

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinde Biyoaktif Ajan Olarak Kiral Grup İçeren Bor Bileşiklerinin Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of Cytotoxic Effects of Boron Compounds Containing Chiral Group as Bioactive Agents in A549 Lung Cancer Cells

Nilgün OKŞAK¹ , Ahmet KILIÇ² 

¹Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Şanlıurfa, TÜRKİYE

²Harran Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Şanlıurfa, TÜRKİYE

Öz

Amaç: Sinsi şekilde ilerleyerek geç evrede teşhis edilen akciğer kanserinde hastalığın nüksetmesi, ilaç direncinin gelişmesi veya klasik tedavi etkinliğinin sınırlı olması hala bir sorun olmaya devam etmektedir. Tedaviyi zorlayan bu faktörler araştırmacıları yeni arayışlara yönlendirmektedir ki; son zamanlarda bor içeren bileşikler, kanser türlerinde sitotoksik veya genotoksik etkilerinden dolayı ilgi çekmektedir. Bu nedenle çalışmada ilk kez kiral grubu bor temelli bileşiklerin insan alveolar hücre adenokarsinomu olan A549 hücre hattında sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve metod: T₁B₁ ve T₁B₂ bileşikler daha önce açıklanan yöntemler üzerinde bazı stokiyometrik oranlarda değişiklikler yapılarak Dean-Stark sisteminde uygun reaksiyon koşullarında yeniden sentezlendi. Sentezlenen T₁B₁ ve T₁B₂ bileşikler, 10-60 µg/ml konsantrasyonlarda 6 dozda A549 hücrelere 48 ve 72 saat ayrı ayrı uygulandı. A549 adenokarsinoma hücrelerinde kiral grup içeren üç koordineli bor bileşikler olan T₁B₁ ve T₁B₂'nin sitotoksik etkileri kolorimetrik olarak MTT yöntemiyle belirlendi. Ardından elde edilen optik dansite (OD) verilerinden yararlanılarak her bileşiğe ait IC₅₀ değeri hesaplandı.

Bulgular: Elde edilen sonuçlara göre 10-60 µg/ml konsantrasyon aralığında çalışılan biyoaktif ajan olarak kiral grup içeren üç koordineli T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşikler A549 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri tespit edildi. Kontrol grubuna göre her iki bileşiğin tüm konsantrasyonlarında önemli düzeyde sitotoksik etki olduğu belirlendi (p<0.001). IC₅₀ değerlerine baktığımızda, T₁B₁ bileşiği için 48 saatte 15.84 µg/ml ve 72 saatte 12.22 µg/ml olarak, T₁B₂ bileşiği için 48 saatte 19.62 µg/ml ve 72 saatte 13.59 µg/ml olarak hesaplandı. Bu bor bileşiklerden T₁B₁'in sitotoksik aktivitesinin daha güçlü olduğu belirlendi.

Sonuç: A549 hücrelere uygulanan T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerin artan zamana ve konsantrasyonlara bağlı olarak proliferasyonu azalttığı ve sitotoksik etki oluşturduğunu belirledik. Gelecekte yeni sentezlenecek bor bileşiklerin kanser hücrelerindeki biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar üzerinde etki mekanizmalarının daha detaylı açıklanması kanserle mücadelede ve tedavisindeki rolünün belirlenmesi açısından önemli olacaktır.

Anahtar Kelimeler: A549, antikanser, bor bileşikler, sitotoksikite, MTT yöntemi

Abstract

Background: In lung cancer, which progresses insidiously and is diagnosed at a late stage, recurrence of the disease, development of drug resistance or limited efficacy of conventional treatment remains a problem. These treatment challenging factors lead researchers to new researches; recently, boron-containing compounds have attracted interest due to their cytotoxic or genotoxic effects in cancer types. Therefore, the aim of this study was to investigate for the first time the cytotoxic effect of chiral group boron-based compounds in human alveolar cell adenocarcinoma A549 cell line.

Materials and Methods: Compounds T₁B₁ and T₁B₂ were re-synthesized in the Dean-Stark system under suitable reaction conditions by modifying some stoichiometric ratios based on the previously described methods. The cytotoxic effects of T₁B₁ and T₁B₂, three coordinated boron compounds containing chiral groups as bioactive agents in A549 adenocarcinoma cells, were determined calorimetrically by the MTT method. For this purpose, the synthesized compounds were used at concentrations of 10-60 µg/ml and incubated with A549 cells for 48 and 72 hours. Then, the IC₅₀ value of each compound was calculated using the optical density (OD) data obtained.

Results: According to the results obtained, cytotoxic effects of three coordinated T₁B₁ and T₁B₂ boron compounds containing chiral groups as bioactive agents studied in the concentration range of 10-60 µg/ml were determined on A549 cell line. It was determined that significant cytotoxic effect occurred at all concentrations of both compounds compared to the control group (p<0.001). The IC₅₀ values for compound T₁B₁ were calculated as 15.84 µg/ml at 48 h and 12.22 µg/ml at 72 h, while for compound T₁B₂, the IC₅₀ values were 19.62 µg/ml at 48 h and 13.59 µg/ml at 72 h. This indicated that the cytotoxic activity of T₁B₁ was stronger than that of boron compounds.

Conclusions: It was determined that T₁B₁ and T₁B₂ boron compounds applied to A549 adenocarcinoma cells decreased proliferation and produced a cytotoxic effect, depending on increasing concentration and time. Further elucidation of the biochemical and molecular mechanisms of newly synthesized boron compounds will become important in terms of determining their role in cancer prevention and treatment.

Keywords: A549 cell, anticancer, boron compounds, cytotoxicity, MTT method

Sorumlu Yazar / Corresponding Author

Dr. Nilgün OKŞAK

Harran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Şanlıurfa, TÜRKİYE

E-mail: nilgunoksak@harran.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 20.02.2025

Kabul tarihi / Accepted: 12.08.2025

DOI: 10.35440/hutfd.1643464

Giriş

Akciğer kanseri, kanser ölümlerinin önde gelen nedeni olup dünya çapında yılda 1,76 milyon ölüme sebep olmaktadır (1). Yeni kanser teşhislerinin ve ölümlerin önemli bir bölümünü oluşturan akciğer kanseri sinsi ve yıkıcı bir tehdit olmaya devam etmektedir (2). Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olarak iki türü mevcuttur. KHOAK, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini temsil eder ve adenokarsinom en yaygın alt türüdür. KHAK kalan %15'i oluşturur ve genellikle daha agresif bir şekilde seyreder (3). Akciğer kanserinde çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır. Asbest, radon ve diğer kanserojen maddelere maruz kalma, aile öyküsünün pozitif olması (4) ve en önemlileri sigara içimi ile pasif içicilik (5) bu kansere yakalanma riskini artırmaktadır. Bu hastalığın sinsi şekilde kritik noktaya kadar ilerlemesi geç evrede teşhis edilmesine yol açmakta ve bu durum tedaviyi zorlaştırmaktadır (6). Buna ek olarak hastalığın nüksetmesi, ilaç direncinin gelişmesi ve klasik tedavi etkinliğinin sınırlı olması da hala bir sorun oluşturmaktadır. İkinci basamak tedavide tercih edilen bağışıklık temelli nivolumab, pembrolizumab ve atezolizumab sağ kalımı artırırsa da tüm hastalar immünoterapiye cevap veremeyebilir (7). Vinorelbin, gemtabin, pemetreksat ve paklitaksel gibi platin içerikli sitotoksik ilaçlar (8) önemli yan etkiler oluşturabilir. Tüm bu sebepler akciğer kanseri için yenilikçi tedavi arayışına yol açmaktadır. Bu yenilikçi tedavinin hedefi, kanser hücrelerinde seçici sitotoksik ve/veya antiproliferatif etkiler gösterebilen ve böylece normal hücrelerde toksik yan etkiler oluşturmayan terapötik ajanların keşfidir.

Türkiye'nin dünyanın en zengin bor kaynaklarına sahip olduğu bilinmektedir. Ülkemiz toplam dünya rezervinin %72,1'ine sahiptir. Bor oksijen, hidrojen ve su ile tepkimeye girebilir, su ile tepkimeye girdiğinde çeşitli bor bileşenleri oluşmaktadır (9). Oluşan bu bileşikler gıda endüstrisi ya da sağlık sistemlerinde farklı amaçlarda kullanılmaktadır. Borik asit, boraks, kolemanit, kernit, üleksit ve diğer boratlar su yumuşatıcıları, gıda koruyucuları, stabilizatörler, emülgatörler, pH ayarlayıcılar ve tamponlar gibi çeşitli uygulamalarda kullanılır (10-13). Özellikle son zamanlarda bor içeren bileşikler tıp ve eczacılık sektöründe kullanılması nedeniyle ilgi çekmektedir. Örneğin borun steroid hormon metabolizmasında, kemik gelişiminde ve hücre zarının yapısı ve işlevlerini yerine getirilmesinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir (14). Yine karbonhidrat, mineral metabolizması, enerji tüketimi, çeşitli enzim aktivitelerinin düzenlenmesi ve embriyonik gelişim süreçleri gibi çeşitli mekanizmaları da etkilediği de raporlanmıştır (15). Borun antioksidan savunma mekanizmalarını indükleyerek reaktif oksijen türleri (ROS) elimine ettiğini ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (16-19). Ayrıca bor bileşiklerinin bazı kanser türlerinde sitotoksik veya genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Kuersetin-boronat esterlerinin pankreas kanseri hücrelerinde önemli düzeyde hücre canlılığını azalttığı raporlanmaktadır (20). Benzer şekilde spiro-

borat bileşiklerin A549 akciğer kanseri hücrelerinde anti-kanser aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (21). Bununla birlikte kandaki yüksek borik asit seviyesinin prostat kanseri riskini düşürdüğü ve bunu intrasellüler Ca^{+2} sinyalini ve depolanmasını azaltarak gerçekleştirebileceği tahmin edilmektedir (22). Sodyum pentaboratın kanser ve sağlıklı insan akciğer hücrelerinde sitotoksik ve genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada, bu bileşiğin hücre canlılığını anlamlı düzeyde azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu bileşik yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında hücre içi ROS seviyesini artırarak genotoksik etkiye yol açtığı düşünülmektedir (23). U251 insan glioblastoma hücre hattında da borik asitin sitotoksik etki göstermiştir (24). Borik asidin antikanser özelliklerine ek olarak karaciğerde koruyucu etki gösterdiği de bildirilmektedir (25). Borun sahip olduğu yapısal ve fonksiyonel rollerle biyokimyasal yolları desteklemesi birçok alanda tercih edilmesine neden olmaktadır (22). Borun yukarıda bildirilen üstün özelliklerinden dolayı bu çalışmada daha önce sitotoksik etkisi bilinmeyen bor temelli iki bileşiğin, insan alveolar hücre adenokarsinomu olan A549 hücre hattında sitotoksik etkisi değerlendirildi. Bu çalışmada biyoaktif ajan olarak kiral grup içeren üç koordineli bor bileşiklerinin (T_1B_1 ve T_1B_2) radikal süpürücü aktivite gösterdiği ve antioksidan etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (26). Önceki çalışmalarımızda nefrotoksisite oluşturulan sağlıklı insan proksimal tübül hücre olan HK-2 hattında, T_1B_1 ve T_1B_2 bileşiklerin nefro koruyucu ve antiinflamatuar etkiye sahip olduğu tespit edildi (veriler henüz yayınlanmadı). Bu sonuçlardan yola çıkarak bu çalışmada kiral grubu bor temelli bileşiklerin ilk kez insan alveolar hücre adenokarsinomu olan A549 hücre hattında sitotoksik etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod

Bileşiklerin Hazırlanması ve Yapısal Analizi

Test edilen ve Şekil 1'de formülü verilen T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşikler daha önce açıklanan yöntemler üzerinde bazı stokiometrik oranlarda değişiklikler yapılarak Dean-Stark sisteminde uygun reaksiyon koşullarında yeniden sentezlendi (26). Burada ilk olarak 3,4-dihidroksibenzaldehit ve (R)-(+)- α -etil benzilaminin 1:1 mol oranlarındaki karışımları birkaç damla zayıf asit varlığında 6 saat süre ile reflakse edildi. Daha sonra karışımdaki çözücü evaporatörde buharlaştırıldı ve elde edilen katı bileşik CH_2Cl_2/C_2H_5OH (1:3) kristallendirildi. Böylece (T_1) bileşiği saf olarak elde edildi. Bunun devamında elde edilen saf katı bileşik ikiye ayrılarak birinin üzerinde uygun mol oranlarında ferrosen boronik asit, diğerinin üzerine ise 3,5-Bis(triflorometil)fenil boronik asit eklenerek saf T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşikler başarılı bir şekilde sentezlendi. Sentezleri başarılı bir şekilde gerçekleşen bu bor bileşiklerinin kalitesini belirlemek ve yapılarını detaylı açıklamak için 1H , ^{13}C ve ^{11}B NMR, FT-IR spektroskopisi, UV-Vis spektroskopisi, LC-MS/MS spektrometresi ve element analizi gibi çeşitli spektroskopik teknikler kullanıldı. Tüm tekniklerden elde edilen spektroskopik bulgular önerilen molekül yapıları ile uyumlu olduğu tespit edildi.

Sentezlenen ve yapıları farklı spektroskopik tekniklerle açıklanan bu kiral bor bileşiklerin stok çözeltileri dimetilsülfoksit (DMSO, Merck) içinde hazırlanırken, gerekli konsantrasyonlardaki çalışma çözeltileri uygun kültür ortamında seyreltilerek yapıldı.

Hücre Kültürü

Çalışma, Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Hücre Kültürü ve Kök Hücre Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirildi.

Bu çalışmada kullanılan insan alveolar hücre adenokarsinomu olan A549 hücre hattı ATCC'den temin edilmiştir. A549 hücreler, 100.000 U/L penisilin ve 100.000 g/L streptomisin (K952-100 MI) ilave edilen, %10 fetal siğir serumu (FBS, Gibco 10270-106) içeren DMEM (Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu) (Sigma-Aldrich) kültür ortamında büyütüldü. 25 cm²'lik flaklarda büyütülen hücreler 37 °C'de ve %5 CO₂'li etüv atmosferinde inkübe edildi. Hücrelerin kültür ortamı üç günde bir değiştirildi ve %70-90 konfluent olduklarında pasajlandı.

MTT Testi

İlk basamak tarama testi olan MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (Sigma-Aldrich) testi, hücre canlılığına dayanan sitotoksiteyi ölçen kantitatif ve kolorimetrik bir yöntemdir. Doğal ya da sentetik bileşiklerin sitotoksitesini değerlendirmede yaygın olarak kullanılan hassas, güvenilir ve ucuz bir testtir (27).

A549 hücreler, %70-90 konfluent olduğunda tripsinlenerek kaldırıldı ve tripan mavisi boyası ile canlılık oranları belirlendi. Ardından hücreler, 96 kuyucuklu kültür plağına her kuyucukta 10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler kontrol ve deney grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir bileşik uygulanmazken, deney grubu hücrelerine 10-60 µg/ml konsantrasyonlarda (10, 15, 20, 30, 40 ve 60 µg/ml konsantrasyonlarda) ayrı ayrı T₁B₁ ve T₁B₂ kiral grup içeren bor bileşikler eklendi. Daha sonra hücreler 37 °C'de ve nemli %5 CO₂ ortamında, 48 saat ve düşük dozda sitotoksik etki oluşturmak için 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda her kuyucuğa 0,5 mg/ml olacak şekilde 1x PBS'te (Merk Millipore, Almanya) hazırlanan MTT çözeltisinden 10 µl eklendi ve etüvde 37 °C'de, %5 CO₂ ortamında 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda formazan kristallerinin çözülmesi için her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenerek optik dansite (OD) değerleri mikropalak okuyucuda (MD Spectramax M5) 570 nm dalga boyunda okutuldu. OD değerleri kullanılarak her bileşiğe ait sitotoksite ve IC₅₀ değerleri (Hücre canlılığını 50 inhibe eden doz) hesaplandı. Her deney serisi üç kez tekrarlandı.

İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama ve standart sapma (SD) olarak ifade edildi. IC₅₀ değerinin hesaplanmasında Graphpad Prism 5.0.1 Programı kullanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Bileşiklerin

IC₅₀ değerleri doğrusal regresyonun uyumsuzluğu-doz inhibisyon analizi ve bileşiklerin doza bağımlı sitotoksik etkilerinin karşılaştırılmasında ise one-way ANOVA Testi Testi ve ardından Dunnet Çoklu Karşılaştırma Testi kullanıldı. Veriler "p<0.05" bulunması durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

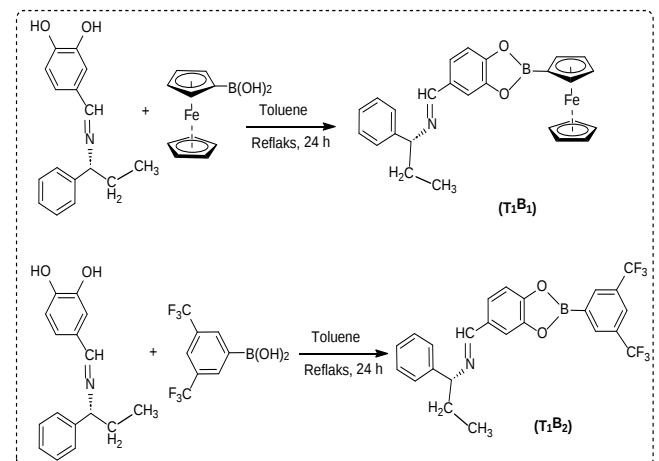
Bulgular

Bileşiklerin Sentezi

Bu çalışmada insan alveolar hücre adenokarsinomu olan A549 hücre hattında kiral grup içeren T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini araştırmak amaçlandı. Başarılı bir şekilde sentezlenen T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin (Şekil 1) ¹H, ¹³C ve ¹¹B NMR spektrumlarında ortaya çıkan kimyasal kaymaların belirlenen pozisyonlar çıkması yapıların başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Özellikle bu bor bileşiklerin en karakteristik pik olan imin (HC=N) piki ¹H NMR spektroskopisinde 8.69-8.17 ppm de ortaya çıktı. Bunun yanında ferrosen bazlı bor bileşiklerinde süstitüe olmayan siklopentadienil nedeniyle 4.30-4.04 ppm aralığında üç sinyal görüldü. NMR spektrumları incelendiğinde ise HC=N karbon pikleri sırasıyla 158.21 ve 160.77 ppm gözlemlendi. Diğer ¹H, ¹³C ve ¹¹B NMR kimyasal kaymaları da hedef bileşiklerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

FT-IR spektrumları incelendiğinde, en karakteristik pik olan azometin pikleri (HC=N) T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşikler için 1649 ve 1643 cm⁻¹ ortaya çıktı. Diğer aromatik ve alifatik gruplara ait eğilme ve gerilme titreşim frekansları da beklenen konumlarda ortaya çıkmıştır.

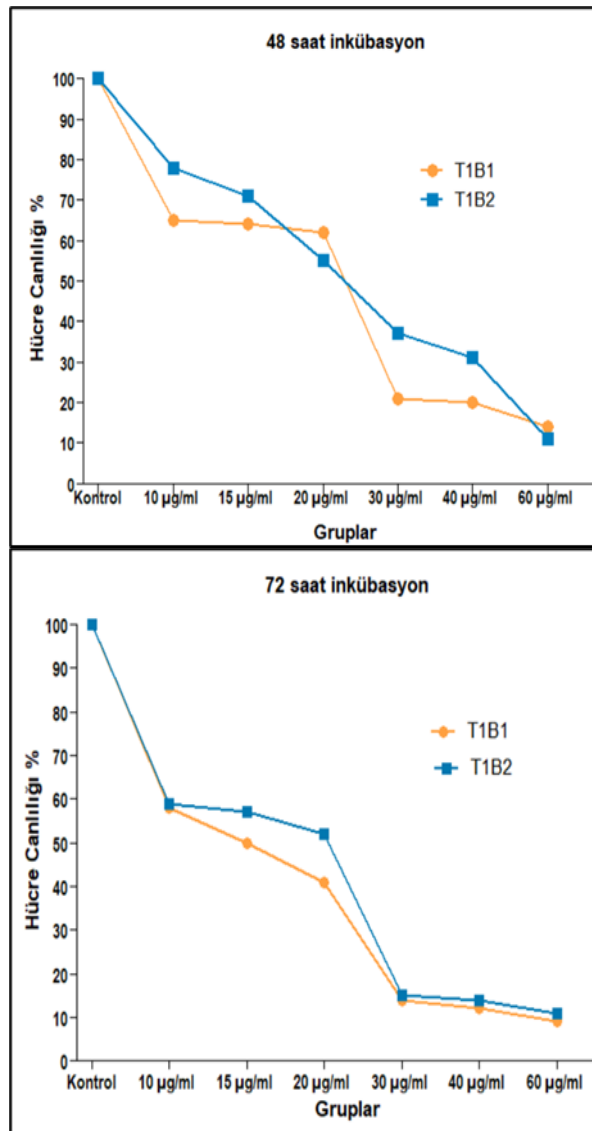
Sentezlenen T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin oluşumu için daha fazla doğrulamak için LC-MS/MS analizi de yapıldı. Yapılan bu analizler sonucunda T₁B₁ bileşiği için moleküller iyon piki m/z = 450.1 [M+H]⁺ ve T₁B₂ bileşiği için moleküller iyon piki m/z = 478.2 [M+H]⁺ olarak tespit edildi. Bu LC-MS/MS sonuçları da hedef T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin oluşumunu desteklemiştir. Ayrıca, CHN element analizi de bileşiklerin saflığını ve yapıların sentezini desteklemiştir.



Şekil 1. Biyoaktif ajan olarak kiral grup içeren üç koordineli bor bileşiklerinin (T₁B₁ ve T₁B₂) sentez metodu

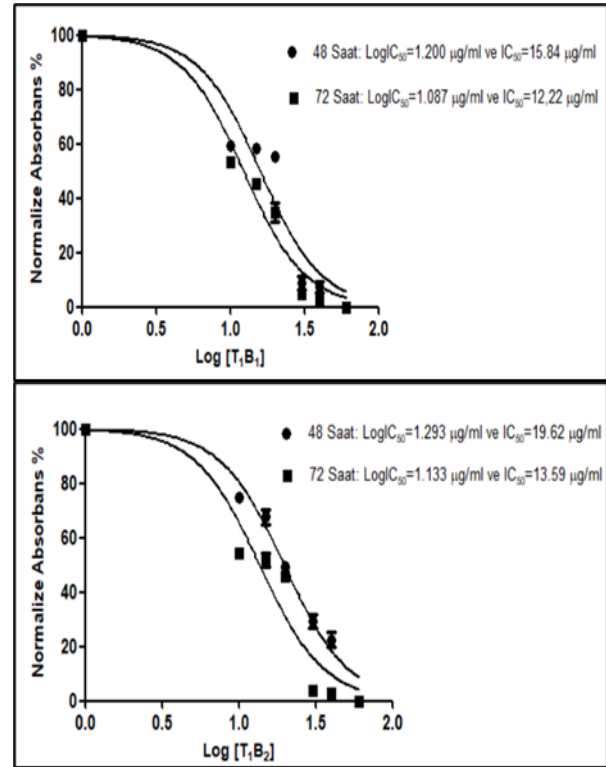
Sitotoksisite

Sitotoksik etkiyi değerlendirmek için MTT testi uygulandı ve her iki bileşik için IC_{50} değeri hesaplandı. Buna göre hem T_1B_1 hem de T_1B_2 bor bileşiği için 10-60 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarda elde edilen yüzde hücre canlılığı Şekil 2’de verilmiştir. Bulgularımıza göre kiral grup içeren bor bileşiklerin dozu ve inkübasyon süresi artırıldığında, hücre canlılığın azaldığı ve doza bağlı canlılık seviyesinin her iki bileşikte benzer olduğu tespit edildi. T_1B_1 bileşiği için 10-60 $\mu g/ml$ konsantrasyonlarda sırasıyla canlılık seviyesi, 48 saatte %65-14 aralığında iken; 72 saatte %58-12 aralığında belirlendi. Aynı konsantrasyonlarda hücreler T_1B_2 bor bileşiğiyle 48 saat inkübe edildiğinde canlılık seviyesi %78-11 aralığında hesaplanırken, 72 saat inkübe edildiğinde canlılık daha da azaldı ve %59-11 aralığında tespit edildi.



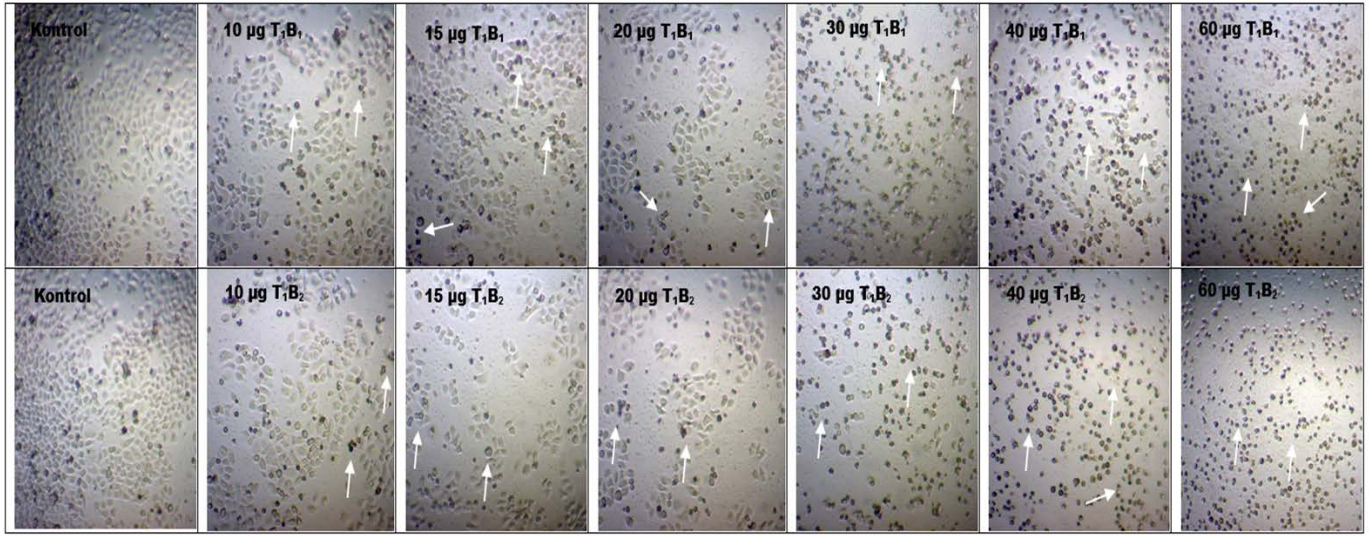
Şekil 2. A549 hücre hattında farklı dozlarda uygulanan kiral grubu bor bileşiklerine (T_1B_1 ve T_1B_2) bağlı yüzde canlılık değerleri

Şekil 3’te A549 hücrelerde kiral grup içeren T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşiklerin IC_{50} değeri gösterilmiştir. Bileşiklerin sitotoksik etkilerine baktığımızda T_1B_1 bileşiği için IC_{50} değeri, 48 saat inkübasyon sonrası 15.84 $\mu g/ml$ ($Log IC_{50}=1.200 \mu g/ml$) iken 72 saat inkübasyonda ise 12.22 $\mu g/ml$ ($Log IC_{50}=1.087 \mu g/ml$) olarak tespit edildi. Bu değer T_1B_2 bileşiğinde 48 saat inkübasyonda 19.62 $\mu g/ml$ ($Log IC_{50}=1.293 \mu g/ml$) olarak, 72 saat inkübasyonda ise 13.59 $\mu g/ml$ ($Log IC_{50}=1.133 \mu g/ml$) olarak hesaplandı.



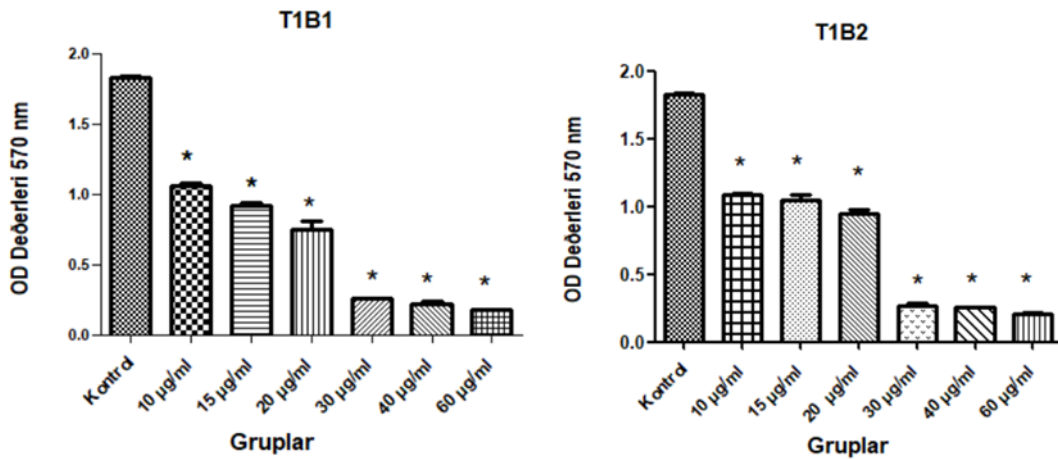
Şekil 3. A549 hücrelerde T_1B_1 ve T_1B_2 bileşiklerinin IC_{50} değerleri. Bileşikler 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir.

Hücrelerdeki morfolojik değişimler ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Buna göre kontrol hücrelerinin ve T_1B_1 ile T_1B_2 bor bileşiklerinin hücre canlılığı %50 inhibe eden dozlarının uygulanmasından sonra elde edilen sonuçlar Şekil 4’te verilmiştir. Bulgularımıza göre kontrol grubunda hücreler koloni halinde yani yüzeye yayılmış ve birbirine bağlantılı durumda normal bir çoğalma gösterirken, bu bileşiklerin uygulanmasıyla hücrelerin küçüldüğü (Yuvarlak hücreler beyaz ok ile gösterilmiştir) ve yapıştığı zeminden kalktığı görülmektedir. Ayrıca hücreler arasında bağlantıların ve hücre sayısının azaldığı dikkati çekmektedir (Büyütme x 60). Bu morfolojik bulgular MTT testi sonucuyla da örtüşmektedir. Bu bulgular hücrelerin apoptoza uğradığını ya da hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir.



Şekil 4. Kontrol ve deney grubu A549 hücrelerin ışık mikroskopunda görüntüleri.

Deney grubu hücrelerine 72 saat, 10 µg/ml- 60 µg/ml aralığında T₁B₁ ve T₁B₂ bileşiği uygulanmıştır. Beyaz oklar zeminden ayrılan ve boyutu küçülen hücreleri göstermektedir. Büyütme x 60



Şekil 5. A549 hücre hattında T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik etkisi.

Veriler, üç bağımsız deneyin ortalaması $\pm$ SD olarak göstermektedir. İstatistiksel analiz one-way ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

*, Kontrol grup ile T₁B₁ veya T₁B₂ bor bileşiklerini uygulanan gruplar karşılaştırıldığında farklılığı gösterir (72 saat) ($p < 0.001$) (OD, Optik Dansite)

Şekil 5'te, A549 akciğer kanseri hücre hattında 10-60 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda T₁B₁ ve T₁B₂ bor bileşiklerinin uygulanmasıyla elde edilen OD değerleri verilmektedir. Bulgularımızı değerlendirdiğimizde her iki bileşikte de süre ve dozlar artırıldıkça sitotoksik etkinin arttığı gözlemlendi. Buna göre 72 saat inkübasyonun ardından kontrol grubuna göre her iki bileşiğin tüm konsantrasyonlarında önemli düzeyde sitotoksik etki olduğu tespit edildi ($p < 0.001$).

Tartışma

Son yıllarda kanser, dünya genelinde en yaygın hastalıklardan biri haline gelmiş ve beraberinde birçok sorunu getirmiştir. Kemoterapi, kanser hücrelerinin çoğalmasını, hastalığın ilerlemesini ve metastazı kontrol altına almak amacıyla

sıklıkla başvurulan tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır. Ancak, kemoterapötik ilaçlar bazı durumlarda yalnızca kanser hücrelerini hedef almakla kalmayıp, aynı zamanda normal hücrelerde de toksik etkilere yol açabilmektedir (28). Bu sebeple, yan etkileri azaltmayı ve kemoterapinin etkinliğini artırmayı hedefleyen yeni anti tümör ilaçların geliştirilmesi için çalışmalar sürdürülmektedir.

Yakın gelecekte bor bileşiklerinin kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneziindeki hücresel süreçleri etkileyebilmeleri sayesinde koruyucu veya tedavi edici amaçlarla kullanılacağı tahmin edilmektedir (22). Bu bakımdan borun moleküler mekanizmasının açıklanmasıyla kanseri önleme ve tedavisindeki rolünün açıklanması daha önemli hale gelecektir. Bu nedenle bu alanla ilgili çalışmalar gidererek artış göstermektedir. Örneğin De Pasquale ve ark. (2020) hücre

zarı kaplı bor nitrür nanotüplerin glioblastoma hücrelerini homotipik hedefleyen doksorubisin yüklü nano taşıyıcı sundular (29). Çalışmanın sonunda bu bor nitrür nanotüplerin glioblastoma hücrelerini spesifik olarak hedefleyerek hücreleri öldürebildiği raporlanmıştır. Başka bir çalışmada Çoksever (2021) dietanolboranat'ın prostat kanseri hücre hattı olan LNCaP hücrelerinde proliferasyonu azalttığını ve etkin bir antiproliferatif ajan olabileceğini bildirilmiştir (30). İnsan kolon adenokarsinom hücresi olan SW-480 hücre hattında borik asidin hem 2D hem de 3D kültür koşullarında hücre proliferasyonunun baskılandığı ve apoptozun indükleştiği gösterilmiştir (31). Yine kolon kanseri hücresi olan HCT-116 hücrelerde de boraks uygulamasıyla benzer sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (32). Bu çalışmamızda A549 akciğer kanseri hücrelerinde etkileri henüz tam olarak bilinmeyen bor bileşiklerinden T_1B_1 ve T_1B_2 'nin sitotoksik ve antiproliferatif etkilerini araştırdık. Bu bileşiklerin 10-60 µg/ml konsantrasyon aralığında ayrı ayrı uygulanmasıyla A549 hücrelerinde zaman ve doz arttıkça inhibisyon etkisinin arttığı ve hücre canlılığın giderek azaldığı gözlemlendi (Şekil 2).

Bor bileşiklerin IC_{50} değerleri uygulanma sürelerine göre değişebilmekte ve süre arttıkça IC_{50} dozun azalmasını sağlamaktadır. Buda daha düşük dozda bileşiğin sitotoksik etki yaratmasını sağlamaktadır. Ersöz (2021) 8305C anaplastik tiroit kanseri hücrelerinde borik asitin antioksidan ve anti-kanser aktivitelerini değerlendirirken bu bileşiğin IC_{50} değerinin 24, 48 ve 72 saatlerde sırasıyla 238 µg/ml, 116 µg/ml ve 70 µg/ml olarak hesapladığını vurguladı (33). Bu bilgi ışığında çalışmamızda T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşiklerinin IC_{50} değerini hesaplarırken, bu bileşikler A549 hücrelere hem 48 saat hem de 72 saat uyguladık. Sonuçlarımıza göre IC_{50} değeri inkübasyon süresi artırıldığında IC_{50} değerinin azaldığı gözlemlendi ve bu değer 48 ve 72 saatlerde sırasıyla T_1B_1 bileşiği için 15.84 µg/ml ve 12.22 µg/ml iken, T_1B_2 için 19.62 µg/ml ve 13.59 µg/ml olarak tespit edildi. Bu sonuçlar, T_1B_1 bileşiğinin T_1B_2 'ye göre kanser hücrelerinde daha toksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

Yapılan birçok çalışmayla bor bileşiklerinin farklı kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği ispatlanmıştır (34-36). U251 insan glioblastoma (24), SK-MEL28 insan cilt melanoma (37), L929 fibroblast ve DLD-1 kolorektal adenokarsinom hücreleri (38) üzerinde borik asidin sitotoksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde bor temelli bileşikler ve akciğer kanseri ile yapılan çalışmalarda da bu bileşiklerin sitotoksik etkiye sahip olduğu desteklenmektedir. Tunçay (2011) çalışmasında borik asit, sodyum perborat ve diamoniyum tetraboratın akciğer ve meme kanserleri hücrelerinde sitotoksik ve apoptik etkilerini incelemiş; en etkili bileşik olan borik asitin A549 akciğer kanseri hücrelerinde etkili olduğunu belirtmiştir (39). Benzer şekilde Semerci Sevimli ve ark. (2023) da borik asidin, A549 hücreleri üzerinde sitotoksik ve anti-proliferatif etkiler gösterdiğini bildirmiştir (40). 2024 yılında yapılan bir çalışmada, sodyum pentaboratın sağlıklı BEAS-2B (48h, IC_{50} : 5333,33 µg/ml) ve akciğer kanseri A549 (48h, IC_{50} : 7894,52 µg/ml) hücre hatlarında

artan konsantrasyonlara bağlı olarak apoptozu arttırarak sitotoksisiteyi sağladığı gösterilmiştir (23). Literatüre katkı sağlayacağını düşündüğümüz T_1B_1 ve T_1B_2 'nin A549 akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkisini değerlendirdiğimizde, hücrelerde apoptozu işaret eden morfolojik değişiklikler gözlemledik. Bileşik uygulanan hücrelerde bağlantıların ve hücre sayısının azaldığı, hücrelerin küçülerek yuvarlak bir hal aldığı ve zemine yapışma özelliklerini kaybettiği dikkati çekmektedir. Bu da bileşiklerin hücreler üzerinde toksik etki yarattığını göstermektedir. Buna ek olarak uygulanan bileşik dozlarının sitotoksik etkisine baktığımızda kontrol grubuna göre bor bileşiği uygulanan hücrelerde önemli düzeyde sitotoksik etki oluştuğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar, kiral grup içeren T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşiklerinin akciğer kanseri tedavisinde anti-kanser aktiviteye sahip olabileceği öngörülmektedir. Ancak çalıştığımız bu iki bileşiğin apoptik mekanizmalarının anlaşılması için ayrıntılı şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu açıdan mevcut çalışmanın bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Annexin V/PI veya immüno floresan analizlerin yapılması uygundur. Ayrıca bu çalışma A549 akciğer adenokarsinom hücre hattı üzerinde gerçekleştirilmiştir, bu nedenle bulgular diğer hücre hatlarına genelleştirilemez. İncelediğimiz bu iki bileşiğin, literatürde çalışılmış bor bileşikleriyle kıyaslandığında daha düşük dozlarda A549 akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik etki oluşturarak antikanser etki oluşturması bakımından önemli olduğuna ve daha fazla araştırma için bir temel oluşturduğuna inanıyoruz.

Sonuç olarak çalışmada A549 akciğer kanseri hücrelerine uygulanan kiral grup içeren T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşiklerinin artan konsantrasyonlara ve zamana bağlı olarak proliferasyonu azalttığını ve sitotoksik etki oluşturduğunu belirledik. Yeni sentezlenen ve yapısı farklı tekniklerle açıklanan bor bileşiklerinin biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarının daha detaylı açıklanması kanser önleme ve tedavisindeki rolünün belirlenmesi açısından önemli hale gelecektir. Bundan dolayı sonraki çalışmalarımızda mevcut çalışmayla sitotoksik etkisi ilk kez belirlenen T_1B_1 ve T_1B_2 bor bileşiklerinin kanser hücreleri üzerindeki diğer ilişkili olabilecek moleküller mekanizmalarını açıklamayı planlamaktayız.

Etik onam: Bu çalışma için etik kurul izni gerekmemektedir.

Yazar Katkıları:

Konsept: N.O, A.K.

Literatür Tarama: N.O, A.K.

Tasarım: N.O, A.K.

Veri toplama: N.O, A.K.

Analiz ve yorum: N.O, A.K.

Makale yazımı: N.O, A.K.

Eleştirel incelenmesi: N.O, A.K.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma herhangi bir fon tarafından desteklenmemiştir.

Kaynaklar

1. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, et al. (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today>, accessed 7 June 2024.

2. Leiter A, Veluswamy RR, Wisnivesky JP. The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nat Rev Clin Oncol*. 2023;20(9):624-639.
3. Travis WD. Lung Cancer Pathology: Current Concepts. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):67-85.
4. Huang J, Deng Y, Tin MS, Lok V, Ngai CH, Zhang L, Lucero-Prisno DE 3rd, Xu W, Zheng ZJ, Elcarte E, Withers M, Wong MCS. Distribution, risk factors, and temporal trends for lung cancer incidence and mortality: A Global Analysis. *Chest*. 2022;161(4):1101-1111.
5. Schabath MB, Cote ML. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1563-1579.
6. Li C, Lei S, Ding L, Xu Y, Wu X, Wang H, et al. Global burden and trends of lung cancer incidence and mortality. *Chin Med J (Engl)*. 2023;136(13):1583-1590.
7. Howlader N, Forjaz G, Mooradian MJ, Meza R, Kong CY, Cronin KA, et al. The Effect of Advances in Lung-Cancer Treatment on Population Mortality. *N Engl J Med*. 2020 Aug 13;383(7):640-649.
8. Pirker R. Chemotherapy remains a cornerstone in the treatment of nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(1):63-67.
9. Aydın T, Gönen B, Eseceli H. Bor'un İnsan Sağlığı ve Beslenme Üzerine Etkisi. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2018;9(2):119-122.
10. Beyer KH, Bergfeld WF, Berndt WO, Boutwell RK, Carlton WW, Hoffmann DK et al. Final report on the safety assessment of sodium borate and boric acid. *J Am Coll Toxicol*. 1983;2(7):87-125.
11. Scorei R. Is boron a prebiotic Element? A mini-review of the essentiality of boron for the appearance of life on earth. *Orig. Life Evol. Biosph*. 2012;42:3-17.
12. Acaroz U, Ince S, Arslan-Acaroz D, Gurler Z, Kucukkurt I, Demirel HH et al. The ameliorative effects of boron against acrylamide-induced oxidative stress, inflammatory response, and metabolic changes in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2018;118:7.
13. Küçükdoğru R, Türkez H, Arslan ME, Tozlu ÖÖ, Sönmez E, Mardinoğlu A et al. Neuroprotective effects of boron nitride nanoparticles in the experimental Parkinson's disease model against MPP+ induced apoptosis. *Metabolic Brain Disease*. 2020;35:947-957.
14. Cui Y, Winton MJ, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB et al. Dietary boron intake and prostate cancer risk *Oncol Rep*. 2004;11(4):887-892.
15. Tanaka M, Fujiwara T. Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflügers Arch*. 2008;456(4):671-7.
16. Spielberg SP, Butler JD, Macdermot K, Schulman JD. Treatment of glutathione synthetase deficient fibroblasts by inhibiting gamma-glutamyl transpeptidase activity with serine and borate. *Biochem. Biophys Res Commun*. 1979;89(2):504-511.
17. Hunt CD, Herbel JL, Idso JP. Dietary boron modifies the effects of exercise training on bone and energy substrate metabolism in the rat. *FASEB J*. 1993;7(3):A204-A204.
18. Kilic A, Soylemez R, Okumus V. Design, spectroscopic properties and effects of novel catechol spiroborates derived from Schiff bases in the antioxidant, antibacterial and DNA binding activity. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2022;960: 122228.
19. Farfán-García ED, Kilic A, García-Machorro J, Cuevas-Galindo ME, Rubio-Velazquez BA, García-Coronel IH et al. Antimicrobial (viral, bacterial, fungal, and parasitic) mechanisms of action of boron-containing compounds, in: Bagchi D, Das A, Downs BW (Eds.), *Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections*, Academic Press, 2023:733-754.
20. Yıldırım M, Kilic A, Cimentepe M, Necip A, Turedi S. Synthesis of bioactive quercetin-boronate esters as a novel biological agent: enzyme inhibition, anti-microbial properties, computational insights and anti-cancer activity. *J Mol Struct*. 2025;1321(5):140216.
21. Yıldırım M, Yasar E, Necip A, Cimentepe M, Demirbağ B, Kilic A. Facile synthesis and spectral analysis of the bioactive spiroborate compounds as a novel therapeutic agent for computational insights, biological evaluation, and applications. *J Organometal Chem*. 2025;1027:123510.
22. Erbaykent Tepedelen B, Korkmaz M. Effects of Natural and Synthetic Boron Compounds on Cancer Prevention and Cancer Treatment. In *Boron and Human Health*, Ankara: Nobel Publishing House, 2020:129-147.
23. Huriyet H. Sodyum pentaboratın kanser ve sağlıklı insan akciğer hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksik genotoksik ve radyobiyojik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Bursa: Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2024:85-94.
24. Hacıoğlu C. Borik Asidin endoplazmik retikulum stresine ilgili proteinler aracılığıyla glioblastoma hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkileri. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2024;46(2):217-2.
25. Saylam M. Sepsis modeli oluşturulan sıçanlarda karaciğer hasarı üzerine borik asitin koruyucu etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2024;35-37.
26. Kilic A, Balci TE, Arslan N, Aydemir M, Durap F, Okumus V, et al. Synthesis of cis-1,2-diol-type chiral ligands and their dioxaborinane derivatives: Application for the asymmetric transfer hydrogenation of various ketones and biological evaluation. *Appl Organomet Chem*. 2020;34: e5835.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2): 55-63.
28. Li Z, Tan S, Li S, Shen Q, Wang K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. *Oncology reports*. 2017;38(2):611-624.
29. De Pasquale D, Marino A, Tapeinos C, Pucci C, Rocchiccioli S, Michelucci E et al. Homotypic targeting and drug delivery in glioblastoma cells through cell membrane-coated boron nitride nanotubes. *Mater Des*. 2020;192:108742.
30. Çoksever İ. Prostat kanseri hücrelerinde bor bileşiklerinin endoplazmik retikulum (er) stresine olan etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2021;1-108.
31. Sevimli M, Bayram D, Özgöçmen M, Armağan I, Semerci Sevimli T. Boric acid suppresses cell proliferation by TNF signaling pathway mediated apoptosis in SW-480 human colon cancer line. *J Trace Elem. Med Biol*. 2022;71:126958.
32. Hacıoğlu C, Davran F. Kolorektal kanser hücrelerinde boraksın Gpx4/ACSL4 sinyal yolu aracılığıyla sitotoksik etkileri. *Sağlık Bilimlerinde Değer*. 2023;13(1):54-60.
33. Ersöz M. Borik asidin 8305C anaplastik tiroit kanseri hücrelerinde antioksidan ve anti-kanser aktivitesi. *Gümüşhane Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2021;10(2):213-221.
34. 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.
35. Mohammed EE, Türkel N, Yigit UM, Dalan AB, Sahin F. Boron Derivatives Inhibit the Proliferation of Breast Cancer Cells and Affect Tumor-Specific T Cell Activity In Vitro by Distinct Mechanisms. *Biol Trace Elem Res*. 2023;201(12):5692-5707.
36. Yıldırım O, Seçme M, Dodurga Y, Mete GA, Fenkci SM. In Vitro Effects of Boric Acid on Cell Cycle, Apoptosis, and miRNAs in Medullary Thyroid Cancer Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2025;203(2):799-809.
37. 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.
38. Albuz Ö, Dülger D, Tunalı BÇ, Aydın F, Yalçın S, Türk M. Effects of B2O3 (boron trioxide) on colon cancer cells: our first-step experience and in vitro results. *Türk J Biol*. 2019;43(3):209-223.
39. Tunçay, T. Çeşitli Bor Minerallerinin Göğüs ve Akciğer Kanseri Türleri Üzerine Etkilerinin İn Vitro Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
40. Semerci Sevimli T, Ghorbani A, Sevimli M. Borik Asidin Anti-Proliferatif ve Anti-Apoptotik Etkilerinin İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerinde TGF-β Sinyal Yolu Üzerinden İncelenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*. 2023;7(3):553-564.