artmış olan sitokin seviyelerini düşürdüğünü gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak 4-hidroksi fenilboronik asidin karaciğer hasarını tedavi etme potansiyeline sahip bir ajan olabileceği gösterilmiştir.

## Investigation of possible protective effects of 4-hydroxy phenylboronic acid on lipopolysaccharide-induced liver injury

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received January 13, 2022  
Accepted February 24, 2022  
Available online March 29, 2022

#### Research Article

DOI: 10.30728/boron.1057322

#### Keywords:

4-hydroxy phenylboronic acid  
BRL 3A  
Boron  
LPS  
Liver injury

### ABSTRACT

Boron products have been used in the field of health for many years. Boron products, which were used in the treatment of cancer for the first time in the medical field, have taken their place in medical treatments over the years due to their positive effects on cardiovascular health, bone health, wound healing and immune system. Boronic acids are a group of boron compounds that have recently been studied very popularly in medical research. Boronic acids have been known for their anti-microbial effect for more than 100 years. However, recent studies have shown that boronic acids have not only an antimicrobial effect, but also a strong anti-inflammatory effect. With these effects, they can be used in many inflammatory diseases. Liver injury is one of the diseases in which inflammation is seen. In recent years, the incidence of liver injury have increased extremely due to cancer, chemotherapies, use of antiviral drugs, increased hepatic steatosis and the use of wrong herbal supplements. For this reason, the treatment of liver damage is of greater importance today. In this study, the role of 4-hydroxy phenylboronic acid, a derivative of boronic acid, in lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury was examined. Looking at the results, it was observed that the 4-hydroxy phenylboronic acid treatment reduces the increased cytokine levels. Based on these results, it was shown that 4-hydroxy phenylboronic acid can be an agent with potential to treat liver injury.

### 1. Giriş (Introduction)

Bor, doğada oksijen ile bileşik yapmış olarak bulunan, nonmetal bir eser elementtir [1]. Periyodik tablodaki komşusu karbonun son iki yüzyıldır geniş çapta in-

celenmesine rağmen, bor kimyası ile ilgili çalışmalar karbon kimyasına kıyasla nispeten yenidir. Bununla birlikte, kendi başına yapı taşı olarak oldukça zengindir [2,3]. Borun organizmalarda yaşam döngüsünün tamamlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bitki-

\*Corresponding author: zafer.bayraktutan@atauni.edu.tr

lerde büyüme, çiçeklenme, tozlaşma ve tohum oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiş olmakla beraber bor, bitkilerde hücre duvarı sertliği sağlamak için gerekli moleküller arasında çapraz bağlar oluşturur. Borun insanlar için gerekli olduğu gösterilmemiştir [4]. Artan sayıda hücre kültürü, hayvan ve insan çalışmaları, besin ile alınan miktarlardaki borunun sağlığa yararlı etkileri olduğunu göstermektedir ve bor insan vücudunda genellikle 18 mg'ı aşmayacak kadar az miktarda bulunur [5,6].

Bor ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, bor ve bor bileşiklerinin kemik sağlığı üzerine ve kırık iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu; yara iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu, kanser tedavisinde kullanıldığı, immüniteyi destekleyici etkileri olduğu, kardiyovasküler sağlık üzerine olumlu etkileri olduğu ve anti enflamatuvar etkisi olduğu görülmüştür [7-12]. Borik asit veya borat olarak borun cis-hidroksil grupları, özellikle riboz içeren biyolojik olarak önemli birkaç şekerle ester kompleksleri oluşturur. Sonuç olarak, S-adenosilmetiyonin, diadenozin fosfat, NAD<sup>+</sup> ve NAD<sup>+</sup> metaboliti olan siklik ADP riboz (cADPR) gibi riboz içeren biyokimyasal varlıkların işlevi bor tarafından değiştirilebilir. Bu da borunun faydalı bir şekilde ilişkilendirildiği kemik oluşumu ve kırık iyileşimi, immünite üzerine olan etkileri, anti enflamatuvar ve antioksidan etkileri ve kardiyovasküler sağlık ile ilişkilendirilmiştir [13].

Yeni biyolojik aktivitelerde kolaylaştırıcı olarak değerlendirilebilecek potansiyele sahip olması nedeniyle bor farmasötik ilaç tasarımında kullanılmıştır. Bor içeren biyoaktif moleküller iki tiptir; bir tip tek bor atomu içerirken diğeri tip ise bor kümesi şeklindedir. Fizyolojik koşullar altında kullanıldığında bor, trigonal düzlemsel bir formdan, yani nötr bir formdan, anyonik forma anında dönüşebilme özelliğine sahiptir. Bu da enzim katalizli hidrolitik işlem inhibitörleri tasarlamak için bor kullanmanın temelini sağlamıştır [14-16]. Borun medikal alanda kullanımında çığır açan olay kanser tedavisi için bor nötron yakalama terapisinin (BNCT) kullanılmasıdır [17,18]. Son gelişmelerle birlikte bor moleküllerinin ve komplekslerinin anti kanser aktivitesi, anti-HIV aktivitesi, anti-romatoid artrit aktivitesi ve protein-biyomoleküler etkileşimlerin araştırılması dahil olmak üzere yeni biyolojik aktiviteleri ortaya çıkarılmıştır [19-21].

Günümüzde en çok incelenen bor bileşiklerinden biri de boronik asitlerdir. Boronik asit stabil, genellikle toksik olmayan ve kolayca sentezlenen bir bor bileşeni grubudur. Bu kimyasal özelliklerinden dolayı, Suzuki-Miyaura reaksiyonu, asit katalizi, hidroborasyon, amino asitlerin asimetric sentezi gibi metal katalizli işlemler dahil olmak üzere birçok kimyasal ve biyolojik reaksiyonda kullanılabilir [22,23]. Boronik asitler ilaçlarda kullanıldıklarında çoğunlukla aril formunda bulunmasının yanı sıra piridinil, pirolil ve indolil türevlerinde de bulunabilir [24].

Literatür bilgilerine bakıldığı zaman boronik asitlerin sentetik organik kimyada, biyo-organik kimya alanında

ve özellikle medikal alanda çok önemli roller üstlendiği görülmektedir. Biyo-aktif moleküllerin sentezinde ve boronik asitlerin kendilerinin farmasötik ajan olarak kullanılabilmesi bu ilgiyi arttırmaktadır. Boronik asit içeren moleküller HIV tedavisi de dahil olmak üzere obezite, diyabet ve kanser tedavisine kadar gibi birçok biyomedikal uygulamalarda da kullanılmaktadır [25]. Literatürde ilk kez Michaelis ve Becker'ın fenilboronik asitlerin mikroorganizmalara karşı etkili olduğunu yüz yıldan fazla bir süre önce tespit edilmiş olmakla birlikte boronik asitlerin  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri olarak hareket edebileceğine dair ilk rapor, Oxford Üniversitesi'nden bir araştırma grubu tarafından borat iyonlarının  $\beta$ -laktamaz l'i inhibe ettiği fark etmeleri sonucu yapılmıştır [26]. Yapılan başka bir çalışmada ise *P. aeruginosa* tarafından üretilen çeşitli virülan faktörler üzerine boronik asit moleküllerinin inhibisyon etkisi gösterilmiştir [27]. Bir boronik asit türevi olan Bortezomib'le yapılan çalışmada EBV enfeksiyona bağlı artan karaciğer hasarının azaldığı ve sitokin seviyelerini anlamlı derecede düşürdüğü tespit edilmiştir [28]. Yakın zamanda yapılmış bir *in vitro* çalışmada ise Bortezomib'in H22 fare hepatokarsinom hücrelerin üzerine olan anti kanser etkisi tümör modeli çalışması ile ispatlanmıştır [29]. İlgi çeken başka bir çalışmada ise lipopolisakkarit (LPS) ile oluşturulan periodontit modelinde bir boronik asit türevi olan bortezomib etkili bir şekilde iyileştirici etki göstermiş olup LPS ile artan sitokin seviyelerini NF- $\kappa$ B yolağını bloke ederek ve MAPK/AP-1 sinyal yolağının aktivasyonunu inhibe ederek önemli miktarda düşürmüştür [30]. Boronik asit türevleri ile yapılan başka bir çalışmada ise yapılan boronik asit tedavisinin IL-1 $\beta$  seviyesini azalttığını ve TLR4 yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir [31]. Yapılan bir deneysel sepsis çalışmasında bortezomibin sitokin salınımını önleyerek yararlı etkiler gösterdiği ortaya konmuştur [32].

Karaciğer hasarı son yıllarda oldukça artmış ve bunun birçok sebebi bulunmaktadır. Ancak neden ne olursa olsun sonuç olarak karaciğer hücrelerindeki sitokin salınım artışının karaciğer hasarına neden olduğu unutulmamalıdır [33]. İçinde bulunduğumuz COVID-19 pandemisi nedeniyle kullandığımız antiviral ajanlar olan remdesivir, lopinavir, ritonavir, favipiravir, triazavirin ve umifenovir nedeniyle, bunun yanı sıra pandemide yine sık olarak kullanılan azitromisin ve seftriakson, COVID-19 pandemisinin başında oldukça popüler olarak kullanılan ancak daha sonra yaptığı advers olaylar sebebiyle tedavi protokolünden kaldırılan hidrosiklorokin, immünmodülatör ajanlardan tosilizumab, anakinra ve deksametazon, bilinçsizce kullanılan vitaminler ve doğal ürün destekleri ne yazık ki hepatik hasarı son derece arttırmıştır [34,35]. Günümüzün en büyük sağlık problemlerinin başında gelen kanser ile birlikte hepatik hasar insidansı hem kanserin kendisinin direkt karaciğer hasarı yapabilmesiyle ve kemoterapi sonucunda oluşabilen toksisite nedeniyle oldukça artmış bulunmaktadır [36,37]. Günümüz çağının sağlık problemlerinden biri haline gelmiş olan obezite de oldukça ciddi bir karaciğer hasarı sebebidir. Obezite

sebebiyle oluşan hepatik steatozis sebebiyle oluşan karaciğer hasarı yanında, diğer komplikasyonlarından dolayı gelişen hasarlar ve obezite için kullanılan ilaçların kendilerinin yaptıkları hepatotoksisite nedeniyle hepatik hasar insidansı günümüzde oldukça artmıştır [38-40]. Karaciğer hasarının önlenmesi ve tedavisi büyük önem arz etmektedir. Karaciğer fonksiyonlarını yerine getirebilecek herhangi bir diyaliz benzeri tedavinin henüz geliştirilmekten çok uzak olunması ve ilerleyen karaciğer hasarlarından dolayı karaciğer nakli gereken durumlar gibi sebepler oldukça büyük sağlık problemlerine ve sağlık ekonomisi yüküne yol açmaktadır.

Çalışmada kullanılan 4-hidroksi fenilboronik asidin medikal kullanımıyla alakalı çok az yayın olmakla birlikte yukarıda bahsedilen ve aynı grupta yer aldığı boronik asitler gibi davranması muhtemeldir. Çünkü aynı grupta yer alan moleküllerin farmakolojik özellikleri de birbirine yakın olmakla beraber çok az da olsa kendilerine has özellikler gösterebilmektedirler. Ayrıca 4-hidroksi fenilboronik asidin anti enflamatuvar özelliğinin olup olmadığına dair bir literatür kaynağının bulunmaması, bu makalenin literatüre bu bilgiyi dahil edebilme potansiyeli nedeniyle oldukça önem arz etmektedir. Tüm bu bilgiler ışığında LPS ile indüklenmiş artan enflamatuvar sitokin ve buna bağlı oluşan karaciğer hasarında bir boronik asit türevi olan 4-hidroksi fenilboronik asidin etkisini *in-vitro* olarak sitokin seviyeleri ve hücre canlılık testleri ile gösterilecektir.

## 2. Malzemeler ve Yöntemler (Materials and Methods)

### 2.1. Kimyasallar, Reaktifler ve Kitler (Chemicals, Reagents and Kits)

Fenol ekstraksiyonu ile saflaştırılmış LPS L2880 Sigma-Aldrich Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O55:B5 Merck-Industrial&Lab Chemicals'tan alındı. 4-hidroksi fenilboronik asit ise Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (TENMAK BOREN) tarafından sağlandı. Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumunu (DMEM), hücre kültürü ortamı ve fetal siğir serumu ve penisilin/streptomisin gibi reaktifler Gibco'dan (Invitrogen Inc., Grand Island, New York, ABD) elde edildi. MTT hücre proliferasyon kiti Roche'tan (Basel, İsviçre) temin edildi. ELISA kitleri Bioassay Technology Laboratory BT Lab'dan (Birmingham, İngiltere) temin edildi. AST ve ALT kitleri Roche Diagnostics'ten temin edildi.

### 2.2. Hücre Kültürü ve LPS Uygulaması (Cell Culture and LPS Administration)

American Type Culture Collection (ATCC, USA)'dan temin edilen BRL 3A hücre hattı sıvı azot tankından çıkarılarak %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM hücre vasatı bulunan 75 cm<sup>2</sup> flaska ekildi ve 37°C'te, %90 nemlilikte %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edildi. Hücreler art arda pasajlandı. İkinci pasajdan sonra hücre sayımı yapılarak 48 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna (2×10<sup>5</sup> hücre/kuyucuk) hücre ekimi yapıldı. Hücreler yaklaşık %80 oranında konflue oldukları zaman adhezyon için 24 saat inkübe edildi. Daha son-

rasında hücreler 10 µg/ml LPS ile 12 saat muamele edildi [41,42]. LPS verilisinden 1 saat sonra 4-hidroksi fenilboronik asit tedavileri verildi [43]. Tedavi gruplarında kullanılacak olan 4-hidroksi fenilboronik asit (4OHFBA) dozları sırasıyla 31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM olarak belirlendi.

### 2.3. Deney Grupları (Experimental Groups)

Hücreler aşağıda tarif edildiği şekilde altı gruba ayrıldı:

- Sağlıklı grup: LPS uygulanmamış ve 4OHFBA tedavisi almamış olan grup.
- LPS grubu: 10 µg/ml LPS ile 12 saat işlem görmüş ancak 4OHFBA tedavisi almamış olan grup.
- LPS+31,25µM 4OHFBA grubu: 10 µg/ml LPS ile 12 saat muamele edilmiş ve 31,25µM 4OHFBA tedavisi almış olan grup.
- LPS+62,5µM 4OHFBA grubu: 10 µg/ml LPS ile 12 saat muamele edilmiş ve 62,5µM 4OHFBA tedavisi almış olan grup.
- LPS+125µM 4OHFBA grubu: 10 µg/ml LPS ile 12 saat muamele edilmiş ve 125µM 4OHFBA tedavisi almış olan grup.
- LPS+250µM 4OHFBA grubu: 10 µg/ml LPS ile 12 saat muamele edilmiş ve 250µM 4OHFBA tedavisi almış olan grup.

### 2.4. MTT Analizi (MTT Assay)

American Type Culture Collection (ATCC, USA)'dan temin edilen BRL 3A hücre hattı pasajlama ve sayım işlemlerinden sonra 3 ayrı 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna (5×10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk) hücre ekimi yapıldı ve ardından hücreler 10 µg/ml LPS'ye maruz bırakıldı. LPS uygulamasının 1 saat sonrasında farklı konsantrasyonlarda (31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM) 4-hidroksi fenilboronik asit tedavisi uygulandı. 4OHFBA'nın LPS'ye karşı hem hücre proliferasyonu hem de canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca 3 farklı süreç boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 20 µl metiltiazol tetrazolyum (MTT) solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve hücreler 4 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, formazan kristallerini çözmek için DMSO eklendi ve hücre canlılığı, 550 nm dalga boyunda (Epoch Mikropilaka Spektrofotometresi, BioTek, ABD) absorbans ölçülerek belirlendi [44].

### 2.5. ELISA Ölçümleri (ELISA Assay)

Hücre hatlarından toplanan örnekler kit manualinde yer alan hücre kültürü süpernatantı ile ölçüm protokolüne uygun olarak 2-8°C'de 3000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi ve sonrasında elde edilen süpernatantlardan IL-1β, IL-6 ve TNF-α seviyeleri ELISA yöntemi ile Epoch Spectrophotometer System and Take3 Plate (BioTek) cihazında ölçüldü. Standart bir eğri çizildi ve standartların absorbansından bir denklem elde edildi. Doğrusal IL-1β, IL-6 ve TNF-α konsantrasyonları bu denkleme göre hesaplandı ve pg/ml cinsinden ifade

edildi [45]. ELISA prosedürü kit protokolünde anlatılan basamaklara uygun olarak yapıldı.

## 2.6. AST ve ALT Ölçümleri (AST and ALT Assay)

Hücre süpernatantlarındaki ALT ve AST aktivite seviyeleri ticari kit protokolü uygulanarak belirlendi. Absorbanslar bir mikropolaka okuyucu kullanılarak ölçüldü ve AST ve ALT aktiviteleri litre başına birim (U/L<sup>-1</sup>) olarak ifade edildi.

## 2.7. İstatistiksel Analizler (Statistical Analysis)

Değişkenlerin dağılımının normalliği Shapiro-Wilk Testi ile belirlendi. ELISA ölçüm sonuçları ve AST ve ALT ölçüm sonuçları normal dağılım gösterdiğinden grupların karşılaştırmaları One Way ANOVA Post Hoc Duncan testi ile analiz edildi. Tüm istatistiksel analizler için Windows için SPSS-20 (IBM Corp., NY, Armonk, ABD) kullanıldı. 0,05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MTT ölçüm sonuçlarının dağılım normalliği Shapiro-Wilk Testi ile belirlendi. One Way ANOVA Post Hoc Tukey testi ile analiz edildi. Tüm istatistiksel analizler için Windows için SPSS-20 (IBM Corp., NY, Armonk, ABD) kullanıldı. 0,05'ten küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi [46].

## 3. Sonuçlar ve Tartışma (Results and Discussion)

### 3.1. MTT Analizi (MTT Assay)

24. saat MTT sonuçları incelendiğinde LPS grubundaki hücre canlılık yüzdesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde düştüğü gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). LPS uygulanmış ve 31,25µM, 62,5µM, 125µM, 250µM 4OHFBA tedavisi almış grupların LPS grubuna kıyasla hücrelerin canlılık yüzdesinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ). LPS grubuna kıyasla tedavi alan gruplar incelendiğinde 62,5µM+4OHFBA grubundaki canlılık yüzdesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve sağlıklı gruba en yakın grup

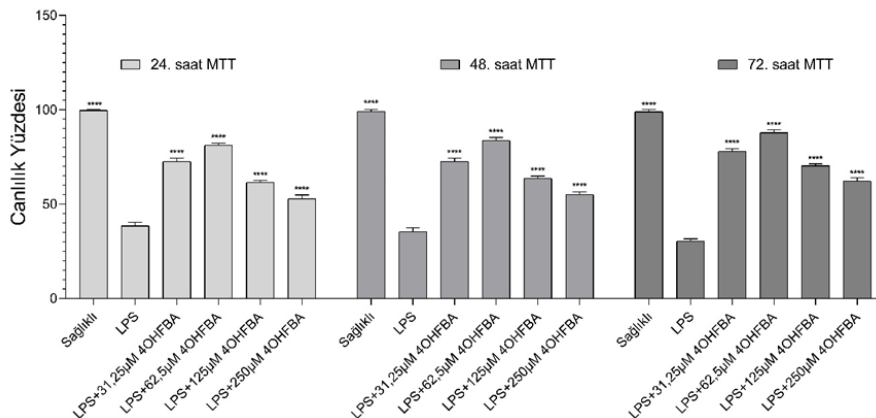
olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (Şekil 1).

48. saat MTT sonuçları incelendiğinde LPS grubundaki hücre canlılık yüzdesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde düştüğü gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). 31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM 4OHFBA tedavi gruplarının LPS grubuna kıyasla hücrelerin canlılık yüzdesinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ). LPS grubuna kıyasla tedavi alan gruplar incelendiğinde 62,5µM+4OHFBA grubundaki canlılık yüzdesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve sağlıklı gruba en yakın grup olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (Şekil 1).

72. saat MTT sonuçları incelendiğinde LPS grubundaki hücre canlılık yüzdesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde düştüğü gözlemlenmiştir ( $p < 0,001$ ). 31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM 4OHFBA tedavi gruplarının LPS grubuna kıyasla hücrelerin canlılık yüzdesinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,001$ ). LPS grubuna kıyasla tedavi alan gruplar incelendiğinde 62,5µM+4OHFBA grubundaki canlılık yüzdesinin diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve sağlıklı gruba en yakın grup olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ) (Şekil 1).

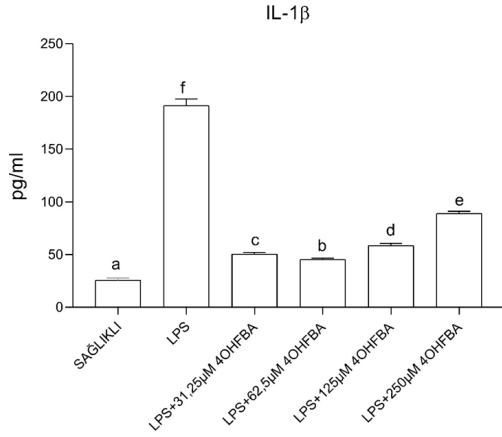
### 3.2. ELISA Sonuçları (ELISA Results)

IL-1β seviyeleri incelendiğinde LPS grubundaki sitokin seviyesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ). 31,25µM, 62,5µM, 125µM ve 250µM 4OHFBA tedavisi alan gruplarda IL-1β seviyelerinin LPS grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 62,5µM+4OHFBA grubunda bu azalmanın çok daha fazla olduğu ve sağlıklı gruba en yakın olan grup olduğunu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). 31,25µM, 125µM ve 250µM 4OHFBA tedavisi alan gruplarda IL-1β seviyelerinin LPS grubuna göre düşmüş olduğu gözlemlenmiş olsa da 62,5µM+4OHFBA grubuna göre sitokin seviyelerindeki düşüş daha az olmuştur ( $p < 0,05$ ) (Şekil 2).



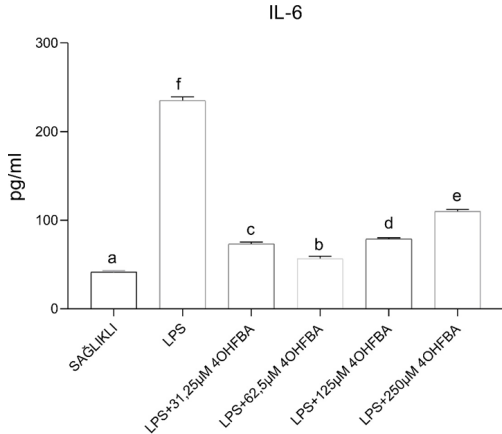
**Şekil 1.** 24., 48. ve 72. saat grupları MTT ölçüm sonuçları. (Hücre canlılık yüzdesi karşılaştırılması. Sonuçlar, sağlıklı kontrole kıyasla hücrelerin canlılık yüzdesi olarak ifade edildi. One Way Anova-Tukey testine göre gruplar arasındaki fark LPS grubu ile diğer gruplar arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,001$ ) (\*\*\*\*  $p < 0,001$ 'i ifade etmektedir). (Cell viability percentage comparison. Results were expressed as cell viability percentage compared to healthy control. The difference between the groups according to the One Way Anova-Tukey test is statistically significant in the comparison between the LPS group vs other groups. ( $p < 0,001$ ) (\*\*\*\* denotes  $p < 0,001$ )).





**Şekil 2.** Gruplar arası IL-1 $\beta$  seviyelerinin karşılaştırması (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p < 0,05$ ) (Comparison of IL-1 $\beta$  levels between groups (According to the One-way ANOVA Tukey test means with the same letter in the same column are not significantly different; Means with different letters in the same column show statistically significant differences between groups  $p < 0.05$ )).

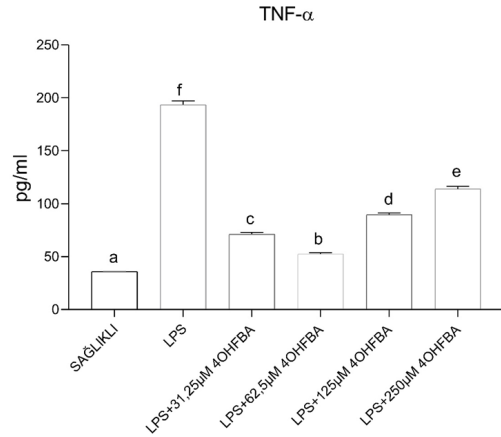
IL-6 seviyeleri incelendiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. LPS grubundaki IL-6 seviyesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavisi alan gruplarda IL-6 seviyelerinin LPS grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ( $p < 0,05$ ). En iyi düzelmenin 62,5 $\mu$ M+4OHFBA grubunda olduğu ve sağlıklı gruba en yakın grup olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Gruplar arası IL-6 seviyelerinin karşılaştırması (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p < 0,05$ ) (Comparison of IL-6 levels between groups (According to the One-way ANOVA Tukey test means with the same letter in the same column are not significantly different; Means with different letters in the same column show statistically significant differences between groups  $p < 0.05$ )).

TNF- $\alpha$  ölçümleri incelendiğinde LPS grubunda sağlıklı gruba göre oldukça fazla bir artış olduğu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M

4OHFBA tedavisi alan gruplarda LPS grubuna göre TNF- $\alpha$  seviyeleri anlamlı şekilde düşmüştür ( $p < 0,05$ ). 62,5 $\mu$ M+4OHFBA grubunda bu azalmanın çok daha fazla olduğu ve sağlıklı gruba en yakın olan grup olduğunu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavisi alan gruplarda TNF- $\alpha$  seviyelerinin LPS grubuna göre düşmüş olduğu gözlemlenmiş olsa da 62,5 $\mu$ M+4OHFBA grubuna göre sitokin seviyelerindeki düşüş daha az olmuştur ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4).



**Şekil 4.** Gruplar arası TNF- $\alpha$  seviyelerinin karşılaştırması (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p < 0,05$ ) (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p < 0,05$ ). (Comparison of TNF- $\alpha$  levels between groups (According to the One-way ANOVA Tukey test means with the same letter in the same column are not significantly different; Means with different letters in the same column show statistically significant differences between groups  $p < 0.05$ )).

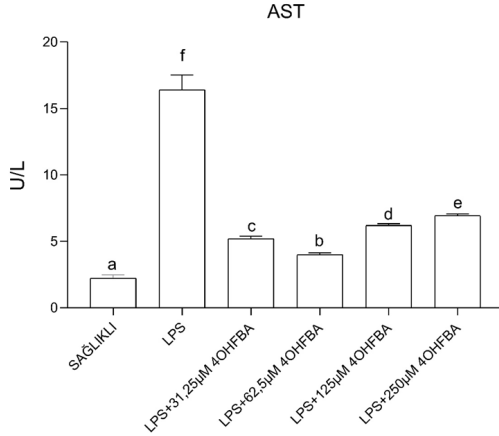
Yapılan analizlerde 31,25 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavisi alan gruplar incelendiğinde LPS grubuna göre tüm sitokin seviyelerinde anlamlı düşüşlerin olduğu görülmektedir (Şekil 2,3 ve 4).

### 3.3. AST ve ALT Sonuçları (AST and ALT Results)

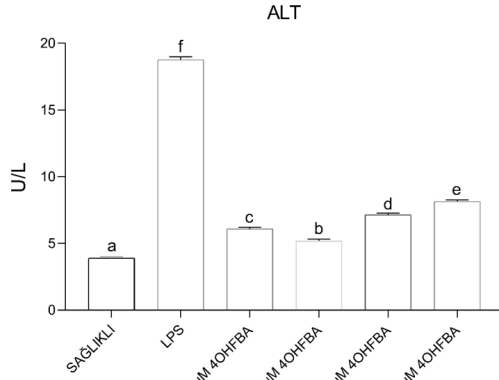
AST seviyeleri incelendiğinde LPS grubundaki AST seviyesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavisi alan gruplarda AST seviyelerinin LPS grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir ( $p < 0,05$ ). 62,5 $\mu$ M+4OHFBA grubunda bu azalmanın çok daha fazla olduğu ve sağlıklı gruba en yakın olan grup olduğunu görülmektedir ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavisi alan gruplarda AST seviyelerinin LPS grubuna göre düşmüş olduğu gözlemlenmiş olsa da 62,5 $\mu$ M+4OHFBA grubuna göre sitokin seviyelerindeki düşüş daha az olmuştur ( $p < 0,05$ ) (Şekil 5).

ALT seviyeleri incelendiğinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. LPS grubundaki ALT seviyesinin sağlıklı gruba göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür ( $p < 0,05$ ). 31,25 $\mu$ M, 62,5 $\mu$ M, 125 $\mu$ M ve 250 $\mu$ M 4OHFBA tedavi-

si alan gruplarda ALT seviyelerinin LPS grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ( $p<0,05$ ). En iyi düzelmenin  $62,5\mu\text{M}+4\text{OHFBA}$  grubunda olduğu ve sağlıklı gruba en yakın grup olduğu gözlemlenmiştir ( $p<0,05$ ) (Şekil 6).



**Şekil 5.** Gruplar arası AST seviyelerinin karşılaştırması (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p<0,05$ ) (Comparison of AST levels between groups (According to the One-way ANOVA Tukey test means with the same letter in the same column are not significantly different; Means with different letters in the same column show statistically significant differences between groups  $p < 0.05$ )).



**Şekil 6.** Gruplar arası ALT seviyelerinin karşılaştırması (One Way Anova-Duncan testine göre aynı harfle işaretli kolonlar arasında anlamlı fark yokken farklı harfle işaretli gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır  $p<0,05$ ) (Comparison of ALT levels between groups (According to the One-way ANOVA Tukey test means with the same letter in the same column are not significantly different; Means with different letters in the same column show statistically significant differences between groups  $p < 0.05$ )).

Yapılan analizlerde  $31,25\mu\text{M}$ ,  $62,5\mu\text{M}$ ,  $125\mu\text{M}$  ve  $250\mu\text{M}$  4OHFBA tedavisi alan gruplar incelendiğinde LPS grubuna göre AST ve ALT seviyelerinde anlamlı düşüşlerin olduğu görülmektedir (Şekil 5 ve 6).

### 3.4. Verilerin Tartışması (Discussion of Data)

Bu çalışmada bir boronik asit türevi olan 4-hidroksi fe-

nilboronik asidin LPS ile indüklenmiş karaciğer hasarında muhtemel koruyucu etkilerini *in vitro* olarak BRL 3A hücre hattında incelenmiştir. Çalışmanın ilk sonuçlarına bakıldığında LPS ile sitotoksikite oluşturulmuş BRL 3A hücre hatlarında 4-hidroksi fenilboronik asit ile tedavisiyle hücre canlılık oranının arttığını görülmüş oldu. Bu sonuçlar da 4-hidroksi fenilboronik asidin enflamatuvar yangı sonucu oluşan karaciğer hasarını önlemede etkinliğini gösterebilmektedir. Elbette ki karaciğer hasarını gösterirken esas olarak klinikte takip ettiğimiz AST ve ALT seviyelerinden de bahsedilmelidir. Çalışmanın bu sonuçlarına bakıldığı zaman LPS uygulaması ile artan AST ve ALT miktarının 4OHFBA uygulaması ile düştüğünü tespit edilmiştir. Bu sonuç da 4OHFBA'nın hücresel düzeyde koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. 4OHFBA'nın LPS ile oluşturulmuş karaciğer hasarındaki koruyucu etkisinin sitokin seviyeleri üzerine olan etkisine bakıldığında LPS ile artan anormal sitokin sekresyonunun boronik asit uygulaması ile azaldığını; bunun da enflamatuvar yangıyı azaltarak karaciğer hücrelerini koruduğu gösterildi.

Akut veya kronik organ hasarları karaciğerin de dahil olduğu kalp, akciğer, böbrek, pankreas, beyin, gonadlar ve bağırsaklar gibi birçok organda görülebilir [45,47-49]. Karaciğer enfeksiyöz olan veya olmayan birçok ajanla hasara uğrayabilir [50,51]. Karaciğerin enfeksiyöz enflamasyonu esas olarak bakteriyel ürünler, hepatit B virüsü veya hepatit C virüsü dahil olmak üzere mikroorganizmalara atfedilir [52]. Kontrolsüz enflamasyonun karaciğer parankimal hücrelerinde ciddi yıkıma yol açarak kronik karaciğer hastalıkları riskine yol açabileceği ispatlanmıştır [53]. Yüksek miktarlarda TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 üretiminin karaciğerde enflamasyona, apoptozise ve organ hasarına neden olduğu ve bu sitokin miktarlarının azalmasıyla birlikte karaciğer hasarının da azaldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [54,55]. Yapılan çalışmalar bakteriyel bir ürün olan LPS'nin bağışıklık hücrelerini güçlü bir şekilde uyardığını ve TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin sentezini ve salınımını artırarak aşırı enflamasyonu tetiklediğini göstermektedir [56]. Deneysel karaciğer hasarı oluşturmak için kullanılan birçok model vardır ve bu modellerden biri de LPS ile indüklenen karaciğer hasarıdır. Birçok hayvan modeli ve hücre kültürü çalışmasında ve özellikle BRL 3A hücre hattında da bu model uygulanmıştır [57-59]. LPS ile indüklenen karaciğer hasarını mekanistik olarak incelersek; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 dahil olmak üzere makrofajlardan sekrete edilmiş pro-enflamatuvar sitokinlerin karaciğer hasarının oluşumunda önemli rol aldığını görmekteyiz [60]. TNF-a'nın daha önce yapılan çalışmalarda farelerde LPS ile indüklenen hepatik hasara yol açtığı gösterilmiştir [61]. LPS'nin neden olduğu karaciğer hasarı, hepatosit ölümü ve organ yetmezliğine neden olan nötrofil aktivasyonuna TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 üretimine bağlıdır [62].

Verilen literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi karaciğer hasarını azaltmada sitokin salınımının azaltılması büyük önem arz etmektedir. Enflamatuvar

hastalıklarla ilgili yapılan insan çalışmalarında sitokin seviyelerinin yüksekliğinin mortalite artışı ile ilişkili olduğu; hücresel düzeyde yapılan deneylerde ise hücre canlılık düzeyinin düşmesi ile doğrudan ilişkilidir [63,64]. Bu sebeple yapılan tedavinin etkinliği artmış olan sitokin seviyelerinin düşürülmesi ile sağlanabilir. Artmış olan sitokin seviyelerini azaltan bir tedavi de sonuç olarak karaciğer hasarının ana serum belirteçleri olan AST ve ALT düzeylerini düşürebilir ve hücre canlılık oranını arttırabilir.

Enflamatuvar hastalıklarda TNF- $\alpha$  cevabına baktığımızda sitokin seviyesinin aşırı bir şekilde yükseldiği ve bu yüksekliğin hücre hasarı ve apoptozise ile birlikte olduğu görülmektedir [65,66]. Hepatositler tarafından salgılanan TNF- $\alpha$ , hepatosit apoptozunu indükleyerek karaciğer hasarının arttırılmasında hayati öneme sahiptir [67]. IL-6 karaciğer hasarı mekanizmasında da önemli bir yere sahiptir. IL-6 yüksekliği ile karaciğer hasarı arasında bir korelasyon daha önce yapılan çalışmalarda bulunmuştur ve IL-6 seviyesinin baskılanmasının karaciğer hasarını azalttığı tespit edilmiştir [68]. IL-6 birçok enflamatuvar hastalığıdaki anahtar sitokindir ve IL-6 seviyesinin düşürülmesi birçok enflamatuvar hastalıkta terapötik hedef haline gelmiştir [69]. IL-1 $\beta$  enflamatuvar durumlarda önemli bir rol oynadığı için karaciğer hasarında da oldukça anahtar bir rol oynamaktadır. IL-1 $\beta$  seviyelerinin artışı karaciğerdeki hasarın seviyesini azaltırken yapılan çalışmalarda ise IL-1 $\beta$  seviyelerinin düşmesi karaciğer hastalıklarındaki hasarın şiddetini azaltmaktadır.

Çalışmanın sonuçları incelendiği zaman tedavi gruplarındaki sitokin seviyelerinin, LPS grubundaki artmış olan sitokin seviyelerine göre oldukça düştüğü görülmektedir. Düşen sitokin seviyeleriyle birlikte, yapılan hücre canlılık testlerinde ise tedavi gruplarındaki hücre canlılık oranlarının LPS grubuna göre düşmüş olan hücre canlılık seviyelerini arttırmış olduğu görülmektedir. Bulgularımız incelendiğinde tedavide kullanılan 4OHFBA'nın sitokin seviyelerini düşürerek bir anti enflamatuvar etki göstermiş olması muhtemeldir.

Artan pro-enflamatuvar sitokin seviyeleri ilk başta patojene karşı immün bir yanıt olsa da belli bir seviyede olan ve uzun süren bir artış hücresel hasar başlatıp organ hasarı ile sonuçlanabilmektedir [70]. Tedavi için kullanılan 4OHFBA'nın ise sitokin ölçüm sonuçlarına bakıldığında sitokin seviyelerini düşürdüğü görülmektedir. Sitokin seviyelerinin düşmesi enflamasyonu azaltarak hücresel canlılığı da korumaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak 4OHFBA tedavisi de sitokin seviyelerini düşürmesinin yanı sıra LPS grubuna göre de hücresel canlılığı arttırmıştır. Bu sonuç direkt olarak sitokin seviyelerinin azalmasına bağlı olduğu gibi fenilboronik asidin ve bor bileşiklerinin kendilerine has immünolojik ve hücresel düzeydeki pozitif etkilerine bağlı olarak da artmış olabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda bir boronik asit türevi olan bortezomibin dendritik hücre maturasyonunu baskılayarak aşırı sitokin cevabını engellediği ve sitokin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir [71]. CXCR1/2 yolağı

enflamasyon, yara iyileşmesi ve anjiyogenez ile ilgilidir ve bunların düzensizliği, akut ve kronik enflamasyonu içeren sayısız hastalıkta rol oynar. Yeni bir boronik asit türevi olan 2-[5-(4-fluorofenilkarbamoyl)piridin-2-ylsulfanilmetil] fenilboronik asit (SX-517) ise CXCR1 ve CXCR2'nin nonkompetitif antagonisti olarak davranmaktadır [72]. Böylelikle enflamasyonu azaltarak organ hasarlarının azalmasını sağlamakla birlikte CXCR1/2 yolağına bağlı oluşan kronik enflamasyonun önüne geçerek de karsinogenezisi azaltmakta başarılı olabilir.

LASSBio-1524, nükleer faktör  $\kappa$ B kanonik yolunun aktivasyonuna katılan IKK- $\beta$  enziminin inhibitörü olarak tasarlanmıştır. LASSBio-1760, LASSBio-1763 ve LASSBio-1764 olmak üzere LASSBio-1524'ün 3 yeni analogu tasarlanmıştır. LASSBio-1760 ve LASSBio-1763'ün üretiminde LASSBio-1524'e 4-formil fenilboronik asit grubu eklenerek tasarlanmıştır ve üretilen LASSBio-1760 ve LASSBio-1763 in vivo anti-TNF- $\alpha$  etki ve güçlü anti enflamatuvar özellikler göstermektedir [73]. Böylelikle fenilboronik asitlerin anti enflamatuvar etkilerinin yanında direkt anti sitokin etki gösterdikleri de deneysel olarak ispatlanmıştır. Ayrıca yapılan bir çalışmada ise bor varlığında TLR4 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür [74]. Böylelikle bor ürünlerinin tedavide kullanımı ile TLR4 seviyeleri azalarak LPS'ye bağlı oluşabilecek aşırı enflamatuvar cevaplarda düşme görülmesi olasıdır.

#### 4. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmada bir boronik asit türevi olan 4-hidroksi fenilboronik asit tedavisinin, LPS ile indüklenmiş karaciğer hasarında artmış olan pro-enflamatuvar sitokin seviyeleri ile AST-ALT seviyelerini düşürdüğü ve yapılan hücre canlılık testleri ölçümleri sonucunda hepatotoksisteyi hücresel seviyede düzelttiği gösterilmiş oldu. Bu çalışma da özellikle 4-hidroksi fenilboronik asit başta olmak üzere boronik asit türevlerinin karaciğer hasar tedavisinde terapötik bir ajan olabileceğini göstermiştir. Çalışmaların ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

#### Kaynaklar (References)

- [1] Merian, E. (2004). *Nonmetals, Particular Aspects*. Wiley-VCH, ISBN: 3-527-30459-2.
- [2] Axtell, J. C., Saleh, L. M., Qian, E. A., Wixtrom, A. I., & Spokoyny, A. M. (2018). Synthesis and applications of perfunctionalized boron clusters. *Inorganic Chemistry*, 57(5), 2333-2350.
- [3] Ili, A. R. and F. M. Hawthorne, (1960), The isolation of the icosahedral B<sub>12</sub>H<sub>12</sub>-2 Ion. *Journal of the American Chemical Society*. 82(12), 3228-3229.
- [4] Nielsen, F. H., & Eckhert, C. D. (2020). Boron. *Advances in Nutrition*, 11(2), 461-462.
- [5] Marriott, B. P., Birt, D. F., Stallings, V. A., & Yates, A. A. (Eds.). (2020). *Present Knowledge in Nutrition: Clinical and Applied Topics in Nutrition*. Academic Press.



- [6] Emsley, J. (2011). *Nature's building blocks: an AZ guide to the elements*. Oxford University Press.
- [7] Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological Trace Element Research*, 186(1), 31-51.
- [8] Doğan, A., Demirci, S., Bayir, Y., Halici, Z., Karakus, E., Aydin, A., ... & Şahin, F. (2014). Boron containing poly(lactide-co-glycolide)(PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 246-253.
- [9] Atila, A., Halici, Z., Cadirci, E., Karakus, E., Palabiyik, S. S., Ay, N., ... & Yilmaz, S. (2016). Study of the boron levels in serum after implantation of different ratios nanohexagonal boron nitride-hydroxy apatite in rat femurs. *Materials Science and Engineering: C*, 58, 1082-1089.
- [10] Yayla, M., Cadirci, E., Halici, Z., Bakan, F., Ay, N., Demirci, S., ... & Sahin, F. (2020). Regenerative effect of resorbable scaffold embedded boron-nitride/hydroxyapatite nanoparticles in rat parietal bone. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(2), 680-691.
- [11] Demirci, S., Doğan, A., Karakuş, E., Halıcı, Z., Topçu, A., Demirci, E., & Sahin, F. (2015). Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. *Biological Trace Element Research*, 168(1), 169-180.
- [12] Bouchareb, R., Katz, M., Saadallah, N., Sassi, Y., Ali, S., & Lebeche, D. (2020). Boron improves cardiac contractility and fibrotic remodeling following myocardial infarction injury. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11.
- [13] Nielsen, F. H., & Meacham, S. L. (2011). Growing evidence for human health benefits of boron. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 16(3), 169-180.
- [14] Einsele, H. (2010). Bortezomib. *Small Molecules in Oncology*, 173-187.
- [15] Das, B. C., Thapa, P., Karki, R., Schinke, C., Das, S., Kambhampati, S., ... & Evans, T. (2013). Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future Medicinal Chemistry*, 5(6), 653-676.
- [16] Leśnikowski, Z. J. (2016). Recent developments with boron as a platform for novel drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(6), 569-578.
- [17] Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G. H., & Blue, T. E. (2005). Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clinical Cancer Research*, 11(11), 3987-4002.
- [18] Hawthorne, M. F. (1998). New horizons for therapy based on the boron neutron capture reaction. *Molecular Medicine Today*, 4(4), 174-181.
- [19] Hawthorne, M. F., & Maderna, A. (1999). Applications of Radiolabeled Boron Clusters to the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Chemical Reviews*, 99(12), 3421-3434.
- [20] Qian, E. A., Wixtrom, A. I., Axtell, J. C., Saebi, A., Jung, D., Rehak, P., ... & Spokoyny, A. M. (2017). Atomically precise organomimetic cluster nanomolecules assembled via perfluoroaryl-thiol SN Ar chemistry. *Nature Chemistry*, 9(4), 333-340.
- [21] Hawthorne, M. F. (1993). The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(7), 950-984.
- [22] Lam, P. Y., Clark, C. G., Saubern, S., Adams, J., Winters, M. P., Chan, D. M., & Combs, A. (1998). New aryl/heteroaryl C-N bond cross-coupling reactions via arylboronic acid/cupric acetate arylation. *Tetrahedron Letters*, 39(19), 2941-2944.
- [23] Miyaura, N., & Suzuki, A. (1995). Palladium-catalyzed cross-coupling reactions of organoboron compounds. *Chemical Reviews*, 95(7), 2457-2483.
- [24] Hall, D. G. (2005). *Structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives. Overview of their reactions and applications*. Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine, pp. 1-99.
- [25] Cambre, J. N., & Sumerlin, B. S. (2011). Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer*, 52(21), 4631-4643.
- [26] Kiener, P. A., & Waley, S. G. (1978). Reversible inhibitors of penicillinases. *Biochemical Journal*, 169(1), 197-204.
- [27] Ulusoy, S., & Akalin, R. B. (2018). Effects of boronic acids on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Boron*, 3(3), 166-173.
- [28] Yoshimori, M., Shibayama, H., Imadome, K. I., Kawano, F., Ohashi, A., Nishio, M., ... & Arai, A. (2021). Antineoplastic and anti-inflammatory effects of bortezomib on systemic chronic active EBV infection. *Blood Advances*, 5(7), 1805-1815.
- [29] Zhu, M. (2019). Inhibitory effects of bortezomib in a subcutaneous tumor model of H22 mouse hepatocarcinoma cells. *Pathology-Research and Practice*, 215(6), 152388.
- [30] Jiang, L., Song, J., Hu, X., Zhang, H., Huang, E., Zhang, Y., ... & Wu, X. (2017). The proteasome inhibitor bortezomib inhibits inflammatory response of periodontal ligament cells and ameliorates experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 88(5), 473-483.
- [31] Liang, Y., Ma, S., Zhang, Y., Wang, Y., Cheng, Q., Wu, Y., ... & Liu, H. (2014). IL-1 $\beta$  and TLR4 signaling are involved in the aggravated murine acute graft-versus-host disease caused by delayed bortezomib administration. *The Journal of Immunology*, 192(3), 1277-1285.
- [32] Han, S. H., Kim, J. S., Woo, J. H., Jeong, S. J., Shin, J. S., Ahn, Y. S., & Kim, J. M. (2015). The effect of bortezomib on expression of inflammatory cytokines and survival in a murine sepsis model induced by cecal ligation and puncture. *Yonsei Medical Journal*, 56(1), 112-123.
- [33] Wen, Z., Lei, Z., Yao, L., Jiang, P., Gu, T., Ren, F., ... & Wen, T. (2016). Circulating histones are major mediators of systemic inflammation and cellular injury in patients with acute liver failure. *Cell Death & Disease*,



- 7(9), 2391-2391.
- [34] Sodeifian, F., Seyedalhosseini, Z. S., Kian, N., Eftekhari, M., Najari, S., Mirsaedi, M., ... & Nasiri, M. J. (2021). Drug-Induced Liver Injury in COVID-19 Patients: A Systematic Review. *Frontiers in Medicine*, 8, 731436.
- [35] Abubakar, A. R., Sani, I. H., Godman, B., Kumar, S., Islam, S., Jahan, I., & Haque, M. (2020). Systematic review on the therapeutic options for COVID-19: clinical evidence of drug efficacy and implications. *Infection and Drug Resistance*, 13, 4673-4695.
- [36] Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends-an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25(1), 16-27.
- [37] Floyd, J., Mirza, I., Sachs, B., & Perry, M. C. (2006, February). *Hepatotoxicity of chemotherapy*. In *Seminars in Oncology* (Vol. 33, No. 1, pp. 50-67). WB Saunders.
- [38] Caballero, B. (2019). Humans against obesity: Who will win?. *Advances in Nutrition*, 10(suppl\_1), S4-S9.
- [39] Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(10), 423-444.
- [40] Hurr, C., Simonyan, H., Morgan, D. A., Rahmouni, K., & Young, C. N. (2019). Liver sympathetic denervation reverses obesity-induced hepatic steatosis. *The Journal of Physiology*, 597(17), 4565-4580.
- [41] Zhang, X., Jiang, D., Jiang, W., Zhao, M., & Gan, J. (2015). Role of TLR4-Mediated PI3K/AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway in apoptosis of rat hepatocytes. *BioMed Research International*, 2015, 631326.
- [42] Guo, X., Qiu, J., & Qian, Y. (2021). 6-Shogaol mitigates sepsis-associated hepatic injury through transcriptional regulation. *Nutrients*, 13(10), 3427.
- [43] Azrad, M., Zeineh, N., Weizman, A., Veenman, L., & Gavish, M. (2019). The TSPO ligands 2-CI-MGV-1, MGV-1, and PK11195 differentially suppress the inflammatory response of BV-2 microglial cell to LPS. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 594.
- [44] Ayaz, G., Halici, Z., Albayrak, A., Karakus, E., & Cadirci, E. (2017). Evaluation of 5-HT7 receptor trafficking on in vivo and in vitro model of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell injury in rats and LPS-treated A549 cells. *Biochemical Genetics*, 55(1), 34-47.
- [45] Keskin, H., Tavaci, T., Halici, H., Yuksel, T. N., Ozkaraca, M., Bilen, A., ... & Halici, Z. (2021). Early administration of milrinone ameliorates lung and kidney injury during sepsis in juvenile rats. *Pediatrics International*.
- [46] BBilen, A., Calik, I., Yayla, M., Dincer, B., Tavaci, T., Cinar, I., ... & Mercantepe, F. (2021). Does daily fasting shielding kidney on hyperglycemia-related inflammatory cytokine via TNF- $\alpha$ , NLRP3, TGF- $\beta$ 1 and VCAM-1 mRNA expression. *International Journal of Biological Macromolecules*, 190, 911-918.
- [47] Beheshti, F., Hosseini, M., Taheri Sarvtin, M., Kamali, A., & Anaeigoudari, A. (2021). Protective effect of aminoguanidine against lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity and liver dysfunction in rat. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(2), 215-221.
- [48] Cinar, I., Yayla, M., Tavaci, T., Toktay, E., Ugan, R. A., Bayram, P., & Halici, H. (2022). In vivo and In vitro cardioprotective effect of gossypin against isoproterenol-induced myocardial infarction injury. *Cardiovascular Toxicology*, 22(1), 52-62.
- [49] Keskin, H., Keskin, F., Tavaci, T., Halici, H., Yuksel, T. N., Ozkaraca, M., ... & Halici, Z. (2021). Neuroprotective effect of roflumilast under cerebral ischaemia/reperfusion injury in juvenile rats through NLRP-mediated inflammatory response inhibition. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(8), 1103-1110.
- [50] Dai, W., Zhan, X., Peng, W., Liu, X., Peng, W., Mei, Q., & Hu, X. (2021). Ficus pandurata hance inhibits ulcerative colitis and colitis-associated secondary liver damage of mice by enhancing antioxidation activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2617881.
- [51] Cheng, D., Wu, C., Li, Y., Liu, Y., Mo, J., Fu, L., & Peng, S. (2021). METTL3 inhibition ameliorates liver damage in mouse with hepatitis B virus-associated acute-on-chronic liver failure by regulating miR-146a-5p maturation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 194782.
- [52] Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P. T., Lampertico, P., ... & Maini, M. K. (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(3), 667-680.
- [53] Brenner, C., Galluzzi, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2013). Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of Hepatology*, 59(3), 583-594.
- [54] Essani, N. A., Fisher, M. A., & Jaeschke, H. (1997). Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock (Augusta, Ga.)*, 7(2), 90-96.
- [55] Teng, C. Y., Lai, Y. L., Huang, H. I., Hsu, W. H., Yang, C. C., & Kuo, W. H. (2012). Tournefortia sarmentosa extract attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 50(3), 291-396.
- [56] Kim, E. A., Kim, S. Y., Ye, B. R., Kim, J., Ko, S. C., Lee, W. W., ... & Heo, S. J. (2018). Anti-inflammatory effect of Apo-9'-fucosanthinone via inhibition of MAPKs and NF-kB signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model. *International Immunopharmacology*, 59, 339-346.
- [57] Pervin, M., Karim, M. R., Kuramochi, M., Izawa, T., Kuwamura, M., & Yamate, J. (2018). Macrophage populations and expression of regulatory inflammatory factors in hepatic macrophage-depleted rat livers under lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Toxicologic Pathology*, 46(5), 540-552.
- [58] Yang, R., Yu, H., Chen, J., Zhu, J., Song, C., Zhou, L.,

- ... & Zhang, Q. (2021). Limonin attenuates LPS-induced hepatotoxicity by inhibiting pyroptosis via NLRP3/Gasdermin D signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(3), 982-991.
- [59] Zhang, X., Shang, X., Jin, S., Ma, Z., Wang, H., Na, A. O., ... & Du, J. (2021). Vitamin D ameliorates high-fat-diet-induced hepatic injury via inhibiting pyroptosis and alters gut microbiota in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 705, 108894.
- [60] Jiang, W., Sun, R., Wei, H., & Tian, Z. (2005). Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17077-17082.
- [61] Olleros, M. L., Vesin, D., Fotio, A. L., Santiago-Raber, M. L., Tauzin, S., Szymkowski, D. E., & Garcia, I. (2010). Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis. *Journal of Hepatology*, 53(6), 1059-1068.
- [62] Gantner, F., Leist, M., Lohse, A. W., Germann, P. G., & Tiegs, G. (1995). Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology*, 21(1), 190-198.
- [63] Angurana, S. K., Bansal, A., Muralidharan, J., Aggarwal, R., & Singhi, S. (2021). Cytokine levels in critically ill children with severe sepsis and their relation with the severity of illness and mortality. *Journal of Intensive Care Medicine*, 36(5), 576-583.
- [64] Rahim, V. B., Khammar, M. T., Rakhshandeh, H., Samzadeh-Kermani, A., Hosseini, A., & Askari, V. R. (2019). Crocin protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation. *Pharmacological Reports*, 71(6), 1228-1234.
- [65] Kim, J. W., Yun, H., Choi, S. J., Lee, S. H., Park, S., Lim, C. W., ... & Kim, B. (2017). Evaluating the influence of side stream cigarette smoke at an early stage of non-alcoholic steatohepatitis progression in mice. *Toxicological Research*, 33(1), 31-41.
- [66] Webster, J. D., & Vucic, D. (2020). The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 365.
- [67] Zimmermann, H. W., Trautwein, C., & Tacke, F. (2012). Functional role of monocytes and macrophages on the inflammatory response in acute liver injury. *Frontiers in Physiology*, 3, 56.
- [68] Balaha, M., Kandeel, S., & Barakat, W. (2016). Carvedilol suppresses circulating and hepatic IL-6 responsible for hepatocarcinogenesis of chronically damaged liver in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 311, 1-11.
- [69] Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448-457.
- [70] McMaster, W. G., Kirabo, A., Madhur, M. S., & Harrison, D. G. (2015). Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circulation Research*, 116(6), 1022-1033.
- [71] NNencioni, A., Schwarzenberg, K., Brauer, K. M., Schmidt, S. M., Ballestrero, A., Grunebach, F., & Brosart, P. (2006). Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood*, 108(2), 551-558.
- [72] Maeda, D. Y., Peck, A. M., Schuler, A. D., Quinn, M. T., Kirpotina, L. N., Wicomb, W. N., ... & Zebala, J. A. (2014). Discovery of 2-[5-(4-Fluorophenylcarbamoyl)pyridin-2-ylsulfanylmethyl] phenylboronic acid (SX-517): noncompetitive boronic acid antagonist of CXCR1 and CXCR2. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20), 8378-8397.
- [73] Cordeiro, N. M., Freitas, R. H., Fraga, C. A., & Fernandes, P. D. (2016). Discovery of novel orally active tetrahydro-naphthyl-N-acylhydrazones with in vivo anti-TNF- $\alpha$  effect and remarkable anti-inflammatory properties. *PLoS One*, 11(5), e0156271.
- [74] Huang, H. B., Xiao, K., Lu, S., Yang, K. L., Ansari, A. R., Khaliq, H., ... & Peng, K. M. (2015). Increased thymic cell turnover under boron stress may bypass TLR3/4 pathway in African ostrich. *PLoS One*, 10(6), e0129596.