

# Borik Asitin Anti-Proliferatif ve Anti-Apoptotik Etkilerinin İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde TGF- $\beta$ Sinyal Yolağı Üzerinden İncelenmesi

## Investigation Of The Anti-Proliferative and Anti-Apoptotic Effects Of Boric Acid On Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through The TGF- $\beta$ Signaling Pathway

Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ<sup>1 A,B,C,E,F</sup>, Aynaz GHORBANI<sup>1 B,C,D,E</sup>, Murat SEVİMLİ<sup>3 B,C,E,G</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre AD, Eskişehir, Türkiye

<sup>3</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji & Embriyoloji AD, Isparta, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Akciğer kanseri, tüm dünyada hem kadın hem de erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda kanser konusunda elde edilen bilimsel gelişmelere rağmen, bu patoloji hala yüksek mortalite oranları ile ilk sıralarda yer almaktadır. Akciğer kanseri olgularının %85'ini küçük hücreli olmayan akciğer kanseri oluşturmaktadır. Bu hastalarda hastalığın seyri oldukça kötü ilerlemekte ve tanı çoğunlukla ileri evrelerde konulduğundan, çoğu hastada uygulanan tedaviler başarılı olamamaktadır. Borik asit (BA) sahip olduğu kimyasal özellikler, düşük yan etki oranları ve anti-kanserojen etkilere sahip esansiyel bir mikro elementtir. Bu çalışma kapsamında anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkileri bilinen BA'nın, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri (A549) üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerinden araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmada insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri (A549) kullanıldı. BA'nın sitotoksik analizi MTT analizi ile yapıldı. BA'nın apoptotik etkisi Annexin V/PI ve immünfloresan analizlerle belirlendi. TGF- $\beta$ , SMAD2/3/4 genlerinin ekspresyon düzeyleri moleküler düzeyde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile analiz edildi. Her bir reaksiyon üç kez tekrarlandı.

**Bulgular:** MTT analizi sonucu 50 mM BA'nın A549 hücrelerinde proliferasyonu azalttığı gözlemlendi ( $p < 0.01$ ). 50 mM BA uygulaması ile 48. saatte apoptotik hücre oranı %9.7'ye, erken apoptoz evresindeki hücre oranı ise %10.1'e yükseldi. İmmünfloresan analizinde de A549 hücrelerinde Kaspaz-3 işaretlenme düzeyininin kontrol grubuna göre yüksek miktarda olduğu gözlemlendi. BA uygulanan A549 hücrelerinde SMAD3 ve SMAD4 genlerinin ifadesinde anlamlı bir değişme gözlemlendi. TGF- $\beta$  geninin ifadesinde azalma gözlemlenirken ( $p < 0.05$ ), SMAD2 gen ifadesinde artış gözlemlendi ( $p < 0.01$ ).

**Sonuç:** Sonuçlar BA'nın; anti-proliferatif ve anti-apoptotik aktiviteye sahip yeni bir tedavi edici ajan olabileceğini göstermektedir. Ancak bu etkilere aracılık eden yolların aydınlatılması için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, borik asit, sitotoksikite, apoptoz, TGF- $\beta$ /Smad sinyal yolağı.

### ABSTRACT

**Objective:** Lung cancer is the most common type of cancer in both men and women worldwide. Despite scientific advances in cancer in recent years, this pathology still ranks first with high mortality rates. Non-small cell lung cancer constitutes 85% of lung cancer cases. In these patients, the course of the disease progresses very poorly and since the diagnosis is mostly made in

**Sorumlu Yazar:** Tuğba SEMERCİ SEVİMLİ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Hücresel Tedavi ve Kök Hücre Üretim, Uygulama ve Araştırma Merkezi, Eskişehir, Türkiye

tssevimli@ogu.edu.tr

Geliş Tarihi: 26.04.2023 – Kabul Tarihi: 27.07.2023

Yazar Katkıları: A) Fikir/Kavram, B) Tasarım, C) Veri Toplama ve/veya İşleme, D) Analiz ve/veya Yorum, E) Literatür Taraması, F) Makale Yazımı, G) Eleştirel İnceleme

advanced stages, the treatments applied in most patients are not successful. Boric acid (BA) is an essential microelement with its chemical properties, low side effects and anti-carcinogenic effects. In this study, it was aimed to investigate the cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of Boric Acid (BA), which has known anti-proliferative and anti-apoptotic effects, on non-small cell lung cancer cells (A549) via TGF- $\beta$  signaling pathway.

**Methods:** Human non-small cell lung cancer cells (A549) were used in the study. Cytotoxic analysis of BA was performed by MTT analysis. The apoptotic effect of BA was determined by Annexin V/PI and immunofluorescence analysis. Expression levels of TGF- $\beta$ , SMAD2/3/4 genes were analyzed at the molecular level by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Each reaction was replicated three times.

**Results:** As a result of MTT analysis, it was observed that 50 mM BA decreased proliferation in A549 cells ( $p < 0.01$ ). With 50 mM BA application, the rate of apoptotic cells at 48 hours increased to 9.7%, and the rate of cells in the early apoptosis stage to 10.1%. In the immunofluorescence analysis, it was observed that the level of Caspase-3 labeling index in A549 cells was higher than the control group. No significant change was observed in the expression of SMAD3 and SMAD4 genes in BA applied A549 cells. While a decrease was observed in the expression of TGF- $\beta$  gene ( $p < 0.05$ ), an increase in SMAD2 gene expression was observed ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** The results show that BA may be a new therapeutic agent with anti-proliferative and anti-apoptotic activity. However, further in vivo and advanced molecular level studies are needed to support these findings.

**Key words:** Non-small cell lung cancer, boric acid, cytotoxicity, apoptosis, TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway.

## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri dünya çapında kansere bağlı ölümler arasında ilk sıralarda yer almaktadır (1). Akciğer kanserine bağlı yeni vaka ve ölüm oranlarındaki yüksekliğin en önemli nedenlerinden biri hastalığın başlangıç evrelerinde çoğunlukla asemptomatik olması, ancak ilerleyen evrelerde tanı konulabilmesidir. Tanı konulduğunda ise kanserin tipi ve evresi tedavinin şekillenmesinde belirleyici rol oynamaktadır (2). Hastaların yaklaşık %85'i "Akciğer Adenokarsinomu" ve "Akciğer Skuamöz Hücreli Karsinomu" olarak alt tiplere ayrılan ve "Küçük Hücreli Dışı Akciğer Karsinomu" (KHDAK) olarak adlandırılan bir histolojik grupta yer alır (3).

Evre, histoloji, genetik farklılıklar ve hastanın genel durumu KHDAK'de tedavi yaklaşımını belirleyen temel unsurlardır. Buna göre cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve yeni moleküler hedefli tedaviler tek başlarına veya kombinasyon şeklinde uygulanır. Daha ileri evre hastalar ise tedavi seçimi öncesi multidisipliner bir değerlendirmeye ihtiyaç duyar (4). Evre I ve II hastalar eğer kontrendikasyon yoksa cerrahi rezeksiyon ile tedavi edilir. Opere edilemeyen hastalarda ise konvansiyonel veya sterotaktik radyoterapi tercih edilir. Mikro-metastazları önlemeye yönelik olarak ise çoğunlukla neoadjuvan ve adjuvan kemoterapi yaklaşımları gerekli olmaktadır (5). Palyatif kemoterapide ilk seçenek Vinorelbin, Gemstabin, Pemetreksat ve Paklitaksel gibi platin içerikli sitotoksik ilaçların ikisinden oluşur. Seçili hastalarda bu ikili kombinasyona Bevasizumab veya Nesitumumab eklenebilir (6).

Hastaların başlangıçta kemoterapiye cevapları iyi olsa da ilerleyen dönemde relapslar görülmektedir. Yan etkiler ve ilaç direnci akciğer kanseri kemoterapisinde, ilaçların etkinliğini azaltan ve kullanımını kısıtlayan en önemli etkenlerin başında gelmektedir (7). Kemoterapiye bağlı yan etkilerin nedeni ise ilaçların özgün olmaması, sağlıklı hücre veya kanser hücresi ayırt etmeksizin hızlı çoğalan tüm hücreleri inhibe etmesi veya öldürmesidir. Yan etkiler çoğunlukla nötropenik sepsis, bulantı, kusma, diyare, alopesi, stomatit, periferik nöropati ve ekstrasvazyon şeklinde görülmektedir (8). Bu yan etkiler hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve tedaviye uyumu ciddi oranda bozmaktadır. Ciddi düzeyde ve çok sayıda gelişen yan etki ise yaşamı tehdit eden tablolara neden olabilmektedir (9). Bu nedenlerle daha hedefe

yönelik, yan etki oranları düşük ve dirençli tümörleri hedef alabilen yeni nesil ilaçların gelişimine ihtiyaç duyulmaktadır (10).

Bor, doğada boraks ve BA şeklinde bulunan ametal bir elementtir. Gıdalarda ve içme suyunda yaygın olarak bulunur ve insan plazmasında da yaklaşık 10-20  $\mu$ M düzeyinde bulunduğu bildirilmektedir (11). BA maruziyetinin erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda ise servikal kanser ve akciğer kanseri görülme sıklığını azalttığı bilinmektedir (12-14). Ayrıca bazı in-vitro çalışmalar BA'nın prostat, melanom, meme kanseri, kolon kanseri, hepatoselüler karsinom, glioblastom ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli tümörlerde kanser hücrelerinde proliferasyonu azaltarak veya apoptoza neden olarak anti-kanserojen etkiler gösterdiğini bildirmektedir (15-21).

TGF- $\beta$  sinyal yolağı, hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz ve diğer hücresel işlevlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu sinyal yolağı, TGF- $\beta$  ligandlarının hücreye bağlanmasıyla başlar ve hücre zarından SMAD sinyal vericileri aracılığıyla nükleusa geçiş yapar. SMAD proteinleri, nükleusta TGF- $\beta$  yanıt elemanlarına bağlanıp gen ifadesini düzenleyerek TGF- $\beta$  sinyal yolağının hücresel yanıtını kontrol eder (22).

Çalışmamızda düşük yan etki oranları, anti-proliferatif ve anti-apoptotik özellikleri bilinen BA'nın, yüksek insidans ve mortalite oranları ile önemli bir sağlık sorunu haline gelen KHDAK hücre döngüsü üzerine etkilerini incelemeyi hedefledik. Bu amaçla KHDAK hücre hattı olan A549 hücreleri kültüre edildi ve BA uygulaması sonrası apoptoz durumları Annexin V\PI yöntemi ve Kaspaz-3 immünohistokimyası ile, TGF- $\beta$  sinyal yolağı genlerinin ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile araştırıldı.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Hücre Hattı ve Kültürü

Çalışmada A549 (ATCC® CCL-185™), insan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücreleri kullanıldı. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri; %10 fetal sığır serumu, %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde, %95 bağıl nemde 37°C'de kültür ortamında çoğaltıldı. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlerle pasajlandı.

### MTT Sitotoksosite Analizi

BA'nın hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile belirlendi. Bu amaçla BA serum içermeyen hücre medyumunu içerisinde 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM ve 75 mM final konsantrasyonlarında olacak şekilde çözdürüldü (17). Hücreler 96 kuyucuklu kültür kabına 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk yoğunluğunda 200  $\mu$ L besiyeri içerisinde ekildi. Hücreler tutunduktan sonra 100  $\mu$ L besiyeri çekildi ve BA gruplarına 100  $\mu$ L belirtilen konsantrasyonlarında BA uygulandı, kontrol grubuna ise BA uygulaması yapılmadı, 100  $\mu$ L serum içermeyen kültür medyumunu eklendi ve hücreler 24 ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süreleri sonunda kuyucuklara MTT solüsyonu uygulandı ve 3-4 saat daha inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki medyum uzaklaştırıldı, 100  $\mu$ L DMSO eklendi, 15 dk karanlıkta bekletilerek 540 nm'de mikropilaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, ABD) okutulularak absorbanans değerleri ölçüldü ve kontrol grubuna kıyasla BA gruplarında hücre canlılıkları hesaplandı.

### **Annexin V/PI Analizi**

A549 hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarına,  $3 \times 10^5$  hücre/kuyucuk oranında, 2 ml besiyeri içerisinde ekildi. 24 saatlik inkübasyon sonucunda her kuyudan 1 ml besiyeri uzaklaştırılarak, 1 ml besiyeri içerisinde sitotoksiste analizi sonucu belirlenen dozda BA uygulandı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında, hücreler PBS ile 2 kez yıkandı ve 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 100 µL bağlama solüsyonu eklenerek pipetlendi. Hücrelere 5 µL Annexin V, 5 µL Propidium İyodür (PI) eklenerek 15 dk karanlık bir ortamda inkübe edildi. Daha sonra 400 µL bağlama solüsyonu aktarılarak Flow Sitometri cihazı (Novocyte D3005, Agilent, USA) ile NovoExpress Flow Cytometry software (version 1.5.0) programı ile analiz edildi.

### **RT-qPCR Analizi**

BA uygulanan A549 hücrelerinden ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinden total RNA ekstraksiyonu (GeneAll® Hybrid-RTM, Seul, Kore) yapıldı. Elde edilen RNA'lar cDNA sentez kiti (Atlas Biyoteknoloji, Ankara, Turkey) ile komplementer DNA (cDNA)'ya çevrildi. Real-time PCR reaksiyonu için; SYBR Green içeren master mix solüsyonu (RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix, Qiagen, Hilden, Almanya), ve TGF-β, SMAD2/3/4 genlerine özgü primerler ve housekeeping gen olarak GAPDH primerleri (Suarge Biyoteknoloji, İstanbul) kullanıldı (Tablo 1). İlgili genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi için örnekler Rotorgene Q5 plex+HRM Real-Time PCR cihazında (Qiagen, Hilden, Almanya) çalışıldı. Elde edilen veriler 2-ΔΔCt metoduyla analiz edildi. Her bir reaksiyon üç kez tekrarlandı.

### **Kaspaz-3 İmmüno Floresan Analizi**

Bu amaçla 24 kuyucuklu kültür kaplarına  $0.5 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde lamelli ekim yapıldı. Hücreler tutunduktan sonra BA solüsyonu uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edildi. Sürelerin sonunda hücreler metanolla fikse edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1,5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dk inkübe edildi ve Antibody Diluent solüsyonu ile uygun oranlarında dilue edilen kaspaz-3 primer antikoru (Bioss, BS-2593R) ile oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3x2 dk yıkama işleminden sonra immüno floresan çalışmalar için uygun FITC işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilerek, son aşamada DAPI içeren kapatma medyum (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek görüntüler elde edildi.

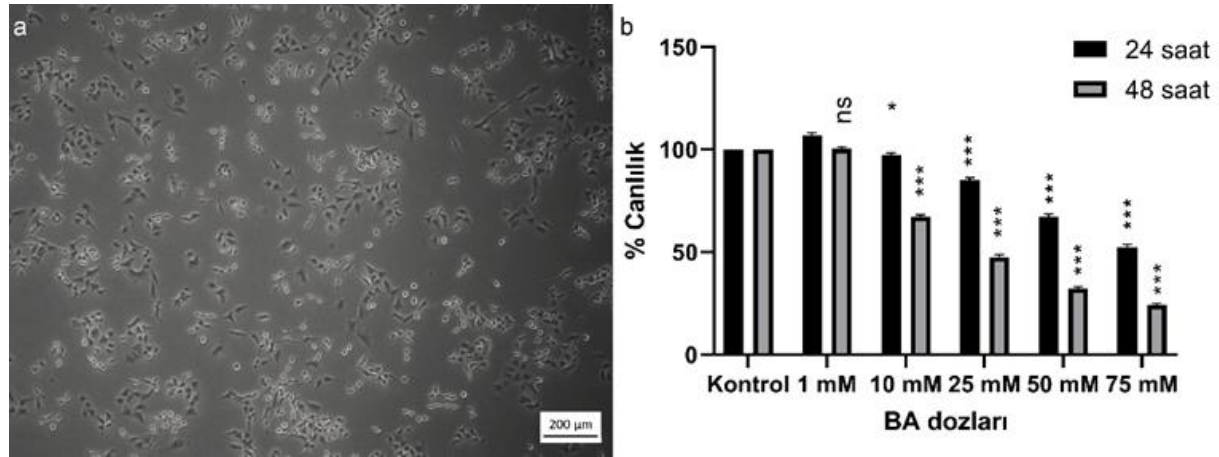
### **İstatistiksel Analiz**

Elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Veriler normal dağılım gösterdiğinden grupların karşılaştırılmasında One-Way Analysis of Variance testi ve Tukey's post hoc testleri uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlılık için  $p < 0.05$  kabul edildi. Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 7.0 programı ile yapıldı.

### 3. BULGULAR

#### Hücre Kültürü

A549 hücrelerinin günlük olarak faz-kontrast mikroskobu ile yapılan incelemelerinde hücrelerin; iç ya da yıldız şekilli fibroblast-benzeri morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 1a). Hücreler çalışmalar için gerekli sayıya ulaşıncaya kadar günlük mikroskopik olarak takip edildi, 3 günde bir besiyeri değiştirilerek, %70-80 konfluent olunca tripsin-EDTA ile kaldırılıp yeni kültür kaplarına 1/3 oranında bölünerek pasajlandı.



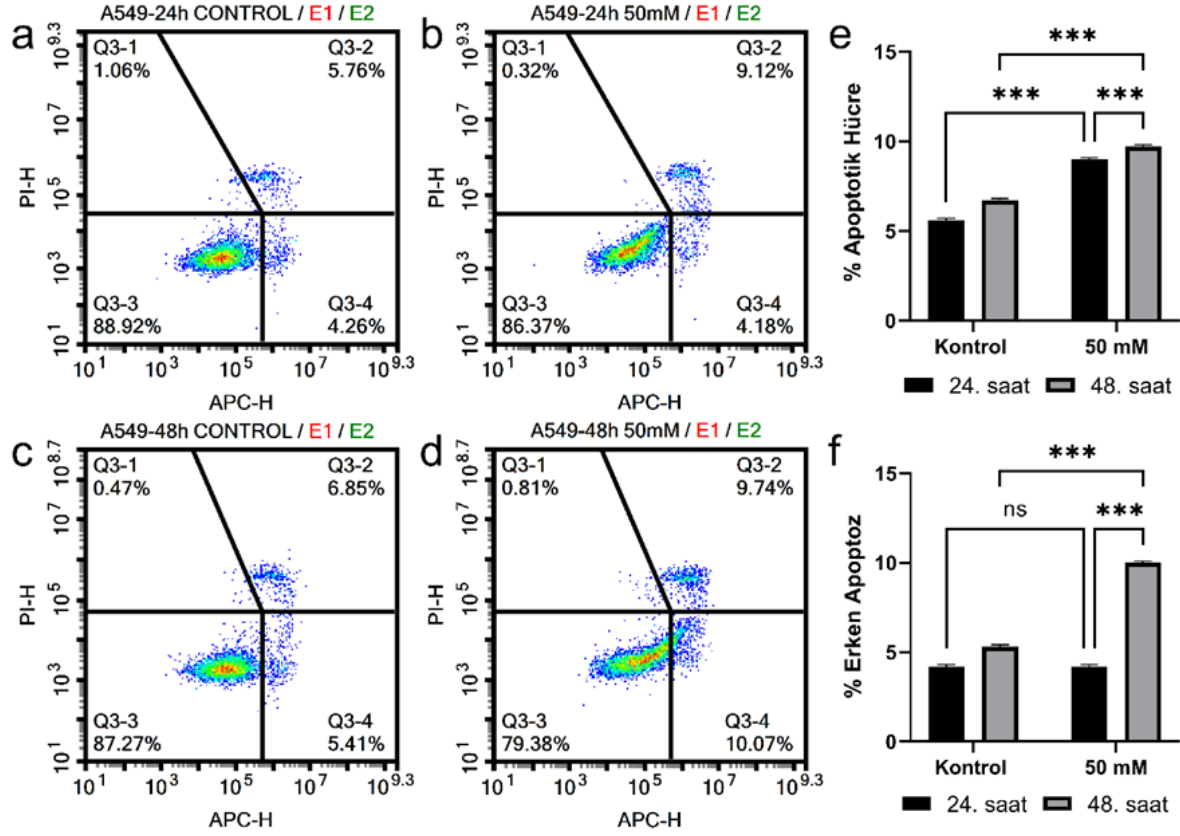
**Şekil 1.** Kültüre alındıktan sonra 3. günde kültür kabına tutunan A549 hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntüleri ve MTT analizi. a) A549 hücreleri iç ya da yıldız şekilli fibroblast-benzeri morfolojide gözlemlendi (Ölçüm çubuğu=200  $\mu$ m). b) BA konsantrasyonlarının A549 hücre hattında, BA uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla MTT yöntemi ile hesaplanan 24. ve 48. saatteki % canlılık değerleri (\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### MTT Sitotoksikite Analizi

BA konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksik etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir. BA uygulaması yapılmayan kontrol grubuna kıyasla 1mM BA uygulanan grupta hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. 10, 25, 50 ve 75 mM BA uygulanan gruplarda ise hem 24 hem 48 saatte hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Şekil 1b). Literatür verileri ve sitotoksikite analiz sonuçlarına göre diğer analizlerde 50 mM dozu uygulanmasına karar verildi.

#### Annexin V/PI Analizi

Analiz sonuçlarına göre 24. saatte kontrol grubu hücrelerinin %5.8'inin apoptotik, %4.3'ünün ise erken apoptoz evresinde olduğu gözlemlendi. 24 saatlik 50 mM BA uygulaması sonrası apoptotik hücre oranı %9.1'e çıkarken, erken apoptoz evresindeki hücre oranı %4.2 olarak tespit edildi. 48. saatte kontrol grubundaki hücrelerin ise %6.9'u apoptoz, %5.4'ü erken apoptoz evresinde tespit edildi. 50 mM BA uygulaması ile 48. saatte apoptotik hücre oranı %9.7'ye, erken apoptoz evresindeki hücre oranı ise %10.1'e yükseldi (Şekil 2).



**Şekil 2.** 24 ve 48 saat süre boyunca A549 hücrelerinin 50 mM BA ile muamele sonrası apoptoz analizi. a) A-549 24 saat kontrol. b) A-549 24 saat 50 mM BA uygulaması. c) A-549 48 saat kontrol. d) A-549 48 saat 50 mM BA uygulaması. e) Apoptotik hücre yüzde grafiği f) Erken apoptoz hücre yüzde grafiği (Q1=Nekroz, Q2= Geç apoptoz, Q3=Canlılık, Q4= Erken apoptoz)

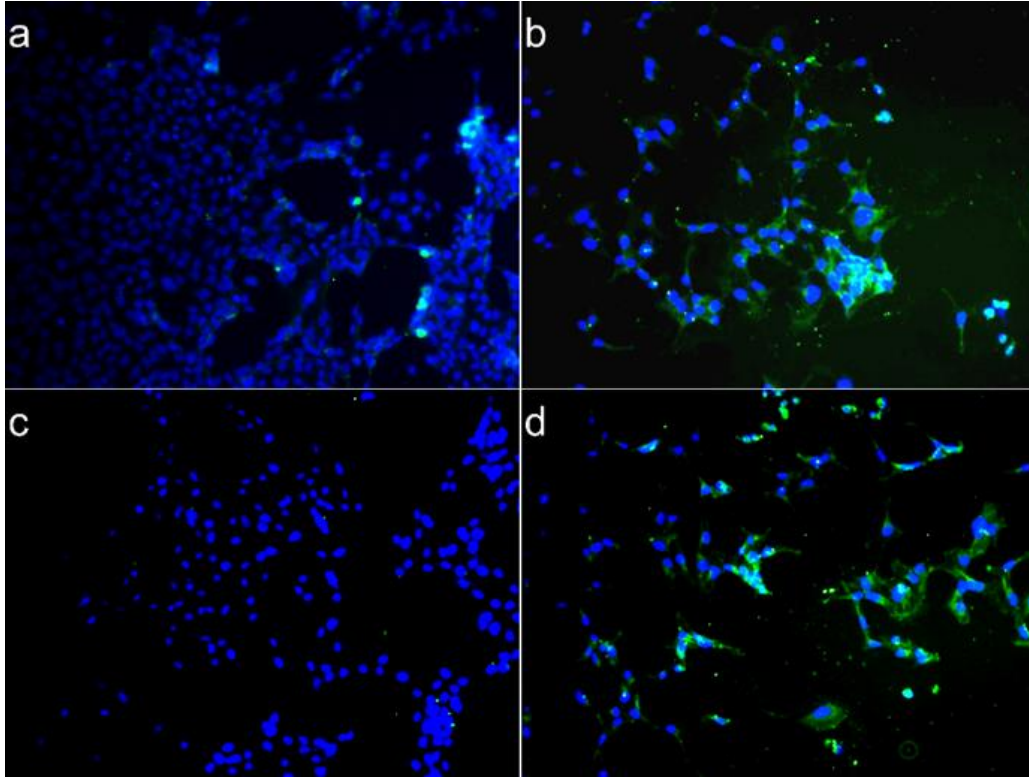
### Kaspaz-3 İmmüno Floresan Analizi

Hücrelerdeki apoptoz durumu kaspaz-3 immünohistokimyası ile araştırıldı. İmmüno Floresan analiz sonuçlarına göre 50 mM BA uygulanan A549 hücrelerinde Kaspaz-3 ile işaretlenme düzeylerinin kontrol grubuna göre kıyasla daha yüksek miktarda olduğu gözlemlendi (Şekil 3a-d).

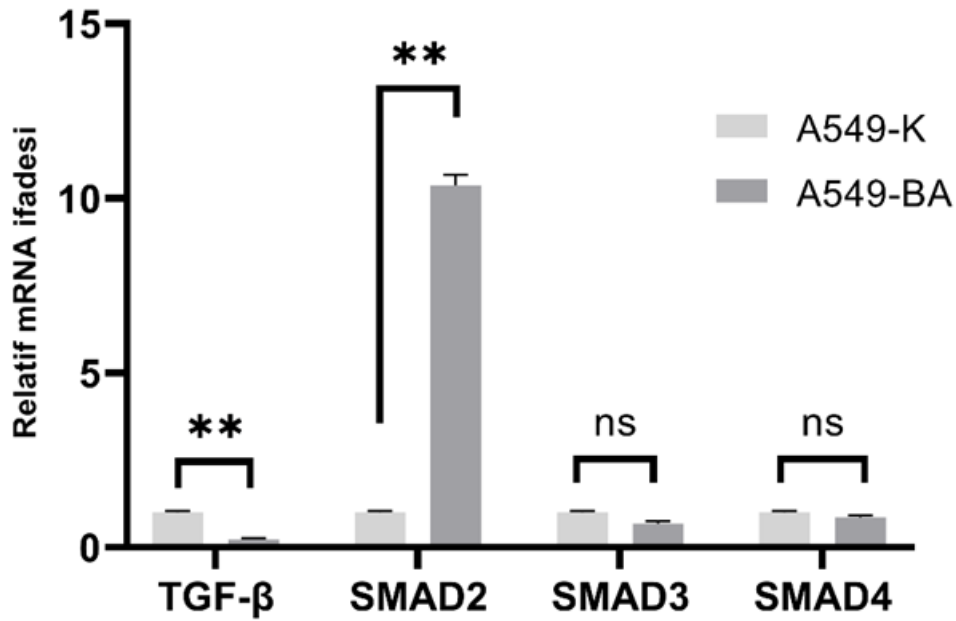
### RT-qPCR Analiz Sonuçları

RT-qPCR analizinde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, BA grubunda TGF- $\beta$  ifade düzeyinin anlamlı derecede azaldığı ( $p < 0.01$ ), SMAD 2 ifade düzeyinin anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi ( $p < 0.01$ ). İki grup arasında SMAD3 ve SMAD4 ifade düzeyleri arasında ise belirgin bir fark gözlenmedi (Şekil 4).





**Şekil 3.** A549 hücrelerinin 50 mM BA ile muamele sonrası kaspaz-3 immüno Floresan analizi a) A-549 24 saat kontrol b) A-549 24 saat 50 mM BA c) A-549 48 saat kontrol d) A-549 48 saat 50 mM BA (nukleus (mavi), kaspaz-3 (yeşil)).



**Şekil 4.** TGF- $\beta$ , SMAD2/3/4 genlerinin ekspresyon profili. Kontrol grubuna kıyasla, BA grubunda TGF- $\beta$  ifade düzeyinin anlamlı derecede azalma ( $p < 0.01$ ), SMAD 2 ifade düzeyinde ise anlamlı derecede artış tespit edildi. İki grup arasında SMAD3 ve SMAD4 ifade düzeyleri arasında ise belirgin bir fark gözlenmedi (ns: fark yok, \*\*  $p < 0.01$ ).

#### 4. TARTIŞMA

Kanser tedavisinin başarısızlığı ve mortalitenin ana nedeni kanser hücrelerinin apoptozdan kaçması ve metastaz olmasına rağmen, mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Apoptozdan kaçarak canlılıklarını devam ettirmeleri, kanser hücrelerinin birincil bölgelerini terk edip, kan dolaşımına geçerek kan damarlarındaki basınca dayanmalarını ve ikincil bir ortamda yerleşimlerini sağlar. Son çalışmalar birçok transkripsiyon ve büyüme faktörünün, aynı zamanda kanser hücrelerinin devamlılığı için gerekli olduğunu ve dolayısıyla kanserin nüks ve metastaz süreçleri ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (22). Bu çalışmada, nüks ve metastaz olaylarında başrol oynayan sinyal yollarından TGF- $\beta$ /Smad sinyal yolağına BA'nın etkisini A549 hücrelerinde çalışmayı amaçladık.

Bor; tarım, sanayi, kozmetik sektörü yanında geleneksel tıp uygulamalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Bor, BA formunda vücuda alınmakta ve dolaşıma bu formda geçmektedir (23). BA ile kanser tedavisi için ilk olarak "Boron neutron capture therapy" kullanılmıştır (24). Yapılan çeşitli çalışmalarda, BA'nın çeşitli kanser türlerinde; hücre proliferasyon, migrasyon ve invazyonunu azalttığı bildirilmiştir (17,19,25,26). BA ve akciğer kanseri ile yapılan çalışmalarda, BA'nın kimyasal bir koruyucu ajan olduğu desteklenmektedir (27,28). Sisplatin toksisitesi üzerine yapılan bir araştırmada, farklı dozlarda uygulanan boraks ve BA'nın, sisplatin toksisitesinin neden olduğu inflamasyon ve oksidatif stresi azaltarak, ER stresini artırdığı gözlenmiştir (29). BA'nın kanser hücreleri üzerine etkisinin çalışıldığı önceki çalışmalarda BA'nın anti proliferatif ve anti-apoptotik özellikleri gösterilmiştir (15; 30-33). BA'nın bu etkilerinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bazı çalışmalar, BA'nın TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerinde etkili olabileceğini öne sürmektedir (28). BA'nın Ülkemizin en önemli stratejik madeni olan BA'nın kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif ve anti-apoptotik özelliklerini MTT, Annexin V/PI ve kaspaz-3 immünohistokimyası ile, TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerine olan etkisini ise RT-qPCR ile analiz ettik.

TGF- $\beta$  sinyal yolağının iki ana yol üzerinden etki ettiği bilinmektedir: Smad bağımlı yol ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolu. Epitelyal mezenkimal geçiş sırasında; TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$  tip II reseptörüne (T $\beta$ RII) bağlanır. Bu bağlanma sonrasında reseptör-ilişkili Smad2 ve Smad3'ün fosforile edildiği kinaz bölgesini içeren TGF- $\beta$  I reseptör (T $\beta$ RI) kinaz aktive edilir. Fosforile Smad'lar, sitozolik Smad4 ile birleşerek heteromerik Smad kompleksi oluşturur, çekirdeğe taşınır ve hedef genlerin Smad bağlama elemanlarına (SBE) bağlanarak gen transkripsiyonunu gerçekleştirirler (34,35). Bu bağlamda, BA'nın TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerindeki etkisi daha fazla araştırılmaya değer bir konudur. Çünkü literatürde TGF- $\beta$  ve Smad2/3/4 sinyal yolağı üzerine farklı kanser türlerinde farklı etken maddelerinin olduğu çalışmalara rastlanırken, BA'nın etkisinin çalışıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. TGF- $\beta$  ifade düzeyinin çalışıldığı diğer kanser çalışmalarında, TGF- $\beta$  ifadesinin arttığı ve epitelyal mezenkimal geçişi indüklediği belirtilmiştir (36-40). Çalışmamızda BA uygulanan kanser hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla TGF- $\beta$  ifade düzeyi literatürdeki diğer kanser çalışmalarına benzer olarak azaldı. SMAD3 ve SMAD4 gen ifade düzeylerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlendi. Çalışmamızda BA uygulanan kanser hücrelerinde SMAD2 ifadesinin azalması beklenirken arttığı gözlemlendi. BA'nın bize farklı olay ve/veya moleküllerin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Örneğin, kodlamayan RNA'lar SMAD3 ve SMAD4 ifade düzeylerinde anlamlı bir etki oluşturmazken,



SMAD 2'yi aktive ediyor olabilir. BA tek başına yeterli gelmemiş olabilir. Belki de etkisini gösterebilmesi için kombine tedavi şeklinde uygulanması gerekebilir. TGF- $\beta$ 'nin kanser-ilişkili fibroblastların (CAF) oluşmasında önemli roller oynadığı ve düzenleyici SMAD2 ve SMAD3 proteinlerinin bu sinyali ilettiği iyi bilinmektedir (35). Ancak, TGF- $\beta$  sinyalinin SMAD2 ifadesini nasıl indüklediği tam olarak anlaşılamamıştır. Bu durumun anlaşılabilmesi için ek moleküler analizler ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Kontrol grubu hücrelerine kıyasla BA grubunda, BA A549 hücreleri üzerinde sitotoksik ve anti-proliferatif etkiler gösterdi. Kontrol grubuna kıyasla 1mM BA uygulanan grupta hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik yokken 10, 25, 50 ve 75 mM BA uygulanan gruplarda ise hem 24 hem 48 saatte hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Hücre apoptozu, hücreyel yok edilme denilen aktif bir fizyolojik süreçtir. Biyokimyasal değişikliklerin yanı sıra, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre yoğunluğunun artması, karyoreksis ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi belirgin morfolojik değişikliklerle karakterizedir. Bu değişiklikler, inverted mikroskop ve transmisyon elektron mikroskopu ile gözlemlenebilir (41). Ayrıca hücre apoptoza giderken iç zardaki fosfatidilserin molekülleri zarın dış tarafına geçer. Bu olay apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde olur. Annexin V, fosfatidilserine bağlanan bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenip apoptotik hücre gözlemlenebilir. Nekrozdan ayırmak için ikinci bir floresan madde PI ile işaretlenir (42). Bu çalışmada da BA uygulanan hücrelerde apoptoz durumunu belirlemek için Annexin V/PI analizi yapıldı. Literatür verileri ve sitotoksite analiz sonuçlarına göre Annexin V/PI ve immünofloresan analizlerinde 50 mM dozu uygulandı. Annexin V/PI analizinde 24. saatte kontrol grubu hücrelerinin %5.8'inin apoptotik, %4.3'ünün ise erken apoptoz evresinde olduğu gözlemlendi. 24 saatlik 50mM BA uygulaması sonrası apoptotik hücre oranı %9.1'e çıkarken, erken apoptoz evresindeki hücre oranı %4.2 olarak tespit edildi. 48. saatte kontrol grubundaki hücrelerin ise %6.9'u apoptoz, %5.4'ü erken apoptoz evresinde tespit edildi. 50 mM BA uygulaması ile 48. saatte apoptotik hücre oranı %9.7'ye, erken apoptoz evresindeki hücre oranı ise %10.1'e yükseldi. Erken dönemde BA grubunda apoptoz açısından kontrol grubuna kıyasla fark olmadığı gözlemlendi. Ancak geç evre apoptoz BA uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek düzeyde gözlemlendi. Bu durum BA'nın apoptik mekanizmalar üzerine etki edebilmesi için hücreyel cevabın akut bir etkiyle ortaya çıkmadığını, hücreler üzerine etkili olabilmesi için belirli bir zaman periyoduna ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler, laboratuvar koşullarından da kaynaklanabilir. Çünkü immünofloresan analizinde A549 hücrelerinde Kaspaz-3 ekspresyonunun kontrol grubuna göre yüksek miktarda olduğu gözlemlendi. Çalışmamızın bulguları, A549 hücrelerinde BA uygulama sonucunda TGF- $\beta$ /Smad sinyalinin nasıl değiştiği konusunda yeni düşünceler sunabilir ancak TGF- $\beta$ /Smad sinyalinin nasıl işlev gördüğünün ayrıntılı şekilde araştırılması gerekmektedir. Annexin V/PI ve immünofloresan analizlerinde gözlenen değişim ve farklılıkları doğrulamak adına Western Blot analizi de yapılması uygundur. Bu açıdan mevcut çalışmanın bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Mikroarray analizi kullanarak miRNA ekspresyon profillerinin çalışılması önemlidir. Ayrıca TGF- $\beta$ /Smad sinyalinde görevli proteinlerin tek tek ayrıntılı çalışılarak miRNA-mRNA regülasyon ağlarının rolünün açıklanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca hayvan modellerinde de doğrulanması gerekmektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanserini önlemeyi amaçlayan ve uzun yıllar süren temel ve klinik araştırmalara rağmen, tedavisi hâlen zor bir konudur ve dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen sebebi olmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, küçük hücreli dışı akciğer kanser hücreleri üzerine BA'nın apoptotik etkisini TGF- $\beta$  sinyal yolağı üzerinden araştırdık. Daha önce gerçekleştirilen hücresel, klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda, diyet ile alınan BA'nın çeşitli kanser türlerinde riski azaltabileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla, karsinogenezde BA'nın rolü henüz tam olarak anlaşılacak şekilde birlikte araştırmalar devam etmektedir. Bu konuyla ilgili kanseri önlemede oynayabileceği rolünün daha iyi aydınlatılması için gelecek çalışmalara ihtiyaç vardır.

### Çıkar Çatışması

Bu çalışmada yazarların çıkar çatışması durumları yoktur.

### Teşekkür

Teşekkür beyanımız bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*, 41(1), 1-24. doi:10.1016/j.ccm.2019.10.001.
2. Nasim, F., Sabath, B. F., & Eapen, G. A. (2019). Lung Cancer. *Med Clin North Am*, 103(3), 463-473. doi:10.1016/j.mcna.2018.12.006
3. HerbstRS, M. (2018). BoshoffC. The Biology and Management of Non-Small Cell Lung Cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
4. Alexander, M., Kim, S. Y., & Cheng, H. (2020). Update 2020: management of non-small cell lung cancer. *Lung*, 198, 897-907.
5. Molina, N. D. R. S. D. (2019). JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment [Internet]. *Mayo Clin. Proc. Elsevier Ltd*, 1623-1640.
6. Pirker, R. (2020). Chemotherapy remains a cornerstone in the treatment of nonsmall cell lung cancer. *Current opinion in oncology*, 32(1), 63-67.
7. Lv, P., Man, S., Xie, L., Ma, L., & Gao, W. (2021). Pathogenesis and therapeutic strategy in platinum resistance lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1876(1), 188577.
8. El-Hussein, A., Manoto, S. L., Ombinda-Lemboumba, S., Alrowaili, Z. A., & Mthunzi-Kufa, P. (2021). A review of chemotherapy and photodynamic therapy for lung cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 21(2), 149-161.
9. Sjøgren, K., Jacobsen, K. A., Grønberg, B. H., & Halvorsen, T. O. (2020). Timing of severe toxicity from chemotherapy in patients with lung cancer. *Anticancer research*, 40(11), 6399-6406.
10. Hirsch, F., Scagliotti, G., Mulshine, J., & Kwon, R., Curran W.J., Wu YL, et al. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet*, 389(10066), 299-311.
11. Corti, A., Dominici, S., Piaggi, S., & Pompella, A. (2023). Enhancement of ferroptosis by boric acid and its potential use as chemosensitizer in anticancer chemotherapy.

- BioFactors*, 49(2), 405-414.
12. Mahabir, S., Spitz, M., Barrera, S., Dong, Y., Eastham, C., & Forman, M. (2008). Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American journal of epidemiology*, 167(9), 1070-1080.
  13. Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakirdere, S., Aydın, F., & Ataman, O. Y. (2007). Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental toxicology*, 22(1), 17-25.
  14. Cui, Y., Winton, M. I., Zhang, Z.-F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J. B., et al. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology reports*, 11(4), 887-892.
  15. Barranco, W. T., & Eckhert, C. D. (2004). Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer letters*, 216(1), 21-29.
  16. Kahraman, E., & Göker, E. (2022). Boric acid exert anti-cancer effect in poorly differentiated hepatocellular carcinoma cells via inhibition of AKT signaling pathway. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 73, 127043.
  17. Sevimli, M., Bayram, D., Özgöçmen, M., Armağan, I., & Semerci Sevimli, T. (2022). Boric acid suppresses cell proliferation by TNF signaling pathway mediated apoptosis in SW-480 human colon cancer line. *J Trace Elem Med Biol*, 71, 126958. doi:10.1016/j.jtemb.2022.126958.
  18. Cebeci, E., Yüksel, B., & Şahin, F. (2022). Anti-cancer effect of boron derivatives on small-cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 70, 126923.
  19. Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A., & Iordachescu, D. (2008). Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells. *Biological trace element research*, 122(3), 197-205.
  20. Acerbo, A. S., & Miller, L. M. (2009). Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*, 134(8), 1669-1674.
  21. Aydın, H. E., Gunduz, M. K., Kizmazoglu, C., Kandemir, T., & Arslantas, A. (2021). Cytotoxic effect of boron application on glioblastoma cells. *Turk Neurosurg*, 31(2), 206-210.
  22. Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(10), 616-630.
  23. Soriano-Ursúa, M. A., Farfán-García, E. D., & Geninatti-Crich, S. (2019). Turning fear of boron toxicity into boron-containing drug design. *Current medicinal chemistry*, 26(26), 5005-5018.
  24. Dymova, M. A., Taskaev, S. Y., Richter, V. A., & Kuligina, E. V. (2020). Boron neutron capture therapy: Current status and future perspectives. *Cancer communications*, 40(9), 406-421.
  25. Miao, S., Ge, Y., Yi, Z., & Feng, Q. (2020). Screening of Aptamer for Breast Cancer Biomarker Calreticulin and Its Application to Detection of Serum and Recognition of Breast Cancer Cell. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 48(5), 642-649.
  26. Simsek, F., Inan, S., & Korkmaz, M. (2019). An in vitro study in which new boron derivatives maybe an option for breast cancer treatment. *Breast cancer*, 13, 14.
  27. Söğüt, Ö., & Acar, O. (2020). Bor ve sağlık. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 9(1), 11-17.
  28. Turkez, H., Tatar, A., Hacimuftuoglu, A., & Ozdemir, E. (2010). Boric acid as a protector against paclitaxel genotoxicity. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1), 95-97.
  29. Hazman, Ö., Bozkurt, M. F., Fidan, A. F., Uysal, F. E., & Çelik, S. (2018). The effect of boric acid and borax on oxidative stress, inflammation, ER stress and apoptosis in cisplatin toxication and nephrotoxicity developing as a result of toxication. *Inflammation*, 41, 1032-1048.

30. Fırat, F., & Aladağ, T. (2022). Comparative effects of boric acid and resveratrol on mcf-7 breast cancer cells metastatic behaviour. *International Journal of Research - GRANTHAALAYAH*, 10(1), 34-46. doi: 10.29121/granthaalayah.v10.i1.2022.4460
31. Ersöz, M., Kaçar, A. K., Sezekler, I., & Coşkun, Z. M. (2019). Effects of boric-acid-applied green tea on the expressions of heat shock proteins in MCF-7 cells. *Cukurova Medical Journal*, 44(1), 66-71.
32. Gallardo-Williams, M. T., Chapin, R. E., King, P. E., Moser, G. J., Goldsworthy, T. L., Morrison, J. P., et al. (2004). Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic pathology*, 32(1), 73-78.
33. Zafar, H., & Ali, S. (2013). Boron inhibits the proliferating cell nuclear antigen index, molybdenum containing proteins and ameliorates oxidative stress in hepatocellular carcinoma. *Archives of biochemistry and biophysics*, 529(2), 66-74.
34. Liu, L.C., Tsao, T. C.-Y., Hsu, S.-R., Wang, H.-C., Tsai, T.-C., Kao, J.-Y., et al. (2012). EGCG inhibits transforming growth factor- $\beta$ -mediated epithelial-to-mesenchymal transition via the inhibition of Smad2 and Erk1/2 signaling pathways in nonsmall cell lung cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9863-9873.
35. Li, Q., Zhang, D., Wang, Y., Sun, P., Hou, X., Larner, J., et al. (2013). MiR-21/Smad 7 signaling determines TGF- $\beta$ 1-induced CAF formation. *Scientific reports*, 3(1), 2038.
36. Tirino, V., Camerlingo, R., Bifulco, K., Irollo, E., Montella, R., Paino, F., . et al.(2013). TGF- $\beta$ 1 exposure induces epithelial to mesenchymal transition both in CSCs and non-CSCs of the A549 cell line, leading to an increase of migration ability in the CD133+ A549 cell fraction. *Cell death & disease*, 4(5), e620-e620.
37. Derynck, R., Turley, S. J., & Akhurst, R. J. (2021). TGF $\beta$  biology in cancer progression and immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(1), 9-34.
38. Wiercinska, E., Naber, H. P., Pardali, E., van der Pluijm, G., van Dam, H., & Ten Dijke, P. (2011). The TGF- $\beta$ /Smad pathway induces breast cancer cell invasion through the up-regulation of matrix metalloproteinase 2 and 9 in a spheroid invasion model system. *Breast cancer research and treatment*, 128, 657-666.
39. Kretzschmar, M. (2000). Transforming growth factor- $\beta$  and breast cancer: transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signaling defects and cancer. *Breast Cancer Research*, 2(2), 1-9.
40. Zheng, L., Liang, H., Zhang, Q., Shen, Z., Sun, Y., Zhao, X., .et al.(2022). circPTEN1, a circular RNA generated from PTEN, suppresses cancer progression through inhibition of TGF- $\beta$ /Smad signaling. *Molecular cancer*, 21(1), 41.
41. Peng, Y., Fu, Z.-z., Guo, C.-S., Zhang, Y.-X., Di, Y., Jiang, B., et al.(2015). Effects and mechanism of baicalin on apoptosis of cervical cancer HeLa cells in-vitro. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 14(1), 251.
42. Güleş, Ö., & Ülker, E. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2), 73-78.