

Kolorektal Kanser Hücrelerinde Boraksın Gpx4/ACSL4 Sinyal Yolu Aracılığıyla Sitotoksik Etkileri

Ceyhan HACIOĞLU¹, Fatih DAVRAN²

ÖZ

Amaç: Kolorektal kanser (CRC), kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %10'unu oluşturmasıyla, malignite yönünden üçüncü ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır. Ferroptoz, CRC dahil çok sayıda kanserin tedavisinde ilaç direncini önlemede terapötiklerin anti-kanser etkinliğini arttırabilecek potansiyel demire bağlı hücre ölüm yolağıdır. Bu çalışmada CRC hücrelerinde ferroptozu sinyal yolağı üzerinden boraksın anti-proliferatif etkilerini araştırmak amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Öncelikle, boraksın sitotoksik konsantrasyonları (0-64 mM aralığında) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlendi. Daha sonra sitotoksik boraks konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde glutasyon peroksidaz 4 (GPx4), açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4), malondialdehit (MDA) ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) seviyeleri belirlendi.

Bulgular: 1 ve 4 mM boraks konsantrasyonları hücre canlılığını etkilemezken, 8 mM ve üzerindeki boraks konsantrasyonları HTC-116 hücrelerinde canlılığı anlamlı şekilde düşürmüştür ($p<0,05$). MTT sonuçlarına göre, boraksın IC25 ve IC50 konsantrasyonları sırasıyla 12,5 mM ve 20,8 mM olarak belirlendi. HTC-116 hücrelerinde 24 saat boyunca 12,5, 16,2 ve 20,8 mM boraks maruziyeti GPx4 seviyelerinde konsantrasyon bağımlı şekilde düşüş olurken, ACSL4 seviyelerinde artış olmuştur. Ayrıca, HTC-116 hücrelerine artan boraks uygulamasının, kontrole kıyasla MDA ve 8-OHdG seviyelerinde önemli bir artış ile lipid peroksidasyonuna ve DNA hasarına neden olduğu bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Deneysel verilerimiz doğrultusunda, boraks insan CRC hücrelerinde potansiyel bir anti-kanser ajanı olarak ferroptozu indükleyerek anti-proliferatif etkiler göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Boraks; DNA hasarı; ferroptoz; HTC-116; lipid peroksidasyonu.

Cytotoxic Effects of Borax via GPx4/ACSL4 Signaling Pathway in Colorectal Cancer Cells

ABSTRACT

Aim: Colorectal cancer (CRC) ranks third in terms of malignancy and second in cancer-related deaths, accounting for approximately 10% of cancer-related deaths. Ferroptosis is a potential iron-induced cell death pathway that could increase the anti-cancer efficacy of therapeutics in preventing drug resistance in the treatment of many cancers, including CRC. In this study, we aimed to investigate the anti-proliferative effects of borax via ferroptosis signaling pathway in CRC cells.

Material and Methods: Firstly, we determined the cytotoxic concentrations of borax (range 0 to 64 mM) with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Subsequently, glutathione peroxidase 4 (GPx4), acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4), malondialdehyde (MDA) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels were determined in HCT-116 cells incubated with cytotoxic borax concentrations for 24 hours.

Results: Borax at 1 and 4 mM concentrations did not affect cell viability, while borax at 8 mM and above concentrations significantly reduced viability in HTC-116 cells ($p<0,05$). According to MTT results, IC25 and IC50 concentrations of borax were determined as 12.5 mM and 20.8 mM, respectively. In HTC-116 cells, exposure to 12.5, 16.2, and 20.8 mM borax for 24 hours resulted in a concentration-dependent decrease in GPx4 levels and an increase in ACSL4 levels. We also found that increased borax administration to HTC-116 cells caused lipid peroxidation and DNA

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 Hacıoğlu, e-mail: ceyhanchacioglu@duzce.edu.tr

Geliş Tarihi / Received: 27.09.2022, Kabul Tarihi / Accepted: 23.11.2022

damage with a significant increase in MDA and 8-OHdG levels compared to control ($p<0.05$).

Conclusion: In line with our experimental data, borax showed anti-proliferative effects by inducing ferroptosis as a potential anti-cancer agent in human CRC cells.

Keywords: Borax; DNA damage; ferroptosis; HTC-116; lipid peroxidation

GİRİŞ

Kolorektal kanser (CRC), erişkin kadınlarda en sık görülen ikinci, erkeklerde ise üçüncü en yaygın kanserdir ve dünya çapında ölümlerin %9,2'sini oluşturan dördüncü önde gelen kanser ölüm nedenidir (1). Gelişmekte olan ülkelerde devam eden ilerlemeyle birlikte, dünya çapında CRC insidansının 2035'te 2,5 milyon yeni vakaya yükseleceği tahmin edilmektedir (2). CRC, bağırsağın en uzun dalını temsil eden kolon dokularından birinde ve rektum dokularında olmak üzere ortaya çıkan bir malignitedir. Hemen hemen tüm CRC, polip adı verilen küçük bir gelişme olarak başlar; bu tür polipler tipik olarak iyi huyludur ve birkaç yıl sonra kanser gibi büyüyebilirler (3). Yaş, polip varlığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, yaşam standardı ve genetik bozukluk öyküsü dahil olmak üzere obezite, fiziksel hareketsizlik, yetersiz beslenme, sigara ve aşırı alkol kullanımı gibi çevresel faktörler de CRC riski ile ilişkilendirilmiştir (4). Gelişmekte olan CRC herhangi bir semptom göstermeyebilir ve CRC endikasyonları sıklıkla metastaz yapma kabiliyetine ve konumuna bağlıdır. Evreye göre değişmekle birlikte CRC tedavisinde genel yaklaşım radyoterapi ve/veya kemoterapi ile kombine cerrahi değerlendiren çok sayıda klinik çalışma sürmekte olsa da, maalesef ilerlemiş rezeke edilemeyen CRC, yıllık ortalama 50.000 üzerindeki ölüm oranı ile tedavi edilemez durumdadır (6). Bu nedenle kanserin moleküler mekanizmalarına odaklanan hedefe yönelik ve güvenli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için de çeşitli doğal bileşiklerin ve bazı eser elementlerin hücre ölüm yollarını etkilerinin araştırılarak potansiyel anti-kanser aktivitelerinin ortaya konması gerekmektedir.

Ferroptoz ilk olarak Dixon tarafından 2012'de yeni bir hücre ölümü olarak önerilmiştir (7). Otofaji ve apoptozdan farklı olarak, ferroptozda, azalmış veya yok olmuş mitokondriyal kristaller ve bozulmuş ve yoğunlaşmış bir dış mitokondriyal membran dikkat çekicidir. Ferroptozdaki bu hücre anormallikleri, artmış membran lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasar nedeniyle plazma zarının seçici geçirgenliğinin kaybindan kaynaklanmaktadır (8). Ferroptoz, glutatyon peroksidaz 4 (GPx4) aktivitesini kaybetme, sistein eksikliği ve açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4) seviyelerinde artış gibi bir dizi faktörün neden olduğu hücrelerde demire bağımlı lipid peroksidatların birikmesinden kaynaklanan bir tür düzenlenmiş hücre ölümüdür (9). Artan sayıda yeni çalışma, hücre içi ferröz demirin (Fe^{+2}), reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini artırarak, antioksidan glutatyon (GSH) seviyesini azaltarak veya CRC hücrelerinde GPx4'ü inaktive ederek ferroptozun indüklenmesinin, CRC'nin klinik tedavisine katkıda bulunabileceğini ortaya koyarken, ferroptoz inhibisyonunun tümörün ilerlemesine

ve CRC'nin tedavi direncine yol açabileceği bildirilmiştir (10). Bu nedenle, ferroptozun düzenlenmesi, CRC tedavisi için umut verici bir strateji olabilir. Ayrıca, ferroptoz ile ilişkili terapötik ajanlar ve metabolitler, bu hastalığın teşhisi ve prognozu için biyolojik belirteçler olarak hareket edebilir. Ancak, bildiğimiz kadarıyla, CRC'nin gelişimi ve tedavisinde ferroptozun rolleri ve etki mekanizmalarına odaklanan çok sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Bor, bitkiler için esansiyel bir eser elementtir ve sağlık sisteminde yaygın olarak kullanılan bir mineral maddedir. Vücuda uygulandıktan sonra hızla emilir ve pasif difüzyon sayesinde hızla yayılarak bazı metabolik süreçleri üzerinde faydalı etkileri vardır (11). Bor bileşikleri olan borik asit ve boraksın deney hayvanları ve insanlarda sistemik toksik etkilerine bağlı olarak, anti-kanserojenik, anti-invaziv, anti-mutajenik, anti-inflamatuvar ve ayrıca anti-oksidatif özellikler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler sergilemiştir (12,13). Ayrıca, yakın tarihli bir çalışma, çeşitli borik asit konsantrasyonlarının CCL-233 kolon kanseri hücre hattı üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olabileceğini gösterdi (14). Bununla birlikte, bor bileşiklerinin CRC üzerindeki sitotoksik etkilerine dair moleküler mekanizmalar henüz tam olarak ortaya çıkarılmamıştır. Bu nedenle, bor bileşiklerinin neden olduğu hücresel değişikliklerin bilinmesi, borun potansiyel terapötik etkilerini ortaya çıkaracak ve bu alandaki diğer çalışmalara rehberlik edecek olan gelecekteki anti-kanser çalışmaları için çok önemlidir. Mevcut çalışmamızda da, boraksın (sodyum tetraborat) HCT-116 kolorektal kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini bir hücre ölüm yolağı olan ferroptoz üzerinden araştırmayı amaçladık. Bununla birlikte, farklı konsantrasyonlardaki boraksın HCT-116 hücrelerindeki canlılığı, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve ferroptoz sinyal yolağı üzerindeki etkilerini değerlendirdik. Bu doğrultuda boraks konsantrasyonları ile inkübe edilmiş HCT-116 hücrelerinde malondialdehit (MDA), 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), GPx4 ve ACSL4 seviyeleri analiz edildi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hücre Hattı ve Kültür Koşulları

İnsan CRC hücreleri HCT-116, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC, Rockville, MD, ABD) temin edildi. Kültür ortamına L-glutamin ve %10 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 (SLM-240 Sigma-Aldrich) ile penisilin/streptomisin (100 µg/mL-100 µg/mL; 15140148 Thermo Fisher Scientific) ilave edildi. Kültür ortamı, uygun nem ve %5 karbondioksit ile 37°C sıcaklıktaki bir inkübatörde stabilize edildi.

Hücre Canlılığı Analizi

Hücre canlılığı analizi için hücreler, bir kültür ortamı ile kuyu başına 5×10^5 hücre yoğunluğunda altı oyuklu kültür plakalarına ekildi. Boraks çözeltisi 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 mM konsantrasyonlarda (71997 Sigma-Aldrich) hazırlandı. HCT-116 hücreleri hazırlanan boraks konsantrasyonları ile 24 saat boyunca inkübe edildi. Ardından, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) çözümü kültür ortamına eklenerek canlı hücreler tarafından mitokondrial dehidrojenaz tarafından formazan kristallerine

dönüştürülmesi sağlanmıştır ve devamında formazan kristallerini çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiştir. Oluşan renk yoğunluğu, 570 nm'de bir mikropilaka okuyucu (Epoch, BioTek) yardımıyla analiz edildi.

HCT-116 hücrelerinin canlılık yüzdesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

(İnkübe edilen hücrelerin optik yoğunluğu – boş optik yoğunluğu) / (İnkübe edilmeyen hücrelerin optik yoğunluğu – boş optik yoğunluğu) × 100

Hücre Lizatının Hazırlanması ve Biyokimyasal Ölçümler

Boraksın biyokimyasal açıdan HCT-116 hücrelerindeki MDA, 8-OHdG, GPx4 ve ACSL4 seviyeleri üzerindeki etkilerini belirlemek için öncelikle hücre lizatları hazırlandı. MTT sonuçlarına göre belirlenen boraksın IC25, IC50 ve bir ara konsantrasyonu ile HCT-116 hücrelerin 24 süreyle inkübe edildi. Ardından, kültür kabına yapışık hücreler, soğuk fosfat tamponu (pH 7.0) ile yıkandı ve daha sonra tripsin eklenerek kültür ortamından ayrılması sağlandı ve 4°C'de 10 dakika boyunca 1000×g'de santrifüjlendi. Toplanan hücreler, pH 7.0'deki fosfat tamponu ile üç kez yıkandı ve lizis tamponu (RIPA) yeniden süspansiyon edilerek 4°C'de 15 dakika boyunca ile inkübe edildi. Son olarak, hücre kalıntıları, 4°C'de 30 dakika boyunca 10000×g'de santrifüjlenerek uzaklaştırıldı. Hücrelerdeki protein seviyeleri Lowry ve ark. (15) yöntemine göre ölçüldü. Hazırlanan hücre lizatları, biyokimyasal analizler için hemen kullanıldı.

Ferroptozun önemli biyobelirteçleri olan ACSL4 ve GPx4 seviyelerinin yanı sıra DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG, boraks ile inkübe edilen hücre lizatlarından, bir mikropilaka okuyucu kullanılarak ticari olarak mevcut kitler (sırasıyla MBS9331516, MBS2000338 ve CSB-E10140h) kullanılarak ölçüldü. Analizi için öncelikle kit bileşenlerinin oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. ACSL4, GPx4 ve 8-OHdG analizi için önceden uygun antikorlar ile kaplanmış plakalar kullanılarak üretici talimatları doğrultusunda reaksiyon ortamına eklenen reaktif sonucu oluşan renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Sonuçlar ng/mg protein olarak ifade edildi.

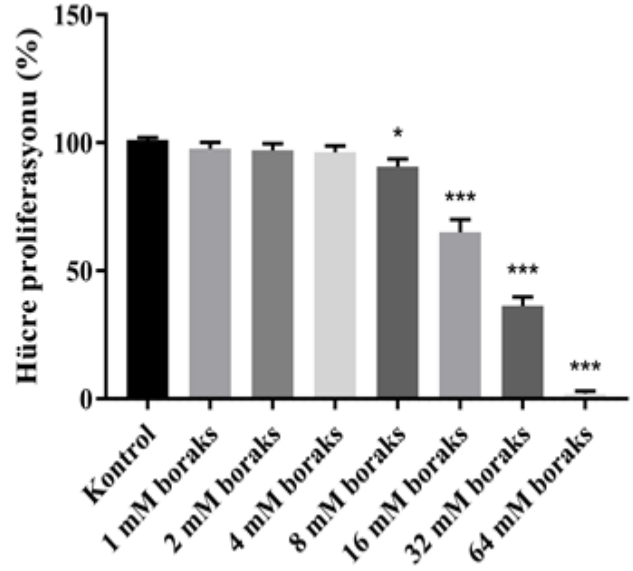
Lipit peroksidasyonunun önemli bir biyolojik belirteci olan MDA'nın, boraks ile inkübe edilen HCT-116 hücre lizatlarında, ticari olarak mevcut bir kit (MAK085-1KT Sigma-Aldrich) kullanılarak üreticinin talimatlarına doğrultusunda mikropilaka okuyucu yardımıyla 532 nm'de kolorimetrik olarak ölçüldü. Sonuç seviyeleri nmol/mg protein olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

DeneySEL protokolün üç kez tekrarlanmasının ardından bağımsız gruplara ait veriler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. Verilerin normallik analizi Shapiro-Wilk normallik testi yardımıyla yapılmıştır. Normal dağılıma uyan veriler, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey posthoc testi kullanıldı. İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism 7 programları kullanıldı. p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hücre canlılığı analizi HCT-116 hücrelerinin boraksın 1, 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 mM konsantrasyonları ile 24 saat süreyle inkübe ederek gerçekleştirildi. Tüm hücre canlılığı yüzdeleri ve önem seviyeleri, Şekil 1'de sunulmuştur. İnkübasyon sonunda, 1, 2 ve 4 mM boraks konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla HCT-116 hücrelerinin canlılığında önemli bir azalmaya neden olmamıştır (p>0,05). Kontrol ile karşılaştırıldığında 8 mM'lık konsantrasyon, önemli sitotoksositeye sahip olan ilk boraks konsantrasyonu (p=0,014). Bununla birlikte, 8 mM ve üzerindeki boraks konsantrasyonlarında hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 8, 16, 32 ve 64 mM boraks konsantrasyonlarında hücre canlılıkları sırasıyla %8,6, % 35,8, %65,2 ve %97,4 (p=0,014 ve p<0,001). MTT sonuçlarına göre, HCT-116 hücreleri için IC25 ve IC50 konsantrasyonları sırasıyla 12,5 mM ve 20,8 mM olarak belirlendi. Biyokimyasal analizler sırasında IC25 ve IC50 konsantrasyonlarına ek olarak 16,2 mM boraks bir ara konsantrasyon olarak kullanıldı.



Şekil 1. HCT-116 kolorektal hücrelerindeki boraks uygulamasının hücresel proliferasyon üzerindeki etkileri. * p<0,05; *** p<0,001 kontrol grubuna göre

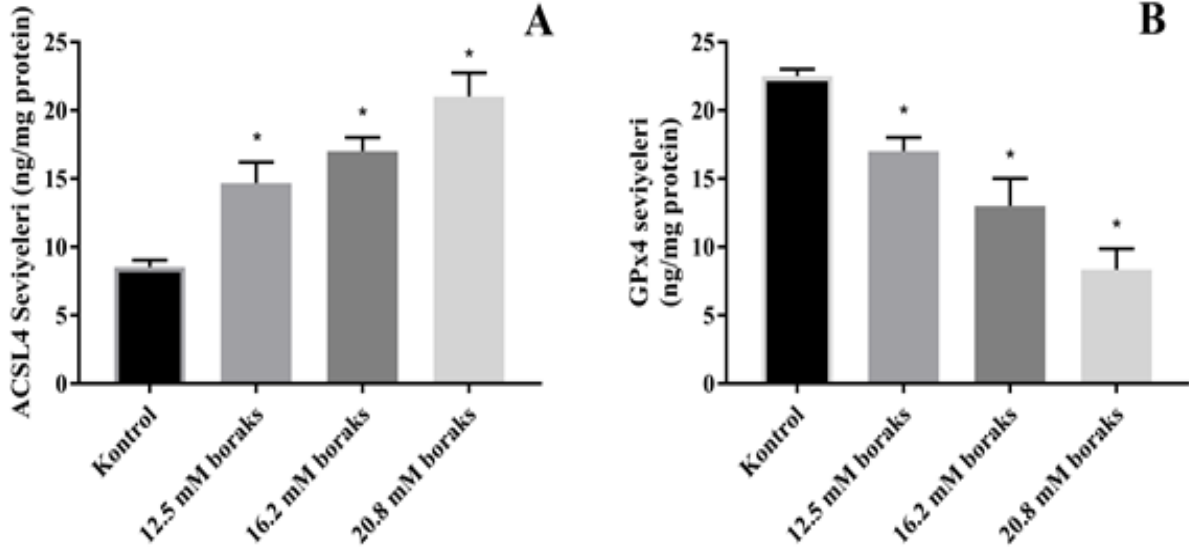
12,5, 16,2 ve 20,8 mM boraks konsantrasyonu ile tedavi edilen HCT-116 hücrelerindeki GPx4 ve ACSL4 seviyeleri, Şekil 2A ve B'de gösterilmiştir. 24 saat boyunca 12,5, 16,2 ve 20,8 mM boraks konsantrasyonları ile inkübe edilen hücreler, ACSL4 seviyelerinde kontrol grubundaki hücrelere kıyasla sırasıyla %54,2, %76,3 ve %106,2'lik istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi (p<0,001). Öte yandan, boraks ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerindeki GPx4 seviyeleri kontrole göre sırasıyla %35,1, %64,4 ve %83,7 oranında istatistiksel olarak azaldı (p<0,001). Genel olarak boraksın konsantrasyon bağımlı bir şekilde ferroptozu indüklediğini gözlemledik.

Şekil 3'de gösterildiği gibi, 12,5, 16,2 ve 20,8 mM boraks ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerinde, kontrole kıyasla artan boraks konsantrasyonlarıyla birlikte 8-OHdG seviyelerinde önemli bir artışa neden oldu. 12,5 ve

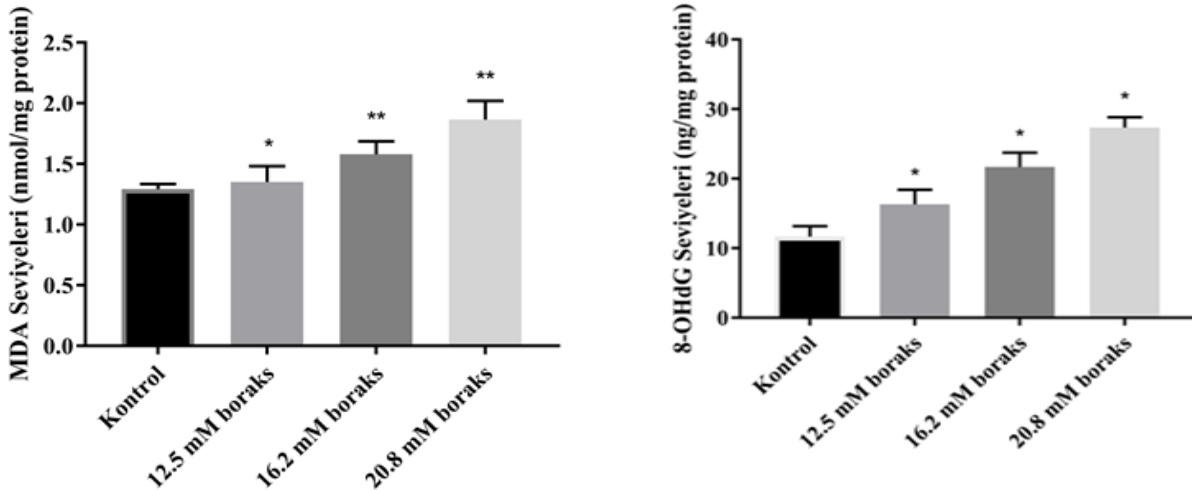
16,2 mM'lik boraks konsantrasyonu, kontrol ile karşılaştırıldığında 8-OHdG seviyelerinde sırasıyla %53,1 ve %118,4'lik artışla sonuçlandı ($p<0,001$). Ayrıca, 20,8 mM boraks konsantrasyonunda 8-OHdG seviyelerin yaklaşık 3 katlık yükselişe en büyük artışa yol açmıştır ($p<0,001$).

Boraks inkübasyonu sonrası HCT-116 hücrelerinde lipit peroksidasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı

bir artış gözlemlendi. Boraks, HCT-116 hücrelerinde MDA seviyelerinde önemli konsantrasyon bağımlı bir artışa yol açmıştır. Artan konsantrasyonlarda boraks ile inkübe edilmiş hücrelerde MDA seviyeleri, Şekil 4'de gösterilmiştir. Kontrol grubu kıyaslandığında 12,5, 16,2 ve 20,8 mM boraks ile inkübe edilen HCT-116 hücrelerindeki MDA seviyeleri sırasıyla %13,5, %38,2 ve %66,4'lük artış göstermiştir ($p=0,0026$ ve $p<0,001$).



Şekil 2. HCT-116 kolorektal hücrelerindeki boraks uygulamasının ferroptoz biyobelirteçleri üzerindeki etkileri. A: ACSL4 seviyeleri; B: GPx4 seviyeleri; GPx4: Glutasyon peroksidaz; ACSL4: Açıl-KoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4; * $p<0,001$ kontrol grubuna göre



Şekil 3. HCT-116 kolorektal hücrelerindeki boraks uygulamasının lipit peroksidasyonu üzerindeki etkileri. MDA: Malondialdehit; * $p<0,01$; ** $p<0,001$ kontrol grubuna göre

Şekil 4. HCT-116 kolorektal hücrelerindeki boraks uygulamasının DNA hasarı üzerindeki etkileri. 8-OHdG: 8-hidroksi deoksiguanozin; * $p<0,001$ kontrol grubuna göre

TARTIŞMA

Dünya nüfusunun yaşlanması ve risk faktörlerinin artması nedeniyle kanser insidansı sürekli artmaktadır. Tüm kanser türleri arasında kolon kanseri yüksek insidans ve mortalite oranlarına sahiptir (16). Erken tanıdaki artış ve yeni geliştirilen tedavi yöntemlerinin başarısı nedeniyle sağkalım oranlarında kısmi iyileşme olmuştur. Ancak, 5 yıllık sağkalım oranları hala %60'ın altındadır (17). Tedavinin başarısı, kanser hücrelerinin moleküler profiline ve toksik etkilerin düzeyine bağlıdır (18). Sentetik kemoterapötik ilaçların yan etkilerinden dolayı, başta kolon kanseri olmak üzere birçok kanserin tedavisi için çeşitli doğal bileşikler, besinler ve fitokimyasallar araştırılmıştır (19). Bu alanda biyoaktif bor bileşikleri, daha önceki makalelerde incelenen önemli özellikleri ile araştırılan moleküllerden biridir (20). Bor bileşikleri ve tuzları, endüstriyel alanlarda bakteri ve mantarları öldürmek için antiseptik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Mikroorganizma büyümesini inhibe etme yeteneğinden dolayı bazı gıda ürünlerinin korunmasında borik asidin kullanıldığı bildirilmiştir (21). Son yıllarda kanserle ilişkili çalışmalarda bor bileşikleri kullanılmaya başlanmıştır. Ek olarak, fenilboronik asit, guanidin biborik asit, dihidroksi bor hidroklorür monohidrat, borik asit ve sodyum tetraborat gibi bor türevi bileşiklerin B16F10 murin melanomu, HL-60 ve U-937 insan lösemi hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri olduğu belgelenmiştir (22,23). Bir başka çalışmada, borik asidin insan prostat kanseri ve insan kolon adenokarsinom hücreleri proliferasyonu üzerindeki inhibisyonunu araştırmak için borik asit içeren besiyeri eklenmiş ve daha sonra hücrelerde proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü ve mitokondriyal aktivasyon açısından DU145, LNCaP, PC3 ve SW-480 kanser hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu açıkça azalttığı tespit edilmiştir (24,25). Benzer şekilde, daha önce bir çalışmamızda borik asidin DU-145 kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak proliferasyonu engellemiş ve morfolojik deformitelere ve oksidan stresi artırarak da apoptoza neden olduğunu bulduk (26). Bu çalışmada, CRC kanser hücre hatları üzerinde yukarıda bahsedilen anti-proliferatif ve apoptotik etkileri nedeniyle sitotoksik ajan olarak boraksı seçtik. Bugüne kadar, çoğu çalışma borik asidin hücre proliferasyonu ve sitotoksikite üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bu nedenle bu çalışmada HCT-116 hücrelerinin 24 saatlik boraks maruziyetinin ferroptoz üzerinden verdiği yanıtları göstermeyi hedefledik. Sonuçlarımızda, boraksın, kolorektal kanser HCT-116 hücrelerinde GPx4/ACSL4 sinyal yolunun lipit peroksidasyon aracılı anti-tümör aktiviteler gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Son yıllarda birçok araştırmacı bor ve bileşikleri üzerinde çeşitli deneysel çalışmalar yapmışlardır. Acerbo ve ark. farklı zaman aralıklarında (1-10 gün) SK-MEL-28 insan melanom hücrelerinin canlılığı üzerindeki değişen borik asit (5-50 mM) dozlarının etkisini tripan mavisi yöntemiyle araştırmıştır. Burada borik asidin hücre canlılığını azalttığı ve doza ve zamana bağlı bir şekilde apoptoza neden olduğu bulunmuştur (27). Ayrıca borik asidin özellikle yüksek dozlarda DU-145, PC-3 prostat ve ZR-75-1 meme hücre dizilerinde hücre göçünü engellediği ve 8 gün sonra hücre canlılığını azalttığı da bildirilmiştir (28). Ek olarak, MDA-MB-231 meme

kanseri hücrelerinde, borik asidin hücre büyümesini inhibe ettiği de bildirilmiştir (29). Bir bor bileşiği olan boraksın HCT-116 kolorektal kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmak için yaptığımız çalışmamızda MTT yöntemi ile hücre canlılığı analizi gerçekleştirdik. Burada 24 saatlik süre boyunca hücre canlılığında konsantrasyon bağımlı bir azalma gözlemledik.

CRC, sindirim sisteminin çok yaygın bir malign tümörüdür. CRC tedavisinde okzaliplatin ve fluorourasil gibi çeşitli kemoterapi ilaçları uygulanmış olmasına rağmen mortalite oranı hala çok yüksektir. Son yıllarda onkoloji alanında ferroptoz üzerine odaklanan araştırmalar oldukça yoğundur ve ayrıca CRC ile ferroptoz arasındaki ilişkiyi ortaya koyan birçok bilimsel başarı da bulunmaktadır (30). Ferroptoz, esas olarak hücre içi demir birikimi ve lipit peroksidasyonu ile indüklenen bir hücre ölümü şeklindedir. Aşırı demir, Fenton reaksiyonu ile ROS üretimi yoluyla ferroptozu katkıda bulunur; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) bağımlı lipit peroksidasyonu ve GSH tükenmesi de ferroptozun uyarılmasında çok önemli roller oynar (31). GPx4, lipit hidroperoksitleri toksik olmayan lipit alkollere indirgemek için kofaktörü olarak GSH'yi kullanır, böylece çift fosfolipit katmanlarının bütünlüğünü korur ve ferroptozu önler. GPx4'ün farmakolojik veya genetik olarak inaktivasyonu, toksik lipit peroksitlerin şiddetli birikimine yol açar ve ferroptozu tetikler (32). Deneysel çalışmalar, tagitinin C'ye maruz kalan HCT-116 hücrelerinde ROS, lipit peroksidasyonu, MDA ve kararsız demir havuzu seviyelerinde artış ve GPx4 ve GSH seviyelerindeki düşüşle ferroptozun indüklediği göstermiştir (33). Bir başka çalışmada, demir homeostazını düzenleyen bir siderofor proteini olan lipokalin 2 aşırı ekspres edildiğinde, hücre içi demir seviyelerini azaltarak ve GPx4 ve xCT ekspresyonunu uyararak ferroptozu azaltabileceği, bunun da hem *in vitro* hem de *in vivo* kolorektal kanser hücrelerinde 5-florourasil direncine yol açabileceğini göstermiştir (34). Çalışmamızın sonuçları, ferroptozun göstergesi olan lipit peroksidasyonu ve ACSL4 düzeylerinin konsantrasyona bağlı olarak artarken, GPx4 düzeylerinin düştüğünü göstermiştir. Dahası, boraksın IC50 konsantrasyonunda MDA ve 8-OHdG seviyelerini artırdığını tespit ettik. Bildiğimiz kadarıyla, farklı olası hedefler için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı ferroptoz indükleyici bileşikler olmasına rağmen, kolorektal kanseri üzerinde onaylanmış ferroptoz indükleyen moleküller yoktur. Bor türevi bileşik olan boraksın HCT-116 kolorektal hücre hattı üzerinde ferroptozu indüklediğini ilk kez belirledik.

SONUÇ

Bugüne kadar, çok sayıda araştırma, CRC'de ferroptozun olası rollerini araştırmıştır. Ferroptoz, yavaş yavaş tümör direncinin tersine çevrilmesi alanında bir araştırma noktası haline gelen, hücre içi ROS birikimi ile karakterize edilen, demire bağımlı, apoptotik olmayan, hücre ölümünün yepyeni bir yoludur. Yukarıda bahsi geçen çalışmalarda, klasik oksidatif stres yolunun ferroptozu indüklemek için önemli bir nedensel faktör olduğunu göstermiştir. CRC patofizyolojisi üzerine yapılan kapsamlı araştırmalarla, CRC direnç

mekanizması giderek daha fazla tartışılmaktadır. Kanser hücrelerinde ferroptozun indüklenmesinin, çoklu kemoterapötiklerin ve hedeflenen preparatların direncini tersine çevirdiği ve ilaçların terapötik etkilerini arttırdığını doğrulanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada, boraks uygulamasının, CRC hücre hattında ferroptoz indükleyerek tümör hücrelerini canlılığını baskılaya bileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak, boraks, HCT-116 hücrelerinde ferroptoz dahil olmak üzere sitotoksik etkiler göstermiştir. Kayda değer şekilde, boraks ferroptozun indüklemesine neden olduğu etki, HCT-116 hücrelerindeki lipit peroksidasyonunu da artırarak anti-proliferatif etkileri güçlendirdiği ortaya konmuştur. Anti-kanser etkinlik, boraks uygulamasıyla ferroptoz duyarlı olmayan HCT-116 hücrelerini ferroptotik hücre ölümüne duyarlı hale getirdi. Ek olarak, boraksın ayrıca ferroptozun indüklemesinin yanı sıra DNA hasarı ile sinerjik sitotoksositeye sahip olduğunu bulduk. Bu da, kanserde ilaç direncinin üstesinden gelmek için yeni terapötik strateji hakkında fikir verebilir. Öte yandan, mevcut verileri destekleyebilecek moleküller temellere sahip ferroptoz biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin araştırıldığı farklı CRC hücre hatları ve *in vivo* modelleri içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

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

KAYNAKLAR

- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet*. 2019; 394(10207): 1467-80.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
- Henrikson NB, Webber EM, Goddard KA, Scrol A, Piper M, Williams MS, et al. Family history and the natural history of colorectal cancer: systematic review. *Genet Med*. 2015; 17(9): 702-12.
- Schoen RE, Razzak A, Yu KJ, Berndt SI, Firl K, Riley TL, et al. Incidence and mortality of colorectal cancer in individuals with a family history of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2015; 149(6): 1438-45.
- Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013; 86(3): 232-50.
- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(4): 252-71.
- Dixon SJ. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev*. 2017; 277: 150-7.
- Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73: 2195-209.
- Bano I, Horky P, Abbas SQ, Majid M, Bilal AHM, Ali F, et al. Ferroptosis: A new road towards cancer management. *Molecules*. 2022; 27(7): 2129.
- Guo C, Liu P, Deng G, Han Y, Chen Y, Cai C, et al. Honokiol induces ferroptosis in colon cancer cells by regulating GPX4 activity. *Am J Cancer Res*. 2021; 11(6): 3039-54.
- Yılmaz S, Ustundag A, Cemiloglu Ulker O, Duydu Y. Protective effect of boric acid on oxidative DNA damage in chinese hamster lung fibroblast V79 cell lines. *Cell J*. 2016; 17(4): 748-54.
- Turkez H, Geyikoglu F, Tatar A, Keles MS, Kaplan I. The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *Exp Toxicol Pathol*. 2012; 64(1-2): 93-101.
- Kar F, Hacıoglu C, Senturk H, Donmez DB, Kanbak G. The role of oxidative stress, renal inflammation, and apoptosis in post ischemic reperfusion injury of kidney tissue: the protective effect of dose-dependent boric acid administration. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 195(1): 150-8.
- Özyarım ŞC, Karabağ Çoban F. Investigation of the apoptotic and antiproliferative effects of boron on CCL-233 human colon cancer cells. *Cell J*. 2021; 23(4): 429-34.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-75.
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol*. 2017; 3(4): 524-48.
- Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010; 375(9719): 1030-47.
- Biller LH, Schrag D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: A Review. *JAMA*. 2021; 325(7): 669-85.
- Rajamanickam S, Agarwal R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects. *Drug Dev Res*. 2008; 69(7): 460-71.
- Hadrup N, Frederiksen M, Sharma AK. Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 121: 104873.
- Yang W, Gao X, Wang B. Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Med Res Rev*. 2003; 23(3): 346-68.
- Deshayes S, Cabral H, Ishii T, Miura Y, Kobayashi S, Yamashita T, et al. Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J Am Chem Soc*. 2013; 135(41): 15501-7.

23. Canturk Z, Tunali Y, Korkmaz S, Gulbaş Z. Cytotoxic and apoptotic effects of boron compounds on leukemia cell line. *Cytotechnology*. 2016; 68(1): 87-93.
24. Wade TB, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett*. 2004; 216(1): 21-9.
25. 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.
26. Hacıoglu 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.
27. Acerbo AS, Miller LM. Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging. *Analyst*. 2009; 134(8): 1669-74.
28. Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adh Migr*. 2008; 2(3): 153-60.
29. 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.
30. Farhadi P, Yarani R, Dokaneheifard S, Mansouri K. The emerging role of targeting cancer metabolism for cancer therapy. *Tumour Biol*. 2020; 42(10): 1010428320965284.
31. Hassannia B, Vandenabeele P, Berghe TV. Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell*. 2019; 35: 830-49.
32. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon SJ, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell*. 2017; 171(2): 273-85.
33. Wei R, Zhao Y, Wang J, Yang X, Li S, Wang Y, et al. Tagitinin C induces ferroptosis through PERK-Nrf2-HO-1 signaling pathway in colorectal cancer cells. *Int J Biol Sci*. 2021; 17(11): 2703-17.
34. Liu L, Yao H, Zhou X, Chen J, Chen G, Shi X, et al. MiR-15a-3p regulates ferroptosis via targeting glutathione peroxidase GPX4 in colorectal cancer. *Mol Carcinog*. 2022; 61(3): 301-10.