

BORAKS PROSTAT KANSERİ HÜCRELERİNDE OTOFAJİ YOLAĞINI REGÜLE EDEREK PROLİFERASYONU ENGELLER

BORAX INHIBITS PROLIFERATION BY REGULATING THE AUTOPHAGY PATHWAY IN PROSTATE CANCER CELLS

Ekrem BAŞARAN¹, Ceyhan HACIOĞLU², Sare UYURCA², Dursun BABA¹,
Arda Taşkın TAŞKIRAN¹, Ahmet Yıldırım BALIK¹

¹Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Ana Bilim Dalı

²Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

ÖZET

AMAÇ: Otofaji, kanser hücrelerinin hayatta kalmasında ve tedaviye karşı direnç geliştirmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Esansiyel bir iz element olan bor, çeşitli biyolojik süreçlerde yer almaktadır; ancak, prostat kanserinde boraksın antitümör etkileri üzerine yapılan araştırmalar sınırlı olup, bu bağlamda otofajinin rolü hâlen yeterince anlaşılmamıştır. Bu çalışma, boraksın DU-145 insan prostat kanseri hücrelerinde otofaji üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin moleküler düzeydeki mekanizmaları araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: : DU-145 hücreleri in vitro koşullarda kültürlenmiş ve boraks ile muamele edilmiştir. Hücre canlılığı ve proliferasyonu, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ve BrdU (5-bromo-2'-deoksüridin) inkorporasyonu ile değerlendirilmiştir. Sitotoksik boraks konsantrasyonları belirlendikten sonra, otofaji ile ilişkili belirteçler olan Beclin1, mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3-II) ve sequestosome-1 (SQSTM1) ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür.

BULGULAR: Elde edilen sonuçlar, boraksın DU-145 hücre canlılığını doz bağımlı olarak anlamlı biçimde azalttığını göstermiştir. Ayrıca, boraks hücre proliferasyonunu baskılamış ve hücre döngüsünün S fazındaki hücre oranını önemli ölçüde azaltmıştır. Moleküler düzeyde ise boraks uygulaması, SQSTM1'in azalmasına, Beclin1 ve LC3-II'nin ise artmasına yol açarak otofajinin indüklendiğine işaret etmiştir.

SONUÇ: Bu bulgular, boraksın DU-145 prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu otofajik yolları aktive ederek inhibe ettiğini göstermektedir. Gözlemlenen etkilerin, büyük ölçüde Beclin1/LC3-II/SQSTM1 sinyal yolunun modülasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, boraksın bir otofaji aktivatörü ile kombinasyonu, antitümör etkinliğini artırabilir ve prostat kanseri tedavisinde umut verici bir strateji sunabilir.

ANAHTAR KELİMELER: Otofaji, Boraks, Prostat kanseri.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Autophagy plays a critical role in the survival of cancer cells and the development of resistance to therapeutic agents. Boron, an essential trace element, is involved in various biological processes; however, limited research has investigated the antitumor effects of borax in prostate cancer, and the role of autophagy in this context remains inadequately understood. The present study investigated the effects and underlying mechanisms of borax on autophagy in DU-145 human prostate cancer cells.

MATERIAL AND METHODS: DU-145 cells were cultured in vitro and treated with borax. Cell viability and proliferation were assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and the 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation method. Following the determination of cytotoxic borax concentrations, the expression levels of autophagy-related markers Beclin1, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-II), and sequestosome-1 (SQSTM1) were measured.

RESULTS: The results demonstrated that borax significantly reduced DU-145 cell viability in a dose-dependent manner. Moreover, borax suppressed cell proliferation and markedly decreased the proportion of cells in the S phase of the cell cycle. At the molecular level, borax treatment led to a reduction of SQSTM1 and an increase of Beclin1 and LC3-II, indicating the induction of autophagy.

CONCLUSIONS: These findings suggest that borax inhibits the proliferation of DU-145 prostate cancer cells by activating autophagic pathways. The observed effects appear to be mediated through the modulation of the Beclin1/LC3-II/SQSTM1 signaling axis. Furthermore, the combination of borax with an autophagy activator may enhance its antitumor efficacy, presenting a promising strategy for therapeutic intervention in prostate cancer.

KEYWORDS: Autophagy, Borax, Prostate cancer.

Geliş Tarihi / Received: 24.04.2025

Kabul Tarihi / Accepted: 21.08.2025

Yazışma Adresi / Correspondence: Doç. Dr. Ceyhan HACIOĞLU

Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı

E-mail: ceyhanhacioglu@duzce.edu.tr

Orcid No (Sırasıyla): 0000-0001-8319-512X, 0000-0002-0993-6118, 0000-0003-2869-9629, 0000-0002-4779-6777, 0000-0003-4556-3475, 0000-0001-8051-5802

GİRİŞ

Prostat kanseri (PK), gelişmiş ülkelerde erkek popülasyonunda kanser ilişkili mortalitenin primer etiyojik faktörleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (1). Epidemiyolojik veriler, kanser mortalitesi ile korelasyon gösteren majör risk faktörlerini tütün kullanımı, obezite/hiper-nutrisyon ve sedanter yaşam tarzı olarak tanımlamaktadır (2). Son dönemde yürütülen klinik ve translyonel araştırmaların ortaya koyduğu bulgular ışığında, 2015 Avrupa onkoloji verileri prostat kanseri mortalite oranlarında yaşa bağlı varyasyonlarla %9-17 aralığında regresyon öngörmektedir (3). Ancak projeksiyon modelleri, önümüzdeki dekada beklenen kanser mortalite insidansının halen kabul edilebilir eşiklerin üzerinde seyredeceğini göstermekte olup, mevcut terapötik protokollerin optimizasyonu ile önemli ölçüde profilaksi sağlanabileceği değerlendirilmektedir. Lokalize prostat kanseri tedavi algoritmaları radikal prostatektomiden radyoterapiye, adjuvan androjen deprivasyon terapisine kadar geniş bir spektrum sergilemektedir (4). Patolojik progresyon sürecinde hormon-resistan klonların seleksiyonu, kaçınılmaz olarak kastrasyona dirençli prostat kanseri (KDPK) fenotipinin gelişimine ve nükse yol açmaktadır. Metastatik KDPK'da birinci basamak tedavi seçeneği olan doksetaksel bazlı kemoterapi rejimlerine karşı gelişen sistemik toksisite ve intrinsik/edinsel direnç mekanizmaları, tedavi başarısını limitlendiren kritik parametrelerdir. Bu nedenle, terapötik etkinliği artırmaya yönelik yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesi acil bir klinik ihtiyaç olarak öne çıkmaktadır.

Otofaji, ökaryotik hücrelerde metabolik stresi önleyerek hücrel homeostazın sürekliliğini sağlar. Bu metabolik yolak, düşük seviyelerde gerçekleşen bir korunma mekanizması olarak, kanser hücrelerindeki hasarlı organellerin ve proteinlerin lizozomal yıkımını içeren otofagozomlar aracılığıyla işlev görür (5). Bu çok aşamalı bir süreç olup, otofagozom oluşumu, mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3'ün (LC3) ardışık modifikasyonunu gerektirir. Sentez sonrasında, LC3'ün C-terminali öncelikle bir sistein proteaz olan otofaji ilişkili proteinler (ATG) tarafından kesilerek otofagozomla ilişkili LC3-I ve LC3-II üretilir. Bu süreçte, hasarlı organeller ve

sitoplazmik proteinler, çift zarlı veziküller olan otofagozomlar tarafından kuşatılır ve ardından lizozomlarla birleşir (6). Ortaya çıkan otolizozomların içeriği, amino asitler ve diğer anabolik öncül maddelere parçalanır. Çoğu hücrede otofaji düşük seviyelerde gerçekleşir ve bu süreçteki bozulmalar, kanser, nörodejenerasyon ve kalp hastalığı gibi çeşitli hastalıklara yol açabilir (7). Ayrıca, otofajinin tümörlerin radyoterapi ve kemoterapiye direncine katkıda bulunduğu da öne sürülmüştür (8). Dolayısıyla otofaji, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve antikanser ilaçlara direnç gelişimini destekleyen bir hücrel süreç olarak kabul edilmektedir. Günümüzde otofaji inhibisyonu, böbrek, karaciğer ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde uygulanan yeni bir tedavi stratejisi olarak öne çıkmıştır (9).

Bor doğal bir elementtir ve Türkiye, dünya bor rezervlerinin %73'üne sahip olarak küresel lider konumdadır (10). Biyolojik açıdan önemli bir iz element olan bor, deniz suyunda 414 µM konsantrasyonla dokuzuncu en bol bulunan element olan bor, doğada boraks (sodyum tetraborat) ve borik asit (BA) formlarında bulunmakta olup, insan plazmasındaki konsantrasyonu 10-20 µM aralığında bildirilmiştir (11). Doğal bor bileşikleri antiviral, antibakteriyel ve antikanser etkileri nedeniyle farmasötik formülasyonlarda kullanılmaktadır. Borun fizyolojik fonksiyonlarına ilişkin çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, BA'nın hücrel fonksiyonlar ve canlılık üzerinde hem koruyucu hem de zarar verici etkileri olduğu rapor edilmiş olup, bu farklılıkların kullanılan model sistemler ve konsantrasyonlara bağlı olabileceği düşünülmektedir (12). Dikkat çekici bir şekilde, prostat hücre hatları üzerinde yapılan bir çalışmada, tümör oluşturmeyen hücrelerin kanser hücre hatlarına kıyasla BA'ya karşı daha az duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (13). Benzer şekilde önceki çalışmalarımızda, BA'nın prostat kanser hücrelerinde proliferasyon, apoptoz ve redoks durumu etkilediğini bulduk (14). Ayrıca insanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, BA alımı ile prostat kanseri riskinde azalma arasında korelasyon olduğunu göstermiştir (15).

Bu çalışmada, androjen-dirençli DU-145 boraks tedavisine karşı gelişen otofajik yanıtların incelenmesi amaçlanmıştır. Boraks maruziyeti sonrası prostat kanser hücrelerinin üzerinde sitotoksik

etkiler hücresel canlılık ve hücresel proliferasyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Dahası, boraksın bu hücrelerde regüle ettiği otofajik sinyalizasyonun belirlemek için Beclin-1, LC3-II ve sekestosom-1 (SQSTM1) seviyeleri de analiz edilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Boraks Maruziyeti

Hücre hatları, maksimum proliferasyonu destekleyen besiyerlerinde kültüre edilmiştir. Prostat kanseri hücre hattı (DU-145), American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiş ve %10 FBS, penisilin/streptomisin (100 U/ml; 100 µg/ml) ve L-glutamin (200 mM) (Gemini Bioproducts, Woodlands, CA) ile desteklenmiş RPMI 1640 (Invitrogen) besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler, %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş bir inkübatörde (Thermoscientific, MA, ABD) 37°C'de muhafaza edilmiştir. DU-145 hücreleri, hazırlanan kültür ortamı ile 75 cm²'lik kültür flasklarına ekilmiştir. Tedavi işlemi, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1,6 mM, 3,2 mM ve 6,4 mM konsantrasyonlarında boraksın (Merck) doğrudan kültür ortamına eklenmesiyle 24 saat boyunca uygulanmıştır.

Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Analizleri

MTT analizi için hücreler, 96 kuyulu plakalara her kuyuya 5×10³ hücre olacak şekilde ekilmiştir. İlk olarak, hücrelerin flasklara yapışması için boraks tedavisinden önce 24 saat bekletilmiştir. Boraksın stok solüsyonu çift distile suda hazırlanmış ve 0,21-µm filtreler ile süzölmüştür. Çalışma solüsyonu, tedaviden hemen önce hücre besiyeri kullanılarak hazırlanmıştır. Boraksın konsantrasyon aralığı, laboratuvarımızda yapılan ön deneyler sonucunda belirlenmiştir. 0'dan 6,4 mM'e kadar değişen boraks konsantrasyonları, 96 kuyulu plakalarda yapışık halde bulunan hücrelere 24 saat süreyle uygulanmıştır. Daha sonra, boraks ilaveli besiyeri uzaklaştırılarak yerine 200 µl MTT ilaveli besiyeri eklenmiş ve 5 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında MTT çözeltisi uzaklaştırılmış ve 200 µl DMSO eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi için iyice karıştırılmıştır. MTT formazan ürününün optik yoğunluğu, mikroparka okuyucuda (BioTek) 590 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Boraks uygulanmayan hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiş ve deneysel hücrelerin canlılığı buna göre hesaplanmıştır.

5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) inkorporasyon yöntemi, in vitro'da hücre proliferasyonunu ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir analizdir. Bu yöntem, BrdU'nun aktif olarak bölünen hücrelerin DNA'sına hücre döngüsünün S fazında entegre olması ve BrdU'ya karşı geliştirilmiş bir antikör kullanılarak tespit edilebilmesi prensibine dayanmaktadır. Yukarıda belirtildiği gibi, hücreler (3 × 10³ hücre/kuyu) %80 konfluens seviyesine ulaşana kadar kültüre edilmiştir. Hücreler, MTT analizi ile belirlenen IC₂₅ ve IC₅₀ boraks konsantrasyonları ile 24 saat boyunca tedavi edilmiştir. Daha sonra, hücre proliferasyonu BrdU hücre proliferasyon assay kiti (2750, Sigma-Aldrich) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre belirlenmiştir. Absorbans değerleri 450 nm'de ölçülmüştür.

Hücre Lizatı Hazırlığı

Hücre lizatlarının hazırlanması buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı uzaklaştırıldıktan sonra hücreler iki kez soğuk fosfat tamponu ile yıkanmış, ardından hücreler soğuk lizis tamponu (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM EDTA; 1 mM ditiotritol; 50 mM HEPES, pH 7.0; 1 mg/mL proteinaz K) ile lizize edilmiştir. Lizatlar, 4°C'de çalkalayıcı plakalar üzerinde 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre lizatları, 4°C'de 15 dakika boyunca 15.000×g'de mikro santrifüj ile santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre lizatları, analizlerde kullanılmak üzere derhal kullanılmıştır.

Beclin1, LC3-II, SQSTM1 Protein Düzeylerinin Analizi

Hazırlanan hücre lizatlarının Beclin1, LC3-II, ATG5 ve SQSTM1 seviyeleri, üretici firma talimatları doğrultusunda ticari kitler (sırasıyla EH1146, CBA-5116 ve ELK3211) kullanılarak analiz edilmiştir. İlk aşamada, tüm reaktiflerin oda sıcaklığına gelmesi sağlanmıştır. Analiz edilecek proteine özgü yakalama antikörleri ile kaplanmış 96 kuyulu ELISA plakalarına, önerilen miktarlarda hücre lizatı eklenmiş ve belirtilen süre aralığında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında, bağlanmamış proteinleri uzaklaştırmak için plakalar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Takip eden işlemlerde, horseradish peroksidaz (HRP) ile konjuge edilmiş sekonder antikör eklenmiş, bağlanmamış antikörler 3 kez yıkama tamponu ile uzaklaştırılmış, substrat çözeltisi ilave edilmiş ve son olarak önerilen inkübasyon süreleri dahilinde durdurma çözel-

tisi eklenmiştir. Son aşamada, her bir kuyudaki protein konsantrasyonunu hesaplamak üzere, mikroparka okuyucu kullanılarak önerilen dalga boylarında absorbans değerleri ölçülmüştür.

Etik Kurul

Çalışmamızda *in vitro* analizler sırasında ticari olarak satılan hücre kültür hattı kullanıldığı için bu çalışma için etik kurul onayına ihtiyaç yoktur.

İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, yedi bağımsız deneyin ortalaması \pm standart sapma (mean \pm SD) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler için GraphPad Prism 8 programı kullanılmıştır. Deneysel verilerin normallik analizi Shapiro–Wilk normallik testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark, tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc testleri ile analiz edilmiştir. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

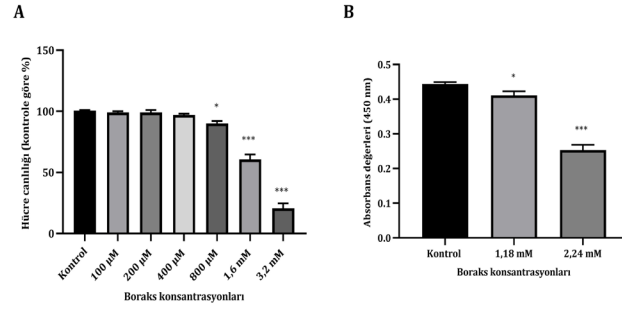
BULGULAR

Boraksın Prostat Kanser Hücre Canlılığı Üzerindeki Antiproliferatif Etkileri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 100 μ M, 200 μ M ve 400 μ M boraks uygulamalarının hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir (sırasıyla %99,2, %98,5 ve %97,1) (**Şekil 1**). İlk anlamlı düşüş, 800 μ M boraks konsantrasyonunda gözlenmiş olup bu grupta hücre canlılığı %93,7 olarak kaydedilmiştir ($p = 0,012$). 1,6 mM ve 3,2 mM boraks konsantrasyonlarında ise canlılık oranı sırasıyla %35,8 ve 75,9'a kadar inhibe etmiştir ($p < 0,001$). DU-145 hücrelerinde 24 saatlik boraks maruziyetine ait IC50 ve IC25 değerleri sırasıyla 2,24 mM ve 1,18 mM olarak hesaplanmıştır.

MTT analizleriyle uyumlu olarak, BrdU analizi ile 24 saatte 1,18 mM ve 2,24 mM boraks konsantrasyonlarının DU-145 hücrelerinde antiproliferatif etkiler gösterdiği belirlenmiştir (**Şekil 1**). 1,18 mM boraks uygulaması kontrol grubuna kıyasla DU-145 hücre proliferasyonunu %9,4 oranında inhibe etmiştir ($p = 0,017$). Ayrıca, 24 saat boyunca 2,24 mM boraks konsantrasyonlarına maruz bırakılan DU-145 hücre proliferasyonu %52,6 oranında baskılanmıştır

(kontrol grubuna kıyasla $p < 0,001$). Genel olarak, 24 saatlik boraks uygulamasının DU-145 hücrelerinde konsantrasyon-bağımlı bir antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlenmiştir.



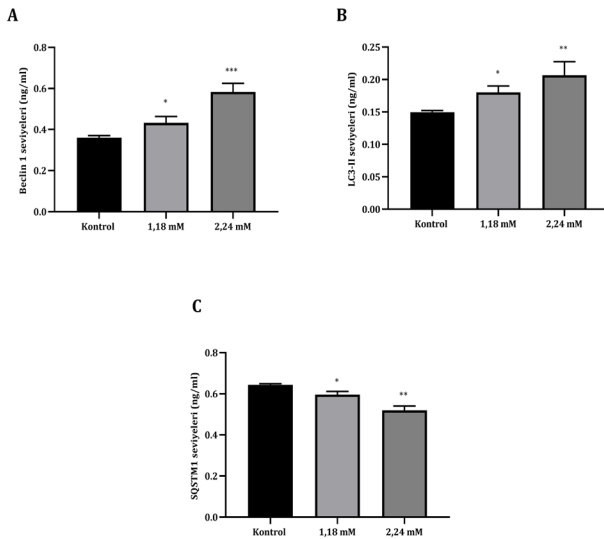
Şekil 1: (A) DU-145 hücrelerinde MTT sonuçlarını ve (B) DU-145 hücrelerinde BrdU inkorporasyonunu göstermektedir. * $p < 0,05$ ve *** $p < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

Boraks uygulaması prostat kanser hücrelerinde otofajik sinyal yolağını indükler

ELİSA sonuçlarına göre, DU-145 hücrelerindeki otofajiyi aktive etmek için saatte 1,18 mM ve 2,24 mM boraks konsantrasyonları seçildi ve otofaji ile ilişkili Beclin1, LC3-II ve SQSTM1 protein seviyeleri analiz edildi. 1,18 mM ve 2,24 mM boraks uygulamaları, kontrol grubuna kıyasla artan konsantrasyonlarda maruz bırakılan DU-145 hücrelerinde Beclin1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur (**Şekil 2**). 2,24 mM boraks konsantrasyonu, Beclin1 seviyelerinde kontrole göre yaklaşık 2 katlık bir artış neden olmuştur ($p = 0,014$ ve $p < 0,001$).

Otofaji aktivasyonu sırasında, LC3, diffüz sitoplazmik LC3-I formundan, yeni oluşan otofagozom zarına alınan lipitlenmiş form olan LC3-II'ye dönüştürülür. ELİSA yöntemi ile hücre içi LC3-II dağılımını analiz ettik. 24 saatlik boraks uygulamasının DU-145 hücrelerinde LC3 seviyelerini arttığı belirlenmiştir ($p = 0,021$ ve $p < 0,001$) (**Şekil 2**).

Daha sonra, poliübikitinlenmiş proteinlere bağlanarak onların otofagozomlara taşınmasını sağlayan otofaji adaptörü SQSTM1'i analiz ettik. Beclin1 ve LC3-II için bildirildiğinin aksine, SQSTM1 seviyeleri otofaji aktivasyonu sırasında azalmaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, DU-145 hücrelerinde 24 saatlik boraks uygulamasının p62 protein seviyelerini düşürerek otofajik aktivasyonu indüklediği bulunmuştur ($p = 0,015$ ve $p < 0,001$) (**Şekil 2**).



Şekil 2: (A) Beclin1 düzeylerini, (B) LC3-II düzeylerini ve (C) SQSTM1 düzeylerini göstermektedir.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Kemodirenç gelişimi, kanser tedavisindeki önemli sorunlardan biridir ve bu süreçte otofajinin rol oynayabileceği düşünülmektedir. Otofajinin, kemoterapi veya radyoterapi gibi stresli koşullar altında kanser hücrelerini öldürdüğümü yoksa bunların sağ kalımını desteklediği mi halen tartışmalıdır. Birçok çalışma, otofajinin kanser hücrelerinin kemoterapiye direncinde rol oynadığını ve dolayısıyla otofaji inhibisyonunun, kanser hücrelerini kemoterapiye yeniden duyarlı hale getirerek tedavi etkinliğini artırabileceğini ileri sürmektedir (16). Bununla birlikte, diğer araştırmalar otofajinin kemoterapi ve radyoterapinin hücre ölümünü indükleyici etkisini güçlendirdiğini öne sürmektedir (17). Benzer şekilde, bitkisel kökenli ajanların prostat kanseri hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkileri de daha önce Koca ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (18). Bu çelişkili bulgular, otofajinin hücre tipine, uyarıcı maddeye ve mikroçevresel koşullara bağlı olarak farklı roller üstlenebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada gözlemlenen Beclin1 ve LC3-II artışı ile birlikte SQSTM1 azalması, boraksın DU-145 hücrelerinde otofajiyi hücre ölümüne aracılık edecek şekilde aktive ettiğini göstermektedir.

Son yıllarda farklı çalışmalar, bor ve türevlerinin hücre canlılığı ve çoğalması üzerinde koruyucu/mitojenikten hasar verici/antiproliferatife kadar değişen büyük ölçüde farklı etkiler gösterebile-

ceği bildirmiştir (19-21). Bu çalışmada MTT ve BrdU testi sonuçları, boraksın DU-145 hücrelerinin canlılığını ve proliferasyonunu kovantrasyon bağımlı bir şekilde anlamlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu durum, boraksın DU-145 hücre ölümünü indüklediğini düşündürmektedir. Dikkat çekici şekilde, ilk kez bu çalışmada, DU-145 hücrelerinde boraksın, Beclin1, LC3-II ve SQSTM1 otofaji belirteçlerini indükleyerek otofajiyi sinyalizasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir.

Otofaji, apoptozdan farklı bir hücre ölümü sürecidir. Hüresel savunma ve stres düzenleme mekanizması olarak otofaji, kanser araştırmalarında kapsamlı biçimde incelenmiştir (22). Otofaji, ökaryotik hücrelerde sitoplazmanın bir bölümünü ve yıkıma uğrayacak hücre içi organel ve proteinleri saran çift zar yapısının oluşmasıyla karakterize edilir; bu yapı otofagozom olarak adlandırılır (23). Otofagozom, endozomlarla birleşerek amfizom oluşturur; bu yapı da daha sonra lizozomlarla birleşerek otofagolizozomu meydana getirir ve içeriği parçalayarak yok eder (24). Fizyolojik koşullar altında otofaji düşük düzeylerde gerçekleşir. Ancak hücreler yetersiz besin, büyüme faktörlerinin eksikliği ve hipoksi gibi çeşitli stres koşullarına maruz kaldığında otofaji başlatılır (25). Bu süreç, hücre içi ortamın stabilitesinin korunması ve normal fizyolojik işlevlerin sürdürülebilmesi açısından kritik öneme sahiptir (26). Daha önce yapılan çalışmalar, otofajinin tümör patogenezi ve ilerleyişinde yakından rol oynadığını ortaya koymuştur (27). Otofaji, özellikle tümör oluşumunun erken evrelerinde tümör büyümesini baskılamaktadır; ancak ilerleyen dönemlerde tümör hücrelerinin olumsuz metabolik stres koşullarına adaptasyonunu sağlayarak hayatta kalmalarına da olanak tanıyabilir (28). Ayrıca, çok sayıda antitümör ajan otofajiyi indüklemektedir; ancak bu durumun tümör hücre ölümüne mi yoksa hücre hayatta kalmasına mı yol açtığı hâlen tartışmalıdır (29). Önceki bir çalışmada, DU-145 hücreleri transmisyon elektron mikroskopu ile incelenmiş ve diosgenin ile muamele edilen hücrelerin sitoplazmalarında çeşitli boyutlarda çok sayıda otofajik vakuol gözlemlenmiştir (30). Ayrıca otofagozom oluşumu da tespit edilmiştir. Bu bulgular, prostat kanser hücrelerinde otofajiyi indüklediğini doğrulamaktadır. Önceki çalışmalarla tutarlı şekilde bu

çalışmada, boraks tedavisinin DU-145 prostat kanseri hücrelerinde otofajik aktivasyonu artırdığı ve hücre canlılığı baskıladığı saptanmıştır.

Beclin1, tümör oluşumu ile otofagozom oluşumunda temel düzenleyici bir rol oynamaktadır (31). Beclin1, otofajiyi indükleyici etki göstermektedir (32). Bu nedenle hücresele Beclin 1 seviyeleri, otofajinin önemli bir düzenleyicisidir. Önceki çalışmada, prostat kanser hücrelerinde Beclin 1 mRNA düzeylerinin anlamlı biçimde artması bu hücrelerde otofajiyi indüksiyonunun gerçekleştiğini bildirmiştir (33). Benzer şekilde bu çalışmada, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında boraksla tedavi edilen hücrelerde daha fazla Beclin1 seviyeler tespit edildi; bu da boraksın otofajiyi indüklediğini düşündürmektedir. LC3, memeli hücrelerde otofajinin bir belirteci olarak görev yapar (34). Tümör hücrelerinde LC3, sitoplazmik LC3-I formuna dönüştürülür ve daha sonra otofagozom zarında fosfatidiletanolamin ile kovalent bağlanarak LC3-II formunu oluşturur. LC3-II düzeyinin otofaji düzeyiyle doğru orantılı olduğu bilinmektedir (35); dolayısıyla LC3-II protein düzeylerinin ölçülmesi, otofajinin başladığını göstermek için kullanılabilir. Nie ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada western blot analizi ile LC3-II protein düzeyleri belirlenmiş ve diosgenin ile muamele edilen DU-145 hücrelerinde LC3-II/LC3-I oranının arttığı saptanmıştır (30). Bu bulgu, diosgenin'in tümör hücrelerinde otofajiyi indüklediğini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bir başka çalışmada, valproik asit uygulamasının DU-145 hücrelerinde LC3-II seviyelerini arttırarak otofajik aktivasyona neden olduğu bildirilmiştir (34). Bahsi geçen çalışmalarda tutarlı şekilde, boraks uygulaması sonucu DU-145 hücrelerinde LC3-II seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu da, boraksın prostat kanser hücrelerinde otofajiyi indükleyebileceğini göstermektedir.

Otofaji akışının izlenmesinde SQSTM1 (ubiquitin bağlayıcı protein p62 olarak da bilinir) düzeyi de kullanılmaktadır, zira otofaji engellendiğinde bu protein hücrelerde birikir. Bir otofaji adaptör proteini olan SQSTM1, LC3-II ile doğrudan etkileşime girer ve ubiquitinlenmiş protein agregatlarının hedeflenmiş yıkımını düzenler (36). SQSTM1, otofaji sırasında yıkıma uğraya-

bilen bir proteindir ve otofaji engellendiğinde hücrede birikir; bu nedenle otofaji akışının izlenmesinde bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu bağlamda, DU145 hücrelerinde SQSTM1 protein düzeyinin, LNCaP ve PC-3 hücrelerine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (35). Mevcut çalışmada, boraks uygulaması DU-145 hücrelerinde SQSTM1 düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bu durum, SQSTM1'in otofaji sırasında lizozomal yıkıma uğradığını ve otofajik akışın gerçekleştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, boraksın DU-145 prostat kanseri hücre hattında belirgin antitümör aktivite gösterdiğini ortaya koymaktadır. Boraks, DU-145 hücrelerinin proliferasyonunu otofajiyi aktive ederek baskılamaktadır ve bu etkinin temelinde Beclin1/LC3-II/SQSTM1 sinyal yolunun aktivasyonunun yer aldığı düşünülmektedir. Buna ek olarak, boraks aracılığıyla otofajinin indüklenmesi, hücresele canlılığı baskılamakta ve böylece terapötik etkiyi güçlendirmektedir. Bu doğrultuda, boraks ile bir otofaji aktivatörünün kombinasyonu, boraksın antitümör etkisini daha da artırabilecek potansiyel olarak etkili bir tedavi stratejisi olabilir. Bununla birlikte, in vitro olarak gözlemlenen etkin konsantrasyonların in vivo sistemlerdeki karşılığı halen net değildir. Literatürde bildirilen bor türevi plazma düzeyleri genellikle mikromolar düzeyde olup, bu çalışmada etkili olan milimolar konsantrasyonların klinik olarak tolere edilebilirliği tartışmalıdır. Bu nedenle, boraksın terapötik potansiyelinin doğrulanması için farmakokinetik ve toksisite çalışmaları gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108.
2. De Nunzio C, Presicce F, Lombardo R, et al. Physical activity as a risk factor for prostate cancer diagnosis: a prospective biopsy cohort analysis. *BJU Int.* 2016;117(6B):29-35.
3. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, et al. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol.* 2015;26:779-86.
4. Cha EK, Eastham JA. Chemotherapy and novel therapeutics before radical prostatectomy for high-risk clinically localized prostate cancer. *Urol Oncol.* 2015;33(5):217-25.

5. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2014;20(3):460-73.
6. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:2503-18.
7. Debnath J, Gammoh N, Ryan KM. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023;24(8):560-75.
8. Livesey KM, Tang D, Zeh HJ, Lotze MT. Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009;10(12):1269-79.
9. Jones TM, Carew JS, Nawrocki ST. Therapeutic Targeting of Autophagy for Renal Cell Carcinoma Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1185.
10. Eroglu Gunes C. Boric Acid Shows ER Stress and Apoptosis Mediated Anticancer Activity in Human Pancreatic Cancer MIA PaCa-2 and PANC- 1 Cells. *Selcuk Med J*. 2023;39(1):1-6.
11. Devirian TA, Volpe SL. The physiological effects of dietary boron. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2003;43(2):219-31.
12. Khaliq H, Juming Z, Ke-Mei P. The Physiological Role of Boron on Health. *Biol Trace Elem Res*. 2018;186(1):31-51.
13. Barranco WT, Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Lett*. 2004;216(1):21-9.
14. 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.
15. Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, et al. Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncol Rep*. 2004;11(4):887-92.
16. Xu Y, Yu H, Qin H, et al. Inhibition of autophagy enhances cisplatin cytotoxicity through endoplasmic reticulum stress in human cervical cancer cells. *Cancer Lett*. 2012;314(2):232-43.
17. Rosenfeld MR, Ye X, Supko JG, et al. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy*. 2014;10(8):1359-68.
18. Koca HB, Köken T, Akan T. Effect of *Apium Graveolens* Extracts on Caspase-3, -8, -9 and Apaf-1 in Lncap Cells. *KTD*. 2024;25:300-6.
19. Tuncer C, Hacıoglu C. Borax induces ferroptosis of glioblastoma by targeting HSPA5/NRF2/GPx4/GSH pathways. *J Cell Mol Med*. 2024;28(7):e18206.
20. Hacıoglu C, Kar F, Davran F, Tuncer C. Borax regulates iron chaperone- and autophagy-mediated ferroptosis pathway in glioblastoma cells. *Environ Toxicol*. 2023;38(7):1690-1701.
21. Hacıoglu C, Oral D. Borax affects cellular viability by inducing ER stress in hepatocellular carcinoma cells by targeting SLC12A5. *J Cell Mol Med*. 2024;28(10):e18380.
22. Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res*. 2014;24(1):24-41.
23. Klionsky DJ, Codogno P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun*. 2013;5(5):427-33.
24. Münz C. Regulation of innate immunity by the molecular machinery of macroautophagy. *Cell Microbiol*. 2014;16(11):1627-36.
25. Hönscheid P, Datta K, Muders MH. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radiat Biol*. 2014;90(8):628-35.
26. Patel AS, Morse D, Choi AM. Regulation and functional significance of autophagy in respiratory cell biology and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013;48(1):1-9.
27. Lorin S, Hamaï A, Mehrpour M, Codogno P. Autophagy regulation and its role in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2013;23(5):361-79.
28. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. *Mol Pharmacol*. 2014;85(6):830-38.
29. Chen HY, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011;4(7):973-83.
30. Nie C, Zhou J, Qin X, et al. Diosgenin-induced autophagy and apoptosis in a human prostate cancer cell line. *Mol Med Rep*. 2016;14(5):4349-59.
31. Won KY, Kim GY, Lim SJ, et al. Autophagy is related to the hedgehog signaling pathway in human gastric adenocarcinoma: prognostic significance of Beclin-1 and Gli2 expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*. 2015;211(4):308-15.
32. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: impact on the aging process. *Ageing Res Rev*. 2013;12(2):520-34.
33. Slobodkin MR, Elazar Z. The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem*. 2013;55:51-64.
34. Romao S, Münz C. LC3-associated phagocytosis. *Autophagy*. 2014;10(3):526-8.
35. Ouyang DY, Xu LH, He XH, et al. Autophagy is differentially induced in prostate cancer LNCaP, DU145 and PC-3 cells via distinct splicing profiles of ATG5. *Autophagy*. 2013;9(1):20-32.
36. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy*. 2009;5(6):862-3.