

Research Article / Araştırma Makalesi

Borik Asidin Endoplazmik Retikulum Stresiyle İlgili Proteinler Aracılığıyla Glioblastoma Hücreleri Üzerindeki Antiproliferatif Etkileri

Antiproliferative Effects of Boric Acid on Glioblastoma Cells via Endoplasmic Reticulum Stress-Related Proteins

^{1,2}Ceyhan Hacıoğlu

¹Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

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

Özet: Endoplazmik retikulum (ER) stresi, metabolizma homeostazının düzenlenmesinde ve gliomalar dahil çeşitli kanserlerin fizyopatolojisinde rol alır. İnsanlar için eser element olan bor, deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarda potansiyel kanser karşıtı özellikler göstermiştir. Bu çalışma, borik asidin insan glioblastoma (GBM) hücrelerindeki ER stresi sinyalizasyonu hücre canlılığı, apoptoz ve oksidan durum üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Çalışma, MTT analizi kullanılarak borik asidin (0-1600 µM) U251 hücre canlılığı üzerindeki sitotoksik etkisini değerlendirdi. Borik asitle tedavi edilen hücrelerde GRP78, ATF4, CHOP, sitokrom c, kaspaz 3, kaspaz 12, toplam oksidan durum (TOS), toplam antioksidan durum (TAS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) seviyelerini belirlemek için spektrofotometrik ölçümler yapıldı. U251 hücrelerinin borik aside maruz bırakılması, hücre canlılığında konsantrasyon ve zaman bağımlı bir düşüşe neden oldu. MTT analizi göre, borik asidin 24, 48 ve 72 saat IC50 sırasıyla değerleri 312,7 µM, 208,6 µM ve 115,2 µM olarak belirlendi. Borik asit, U251 hücrelerinde sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 düzeylerini konsantrasyona bağlı olarak arttırdı. U251 hücrelerinde sitokrom c seviyeleri yaklaşık 3 katlık, kaspaz 3 seviyeleri yaklaşık 2 katlık ve kaspaz 12 seviyeleri yaklaşık 2 katlık artışla 312,7 µM borik asit konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Ek olarak borik asit tedavisi, U251 hücrelerinde TOS ve OSI'yi önemli ölçüde artırdı. Ayrıca, GRP78 ve ATF4 seviyeleri borik asitle tedavi edilen hücrelerde konsantrasyona bağlı bir azalma gösterdi. Tersine borik asit, U251 hücrelerinde CHOP seviyelerini konsantrasyona bağlı bir şekilde arttırdı. Özetle, borik asit GBM hücrelerinde ER stresini tetikleyerek apoptozu ve oksidatif stresin düştü. Bu olumlu özellikleriyle borik asit, GBM'nin tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olabilir.

Anahtar Kelimeler: Borik asit, ER stresi, Glioblastoma

Abstract: Endoplasmic reticulum (ER) stress is involved in the regulation of metabolic homeostasis and the pathophysiology of various cancers, including gliomas. Boron, a trace element for humans, has demonstrated potential anti-cancer properties in experimental and epidemiological studies. This study aims to investigate the effects of boric acid on cell viability, apoptosis and oxidant status via ER stress signaling in human glioblastoma (GBM) cells. The study evaluated the cytotoxic effect of boric acid (0–1600 µM) on U251 cell viability using MTT assay. Spectrophotometric measurements were performed to determine the levels of GRP78, ATF4, CHOP, cytochrome c, caspase 3, caspase 12, total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) and oxidative stress index (OSI) in boric acid-treated cells. Exposure of U251 cells to boric acid caused a concentration- and time-dependent decrease in cell viability. According to MTT analysis, the IC50 values of boric acid at 24, 48 and 72 hours were determined as 312.7 µM, 208.6 µM and 115.2 µM, respectively. Boric acid concentration-dependently increased the levels of cytochrome c, caspase 3 and caspase 12 in U251 cells. In U251 cells, cytochrome c levels increased approximately 3-fold, caspase 3 levels increased approximately 2-fold, and caspase 12 levels increased approximately 2-fold at a boric acid concentration of 312.7 µM. Additionally, boric acid treatment significantly increased TOS and OSI in U251 cells. Furthermore, GRP78 and ATF4 levels showed a concentration-dependent decrease in boric acid-treated cells. Conversely, boric acid increased CHOP levels in U251 cells in a concentration-dependent manner. In summary, boric acid induced apoptosis and oxidative stress by triggering ER stress in GBM cells. With these positive properties, boric acid may be a potential therapeutic agent in the treatment of GBM.

Keywords: Boric acid, ER stress, Glioblastoma

ORCID ID of the authors: CH. [0000-0002-0993-6118](https://orcid.org/0000-0002-0993-6118)

Received 13.12.2023

Accepted 02.02.2024

Online published 06.02.2024

Correspondence: Ceyhan HACIOĞLU – Düzce Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye
Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Düzce, Türkiye

e-mail : ceyhanhacioglu@duzce.edu.tr

1. Giriş

Gliomalar santral sinir sisteminde en sık tanı konulan primer neoplazmlardır ve malign beyin tümörlerinin %81'ini oluştururlar (1). Malign gliomalar arasında anaplastik astrositom (derece 3) ve glioblastoma multiforme (GBM, derece 4) bulunur (2). GBM en yaygın histolojidir ve gliomaların %45'ini oluşturur. Kötü prognoza sahip GBM için ortalama genel sağ kalım yaklaşık 12 ila 15 ay ve tedaviye rağmen 5 yıllık sağ kalım yalnızca %5,5'tir. (3). GBM'nin görülme sıklığı da yaşla birlikte artar ve zayıflık, görsel ve duyuşal değişiklikler, baş ağrıları, nöbetler ve ruh hali, hafıza veya yürütücü işlevlerdeki değişiklikler dahil olmak üzere yıkıcı nörolojik etkilerle ilişkilidir (4). Eksizyon, radyasyon ve kemoterapi standart tedaviler olmasına rağmen GBM'li hastaların prognozu kötü olmaya devam etmektedir (5).

Endoplazmik retikulumun (ER) ana işlevi proteinleri ve lipitleri sentezlemektir. Lipitler, kendi ihtiyaçlarını karşılamamın yanı sıra Golgi aparatına, lizozomlara, plazma membranlarına, mitokondriye ve diğer membranöz hücre yapılarına da sağlanır (6). ER'de katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi, ER stresine neden olur ve bunun sonucunda, proteinin doğru şekilde katlanmasını sağlamak için katlanmamış protein tepkisini (UPR) tetikler (7). ER stresi, hücre çoğalmasını korumak için glikoz düzenleyici proteinlerin [78-kDa glikozla düzenlenen protein (GRP78)] ve diğer ER moleküler şaperonların ekspresyonunu indükleyebilir (8). Bununla birlikte, ER stresi aynı zamanda bağımsız olarak endojen hücre apoptozunu indükleyebilir ve sonuçta adaptasyon, yaralanma veya apoptoz gibi hücre kaderini etkileyebilir (9). Genel olarak, ER stresi sürekli ise, protein kinaz R-benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren enzim 1 (IRE1) ve aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF) 6 sinyal yolları, apoptotik yolları indüklemek için kullanılacaktır (10). Öte yandan, ATF4 hücre canlılığının devamı ve stres koşullarına adaptasyonun artırılmasında rol oynayan çok çeşitli genlerin ekspresyonunu destekleyen bir transkripsiyon faktörüdür (11). ATF4, hücre metabolizması, besin alımı ve antioksidasyonda rol oynayan çok sayıda genin ekspresyonunu uyarır.

Dahası, uzun süreli ER stres koşulları altında ATF4, aynı zamanda büyüme durması ve DNA hasarı indüklenebilir gen olarak da adlandırılan C/EBP homolog proteini (CHOP) gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu teşvik eder (12). CHOP, hücre ölümünü çeşitli şekillerde teşvik edebilen bir transkripsiyon faktörüdür. CHOP gen ekspresyonunun apoptoz yoluyla hücre ölümünde kesinlikle yer aldığı defalarca ileri sürülmüştür (13), ancak araştırmalar CHOP'un indüksiyonu ile apoptoz arasında herhangi bir ilişkinin varlığını doğrulamamıştır. Bu nedenle ER stresi ile GBM hücre apoptozunun nasıl tetikleneceğine dair kanıtlar henüz aydınlatılmayı beklemektedir.

Bor'un besin değerini ve tıbbi özelliklerini kanıtlayan birçok çalışmanın ardından, borun tıbbi önemi yavaş yavaş yeniden ortaya çıkmaktadır. Bor, prostat, rahim ağzı ve akciğer kanseri gibi farklı kanser türleri de dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde oldukça etkilidir (14).

Bu çalışmada, borik asidin U251 insan GBM hücrelerindeki ER stres biyobelirteçleri olan GRP78, ATF4 ve C/EBP homolog proteini (CHOP) seviyeleri ile apoptotik biyobelirteçler olan sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, borik asidin U251 GBM hücrelerindeki pro-oksidan/oksidan dengesini üzerinde etkisini belirlemek için de total oksidan kapasite (TOS) ve total antioksidan kapasite (TAS) seviyeleri ölçülmüştür.

2. Gereç ve Yöntem

2.1. Hücre Kültürü ve Hücre Canlılığı Deneyi

U251 insan GBM hücreleri, American Tissue Culture Collection'dan (ATCC) satın alınmıştır. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir inkübatörde %10 fetal sıgır serumu (Kat. No: 11573397, Gibco) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle meydamu (DMEM, Kat. No: DMEM-HA, Capricorn Scientific) ortamında kültürlendi.

Borik asit (Kat. No: B0394, Sigma-Aldrich) elde edildi ve DMEM ortamında 0.2 M stok çözelti halinde hazırlandı. Hücre canlılığının belirlenmesi için bir 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT, Kat. No: M5655 Sigma-Aldrich) analizi kullanıldı. Hücreler 2×10^3 hücre/kuyu konsantrasyonunda 96 kuyucuklu plakalara ekildi. 24 saat sonra ortam yenilendi ve daha önceki çalışmamızda GBM hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olan konsantrasyonlar olan 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M, 800 μ M ve 1600 μ M borik asit ilave edildi (15) ve hücreler 24, 48 ve 72 saat kültürlendi. Maruziyetten sonra her kuyucuğa 10 μ l MTT solüsyonu [fosfat tamponu (PBS) içinde 5 mg/ml] ilave edildi ve hücreler 37 °C'de 4 saat inkübe edildi. Bu işlem sonunda, hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 μ l dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi. 570 nm'deki optik yoğunluklar, mikro plaka okuyucusu (BioTek) kullanılarak ölçüldü ve hücre canlılığı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı:

Hücre canlılığı (%) = (Borik Asit Uygulanan Hücrelerdeki Optik Yoğunluğu – Blank) / (Borik Asit Uygulanmamış Hücrelerdeki Optik Yoğunluğu - Blank) x 100.

MTT analiz sonuçlarına göre hesaplanan IC25, IC50 ve ara konsantrasyon değerlerini sonraki biyokimyasal analizler sırasında kullanıldı. U251 hücre belirlenen bu konsantrasyonları 24 saat süreyle maruz bırakıldı.

2.2. Morfolojik Analiz

U251 hücreleri, 6 kuyucuklu plakalar üzerinde büyütüldü ve hücrelere üç farklı borik asit konsantrasyonu ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra plakalar inverted mikroskopunda (Oxion Inverso, CMEX-5 Pro kamera ile) hücre küçülmesi, hücre yuvarlaklaşması ve hücre sayısı gibi morfolojik değişiklikler açısından incelendi.

2.3. ER Stres Biyobelirteçlerinin Ölçümü

ER stres biyobelirteçlerinin seviyelerinin belirlenmesi için, U251 hücreleri 6 kuyucuklu plakalarda 24 saat boyunca belirlenen borik asit konsantrasyonlarıyla işleme tabi tutuldu. Hücreler fosfat tamponu ile yıkandı ve daha

sonra buz üzerinde proteaz inhibitörleri ile yeniden işleme tabi tutuldu. Lizatlar, 15 dakika boyunca 4°C'de 13000xg'de santrifüjlenerek elde edilen süpernatandan, ticari olarak temin edilebilen enzim bağlantılı immünosorbent tahlili (ELISA) kitleri kullanılarak GRP78, ATF4 ve CHOP seviyeleri ölçüldü (sırasıyla SEC343Hu, SEB385Hu ve LS-F8872). Analizler, üretici talimatları doğrultusunda kit içerisindeki reaktifleri uygun konsantrasyonlarda ve belirlenen inkübasyon aşamasına göre kullanılmasıyla önerilen dalga boylarında mikropilaya okuyucu yardımıyla absorbans değerlerinin ölçülmesiyle gerçekleştirildi.

2.4. Apoptotik Profilin Değerlendirilmesi

Hücrelerdeki sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 konsantrasyonları, ilgili proteinler için önceden kaplanmış spesifik antikorlara sahip ticari olarak temin edilebilen kitler kullanılarak değerlendirildi (sırasıyla SEA594Mi, SEA626Hu ve SEA682Hu). Kısaca, 24 saatlik borik asit maruziyetinden sonra hücreler, 1500xg'de 10 dakika boyunca santrifüjleme yoluyla toplandı. Daha sonra, sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 antijen-antikor reaksiyonları üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Reaksiyonlar sonucu oluşan renk değişiklikleri 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlendi. Optik yoğunluk değerlerini standart eğri ile ilişkilendirerek hücre lizatlarındaki sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 konsantrasyonları mililitre başına nanogram (ng/ml) cinsinden ifade edildi.

2.5. Oksidan Durum Ölçümleri

TOS ve TAS ölçümleri üretici firma (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak yapıldı. TAS ölçüm süreci 660 nm'de gerçekleştirildi ve sonuçlar mmol Trolox Equiv./L cinsinden rapor edildi. Ek olarak, TOS seviyeleri 530 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bulgular μ mol H₂O₂ Eşdeğeri/L cinsinden rapor edildi. Oksidatif stres indeksi (OSI) = (TOS (μ mol H₂O₂ Eq/L)/TAS (μ mol Trolox Equiv./L) x100 formülü kullanılarak hesaplandı.

2.6. İstatistiksel Analiz

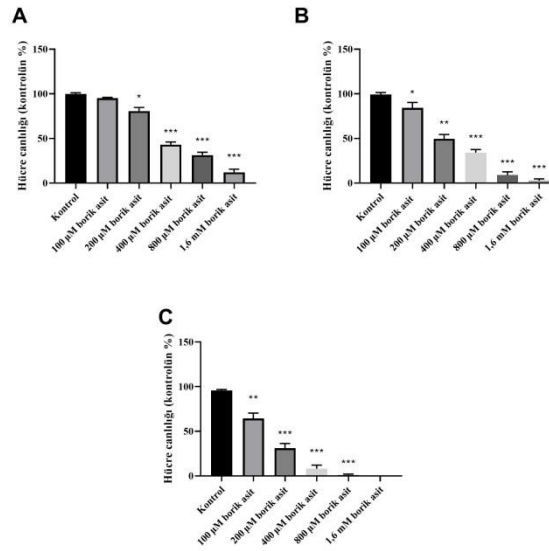
Tüm istatistiksel analizler Graphpad 8 kullanılarak yapıldı. Tüm veriler ortalama±SD olarak ifade edildi. İki den fazla grup arasındaki karşılaştırma, tek yönlü ANOVA ve posthoc Tukey testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,01$ (*), $p < 0,001$ (**) ve $p < 0,0001$ (***) olarak kabul edildi.

3. Bulgular

3.1. Borik Asidin U251 Hücrelerin Proliferasyon Üzerine Etkileri

MTT analizi, 0 ila 1600 μM konsantrasyonlardaki borik aside 24, 48 ve 72 saat boyunca maruz kalan U251 hücrelerindeki canlılığı doğrulamak için gerçekleştirildi. Şekil 1A'da sunulan sonuçlar,

borik asidin 24 saat süreyle maruziyeti U251 hücre hatlarında konsantrasyona bağlı sitotoksiteyi indüklediğini gösterir. Dahası U251 hücrelerine 0, 100 μM , 200 μM , 400 μM , 800 μM ve 1600 μM olmak üzere beş farklı konsantrasyon aralığında borik asit 48 ve 72 saat uygulandı. Benzer şekilde, artan borik asit konsantrasyonları konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak hücre canlılığını düşürdüğünü bulduk (Şekil 1B ve 1C). 24, 48 ve 72 saat sonunda MTT analizi kullanılarak kanser hücrelerinin %50'sinin ölmesi nedeniyle yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC50) sırasıyla 312,7 μM , 208,6 μM ve 115,2 μM olarak belirlendi. MTT analiz sonuçlarına göre de, diğer biyokimyasal analizler sırasında kullanılmak üzere IC25 144,7 μM ve ara konsantrasyonda 200 μM olarak belirlendi.

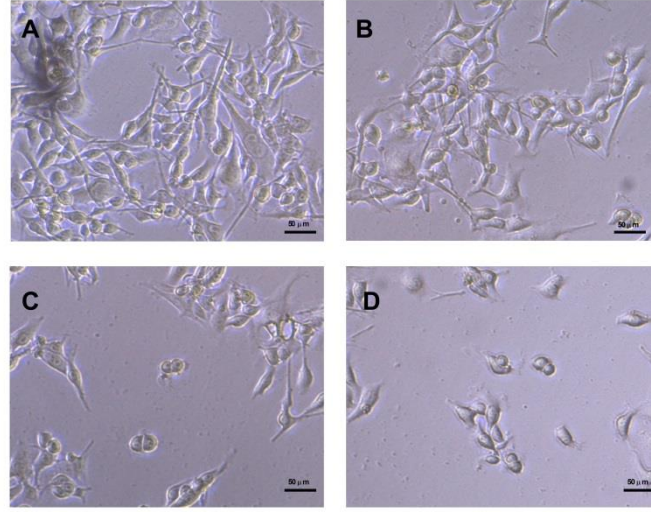


Şekil 1. MTT analizi kullanılarak hücre sağ kalımının değerlendirilmesi. (A) U251 hücrelerinin 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı, (B) U251 hücrelerinin 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı, (C) U251 hücrelerinin 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit ile tedaviden sonra hayatta kalma oranı. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ ve *** $p < 0,0001$.

3.2. Borik asidin U251 Hücrelerindeki Morfolojik Etkileri

Inverted mikroskobu görüntülerine göre (Şekil 2A-D), borik asidin, U251 hücrelerinin

sayısını konsantrasyona bağlı olarak azalttığı görülmektedir. Ek olarak, özellikle 200 μM ve 312,7 μM borik asit konsantrasyonlarında hücre büzülmesi ve hücresel yuvarlanma da dahil olmak üzere hücresel dejenerasyonlardaki artış da dikkat çekicidir.

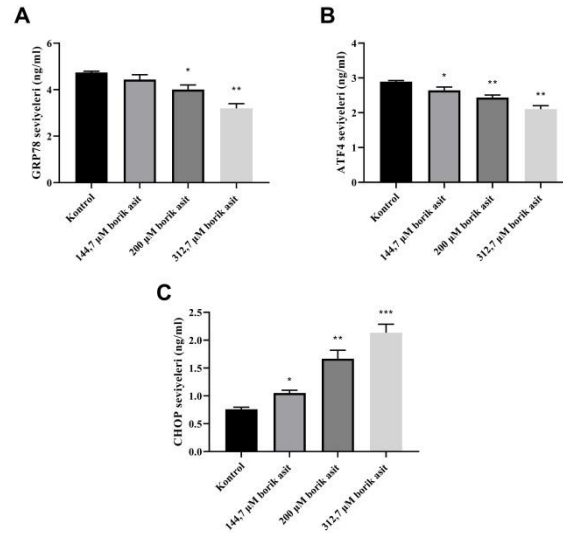


Şekil 2. Borik asit uygulanan U251 GBM hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri. (A) Borik asit uygulanmayan U251 hücreleri. (B) 144,7 µM borik asit uygulanan hücreler. (C) 200 µM borik asit uygulanan hücreler. (D) 312,7 µM borik asit uygulanan hücreler. A-D'deki görüntüler 20X objektifle görüntülenmiştir.

3.3. Borik Asit U251 Hücrelerinde ER Stresini İndükler

Borik asidin GBM hücrelerinde ER stresini nasıl etkilediğini incelemek için, ELISA yöntemiyle GRP78, ATF4 ve CHOP konsantrasyonlarını değerlendirdik. Şekil 3A

ve 3B'de gösterildiği gibi borik asit, özellikle U251 hücrelerinde GRP78 ve ATF4 seviyelerinde konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden oldu (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,0001$). Öte yandan, Şekil 3C'de görüldüğü gibi, U251 hücrelerinde CHOP seviyeleri, borik asit konsantrasyonu arttıkça azaldı (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$).

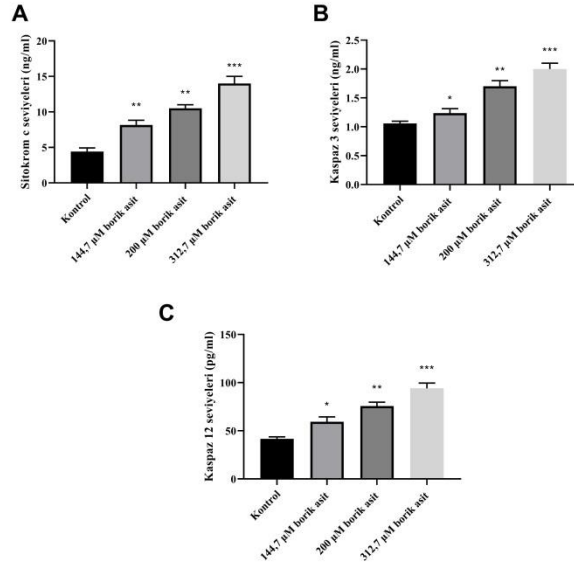


Şekil 3. Borik asidin U251 hücrelerindeki ER stres biyobelirteçleri üzerine etkisi. (A) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki GRP78 seviyeleri, (B) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki ATF4 seviyeleri, (C) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki CHOP seviyeleri, * $p<0,01$, ** $p<0,001$ ve *** $p<0,0001$.

3.3. Borik Asidin U251 Hücrelerinde Apoptoz İndükleyici Etkileri

Borik asidin U251 hücrelerindeki programlanmış hücre ölümü üzerindeki etkisini değerlendirmek için ELISA analizleri yapıldı. Sonuçlar, borik asidin

U251 hücrelerinde konsantrasyon bağımlı şekilde apoptozu tetiklediğini ortaya çıkardı (Şekil 4). 144,7 μ M, 200 μ M ve 312,7 μ M konsantrasyonlarında borik önemli ölçüde sitokrom c seviyelerinde artışa neden oldu (Şekil 4A; sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$).

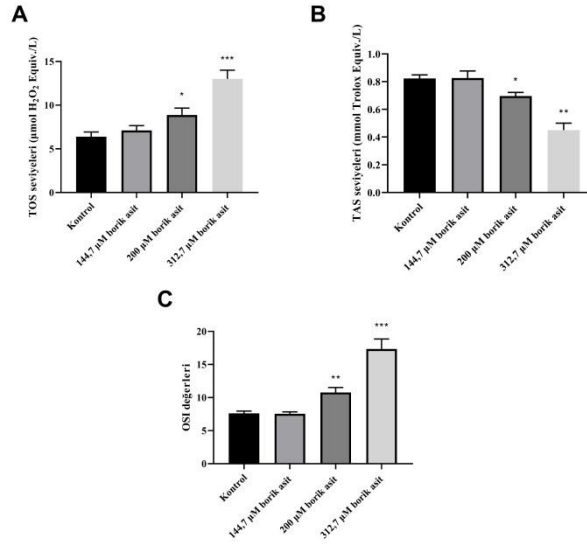


Şekil 4. Borik asidin U251 hücrelerindeki apoptoz üzerine etkisi. (A) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki sitokrom c seviyeleri, (B) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki kaspaz 3 seviyeleri, (C) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki kaspaz 12 seviyeleri, * $p<0,01$, ** $p<0,001$ ve *** $p<0,0001$.

Kaspaz 3 ve kaspaz 12 seviyeleri, 24 saat boyunca 144,7 μ M, 200 μ M ve 312,7 μ M borik asit ile tedavi edilen hücrelerde, tedavi edilmeyen U251 hücrelerine göre belirgin şekilde daha yüksekti (Şekil 4B ve 4C; sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,0001$). Bununla birlikte, sitokrom c'ye benzer şekilde, Uygulanan borik asit konsantrasyonları U251 hücrelerinde kaspaz 3 ve kaspaz 12 düzeylerinde artışa neden oldu.

3.5. Borik Asit U251 Hücrelerin Oksidan Dengeyi Bozar

Borik asidin antikanser etkilerine oksidatif stres modülasyonunun potansiyel katılımını araştırmak için TOS ve TAS seviyeleri spektrofotometrik olarak değerlendirildi. U251 hücrelerine 144,7 μ M, 200 μ M ve 312,7 μ M konsantrasyonlarda borik asit uygulandığında TOS seviyeleri artarken (Şekil 5A; sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$), TAS seviyeleri önemli ölçüde azaldı (Şekil 5B; sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,0001$). Buna göre U251 hücrelerinin OSI'si belirtilen konsantrasyonlarda önemli ölçüde yükseldi (Şekil 5C; sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$).



Şekil 5. Borik asidin U251 hücrelerindeki oksidatif stres üzerine etkisi. (A) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki TOS seviyeleri, (B) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki TAS seviyeleri, (C) Borik asit maruziyeti sonrası U251 hücrelerindeki OSI seviyeleri, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ ve *** $p < 0,0001$.

4. Tartışma ve Sonuç

Bir tür beyin tümörü olan GBM'nin oldukça invaziv ve agresif olduğu biliniyor. Ek olarak, GBM'ye yönelik mevcut tedaviler sıklıkla tümörün nüksetmesini önlemede başarısız olmaktadır (16). Bugüne kadar birçok çalışma, çeşitli potansiyel terapötik ajanların GBM hücrelerindeki hücre döngüsü, ekstraselüler matris ve apoptoz gibi sinyal yolları üzerindeki antikanser etkilerini araştırmıştır (17, 18). Ayrıca önceki çalışmamızda borik asidin, SEMA3F/NRP2 ve ferroptoz sinyal yolları yoluyla reaktif oksijen türleri (ROS) ve kaspaz aktivasyonuna neden olarak GBM hücrelerinde hücre canlılığını baskıladığını gösterdik (19). Bu çalışma borik asidin GBM hücrelerindeki ER stresi nasıl etkilediğini belirlemeyi amaçladık. Bor bazlı bileşikler, antikarsinojenik özelliklerinden dolayı kanser tedavileri üzerine yapılan araştırmalarda incelenmektedir. Birçok çalışma, yüksek bor içeren ortamların prostat, meme, rahim ağzı ve akciğer kanserleri gibi bazı kanserlerin riskini azaltabileceğini göstermiştir (20). Son birkaç yılda yapılan araştırmalar, bor bileşiklerinin antikanser ajan olarak özellikle ameliyat dışı kanserlerde ve yüksek maligniteli kanserlerde yaygın olarak kullanıldığını göstermiştir (21, 22). Bu çalışma, GBM hücrelerinde borik asidin ER

stresi üzerinden potansiyel anti-kanser özelliklerini vurgulayan ilk kanıtları sunmaktadır. Borik asidin GBM hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde baskıladığını ve kaspaz bağımlı mekanizmalar yoluyla apoptozu tetiklediğini, etkilerinin doza bağlı olduğunu ortaya koyuyoruz. Bulgularımıza dayanarak, bu anti-kanser etkilerinin muhtemelen kanser hücrelerinde oksidatif stresin indüklenmesine ve ER stresini indüklemesine atfedilebileceğini öneriyoruz.

Kanser tedavisinin temel amaçlarından biri hücrelerin hızlı ve kontrolsüz çoğalmasını engellemektir. Hücre çoğalmasıyla ilgili sinyallerin engellenmesinin yanı sıra, apoptozun indüklenmesi bu hedefe ulaşmada çok önemli bir rol oynar (23). Prostat kanserinde bor, hücre bölünmesinde yer alan siklin proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak terapötik potansiyel göstermiştir(21). Önceki çalışmamızda bir bor bileşiği olan boraksın, GBM hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda kaspaz 3'e bağlı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (22). Ek olarak, yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduğunda kalsiyum sinyalini bozma yeteneği sayesinde borik asidin prostat kanseri hücre büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini gösteren kanıtlar vardır (24). Scorei ve arkadaşlarının

bulgularına göre borik aside maruz kalma, meme kanseri hücre çoğalmasının baskılanmasına yol açtı. Ancak p53 ve bcl-2 protein seviyelerinde, sitozolik sitokrom c seviyelerinde veya kaspaz 3 aktivitesinde bir artışa yol açmadı (25). Kahraman ve Göker tarafından yapılan çalışmada ise borik asidin hepatoselüler karsinom hücrelerinde apoptoz ve otofajiyi artırdığı, hücre canlılığını inhibe ettiği ve migrasyonu azalttığı gözlenmiştir (26). Benzer şekilde, borik asidin yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre çoğalmasını, istilasını, göçünü ve koloni oluşumunu engellerken aynı zamanda apoptozu teşvik ettiği ve oksidatif stresi indüklediği gösterilmiştir (27). Önceki araştırmalara paralel olarak, çalışmamız borik asidin U251 hücrelerindeki hücre sağ kalımında önemli bir azalmaya yol açtığını ve gözlenen bu etkinin, 312,7 µM'lık bir IC50 değeriyle uygulanan doza bağlı olduğunu gösterdi. Ek olarak bulgularımız borik asidin apoptotik yolu teşvik ederek U251 hücrelerinde sitokrom c, kaspaz 3 ve kaspaz 12 seviyelerini yükselttiğini gösterdi.

Çalışmalar, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında kanserli hastalarda oksidatif stresin arttığını göstermiştir (28). Ayrıca oksidatif stres, hücre proliferasyonu ile ilgili sinyal yollarını aktive ettiğinden malign transformasyon için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (29). ROS tümör büyümesini teşvik etse de aşırı yüksek ROS seviyeleri bu hücreler için sitotoksik hale gelir. Kanser hücreleri, antioksidan sistemle ilişkili enzimleri kodlayan genleri aktive ederek antioksidan kapasitelerini artırır, bu da onların apoptoz geçirmeden büyümelerini teşvik eden bir seviyede ROS'u korumalarını sağlar. Bu nedenle, ROS oluşumunu arttırmak ve antioksidan savunmayı azaltmak, yani oksidatif stresi indüklemek, kanser hücrelerinde apoptozu teşvik etmede faydalı bir yaklaşımı temsil etmektedir (30). Burada, borik asidin U251 hücrelerinde TOS yükselterek, aynı zamanda TAS azaltarak doza bağlı bir şekilde oksidatif stresi indüklediğini gösterdik. Bulgularımız, önceki çalışmamızdaki borik asidin antioksidan süperoksit dismutaz ve katalaz düzeylerini azaltarak oksidatif stresi indüklediğini gösteren sonuçları da desteklemektedir (31).

ER stres tepkisi, stresli hücrelerin kendini koruma mekanizmasıdır. ER stres uyarıldığında, tümör hücreleri, ER homeostazisini yeniden sağlayabilen ve hücre apoptozunu indükleyebilen kapsamlı bir sinyal sistemi olan katlanmamış protein yanıtının adaptif mekanizmasını aktive eder (32). Apoptoz, iç ve dış ortamın uyarılması altında programlanmış hücre ölümü sürecidir. Aynı zamanda anti-tümör ilaçların neden olduğu hücre ölümünün de önemli bir nedenidir (33). Apoptozun tümörlerin oluşumunda ve gelişiminde olumsuz düzenleyici rolü vardır. Tümörlerin oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olduğu bilinen apoptoz genleri temel olarak Bcl-2 ailesi, kaspaz ailesi ve p53 genini içermektedir. Bcl-2'nin inhibisyonu, tümör hücrelerinin apoptozunu teşvik edebilirken, Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu bunu engelleyebilir (34). Dış uyarı çok güçlü olduğunda ER'nin, PERK, inositol gerektiren enzim 1 ve ATF6 yolaklarının aktivasyonu yoluyla hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (35). ATF6, ER stresine yanıt olarak Golgi gövdesine aktarılan bir transkripsiyon faktörüdür; burada bölge-1 proteazlar (S1P) ve S2P tarafından bölünür, hedef gen GRP78'i aktive eder ve daha sonra dolaylı olarak CHOP aracılığıyla hücre apoptozunu modüle eder (36). CHOP'un hücre döngüsünün durmasına neden olarak ve hücre ölümünü tetikleyerek hücre hasara yol açabilen önemli bir pro-apoptotik molekül olduğu iyi bilinmektedir. CHOP, hücre apoptozu sırasında PERK-ATF4-CHOP sinyal yolunda rol oynar (37). Penaranda-Fajardo ve meslektaşları, GBM örneklerindeki yüksek ATF4 seviyelerinin, daha önce tedavi görmemiş hastalarda kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmışlardır (38). Bir başka çalışmada, GRP78'in aşırı ekspresyonu, agresif fenotiplerin malign gliomalarında görülmüştür; ER stresi ayrıca terapötik tedaviler sonrasında glioma hücrelerini apoptoza yatkın hale getirdiği de bildirilmiştir (39). Dahası, gefitinib maruziyetinin GBM hücrelerindeki apoptozu arttırmasına paralel olarak CHOP protein ekspresyonlarını ve ROS seviyelerini arttırarak ROS/ER stres eksenine tutarlı sonuçlar ortaya konmuştur. Verilen sonuçlarla tutarlı şekilde bu çalışmamızda, borik asit maruziyetinin U251 hücrelerinde GRP78 ve ATF4 seviyelerini

düşürdüğü ve CHOP seviyelerini arttırdığını bulduk. Bunun yanı sıra, borik asit maruziyeti sonrasında artan ER stresine artan apoptoz ve oksidatif stresinde eşlik ettiğini belirledik.

Sonuç olarak, mevcut araştırmada, borik asidin muhtemelen ER stresi yoluyla oksidatif stresi ve apoptozu indükleyerek U251 GBM hücre proliferasyonunu inhibe etmek için hareket ettiğini rapor ediyoruz. Bulgularımız

borik asidin GBM hücreleri için terapötik bir ajan olarak potansiyelini desteklemektedir. Bu çalışmanın sınırlamalarından biri, verilerin daha ileri moleküler analizlerle desteklenememiş ve *in vivo* araştırmaların yapılamamış olmasıdır. Ek olarak, gelecekteki çalışmalarda borik asidin geleneksel kemoterapiye bir adjuvan olarak hizmet edip etmediğini araştırmak ilgi çekici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fisher JL, Langer CE, Pekmezci M, Schwartzbaum JA, Turner MC, Walsh KM, Wrensch MR, Barnholtz-Sloan JS. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review. *Neuro Oncol.* 2014;16(7):896-913.
2. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, Cairncross JG; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist.* 2006;11(2):165-80.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro Oncol.* 2016;18(suppl5):1-75.
4. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2017 Jul 20;35(21):2402-2409.
5. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, Zhang G, Wang X, Dong Z, Chen F, Cui H. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):8.
6. Aoyama-Ishiwatari S, Hirabayashi Y. Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact Sites-Emerging Intracellular Signaling Hubs. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:653828.
7. Gonzalez-Gronow M, Gopal U, Austin RC, Pizzo SV. Glucose-regulated protein (GRP78) is an important cell surface receptor for viral invasion, cancers, and neurological disorders. *IUBMB Life.* 2021;73(6):843-854.
8. Ibrahim IM, Abdelmalek DH, Elfiky AA. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 2019;226:156-163.
9. Oakes SA. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2020;190(5):934-946.
10. Zhang D, Wang F, Pang Y, Ke XX, Zhu S, Zhao E, Zhang K, Chen L, Cui H. Down-regulation of CHERP inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis through ER stress induction. *Oncotarget.* 2017;8(46):80956-80970.
11. Schönthal AH. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012:857516.
12. Dey S, Baird TD, Zhou D, Palam LR, Spandau DF, Wek RC. Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response. *J Biol Chem.* 2010;285(43):33165-33174.
13. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med.* 2016;16(6):533-44.
14. Kulkarni S, Bhandary D, Singh Y, Monga V, Thareja S. Boron in cancer therapeutics: An overview. *Pharmacol Ther.* 2023;251:108548.
15. Hacıoglu C, Tuncer C. Boric acid Increases Susceptibility to Chemotherapy by Targeting the Ferritinophagy Signaling Pathway in TMZ Resistant Glioblastoma Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2023.
16. Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee ShU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(1):3-9.
17. Chou YC, Chang MY, Wang MJ, Liu HC, Chang SJ, Harnod T, Hung CH, Lee HT, Shen CC, Chung JG. Phenethyl isothiocyanate alters the gene expression

- and the levels of protein associated with cell cycle regulation in human glioblastoma GBM 8401 cells. *Environ Toxicol.* 2017;32(1):176-187.
18. Chen YY, Chang YM, Wang KY, Chen PN, Hseu YC, Chen KM, Yeh KT, Chen CJ, Hsu LS. Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. *Environ Toxicol.* 2019;34(3):233-239.
 19. Kar F, Hacıoğlu C, Kaçar S. The dual role of boron in vitro neurotoxication of glioblastoma cells via SEMA3F/NRP2 and ferroptosis signaling pathways. *Environ Toxicol.* 2023;38(1):70-77.
 20. Pizzorno L. Nothing Boring About Boron. *Integr Med (Encinitas).* 2015;14(4):35-48.
 21. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* 2004;216(1):21-9.
 22. 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):1690-1701.
 23. Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther.* 2003 Jun;2(6):573-80.
 24. Barranco WT, Kim DH, Stella SL Jr, Eckhert CD. Boric acid inhibits stored Ca²⁺ release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell Biol Toxicol.* 2009;25(4):309-20.
 25. Scorei R, Ciubar R, Ciofrangeanu CM, Mitran V, Cimpean A, Iordachescu D. Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biol Trace Elem Res.* 2008 ;122(3):197-205.
 26. Kahraman E, Göker E. Boric acid exert anti-cancer effect in poorly differentiated hepatocellular carcinoma cells via inhibition of AKT signaling pathway. *J Trace Elem Med Biol.* 2022;73:127043.
 27. 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;796-797:145799.
 28. Heidari F, Rabizadeh S, Mansournia MA, Mirmiranpoor H, Salehi SS, Akhavan S, Esteghamati A, Nakhjavani M. Inflammatory, oxidative stress and anti-oxidative markers in patients with endometrial carcinoma and diabetes. *Cytokine.* 2019;120:186-190.
 29. Liu Q, Yu M, Zhang T. Construction of Oxidative Stress-Related Genes Risk Model Predicts the Prognosis of Uterine Corpus Endometrial Cancer Patients. *Cancers (Basel).* 2022;14(22):5572.
 30. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell.* 2020;38(2):167-197.
 31. 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):400-409.
 32. Markouli M, Strepkos D, Papavassiliou AG, Piperi C. Targeting of endoplasmic reticulum (ER) stress in gliomas. *Pharmacol Res.* 2020;157:104823.
 33. Li Y, Ma H, Lu Y, Tan BJ, Xu L, Lawal TO, Mahady GB, Liu D. Menoprogen, a TCM Herbal Formula for Menopause, Increases Endogenous E2 in an Aged Rat Model of Menopause by Reducing Ovarian Granulosa Cell Apoptosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2574637.
 34. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:150845.
 35. Peñaranda Fajardo NM, Meijer C, Kruyt FA. The endoplasmic reticulum stress/unfolded protein response in gliomagenesis, tumor progression and as a therapeutic target in glioblastoma. *Biochem Pharmacol.* 2016;118:1-8.
 36. Song S, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress. *J Cell Physiol.* 2017;232(11):2977-2984.
 37. Vellanki RN, Zhang L, Volchuk A. OASIS/CREB3L1 is induced by endoplasmic reticulum stress in human glioma cell lines and contributes to the unfolded protein response, extracellular matrix production and cell migration. *PLoS One.* 2013;8(1):e54060.
 38. Peñaranda-Fajardo NM, Meijer C, Liang Y, Dijkstra BM, Aguirre-Gamboa R, den Dunnen WFA, Kruyt FAE. ER stress and UPR activation in glioblastoma: identification of a noncanonical PERK mechanism regulating GBM stem cells through SOX2 modulation. *Cell Death Dis.* 2019;10(10):690.
 39. Zhang Y, Pusch S, Innes J, Sidlauskas K, Ellis M, Lau J, El-Hassan T, Aley N, Launchbury F, Richard-Loendt A, deBoer J, Chen S, Wang L, von Deimling A, Li N, Brandner S. Mutant IDH Sensitizes Gliomas to Endoplasmic Reticulum Stress and Triggers Apoptosis via miR-183-Mediated Inhibition of Semaphorin 3E. *Cancer Res.* 2019;79(19):4994-5007.

Etik bilgiler

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma için *in vitro* hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul iznine ihtiyaç yoktur. Çalışmada kullanılan hücre hatları ilgili firmadan satın alınmıştır.

Telif Hakkı Devir Formu: Tüm yazarlar tarafından Telif Hakkı Devir Formu imzalanmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Hakem değerlendirmesinden geçmiştir.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı: Yapılan çalışmada, araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Yazar Katkı Oranları: Fikir/kavram: CH, Tasarım: CH, Veri Toplama: CH, Veri İşleme: CH, Analiz/Yorum: CH, Literatür taraması: CH, Yazma: CH, Nihai Sonuç: CH

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Destek Beyanı: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.