



Araştırma Makalesi

Borik Asidin Fibroblast Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Sitotoksiste Etkinliğinin *in vitro* Olarak Değerlendirilmesi

Dilek DÜZGÜN ERGÜN*¹, Ahu SOYOCAK²

¹*İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı 34295, İstanbul, Türkiye*

²*İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı 34295, İstanbul, Türkiye*

*yazışılan yazar e-posta: dilekergun@aydin.edu.tr

(Alınış: 14.04.2021, Kabul: 08.07.2021, Yayımlanma: 25.11.2021)

Öz: Son yıllarda yapılan çalışmalar bor bileşiklerinin biyolojik önemi ve insan sağlığı üzerine olası yararlı etkilerini vurgulamaktadır. Bunun yanında yüksek miktarda bor maruziyetinin olumsuz etkileri olabileceği bildirilmektedir. Borun tümör hücrelerinde anti-kanser ve anti-proliferatif etkiler gösterebileceği ile ilgili bilgiler bulunmakta, ancak bu etkilerin normal hücreleri nasıl etkileyebileceği henüz tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda borik asidin (BA) hücre canlılığı/sitotoksiste üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, L929 fare fibroblast hücreleri farklı konsantrasyonlarda BA ile 48 saat muamele edilmiştir. 2H-Tetrazolium,2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-,bromide (MTT) yöntemi ile mitokondriyal aktivite belirlenmiş, nötral kırmızısı alımı (NR) yöntemi ile lizozomal aktivite değerlendirilmiştir. MTT testi ile 3,125-100 mM BA gruplarında ($p<0,05$; $p<0,001$); NR testi ile 25-100 mM BA gruplarında ($p<0,01$; $p<0,001$) hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir. Borik asidin *in vitro* koşullarda konsantrasyona bağlı olarak mitokondriyal ve lizozomal aktiviteyi etkileyerek hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Borik asidin etkin tedavi dozunun belirlenmesi için *in vivo* çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Borik asit, Fibroblast, Hücre canlılığı, L929, Sitotoksiste

***In vitro* Evaluation of Cell Viability/Cytotoxicity Efficiency of Boric Acid in Fibroblast Cells**

Abstract: Recent studies highlight the biological importance of boron compounds and their potential beneficial effects on human health. In addition, it is reported that high amounts of boron exposure may have adverse effects. There is information that boron may exert anti-cancer and anti-proliferative effects on tumor cells, but it is not yet known how these effects can affect normal cells. In our study, we aimed to evaluate the effect of boric acid (BA) on cell viability/cytotoxicity. For this purpose, L929 mouse fibroblast cells were treated with different concentrations of BA for 48 hours. Mitochondrial activity was determined by the 2H-Tetrazolium,2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-,bromide (MTT) method, and lysosomal activity was evaluated with the neutral red uptake (NR) method. A significant decrease was detected in 3.125-100 mM BA groups ($p<0.05$; $p<0.001$) with the MTT test and 25 mM-100 mM BA groups ($p<0.01$; $p<0.001$) with the NK test. Boric acid has been found to reduce cell viability by affecting mitochondrial and lysosomal activity, depending on the concentration *in vitro*. It has been thought that *in vivo* studies are needed to determine the effective treatment dose of boric acid.

1. Giriş

Bor, diyet ve içme suları ile alınan esansiyel bir eser elementtir. Diyet ile alınan bor, vücutta borik aside (H_3BO_3) dönüşür ve normal metabolik aktivitelerde önemli rol oynar [1–3]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bor bileşiklerinin biyolojik önemi ve insan sağlığı üzerinde olası yararlı etkilerinden söz edilmektedir. Borun kemik gelişiminde, yara iyileşmesinde, enerji metabolizmasında ve immün sistemde önemli rolü olduğu ve oksidatif hasara karşı koruyucu bir ajan olarak antioksidan savunmada kullanılabileceği rapor edilmektedir [4–8]. Yapılan çalışmalarda borun prostat kanseri, meme kanseri ve akciğer kanseri gibi pek çok kanser riskinin azaltılmasına katkı sağlayabileceği bildirilmiştir [8–12]. Yüksek miktarda absorbe edildiğinde borun toksisiteye neden olabileceği, diyet dışında bor içeren ilaçları fazla tüketmenin ya da mesleki nedenle yüksek miktarda bora maruz kalmanın gastrointestinal rahatsızlıklar, deri ve mukozanın dökülmesi, sperm sayısı ve motilitesinde azalma gibi olumsuz etkilere neden olabileceği rapor edilmektedir [1, 6]. Eksojen kaynaklı borun tümör hücrelerine olası etki mekanizması ile ilgili bilgiler literatürde yer almakta, ancak bu durumun normal hücreleri nasıl etkilediği henüz tam olarak bilinmemektedir. Doz, kimyasal form ve zamana bağlı olarak borun anti-kanser ve anti-proliferatif etkilerinin olabileceği, bu nedenle kanserde alternatif bir terapötik ajan olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. Ancak borik asidin moleküler etki mekanizması netlik kazanmamıştır [7, 8]. Çalışmamızda borik asidin farklı konsantrasyonlarının fare fibroblast hücre dizisinde hücre canlılığı/sitotoksosite üzerine etkisinin mitokondriyal aktivite ve lizozomal aktivite üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Hücre kültürü

Deneylerde %89 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), %9 ısı ile inaktive edilmiş fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu ile hazırlanan besiyeri kullanılmıştır. L929 fibroblast hücreleri (The American Type Culture Collection (ATCC)) kontrol ve borik asit deney gruplarını oluşturmak üzere, 96 kuyucuklu plakalara 7×10^3 adet hücre/kuyucuk şeklinde ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra kontrol ve BA grupları normal besiyeri ve farklı konsantrasyonlarda (1,56 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 mM) BA içeren besiyeri ile değiştirildi. Daha sonra 48 saat karbondioksit inkübatöründe (37°C, %5 CO₂) inkübe edildi. Deney süresi sonunda MTT ve NR testleri gerçekleştirilerek hücre canlılığı/sitotoksosite belirlendi. Deneylerde kullanılan DMEM, FBS ve penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu (Wisent-Canada) ile MTT, NR, borik asit, dimetil sülfoksit (DMSO), etanol ($\geq 99,7$) ve glasiyal asetik asit (Sigma-Aldrich, Germany) ticari olarak temin edildi.

2.2. Hücre canlılığı/sitotoksosite analizi

2.2.1. MTT-2H-Tetrazolium,2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-,bromide testi

MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrogenaz enzimi bu tuzun tetrazolyum halkasını parçalayarak suda çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. Hücre çoğalması arttıkça formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri de artmaktadır. Bu yöntemle mitokondriyal aktivite üzerinden hücre canlılığı/sitotoksitesini belirlenir. Çalışmamızda borik asitle muamele edilen hücrelerin mitokondriyal

aktiviteleri bu yöntemle değerlendirilmiştir. Borik asit ile inkübe edilmek üzere hücreler 96 kuyucuklu plakalara ekildi. Deney süresi sonunda kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklara 100 µL taze besiyeri ile 10 µL (5 mg/mL) MTT solüsyonu eklendi ve 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her kuyucuğa 100 µL DMSO ilave eklendikten sonra absorbans değerleri 570 nm’de ELISA mikropilaka okuyucuda (Multiskan GO-Thermo) ölçüldü [1]. Optik dansite (OD) değerleri kullanılarak GraphPad Prism 8 programı ile borik asit için inhibitör konsantrasyon IC₅₀ değeri hesaplandı.

2.2.2. Nötral kırmızısı (NR) alımı testi

Nötral kırmızısı alım testi, zayıf katyonik bir boyanın difüzyonla hücre membranından geçerek lizozomlarda birikmesi temeline dayanmaktadır. Yaşayan-sağlıklı ya da hasarlı-ölü hücrelerin boyayı almalarındaki farklılığa göre hücre canlılığı/sitotoksitesi belirlenir. Deney süresi sonunda 96 plakaların her kuyucuğundaki besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklara %0,33 NR standart çözeltisi içeren 100 µL besiyeri eklendi ve hücreler 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda NR çözeltisi içeren besiyeri atıldı ve kuyucuklara 25 mL etanol, 0,5 mL glasiyal asetik asit ve 24,5 mL distile su içeren fiksasyon çözeltisinden 100 µL eklendi. Oluşan renk değişimi ELISA mikropilaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbans ölçümü ile değerlendirildi [13].

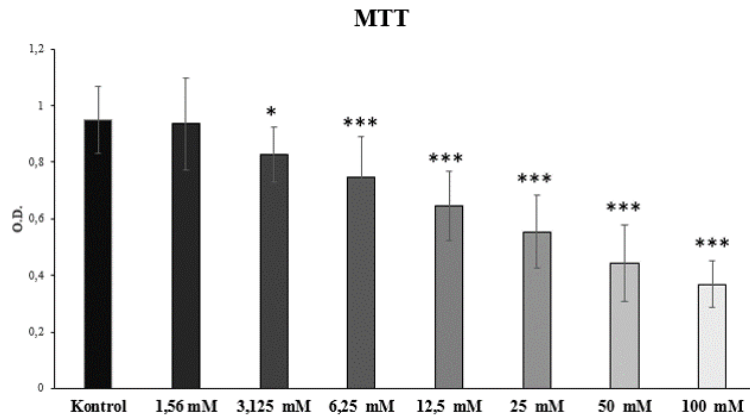
2.3. İstatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen veriler IBM SPSS 21.0 paket programında analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ile varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren gruplar arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (*Ort±Ss*) olarak verildi ve istatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi.

3. Bulgular

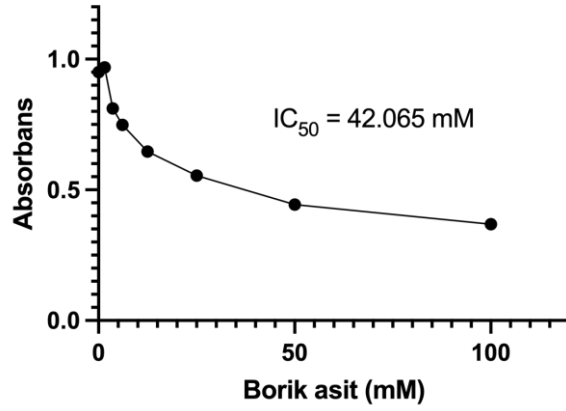
3.1. MTT sonuçları

Borik asit konsantrasyonu 1,56 mM olan grubun hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla değişmezken; 3,125 - 100 mM doz aralığında olan BA gruplarının canlılığında azalma olduğu tespit edildi (p<0,05; p<0,001) (Şekil 1).



Şekil 1. Farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulanan L929 fibroblast hücrelerinde MTT sonuçları

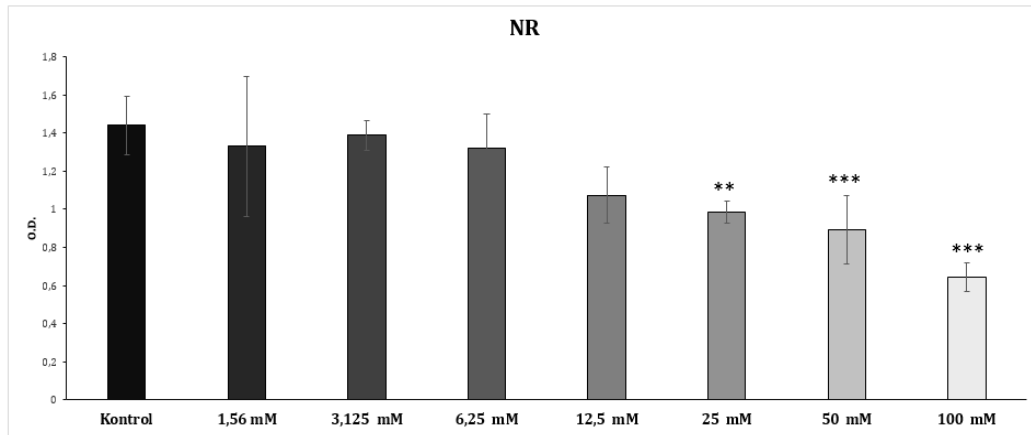
Farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulanan fibroblast hücrelerinde inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değeri MTT sonuçlarına göre elde edilen OD değerler kullanılarak hesaplandı ve 42.065 mM olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. Borik asit için inhibitör konsantrasyon IC₅₀ değeri

3.2. NR sonuçları

Kontrol grubuna göre 1,56 ve 12,5 mM doz aralığında olan BA gruplarında NR değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmezken; 25, 50 ve 100 mM BA gruplarında azalma olduğu tespit edildi (p<0,01; p<0,001; p<0,001) (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulanan L929 fibroblast hücrelerinde NR sonuçları
O.D.: Optik Dansite (Ort ± Ss). **p<0,01; ***p<0,001

4. Sonuç ve Yorum

Canlılar için esansiyel bir eser element olan borun kimyasal form, doz ve maruziyet süresine bağlı olarak, antioksidan savunma mekanizmasını desteklediği, genotoksitesite ve lipid peroksidasyona karşı potansiyel koruyucu etkileri olduğu, oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir [14–16]. Yapılan çalışmalarda borun antioksidan savunmadaki rolünün yanı sıra, farklı kimyasal form ve dozlarda çeşitli kanser hücreleri için sitotoksik etki ile anti-proliferatif ve anti-kanserojen olduğu belirlenmiş, kanser gelişim riskini azaltabileceği için kanserden korunma amacı ile kullanılabileceği önerilmiştir [17–21]. Hacıoglu ve ark. (2020), DU-145 insan prostat kanseri hücrelerinde borik

asidin, konsantrasyona (0-12,5 mM) bağlı olarak oksidatif stres, hücre büyümesi inhibisyonu, apoptoz ve morfolojik değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Antioksidan özelliği bilinen borik asidin belirli dozlarda oksidan olarak davrandığını ve hücre çoğalmasını önleyebileceğini bildirmişlerdir [22]. Celik ve ark. (2020), U-87MG hücrelerinde 2454 µM ve üzerindeki konsantrasyonlarda boraks pentahidratın sitotoksik özellik gösterdiğini ve beyin tümörü tedavisinde kullanılabilir alternatif bir ajan olabileceğini rapor etmişlerdir [23]. Cigel ve ark. (2020), insan kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2) borik asidin doza bağlı olarak kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini gözlemişlerdir [24]. Tombuloglu ve ark. (2020), insan akciğer hepatoma hücre dizisinde (HepG2) doza bağlı olarak borik asidin hücre büyümesini inhibe ettiğini, 24 mM dozun ise HePG2 hücreleri için IC₅₀ değeri olduğunu belirlemişlerdir [1]. Bağka bir çalışmada melanoma hücrelerinde borik asidin 12,5-50 mM dozlarında hücre replikasyonunu yavaşlattığı ve apoptozu indüklediğini bildirilmiştir [25]. Yapılan bu çalışmalarda bor bileşiklerinin etkinliğinin kanser hücrelerinde geniş bir konsantrasyon aralığında araştırıldığı gözlemlenmiştir. Kanser hücrelerinde sitotoksik etki gösterebileceğini rapor edilen borun normal hücrelerde etkinliğini değerlendiren araştırmalar da mevcuttur. Uğur ve ark. (2019), L929 fibroblast hücrelerinde yaptıkları çalışmada, çinko boratın antioksidan aktivite gösterdiğini, antimutajenik özellikleri ile tıbbi amaçlı kullanım potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir [26]. Arslan ve ark. (2016), insan primer alveol epitel hücrelerinde (HPAEpiC) borik asidin nikotin kaynaklı sitotoksositeye karşı potansiyel bir koruyucu ajan olarak değerlendirilebileceğini rapor etmişlerdir [27]. Yılmaz ve ark. (2016), Çin hamster akciğer fibroblast V79 hücre dizisinde 3-200 µM dozlarında borik asidin hücre canlılığını etkilemediğini, hidrojen peroksitin indüklediğini oksidatif DNA hasarını azaltarak koruyucu etki oluşturduğunu rapor etmişlerdir [3]. Akbas ve ark. (2012), HEK293 hücrelerinde borik asidin 250 µM'dan düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı bir değişim gözlemlenmezken 500 µM ve üzerinde hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir [2]. Borun normal hücrelerde etkinliğini değerlendirmek amacı ile yaptığımız çalışmamızda L929 fibroblast hücreleri 1,56 mM ile 100 mM aralığında değişen farklı konsantrasyonda borik asit ile muamele edildi. Borik asidin 42,065 mM (IC₅₀) ve üzerindeki değerlerde fibroblast hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı tespit edildi. Borik asidin mitokondriyal aktiviteyi 3,125 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda, lizozomal aktiviteyi ise 25 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda azalttığı gözlemlendi. Elde edilen veriler literatürdeki bilgiler ile birlikte değerlendirildiğinde borun etkinliğinin hücre tipine ve konsantrasyonuna göre değiştiiği belirlendi. Borun hücre canlılığı ve sitotoksosite üzerine etkinlik mekanizması halen tam olarak belirlenememiş ve araştırılmaya devam edilmektedir. Bu çalışmamızdan yola çıkarak ileriki çalışmalarda borik asidin hücre içi organeller, nükleotit metabolizması, enzimler ve protein aktiviteleri ile ilişkisinin moleküler teknikler ile araştırılması hedeflenmektedir. Sonuç olarak ülkemiz için son derece önemli bir kaynak olan borun gittikçe artan kullanımının olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi için farklı doz, süre ve araştırma metodları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Dilek Düzgün Ergün: Metodoloji, Araştırma, Yazım

Ahu Soyocak: Metodoloji, Araştırma, Yazım

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir destek ve teşekkür beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Kaynakça

- [1] A. Tombuloglu, H. Copoglu, Y. Aydin-Son, and N.T. Guray, "In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory concentration," *J Trace Elem Med Biol*, 62, 126573, 2020.
- [2] F. Akbas and Z. Aydın, "Boric acid increases the expression levels of human anion exchanger genes SLC4A2 and SLC4A3," *Genet Mol Res*, 11(2), 847-854, 2012.
- [3] S. Yılmaz, A. Ustundag, O.C. Ulker, and Y. Duydu, "Protective effect of boric acid on oxidative DNA damage in Chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines," *Cell J*, 17(4), 748-754, 2016.
- [4] S. Ince, I. Kucukkurt, I.H. Cigerci, A.F. Fatih, and A. Eryavuz, "The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats," *J Trace Elem Med Biol*, 24(3), 161-164, 2010.
- [5] F. Simsek, "An in vitro study in which new boron derivatives maybe an option for breast cancer treatment," *Eurasian J Med Oncol*, 3(1), 22-27, 2019.
- [6] P.M. Coates, M.R. Blackman, G.M. Cragg, M. Levine, J. Moss, and J.D. White, *Encyclopedia of dietary supplements*. Boca Raton: CRC Press, 2015, ch.8.
- [7] M.C. Emanet, O. Sen, and M. Culha, "Hexagonal boron nitride nanoparticles for prostate cancer treatment," *ACS Appl Nano Mater*, 3(3), 2364-2372, 2020.
- [8] X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Hanagata, X. Wang, and Q. Weng, "Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment," *Nat Commun*, 8, 13936, 2017.
- [9] Y. Cui, M.I. Winton, Z.F. Zhang, C. Rainey, J. Marshall, and J.B. De Kernion, "Dietary boron intake and prostate cancer risk," *Oncol Rep*, 11(4), 887-892, 2004.
- [10] M.S. Touillaud, P.C. Pillow, J. Jakovljevic, M.L. Bondy, S.E. Singletary, and D. Li, "Effect of dietary intake of phytoestrogens on estrogen receptor status in premenopausal women with breast cancer," *Nutr Cancer*, 51(2), 162-169, 2005.
- [11] S. Mahabir, M.R. Spitz, S.L. Barrera, Y.Q. Dong, C. Eastham, and M.R. Forman, "Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women," *Am J Epidemiol*, 167(9), 1070-1080, 2008.
- [12] R. Scorei and R. Popa, "Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer," *Anti-Cancer Agents Med Chem*, 10(4), 346-351, 2010.
- [13] G. Repetto, A. Del Peso, and J.L. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nat Protoc*, 3(7), 1125-1131, 2008.
- [14] F.K. Coban, S. Ince, I. Kucukkurt, H.H. Demirel, and O. Hazman, "Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats," *Drug Chem Toxicol* 38(4), 391-399, 2015.
- [15] H. Zafar and S. Ali, "Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma," *Arch Biochem Biophys*, 529(2), 66-74, 2013.
- [16] I. Kucukkurt, S. Ince, H.H. Demirel, R. Turkmen, E. Akbel, and Y. Celik, "The effects of boron on arsenic-induced lipid peroxidation and antioxidant status in male and female rats," *J Biochem Mol Toxicol*, 29(12), 564-571, 2015.
- [17] S.S. Hakki, B.S. Bozkurt, and E.E. Hakki, "Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1)," *J Trace Elem Med Biol*, 24(4), 243-250, 2010.
- [18] R.M. Nzietchueng, B. Dousset, P. Franck, M. Benderdou, P. Nabet, and K. Hess, "Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing," *J Trace Elem Med Biol*, 16(4), 239-244, 2002.
- [19] B.E. Tepedelen, E. Soya, and M. Korkmaz, "Boric acid reduces the formation of DNA double strand breaks and accelerates wound healing process," *Biol Trace Elem Res*, 174(2), 309-318, 2016.
- [20] B.E. Tepedelen, M. Korkmaz, E. Tatlisumak, E.T. Uluer, E. Olmez, and I. Degerli, "A study on the anticarcinogenic effects of calcium fructoborate," *Biol Trace Elem Res*, 178(2), 210-217, 2017.
- [21] W.T. Barranco, P.F. Hudak, and C.D. Eckhert, "Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States)," *Cancer Causes Control*, 18(1), 71-77, 2007.
- [22] C. Hacıoğlu, F. Kar, S. Kacar, V. Sahinturk, and G. Kanbak, "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*, 193(2), 400-409, 2020.
- [23] B. Celik, E. Ersoz E, and M. Korkmaz, “Boraks pentahidrat’ın glioblastoma multiforme hücre hattındaki tedavi potansiyelinin araştırılması,” *J Boron*, 5(1), 56-61, 2020.
- [24] A. Cigel, M.D. Bilgin, and R.O. Ek, “Evaluation of the anti-cancer and biological effects of boric acid on colon cancer cell line,” *Meandros Med Dent J*, 21(3), 238-244, 2020.
- [25] A.S. Acerbo and L.M. Miller, “Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging,” *Analyst*, 134(8), 1669-1674, 2009.
- [26] A. Ugur, O. Ceylan, R. Boran, S. Ayrikcil, N. Sarac, and D. Yilmaz, “A new approach for prevention the oxidations and mutations: Zinc borate,” *J Boron*, 4(4), 196-202, 2019.
- [27] H. Turkez, M.E. Arslan ME, O. Ozdemir, and O. Chikha, “Ameliorative effect of boric acid against nicotine-induced cytotoxicity on cultured human primary alveolar epithelial cells,” *J Boron*, 1(2), 104-109, 2016.