

Borik Asit LPS ile Uyarılan Glioblastoma Hücrelerinde İnflamazom Aktivasyonunu İnhibe Eder

Ceyhan HACIOĞLU ^{1,2}

ÖZ

Amaç: En sık görülen primer beyin tümörleri olan gliomalar, çeşitli klinik özellikler ve kötü prognoz sergiler. İnflamazom aktivasyonu, glioma gelişiminde rol oynayan, nükleotid bağlama alanı lösin açısından zengin aile pirin içeren 3 (NLRP3) gibi inflamazomlar tarafından düzenlenen, merkezi sinir sistemindeki inflamatuvar mikro ortamla yakından bağlantılıdır. Ancak NLRP3'ün insan gliomasındaki rolü belirsizliğini koruyor. Bu çalışma borik asidin U87 glioblastoma hücreleri ve NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkilerini araştırmaktadır.

Gereç ve Yöntemler: Enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) yöntemini kullanarak 24, 48 ve 72 saat boyunca çeşitli borik asit konsantrasyonlarına maruz kalan U87 hücrelerindeki hücre canlılığını, 5-bromo-2'-deoksüridin (BrdU), NLRP3, interlökin (IL)-1 β , IL-18, kaspaz 1, apoptoz indükleyici faktörü (AIF) ve sitokrom c seviyelerini değerlendirdik.

Bulgular: Sonuçlarımız, 0-6,4 mM aralığında borik asit konsantrasyonlarına maruz kalmanın ardından U87 hücre canlılığında zamana ve konsantrasyona bağlı bir azalma olduğunu ortaya koydu. BrdU analizi, 24 saatlik borik asit uygulamasından sonra hücre çoğalmasının azaldığını gösterdi. Lipopolisakkarit (LPS) kullanılarak U87 hücrelerinde inflamatuvar aktivasyonun uyarılması, yüksek NLRP3, IL-1 β , IL-18 ve kaspaz-1 seviyeleriyle sonuçlandı. Ancak borik asit uygulaması bu etkiyi ortadan kaldırarak inflamazom aktivasyonu azalttı. Ayrıca borik asit+LPS tedavisi AIF ve sitokrom c düzeylerini indükleyerek apoptoza yol açtı.

Sonuç: Bulgularımız borik asidin U87 hücrelerinde NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu inhibe ettiğini, dolayısıyla hücre canlılığını baskıladığını gösterdi. Bu, borik asidin NLRP3 inflamatuvarını engelleyerek inflamatuvar mikro ortamı hafiflettiğini ve glioblastomanın ilerlemesinde potansiyel terapötik avantajlar sunduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: İnflamazom aktivasyonu; glioblastoma; borik asit.

Boric Acid Inhibits Inflammasome Activation in LPS-Stimulated Glioblastoma Cells

ABSTRACT

Aim: Gliomas, the most common primary brain tumors, exhibit diverse clinical features and a poor prognosis. Inflammasome activation is closely linked to the inflammatory microenvironment in the central nervous system, regulated by inflammasomes like nucleotide-binding domain leucine-rich family pyrin-containing 3 (NLRP3), implicated in glioma development. However, NLRP3's role in human glioma remains unclear. This study explores the effects of boric acid on U87 glioblastoma cells and NLRP3 inflammasome activation.

Material and Methods: Employing the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, we assessed cell viability, 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), NLRP3, interleukin (IL)-1 β , IL-18, caspase 1, apoptosis inducing factor (AIF), and cytochrome c levels in U87 cells exposed to various concentrations of boric acid for 24, 48, and 72 hours.

Results: Our findings revealed a time- and concentration-dependent reduction in U87 cell viability following exposure to boric acid concentrations within the 0-6.4 mM range. BrdU analysis indicated decreased cell proliferation after 24 hours of boric acid application. Stimulation of inflammasome activation in U87 cells using lipopolysaccharide (LPS) resulted in elevated levels of NLRP3, IL-1 β , IL-18, and caspase-1. However, boric acid application countered this effect, reducing inflammasome activation. Additionally, treatment with boric acid+LPS induced AIF and cytochrome c levels, leading to apoptosis.

Conclusion: Our results demonstrated that boric acid inhibited NLRP3 inflammasome activation in U87 cells, consequently suppressing cell viability. This suggests that by impeding the NLRP3 inflammasome, boric acid mitigates the inflammatory microenvironment, offering potential therapeutic advantages in the progression of glioblastoma.

Keywords: Inflammasome activation; glioblastoma; boric acid.

1 Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye
2 Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Ceyhan HACIOĞLU, e-mail: ceyhanhacioğlu@duzce.edu.tr
Geliş Tarihi / Received: 22.12.2023, Kabul Tarihi / Accepted: 03.04.2024

GİRİŞ

Glioma, yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla merkezi sinir sisteminin en yaygın primer tümörünü temsil eder. Gliomalar için standart tedavi, tümör rezeksiyonu ve ardından adjuvan ortamda temozolomid ile radyoterapi ve kemoterapiyi içerir (1). Bununla birlikte, bu multimodal terapötik stratejinin etkinliği, tedaviye karşı genel direnç ve yüksek nüks riski nedeniyle sınırlıdır (2). Bu nedenle, gliomlu hastalarda son derece zayıf tedavi sonuçlarına yönelik yeni bir yaklaşıma büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır.

İnflammozomlar, sitozolik sensörlerin bir araya getirilmesiyle oluşturulur. İnflammozomların aktivasyonu için iki farklı sinyal gereklidir (3). Bunlardan ilki, mikroglia, astrositler, astrositler üzerindeki Toll benzeri reseptör veya NOD ailesi üyeleri gibi model tanıma reseptörleri tarafından tanınan bakteri ve virüsler veya reaktif oksijen türleri (ROS), ATP ve DNA dahil olmak üzere patojen veya tehlike ile ilişkili moleküler kalıpları içerir (4). İkinci sinyal, pro-interlökin (IL)-1 β ve pro-IL-18'in olgun formlara bölünmesine neden olan doku hasarını içerir (5). Son veriler, inflammozomların karsinojen ve tümör ilerlemesinde önemli rol oynadığını göstermektedir (6). İmmüno-inflammatuar yanıtlar sırasında nükleotid bağlama alanı lösin açısından zengin aile pirin içeren 3 (NLRP3) inflammatuarının aktivasyon mekanizması ve işlevi geniş çapta araştırılmıştır. Bununla birlikte, biriken çalışmalar NLRP3 inflammatuarının kanserin ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (7). Özellikle bazı çalışmalar, NLRP3'ün tanımlanamayan inflammatuardan bağımsız bir şekilde işlev gördüğünü, dolayısıyla NLRP3'ün biyoaktif bölünmüş kaspaz-1 ve olgun IL-1 β üretiminden bağımsız olarak hizmet edebileceğini bildirmiştir (8). Ancak NLRP3'ün gliomadaki derinlemesine rolü tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır.

Bor, oksijen molekülüne yüksek afinite ile bağlanabilen borik asit ve boraks formunda doğada yaygın olarak bulunan canlı organizmalar için gerekli iz elementlerden biridir (9). Borun antioksidan savunma mekanizmasındaki etkisi, inflamasyondan sorumlu enzimlerin aktivitesini azaltması ve kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemesine dair literatürde önemli kanıtlar bulunmaktadır (10). Önceki çalışmalarda borun antioksidan ve anti-apoptotik etkileri rapor edilmiştir (11). Borun çeşitli enzim ve minerallerin metabolik süreçlerini ve bağışıklık sistemi düzenlemesini değiştirebileceği de gösterilmiştir. Ayrıca bor bileşiklerinin çeşitli kanser türlerinde anti-karsinojenik etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir (12). Dahası, önceki çalışmalarımızda prostat ve glioblastoma (GBM) kanser hücrelerinde çeşitli bor bileşiklerinin doza bağlı hücre büyümesini inhibe ettiğini, ferroptozu artırdığını ve morfolojik değişikliklere neden olduğunu gösterdik (13,14).

Bu çalışmada, borik asidin GMB hücrelerindeki inflammatuar ilişkili bileşenler üzerindeki etkisini kapsamlı bir şekilde analiz ettik. Borik asidin GBM hücrelerindeki biyolojik rolünü araştırmak amacıyla, NLRP3'ün yanı sıra GBM hücrelerindeki, kaspaz-1, apoptoz indükleyici faktör (AIF), sitokrom c, IL-18 ve IL-1 β protein seviyelerini ölçtük.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre Kültürü ve İnflammozom İndüksiyonu

U87 insan GBM hücreleri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) satın alındı ve %10 (h/h) fetal sıgır serumu (Gibco) ve %1 (h/h) penisilin-streptomisin (100 U/ml – 100 μ g/ml) içeren Dulbecco'nun değiştirilmiş Eagle ortamında inkübe edildi. İnkübatör ortam koşulları %95 hava ve %5 CO₂ içeriyordu. U87 hücreleri 75 cm²'lik hücre kültürü şişelerinde inkübe edildi. Tüm hücreler %80-%90 konfluksa kadar çoğaltıldı ve %0,25 trypsin-1 mM EDTA solüsyonu ile kültür ortamından toplandı.

U87 hücrelerinin lipopolisakkarit (LPS) uyarımı, nöroinflammatuar süreçleri taklit etmek için deneysel bir model olarak kullanıldı. Roosen ve ark. yaptığı çalışmaya göre, LPS uyarımının hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirilmişler ve 100 ng/mL'ye kadar LPS konsantrasyonlarının hiçbir toksik etkisi olmadığını rapor etmişlerdir (15). Bu çalışmada da, standart uyarıcı olarak 100 ng/mL'lik LPS konsantrasyon seçildi. Biyokimyasal analizler sırasında U87 hücreleri LPS ve LPS+borik aside 24 süreyle maruz bırakılmıştır.

Hücre Canlılığı Analizi

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) analizi için, U87 hücreleri, oyuk başına 3 x 10⁵ hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalar üzerinde kültürlendi. Başlangıç olarak, borik asit tedavisinden önce hücrelerin kültür ortamına yapışmasına izin verildi. Damıtılmış suda hazırlanan ve 0,21 μ m filtrelerle filtrelenen 5 mg/ml borik asit stok çözeltisi, hücre ortamıyla istenen borik asit konsantrasyonlarına kadar taze olarak seyreltilti. Bundan sonra hücrelere 96 kuyucuklu bir plakada 0, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M, 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM borik asit konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulandı. Maruziyetten sonra her kuyucuğa 3 saat süreyle 0,5 mg/ml MTT ilave edildi. Üç saat sonra formazan tuzları dimetil sülfoksit ile çözüldürüldü. Sonunda absorbanslar, 570 nm'de enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELISA) okuyucusu ile ölçüldü.

DNA Sentez Analizi

Timidin analogu 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) DNA sentezi katılarak, hücre çoğalmasının miktarının belirlenmesi için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. MTT analize göre belirlenen sitotoksik borik asit konsantrasyonuna hücre 24 saat boyunca bırakıldıktan sonra, hücrelere 10 μ l BrdU solüsyonu ilave edildi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından, kit protokolüne (Katalog No: 2750; Sigma-Aldrich) göre aspirasyon ve yıkama işlemlerinden geçirilerek 450 nm'de mikro plaka okuyucu yardımıyla DNA sentez oranı tespit edildi.

İnflammozom Belirteçlerin Analizi

Ticari olarak temin edilebilen bir ELISA kitleri (sırasıyla SCK115Hu, SEA563Hu ve SEA064Hu) kullanılarak, NLRP3, IL-1 β ve IL-18 protein konsantrasyonları ölçüldü. Üreticinin protokolünün önerdiği gibi, 24 saatlik borik asit uygulamasından sonra 1 ml süpernatant izole edildi. Absorbans, bildirildiği gibi bir mikropilaka okuyucu kullanılarak dalga boyu 450 nm'de ölçülmüştür.

Sitokrom c ve Kaspaz-1 Aktivite Analizi

U87 hücrelerinde AIF, sitokrom c seviyesi ve kaspaz-1 aktivitesi kolorimetrik bir analizle (sırasıyla SEB064Hu, SEA594Mi ve SEB592Hu) belirlendi. Kısaca, 2×10^6 hücre borik asitle inküb edildikten sonra, 50 μL soğutulmuş hücre lizis tamponunda süspansiyon edildi, 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi ve 1 dakika boyunca 10000 x g santrifüjlendi. Her numuneye üretici firmanın talimatları doğrultusunda reaksiyon sölüsyonları eklendi ve 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. Numuneler bir mikropilaka okuyucusunda 450 nm'de değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Tüm hücre deneyleri üç farklı kopya halinde gerçekleştirildi. Deneysel verilerin normallik analizi Shapiro-Wilk normallik testi kullanılarak yapıldı. Tüm veriler normal dağıldığı için sonuçlar ortalama \pm standart ortalama hatası olarak ifade edildi. Daha sonra gruplar arasındaki fark tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey post-hoc testleri ile analiz edildi. Yapılan tüm istatistiksel uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz Graphpad 8 Prism (GraphPad Software Inc., ABD) programı kullanılarak yapıldı.

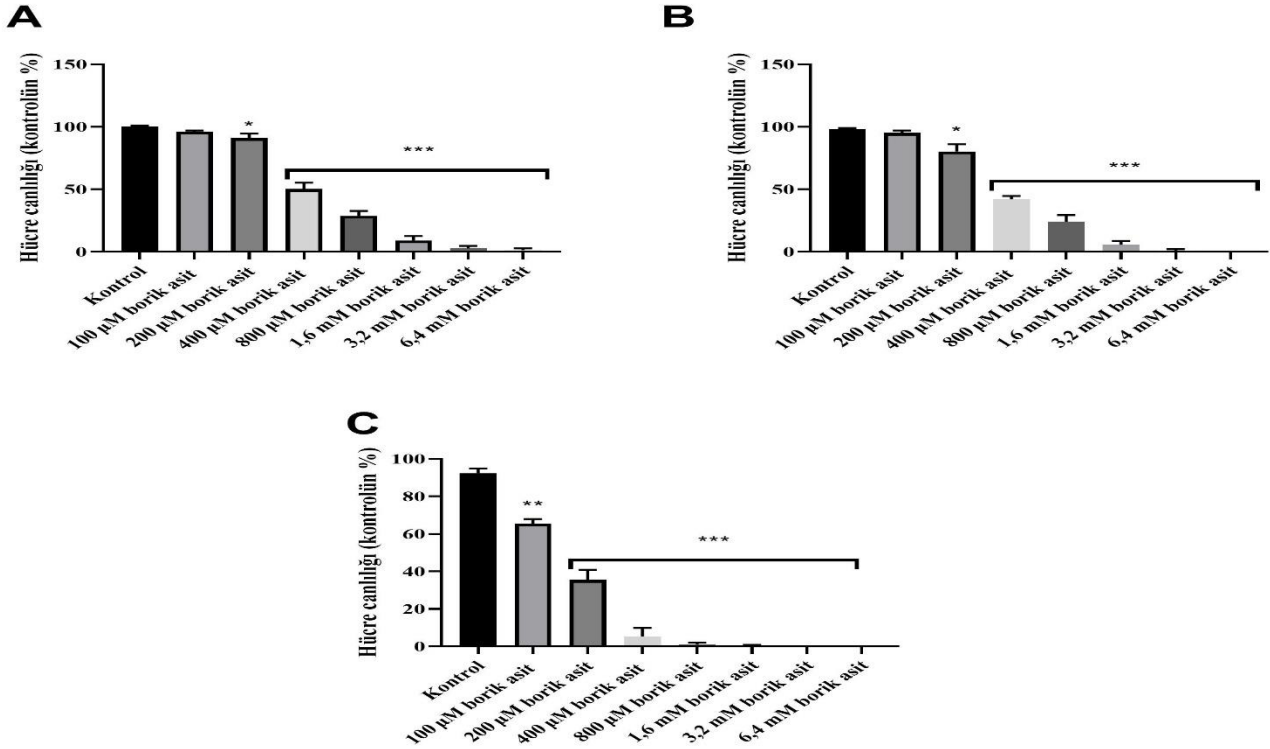
BULGULAR

Borik asidin hücre canlılığı üzerindeki etkileri

Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek borik aside maruz kalan hücrelerin canlılığında

meydana gelen değişim kontrol grubuyla karşılaştırılarak yüzdesel olarak belirtilmiştir. Farklı zaman aralığında (24, 48 ve 72 saat) U87 GBM hücrelerine yedi farklı borik asit konsantrasyonunun (100 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM , 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM) maruziyetini gerçekleştirdik. Tüm hücre canlılığı yüzdeleri ve önem düzeyleri Şekil 1'de sunulmaktadır. MTT analiz sonuçlarına göre, kontrol grubundaki hücre canlılığı $100 \pm 0,57$ olarak belirlendi. 24. saatin sonunda 200 μM üzerindeki borik asit konsantrasyonları U87 hücrelerinin canlılığında ($91 \pm 2,08$) kontrol grubuna göre anlamlı bir azalmaya neden oldu ($p = 0,0139$; Şekil 1A). Ancak hücre canlılığında en fazla düşüş 3,2 mM ve 6,4 mM konsantrasyonlarda gözlemlendi ve hücre canlılığı kontrol grubuna göre sırasıyla %96,5 ve %98,9 oranında düşüş gösterdi (sırasıyla hücre canlılıkları $2,67 \pm 0,74$ ve $1,33 \pm 0,51$). 48. saat deneyinde 200 μM ve üzerindeki borik asit konsantrasyonları hücre canlılığında artan borik asit konsantrasyonuna paralel şekilde düşüş gösterdi (Şekil 1B).

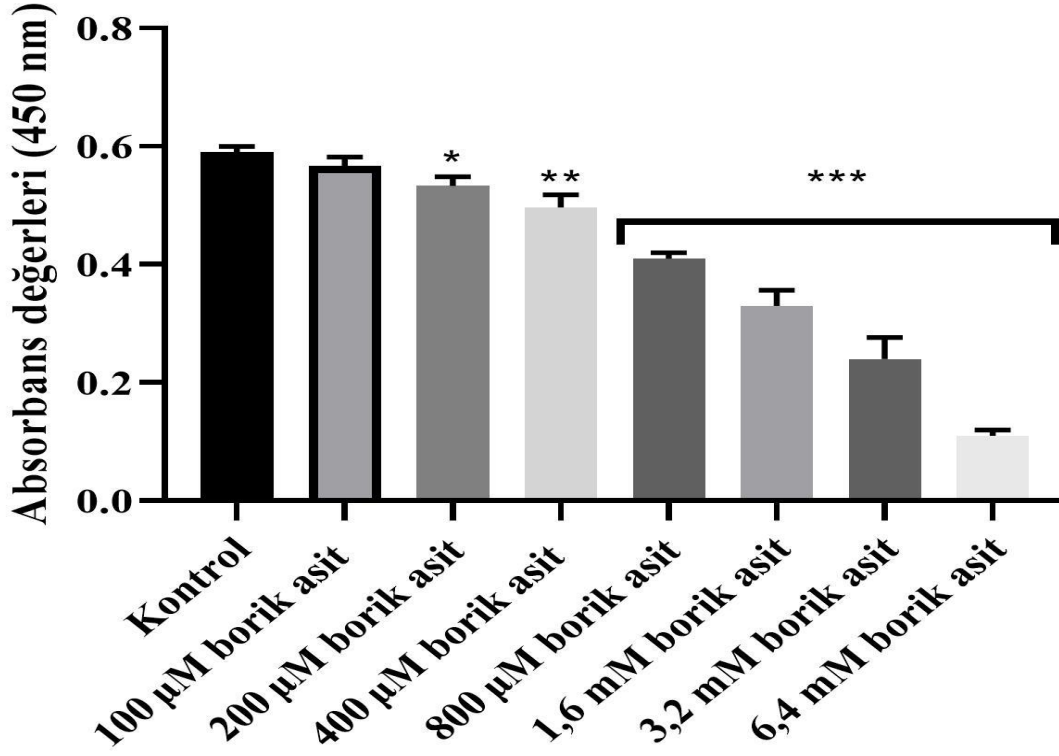
72. saatte tüm borik asit konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında canlılıkta anlamlı bir azalmaya neden olmuş ($p < 0,001$; Şekil 1C) ve 800 μM , 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM borik asit konsantrasyonlarında canlılık yok denecek kadar azalmıştı. MTT analizi kullanılarak hücre canlılığının %50'sini inhibe eden konsantrasyonun (IC50) 405 μM olduğu belirlendi. Diğer biyokimyasal analizler sırasında borik asit belirlenen IC50 konsantrasyonu kullanıldı.



Şekil 1. Borik asidin U87 hücrelerindeki hüresel canlılık üzerindeki etkileri. (A) U87 hücrelerinin 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı, (B) U87 hücrelerinin 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı, (C) U87 hücrelerinin 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Borik asidin U87 hücrelerindeki DNA sentezine etkileri
U87 hücrelerindeki kontrol grubunda daha fazla hücrenin BrdU ile etiketlendiğini gözlemledik. Bunlar aktif olarak çoğalan ve hücre döngüsünün S fazındaki hücreleri temsil eder. BrdU'nun absorbans değerleri 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M, 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM borik asit konsantrasyonlarının uygulandığı deneysel gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşmüştür (Şekil 2). MTT sonuçlarına benzer şekilde, BrdU analizi ile

birlikte borik asit konsantrasyonuna bağımlı şekilde hücre canlılığının da düştüğünü belirledik. BrdU analizine göre, 200 μ M ve 400 μ M absorbans değerleri sırasıyla $0,53\pm 0,0064$ ve $0,49\pm 0,012$ olarak belirlendi ($p=0,017$ ve $p=0,0002$). Benzer şekilde, 00 μ M, 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM borik asit konsantrasyonlarının uygulandığı U87 hücrelerinde BrdU analiz sonuçları sırasıyla $0,41\pm 0,005$, $0,33\pm 0,015$, $0,24\pm 0,02$ ve $0,11\pm 0,004$ 'tür ($p<0,0001$).

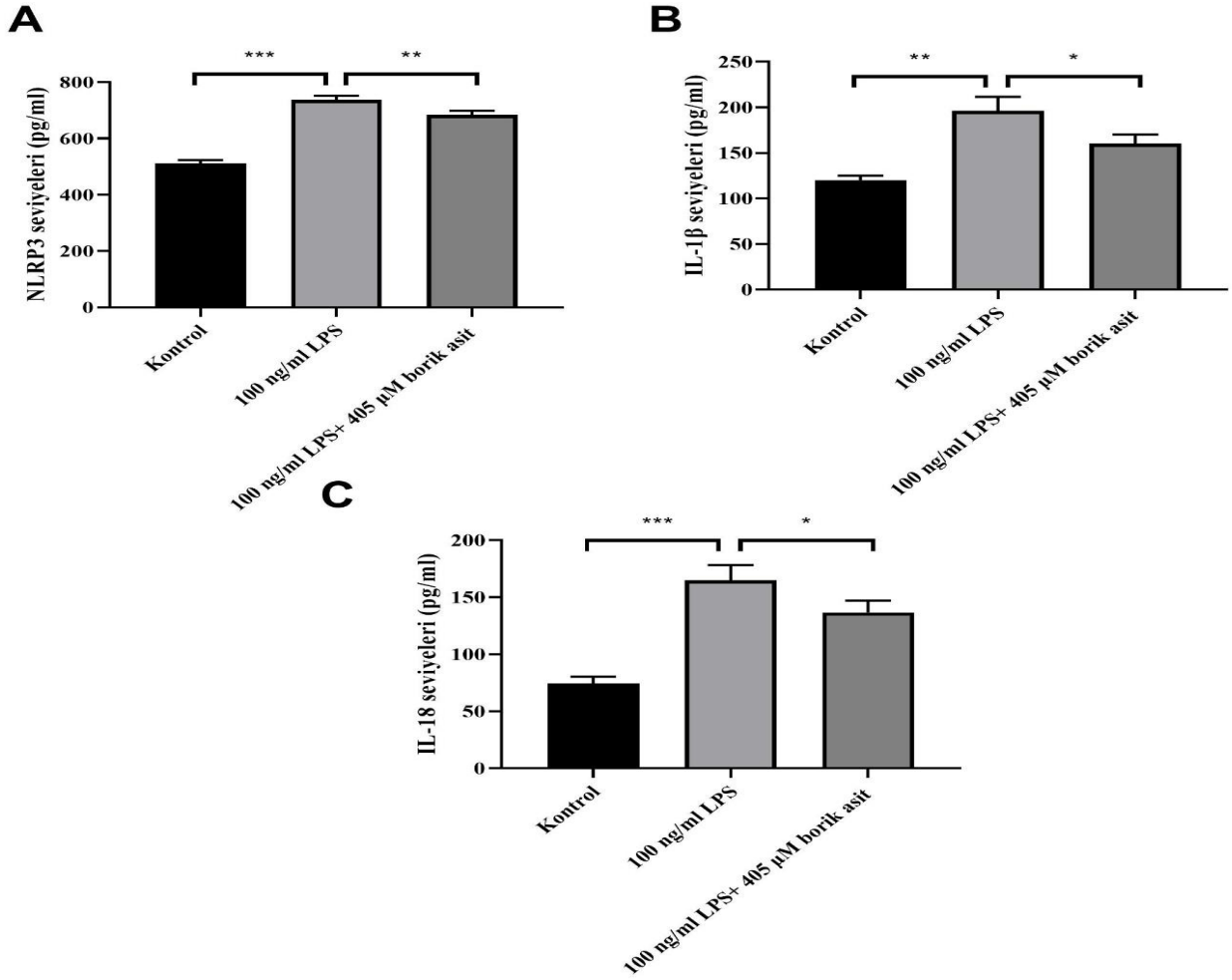


Şekil 2. Borik asidin U87 hücrelerindeki hücre proliferasyonu üzerindeki etkileri. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,0001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Borik asidin inflamazom aktivasyonundaki etkileri

Borik asidin U87 hücrelerindeki inflamazom aktivasyonu etkilerini araştırmak için hücreler 24 saat boyunca LPS ve borik asit+LPS ile birlikte inkübe edildi. Daha sonra, inflamazom aktivasyonundaki temel mekanizmalarda rol alan NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyelerin ölçümü gerçekleştirildi. U87 hücreleri 24 saat boyunca LPS ile tedavi edildiğinde, NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyelerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlendi (Şekil 3A, 3B ve 3C). Öte yandan, 24 saatlik borik asidin LPS ile birlikte uygulamasının NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyelerini düşürdüğü ve bunun sonucunda inflamazom aktivasyonunun baskılandığı bulundu. Kontrol grubunda

NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyeleri sırasıyla $511,7\pm 6,6$ pg/ml, $120\pm 2,8$ pg/ml ve $74,3\pm 3,48$ pg/ml olarak belirlendi. Ek olarak, U87 hücrelerindeki LPS maruziyeti sonrası NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyeleri sırasıyla $736,2\pm 8,19$ pg/ml, $196,3\pm 8,72$ pg/ml ve $165\pm 7,63$ pg/ml olarak ölçüldü (sırasıyla gruplarıyla karşılaştırıldığında $p<0,0001$, $p=0,0003$ ve $p<0,0001$). Dahası, borik asit+LPS ile birlikte uygulandığı gruplardaki NLRP3, IL-1 β ve IL-18 seviyeleri sırasıyla $683,3\pm 8,8$ pg/ml, $160\pm 5,7$ pg/ml ve $136,7\pm 6,01$ pg/ml olduğu bulunmuştur (sırasıyla gruplarıyla karşılaştırıldığında $p=0,0086$, $p=0,0152$ ve $p=0,0035$).

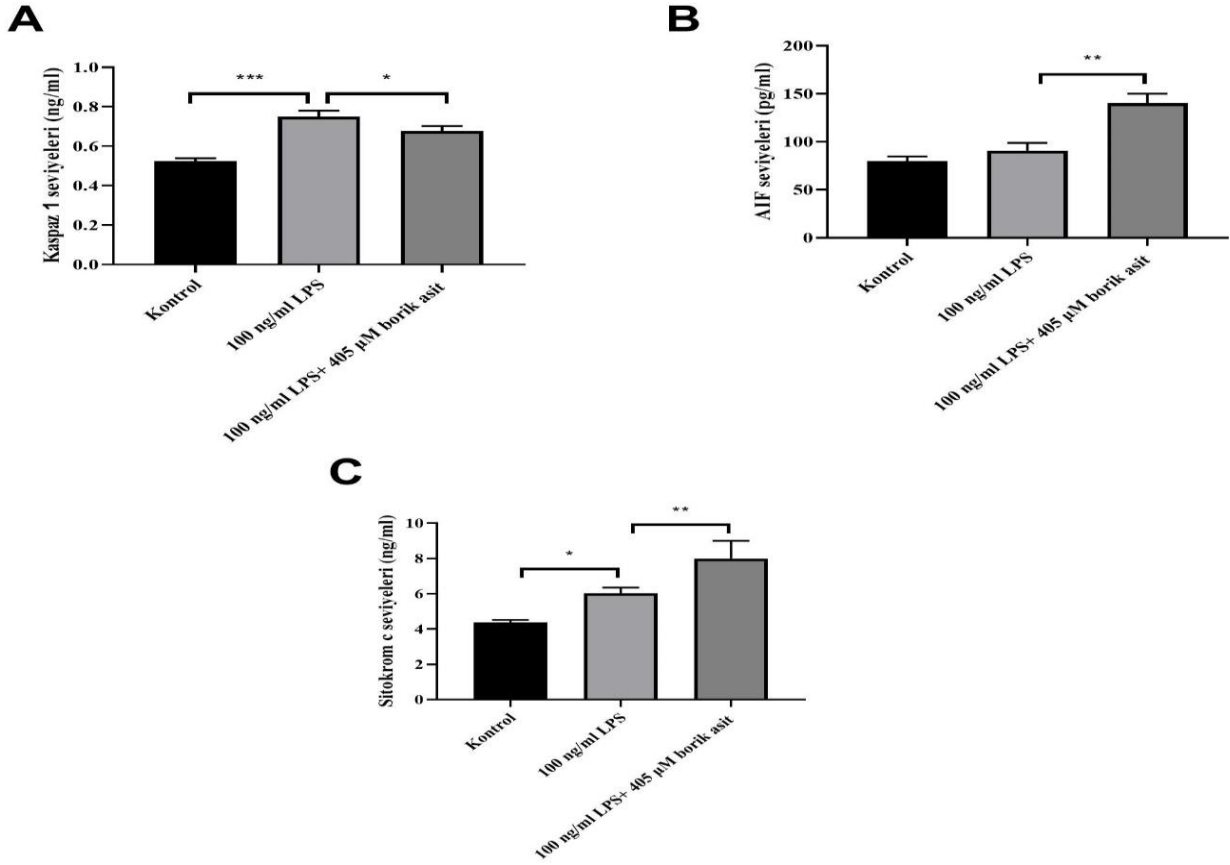


Şekil 3. Borik asidin U87 hücrelerindeki iflamazom aktivasyonu üzerindeki etkileri. (A) Borik asidin maruziyeti sonrası U87 hücrelerindeki NLRP3 seviyeleri, (B) Borik asidin maruziyeti sonrası U87 hücrelerindeki IL-1 β seviyeleri, (A) Borik asidin maruziyeti sonrası U87 hücrelerindeki IL-18 seviyeleri. $p < 0,05$, $**p < 0,01$ ve $***p < 0,0001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

Borik asidin kaspaz-1, AIF ve sitokrom c üzerindeki etkileri

IL-1 β ve IL-18, yapısal olarak benzer sitokinlerdir ve aktif hale gelmek için kaspaz-1 işlenmesini gerektirir. Bu nedenle borik asit U87 hücrelerindeki iflamazom aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin kaspaz-1'e bağlı olup olmadığını araştırdık. Deneylerimiz U87 hücrelerinde LPS'nin kaspaz-1'in aktivitesini tetiklediğini göstermektedir (Şekil 4A). Kontrol grubuna ait kaspaz-1'in aktivitesini $0,52 \pm 0,008$ ng/ml olarak bulduk. Ayrıca, LPS ve borik asit+LPS maruziyetinin olduğu gruplardaki kaspaz-1'in aktivitesi sırasıyla $0,75 \pm 0,01$ ng/ml ve $0,67 \pm 0,14$ ng/ml olarak tespit ettik (sırasıyla gruplarıyla karşılaştırıldığında $p = 0,0006$ ve $p = 0,0235$). Böylece, borik asit maruziyetiyle, aktif kaspaz-1 aktivitesini tersine

çevirdiği ve iflamazom aktivasyonunu baskıladığı belirlendi. Dahası, LPS uygulamasıyla birlikte U87 hücrelerindeki AIF ve sitokrom c seviyeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermezken, borik asit maruziyetiyle birlikte AIF ve sitokrom c seviyeleri önemi bir artış göstermiştir ($p < 0,001$; Şekil 4B ve 4C). Kontrol grupları ait AIF ve sitokrom c seviyeleri sırasıyla $79,67 \pm 2,9$ pg/ml ve $4,3 \pm 0,08$ ng/ml olarak bulduk. borik asit+LPS maruziyetinin olduğu gruplardaki AIF ve sitokrom c seviyelerini sırasıyla $140 \pm 5,7$ pg/ml ve $8 \pm 0,57$ ng/ml olarak ölçtük (sırasıyla gruplarıyla karşılaştırıldığında $p = 0,0007$ ve $p = 0,0181$). Bu sonuçlar da, borik asitle birlikte, AIF ve sitokrom c seviyelerinde artış olduğu bulunmuştur.



Şekil 4. U87 hücrelerinde borik asit maruziyetinin kaspaz-1, AIF ve sitokrom c seviyelerine etkisi. (A) U87 hücrelerindeki kaspaz-1 seviyeleri; (B) U87 hücrelerindeki AIF seviyeleri; (C) U87 hücrelerindeki sitokrom c seviyeleri. $p < 0,05$, $**p < 0,01$ ve $***p < 0,001$ kontrol grubuyla karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Kanser hücreleri, bağışıklık sistemi aracılığıyla ortadan kaldırılmaktan kaçınmak için çeşitli mekanizmalar geliştirir. Bağışıklık sisteminin bozulması, kanserlerin sınıflandırılması ve yönlendirilmiş kanser tedavilerinin geliştirilmesi için yoğun olarak odaklanılan bir alandır (16). NLR reseptör ailesi, bağışıklık ve inflamasyonun önemli düzenleyicileri olarak kabul edilmiştir (17). NLR'ler, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, endotel hücreleri ve nötrofillerin yanı sıra edinsel bağışıklık sistemi hücreleri de dahil olmak üzere doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından ifade edilir (18). NLR'lerin bağışıklık ve inflamasyondaki önemli rolü göz önüne alındığında, NLR'lerin kanserdeki rolünün anlaşılması, terapötik stratejilerin ve rasyonel ilaç tasarımının geliştirilmesine olanak tanır. NLRP3 inflamazomunun ve bileşenlerinin rolü, merkezi sinir sisteminin bir grup malign neoplazmi olan gliomalarda da kapsamlı bir şekilde tanımlanmıştır ve bu, NLRP3'ün protümoral rolünün tanımlanmasına yol açmıştır (19). NLRP3'ün artışı, AKT sinyal yolunu ve IL-1 β /NF-kappaB p65 sinyalini aktive ederek insan glioma ilerlemesini etkiler, böylece metastazı teşvik eder. Ek olarak, glioma hücreleri IL-1 β 'nin anormal ekspresyonu ve NLRP3 seviyelerindeki artışı radyoterapi direncine katkıda bulunduğu görülmektedir (20). Ancak, NLRP3 inflamazomunun gliomadaki işlevselliği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

NLRP3 inflamazom aktivasyonu ile GBM hücre metastazı arasındaki bağlantıya dayanarak, bu çalışmada borik asidin, hücre canlılığı üzerinde zaman ve konsantrasyon bağımlı şekilde belirgin bir inhibe edici etkilere sahip olduğunu bulduk. İnflamazom aktivasyonu ve hücre canlılığı arasındaki korelasyonu analiz etmek için, U87 hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu elde etmek için LPS maruziyetini gerçekleştirdik. Beklendiği gibi, LPS, U87 hücrelerinde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu arttırdı ve beraberinde U87 hücrelerinin IL-1 β ve IL-18 seviyelerinde de artışa neden olduğunu bulduk. Ancak borik asit tedavisi, LPS'nin desteklediği U87 hücrelerinin kaspaz-1 aktivasyonunu ve olgun IL-1 β ve IL-18 üretimini azalttı. Böylece borik asit, U87 GBM hücrelerinde IL-1 β ve IL-18 gibi inflamatuvar sitokinlerin kaspaz-1'e bağımlı proteolitik olgunlaşmasını önlediğini de belirledik. NLRP3 inflamazomunun en önemli efektörlerinden biri olan IL-1 β , glioma inflamatuvar mikroçevresinde önemli bir sitokindir ve glioma proliferasyonu ve metastazının güçlü bir arttırıcısı olarak kabul edilir (21). Tarassishin ve arkadaşları, insan glioma hücrelerinin, oldukça hassas NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerine IL-1 β ürettiğini bildirmiştir; bununla birlikte, insan normal astrosit hücrelerinde, NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve olgun IL-1 β protein üretimi neredeyse tamamen baskılanmıştır; bu, glioma hücrelerinin NLRP3 inflamazomunu aktive etme ve IL-1 β üretme yeteneğinin, agresif bir onkogenetik fenotipin gelişmesine yol açabileceğini göstermektedir (22). IL-

1β'nın, glioma ilerlemesi için çok önemli olan bir transkripsiyon faktörü olan STAT3'ü aktive ederek insan glioma hücrelerinin çoğalmasını, göçünü ve istilasını destekleyebildiği kanıtlanmıştır (23). Sonuçlarımızla tutarlı şekilde, Shang ve meslektaşlarının yaptığı çalışmaya göre beta-hidroksibutirat, kaspaz-1 aktivitesinin baskılanmasıyla olgun IL-1β üretiminin düşürdüğü ve bununla birlikte NLRP3 inflamazomunun inaktivasyonu ile C6 glioma hücrelerindeki göçü durduğu bulunmuştur (24). Önceki bir çalışmada, NLRP3, kaspaz-1 ve pro-IL-1β proteinlerinden oluşturulan NLRP3 inflamazom kompleksinin bir araya getirilmesi ve aktivasyonunun, kolit ile ilişkili kanserin karsinogenezinde negatif bir düzenleyici olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir (25). Hepatoselüler karsinomda (HCC), NLRP3 inflamazom kompleksinin baskılanması, HCC hücre malignitesinin inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (26). Ancak Wang ve arkadaşları, Sail-1'in düzenlenmesi yoluyla kolorektal kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) süreci için NLRP3 ekspresyonunun gerekli olduğunu ancak inflamazom aktivasyonunun gerekli olmadığını bildirmiştir (27). Akciğer kanserinde NLRP3, kaspaz-1'e bağımlı veya bağımsız bir yol yoluyla IL-1β ve IL-18'in salınmasına aracılık ettiği rapor edilmiştir (28).

DU-145, LNCaP ve PC-3 prostat hücre hatlarının kullanıldığı bir çalışmada; hücrelerin borik asit (0–1000 µM) içeren bir ortamla 8 gün boyunca kültürlenmesinden sonra hücre çoğalmasının doza bağlı bir şekilde önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (29). Gallardo ve diğerleri, LNCaP prostatının subkutan enjeksiyonu ile oluşturulan bir hayvan modelinde 70 gün boyunca borik asit solüsyonu (min 1,7 mg/kg-maks 10,3 mg/kg) ile gavajın kanser hücrelerinin büyüme hızını ve tümör morfolojisini olumsuz etkilediğini gösterdi (30). Borik aside maruz kaldıktan sonra kolon kanseri hücrelerinin proliferasyon durumunu değerlendirmek için yapılan çalışmada, BrdU ile hücre döngüsü analizi edilmiş ve borik asidin hem 2D hem de 3D kültürlerde hücre döngüsü durmasına neden olduğunu ve SW480 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (31). Dahası, borik asidin insan yumurtalık kanseri hücre hattı MDAH-2774'de apoptozu indükleyen Bax, Bid, kaspaz-3 ve kaspaz-9'un apoptozla ilişkili gen ifadelerinde anlamlı artışlara neden olduğunu; tersine, apoptozun negatif düzenleyicisi olan apoptozla ilişkili proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL'nin ekspresyonunda önemli azalmalara neden olduğu rapor edilmiştir (32). Yukarıdaki bahsi geçen geçen çalışmamalarla benzer şekilde, BrdU analize göre borik asidin U87 hücrelerinde DNA sentezini durdurarak hücre proliferasyonunu baskıladığını belirledik. Ayrıca, borik asit maruziyetinin U87 hücrelerindeki AIF ve sitokrom c seviyelerini artırarak da apoptozu indüklediği ve böylece hücre canlılığını baskıladığı bulduk.

SONUÇ

Bildiğimiz kadarıyla, borik asidin insan GBM hücreleri üzerindeki inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkilerini araştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmanın bulguları, NLRP3'ün bir tümör promotörü olarak işlev görebileceğini ve borik asit maruziyetiyle NLRP3'ün kaspaz-1, IL-1β ve IL-18 aracılığıyla baskılanması, GBM malignitesinde NLRP3'ün altında yatan mekanizmaya yeni bir bakış açısı

sağlayabileceğini göstermektedir. Verilerimiz borik asidin NLRP3 hedefleyerek GBM tedavisi için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermektedir.

Yazarların Katkıları: Fikir/Kavram: C.H.; Tasarım: C.H.; Veri Toplama ve/veya İşleme: C.H.; Analiz ve/veya Yorum: C.H.; Literatür Taraması: C.H.; Makale Yazımı: C.H.; Eleştirel İnceleme: C.H.

KAYNAKLAR

1. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2015; 314(23): 2535-43.
2. Tosoni A, Franceschi E, Poggi R, Brandes AA. Relapsed glioblastoma: treatment strategies for initial and subsequent recurrences. *Curr Treat Options Oncol*. 2016; 17(9): 49.
3. Rathinam VA, Fitzgerald KA. Inflammasome complexes: emerging mechanisms and effector functions. *Cell*. 2016; 165(4): 792-800.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006; 124(4): 783-801.
5. Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T, Nakasone N, Suzuki T. Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection. *Cell Microbiol*. 2012; 14(2): 149-54.
6. Tarassishin L, Casper D, Lee SC. Aberrant expression of interleukin-1β and inflammasome activation in human malignant gliomas. *PLoS One*. 2014; 9(7): e103432.
7. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 2014; 157(5): 1013-22.
8. Wang H, Wang Y, Du Q, Lu P, Fan H, Lu J, et al. Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Exp Cell Res*. 2016; 342(2): 184-92.
9. Argust P. Distribution of boron in the environment. *Biol Trace Element Res*. 1998; 66: 131-43.
10. Scorei RI, Popa R Jr. Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2010; 10(4): 346-51.
11. Ayhanci A, Tanriverdi DT, Sahinturk V, Cengiz M, Appak-Baskoy S, Sahin IK. Protective effects of boron on cyclophosphamide-induced bladder damage and oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 197(1): 184-91.
12. Kulkarni S, Bhandary D, Singh Y, Monga V, Thareja S. Boron in cancer therapeutics: An overview. *Pharmacol Ther*. 2023; 251: 108548.
13. Hacıoğlu C, Kar F, Kacar S, Sahinturk V, Kanbak G. High concentrations of boric acid trigger concentration-dependent oxidative stress, apoptotic pathways and morphological alterations in du-145 human prostate cancer cell line. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 193(2): 400-9.

14. Hacıoğlu C, Kar F, Davran F, Tuncer C. Borax regulates iron chaperone- and autophagy-mediated ferroptosis pathway in glioblastoma cells. *Environ Toxicol.* 2023; 38(7): 1690-701.
15. Roosen K, Scheld M, Mandzhalova M, Clarner T, Beyer C, Zendedel A. CXCL12 inhibits inflammasome activation in LPS-stimulated BV2 cells. *Brain Res.* 2021; 1763: 147446.
16. Zhu H, Cao X. NLR members in inflammation-associated carcinogenesis. *Cell Mol Immunol.* 2017; 14(5): 403-5.
17. Huang J, Liu F, Liu Z, Tang H, Wu H, Gong Q, et al. Immune checkpoint in glioblastoma: promising and challenging. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 242.
18. Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity.* 2021; 54(3): 437-53.
19. Lin TY, Tsai MC, Tu W, Yeh HC, Wang SC, Huang SP, et al. Role of the NLRP3 inflammasome: insights into cancer hallmarks. *Front Immunol.* 2021; 11: 610492.
20. Vafaei S, Taheri H, Hajimomeni Y, Fakhre Yaseri A, Abolhasani Zadeh F. The role of NLRP3 inflammasome in colorectal cancer: potential therapeutic target. *Clin Transl Oncol.* 2022; 24(10): 1881-9.
21. Munoz L, Yeung YT, Grewal T. Oncogenic Ras modulates p38 MAPK-mediated inflammatory cytokine production in glioblastoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2016; 17(4): 355-63.
22. Tarassishin L, Casper D, Lee SC. Aberrant expression of interleukin-1 β and inflammasome activation in human malignant gliomas. *PLoS One.* 2014; 9(7): e103432.
23. Fathima Hurmath K, Ramaswamy P, Nandakumar DN. IL-1 β microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. *Cell Biol Int.* 2014; 38(12): 1415-22.
24. Shang S, Wang L, Zhang Y, Lu H, Lu X. The beta-hydroxybutyrate suppresses the migration of glioma cells by inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell Mol Neurobiol.* 2018; 38(8): 1479-89.
25. Allen IC, TeKippe EM, Woodford RM, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med.* 2010; 207(5): 1045-56.
26. Wei Q, Mu K, Li T, Zhang Y, Yang Z, Jia X, et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Lab Invest.* 2014; 94(1): 52-62.
27. Wang H, Wang Y, Du Q, Lu P, Fan H, Lu J, et al. Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Exp Cell Res.* 2016; 342(2): 184-92.
28. Wang Y, Kong H, Zeng X, Liu W, Wang Z, Yan X, et al. Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. *Oncol Rep.* 2016; 35(4): 2053-64.
29. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 2004; 216(1): 21-9.
30. Gallardo-Williams MT, Chapin RE, King PE, Moser GJ, Goldsworthy TL, Morrison JP, et al. Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicol Pathol.* 2004; 32(1): 73-8.
31. Sevimli M, Bayram D, Özgöçmen M, Armağan I, Semerci Sevimli T. Boric acid suppresses cell proliferation by TNF signaling pathway mediated apoptosis in SW-480 human colon cancer line. *J Trace Elem Med Biol.* 2022; 71: 126958.
32. Cabus U, Secme M, Kabukcu C, Cil N, Dodurga Y, Mete G, Fenkci IV. Boric acid as a promising agent in the treatment of ovarian cancer: Molecular mechanisms. *Gene.* 2021; 796-7: 145799. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145799>