GÜSBD 2021; 10(2): 213 - 221 **Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi** **Araştırma Makalesi**
GUJHS 2021; 10(2): 213 - 221 Gümüşhane University Journal of Health Sciences Original Article

Borik Asitin 8305C Anaplastik Tiroit Kanseri Hücrelerinde Antioksidan ve Anti-kanser Aktivitesi

Antioxidant and Anti-cancer Activity of Boric Acid in 8305C Anaplastic Thyroid Cancer Cells

Melike ERSÖZ[1]

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, borik asitin 8305C insan anaplastik tiroit kanseri (ATK) hücrelerinde sitotoksik, anti-proliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerini değerlendirmektir. Borik asitin sitotoksisitesi 0-1000 µg/mL doz aralığında (24, 48 ve 72 saat) 8305C insan ATK hücrelerinde bir tetrazolyum testiyle (MTT) belirlendi. Hücrelerdeki proliferasyon ve apoptoz incelendi. Biyokimyasal parametreler spektrofotometrik olarak tespit edildi. 24, 48 ve 72 saat borik asit ile muamele edilen 8305C insan ATK hücrelerinin yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC_{50}) değerleri sırasıyla 238 µg/mL, 116 µg/mL ve 70 µg/mL olarak hesaplandı ($p<0,05$). Prolifere olan hücre çekirdek antijeni (PCNA) pozitif hücrelerin yüzdesi 200, 250, 300 µg/mL konsantrasyonda borik asit ile 48 saat muamele edilen hücrelerde anlamlı azalma gösterdi ($p<0,01$). Borik asitin 250 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında 24 ve 48 saatlik muamelesi, kontrol hücrelerine kıyasla 8305C ATK hücrelerinde apoptotik hücre sayısında anlamlı artış gösterdi ($p<0,01$). En düşük malondialdehit seviyesi 48 saat 300 µg/mL konsantrasyonda uygulanan hücrelerde saptandı ($p<0,01$). En yüksek süperoksit dismutaz aktivitesi 48 saat 250 µg/mL borik asit uygulanan hücrelerde olurken ($p<0,01$), glutatyon seviyesi 300 µg/mL borik asit uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak arttı ($p<0,05$). Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, borik asitin 8305C insan ATK hücrelerinde anti-proliferatif ve apoptotik aktiviteye sahip umut verici yeni bir terapötik ajan olabilirliğini gösterir. Çalışma *in vivo* deneylerle desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Borik Asit, Kanser, Proliferasyon, Tiroit.

ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the cytotoxic, anti-proliferative, apoptotic and antioxidant effects of boric acid in 8305C human anaplastic thyroid cancer (ATC) cells. The cytotoxicity of boric acid was determined at a dose range of 0-1000 µg/mL in the human ATC cells (24, 48, and 72 hours) by a tetrazolium test (MTT). Proliferation and apoptosis in the cells were examined. Biochemical parameters were determined spectrophotometrically. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of cells treated with boric acid for 24, 48, and 72 hours were calculated as 238 µg/mL, 116 µg/mL, and 70 µg/mL, respectively ($p<0.05$). The percentage of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells showed a significant decrease in the cells treated with boric acid at 200, 250, and 300 µg/mL concentrations for 48 hours ($p<0.01$). Boric acid administered at 250 and 300 µg/mL showed a significant increase in the percentage of apoptotic cells of 8305C ATC cells compared to control cells ($p<0.01$). The lowest malondialdehyde level was detected in cells treated with boric acid at 300 µg/mL for 48 hours ($p<0.01$). While the highest superoxide dismutase level was in cells treated with 250 µg/mL boric acid for 48 hours ($p<0.01$), glutathione level increased significantly in cells treated with 300 µg/mL boric acid compared to control cells ($p<0.05$). The results obtained from this study demonstrate that boric acid can be a promising new therapeutic agent in terms of anti-proliferative and apoptotic activities in 8305C human ATC cells. The study should be supported by *in vivo* experiments.

Keywords: Apoptosis, Boric Acid, Cancer, Proliferation, Thyroid.

[1]Dr. Öğr. Üyesi, Melike ERSÖZ, Biyokimya, Demiroğlu Bilim Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, mersoz1@yahoo.com, ORCID:0000-0002-5289-5809

İletişim / Corresponding Author: Melike ERSÖZ
e-posta/e-mail: mersoz1@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received: 01.12.2020
Kabul Tarihi/Accepted: 06.05.2021

GİRİŞ

Anaplastik tiroit kanseri (ATK), kötü prognozlu ölümcül bir hastalık olup, tüm tiroit kanserlerinin %1-2'sini oluşturur.[1] ATK tedavisi için cerrahi ve kemoterapi yöntemlerinin olmasına rağmen, bu standart tedavilere dirençlidir ve alternatif tedavi stratejileri araştırılmalıdır.[2, 3] 8305C insan ATK hücreleri çeşitli *in vitro* çalışmalarda ATK için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde bir model olarak kullanılmaktadır.[4, 5]

Bor, oksijene afinitesi yüksek olan ve mineral bileşiklerde borik asit veya borat tuzları şeklinde bulunan stabil ametaldir. Borik asit, borun su ile uygun sıcaklıkta reaksiyona girmesi sonucunda oluşur.[6] Meyveler, sebzeler, bakliyatlar, baklagiller ve fındık bor açısından zengindir.[7] Vücutta borik asit olarak bulunan bor gastrointestinal sistemden tamamen emilir, hayvanlarda ve insanlarda bor toksisitesinin etkisi nadirdir.[8]

Fizyolojik pH'ta borik asit formunda olan bor, düşük konsantrasyonlarda biyolojik sistemlerde geniş fizyolojik etkilere sahipken, yüksek konsantrasyonlarda toksiktir.[9] Diyette düşük konsantrasyonlarda borik asit kemik minerilizasyonu ve prostat kanseri hücre büyümesinin önlenmesi gibi bazı biyolojik süreçler için önemli iken, yüksek konsantrasyonlarda toksiktir.[10-12] Bazı çalışmalar düşük konsantrasyonda borik asitin oksidan özellik göstermediğini, ancak yüksek konsantrasyonda oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.[13, 14] Ayrıca borik asitin doza bağlı olarak bazı kanser hücre dizilerinde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Kanser hücreleri üzerinde bor aktivitesi içeren mekanizmalar; serin proteazlar, NAD-dehidrojenazlar, mRNA eklenmesi ve hücre bölünmesi dahil çeşitli enzimatik aktivitelerin inhibisyonuna, aynı zamanda reseptör bağlanma taklidine ve apoptozun indüksiyonuna dayanır.[15, 16]

İnsan kanı seviyeleri diyetle alınan borik asit miktarını yansıtır ve bu miktarın 13-70 mM arasında değiştiği bildirilmiştir.[15] Borun insanlar için yararlı bir element olduğu, bor bakımından zengin diyetlerin prostat, meme, karaciğer, pankreas, lenfoma gibi çeşitli kanser türlerini geliştirme riskini önemli ölçüde azalttığı raporlanmıştır.[17] İlk klinik olarak test edilen bor bazlı ilaç, multipl miyelomayı tedavi etmek için kullanılan bortezomibdir.[18] Bor ve bor içeren moleküller günlük diyette doğal anti-kanser ajan veya potansiyel ilaçlar olabileceğinden, etki mekanizmaları ve toksisite riski, hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak aydınlatılmalıdır.[19]

Tüm bu bilgiler doğrultusunda yapılan bu çalışma; borik asitin 8305C ATK hücreleri üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif, apoptotik ve antioksidan etkilerini belirlemeyi amaçlar.

MATERYAL VE METOT

Hücre Kültürü Koşulları

8305C insan ATK hücreleri (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC Porton Down, UK) 100 µg/mL streptomisin ve 100 ünite/mL penisilin (Wisent Bioproducts, Canada), 0,2 mM L-Glutamin (Gibco, Grand Island, New York), %1 Esansiyel olmayan Amino Asit (NEAA) (Gibco, Grand Island, New York) ve %10 Fetal Bovin Serum (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) besiyerinde, 37 °C'de %5 $C0_2$ ve nem içeren inkübatörde kültüre edildi. Kültür sırasında besiyeri her iki günde bir değiştirildi.

Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı, MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil 2,5-difeniltetrazolyum bromid) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) testi kullanılarak değerlendirildi. 8305C insan ATK hücreleri $1x10^4$ hücre/mL olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekildi ve inkübatörde büyütüldü. Besiyeri borik asit içeren (0,5-1000 µg/mL) (Sigma) taze

besiyeri ile değiştirildi. 24, 48 ve 72 saat inkübasyonun ardından MTT reaktifi (50 mg/mL) eklendi ve hücrelerde oluşan formazan kristalleri 0,1 mL DMSO eklenerek çözüldü ve absorbans değerleri (OD) 570 nm'de mikroplaka okuyucuda ölçüldü. Borik asit eklenmeyen hücreleri içeren kuyucuklar kontrol hücreleri olarak değerlendirildi. Hücre canlılığı (%) = (muamele edilmiş hücrelerin OD değeri/muamele edilmemiş hücrelerin OD değeri (kontrol)) x 100 formülüne göre hesaplandı. Elde edilen % hücre canlılığı sonuçlarıyla %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC_{50}) değerleri hesaplandı.

Hücre Proliferasyon Testi

8305C insan ATK hücreleri, lameller üzerine $1x10^4$ hücre/mL olacak şekilde ekilerek kültüre edildi. Besiyeri borik asit içeren (200, 250 ve 300 µg/mL) taze besiyeri ile değiştirilerek 24 ve 48 saat inkübe edildi ve metanolle fikse edildi. Hücrelere bloklama solüsyonu sonrasında çoğalan hücre çekirdek antijeni (PCNA) primer antikoru (Neomarkers, USA) gece boyunca 4 °C'de 1:300 oranında uygulandı. Sekonder antikor ve streptavidinle biotinlenmiş peroksidaz (Invitrogen, USA) inkübasyonu sonrasında, AEC (Invitrogen, USA) kullanılarak immünoreaktivite ortaya çıkarıldı, zıt boyama için hematoksilen kullanıldı. Hücreler, Olympus BX-50 mikroskobu kullanılarak görüntülendi. En az 10 alan rastgele seçildi ve her alanda tüm hücreler sayıldı. İmmünreaktif hücrelerin yüzdesi [(immünoreaktif hücre sayısı/toplam hücre sayısı) x100] formülüyle hesaplandı.

TUNEL Testi ile Apoptoz Tayini

Apoptoz, terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP-Biotin uç etiketleme (TUNEL) test kitinin (Millipore, USA) talimatlarına göre saptandı. Hücreler lameller üzerinde $1x10^4$ hücre/mL olacak şekilde ekilerek büyütüldü ve 200, 250, 300 µg/mL borik asit ile muamele edilerek 24 ve 48 saat inkübe edildi. Metanol ile fikse edilen hücrelere equilibration tamponu, TdT enzimi ve anti-digoxein peroksidaz konjugatı uygulandı ve meydana gelen reaksiyon diaminobenzidin kullanılarak gözlendi ve zıt boyama hematoksilenle gerçekleştirildi. En az 10 alan rastgele seçildi ve her alanda tüm hücreler sayıldı. Apoptotik hücrelerin yüzdesi [(apoptotik hücre sayısı/toplam hücre sayısı)x100] denklemiyle belirlendi.

Oksidatif Stres ve Hücresel Antioksidan Aktivite

Hücre içi oksidatif stres ve antioksidan aktivite, reaktif oksijen türleri üretimi, süperoksit dismutaz enzim aktivitesi ve glutatyon seviyeleri ölçülerek değerlendirildi. ATK hücreleri $1x10^5$ hücre/mL olacak şekilde kültür plaklarına ekildi. Çoğalan hücrelere 200, 250 ve 300 µg/mL borik asit içeren taze besiyeri eklendi. 24 ve 48 saat inkübasyonu takiben elde edilen hücre lizatlarındaki toplam protein konsantrasyonu bikinkoninik asit yöntemi ile standart olarak da sığır serum albümin (BSA) kullanılarak ölçüldü.[20]

Reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunun hücre içi tespiti için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri, malondialdehiti (MDA) tespit eden tiyobarbitürik asit (TBA) reaktif maddeler (TBARS) testidir.[21] 100 µL hücre lizatı, 0,2 mL TBA reaktifi ile karıştırılarak 15 dakika kaynatıldı. Santrifüj sonrasında reaksiyon karışımları, bir mikroplaka okuyucu kullanılarak 535 nm'de kolorimetrik olarak ölçüldü. Sonuçlar, hücrelerde nmol MDA/mg protein olarak ifade edildi.

Hücre içi süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Mccord JM ve Fridovich tarafından açıklanan spektrofotometrik yönteme göre belirlendi.[22] Reaksiyon karışımı; ksantin, nitroblue tetrazolyum, sodyum karbonat, BSA, EDTA ve ksantin oksidaz (XO) enzimi kullanılarak hazırlandı. 490 µL karışım 100 µL hücre lizatına eklendi ve inkübe edildi. Reaksiyon 0,2 mL 0,8 mmol bakır klorür ilave edilerek durduruldu. Üretilen formazanın absorbansı, hücre lizatı hariç tüm reaktifleri içeren bir kör kullanılarak 560 nm'de ölçüldü. SOD aktivitesi miligram protein başına ünite birim olarak ifade edildi.

İndirgenmiş glutatyon (GSH) seviyesi Boyne ve Ellman tarafından tanımlanan kolorimetrik bir yöntemle ölçüldü.[23] 200 µL hücre lizatı metafosforik asit ile karıştırılarak

deproteinize edildi. GSH aktivitesi için; hücre lizatına %1 sodyum sitrat çözeltisi (Ellman reaktif) içinde çözünmüş 1 mmol DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoikasit)) ilave edilerek 412 nm'de absorbans ölçüldü. Hücrelerde GSH seviyeleri µg GSH/mg protein olarak ifade edildi.

İstatistiksel Analizler

Veriler, en az üç kez gerçekleştirilen üç ayrı deneyin ortalama ± standart sapması (SD) olarak sunuldu. İstatistiksel analiz GraphPad Prism yazılımı versiyon 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA) kullanılarak yapıldı. Hücre proliferasyonu ve apoptoz analizi için Mann–Whitney nonparametrik test kullanıldı. IC_{50} değerleri GraphPad Prism kullanılarak hesaplandı. Oksidatif stres ve hücresel antioksidan aktivite ölçümleri iki yönlü Anova testi ile analiz edildi. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Araştırmanın Etik Yönü

Bu çalışmada, deneyler hücre kültürü üzerine yapıldığı için etik kurul başvurusuna gerek duyulmamaktadır. Çalışma Demiroğlu Bilim Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır. Bu çalışma için 12/03/2018 tarihli ve 2018-08 sayılı kurumsal yazılı izin alınmıştır.

Araştırmanın Kısıtlılıkları

Çalışmanın hücre kültürü ile ilgili yapılması araştırma sınırlaması olarak görülmektedir.

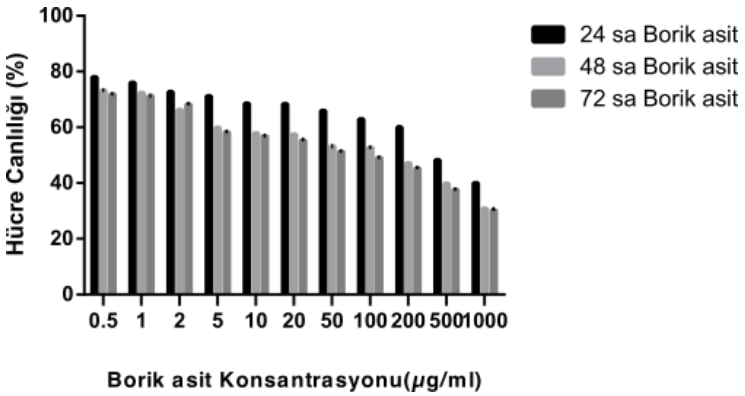
Teşekkür/Destekleyen Kuruluş

Çalışma sürecinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Banu Mansur'a, Gülşah Akbaş'a ve Fatma Şayan Poyraz'a teşekkür ederim.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Borik Asitin Sitotoksik Etkisi

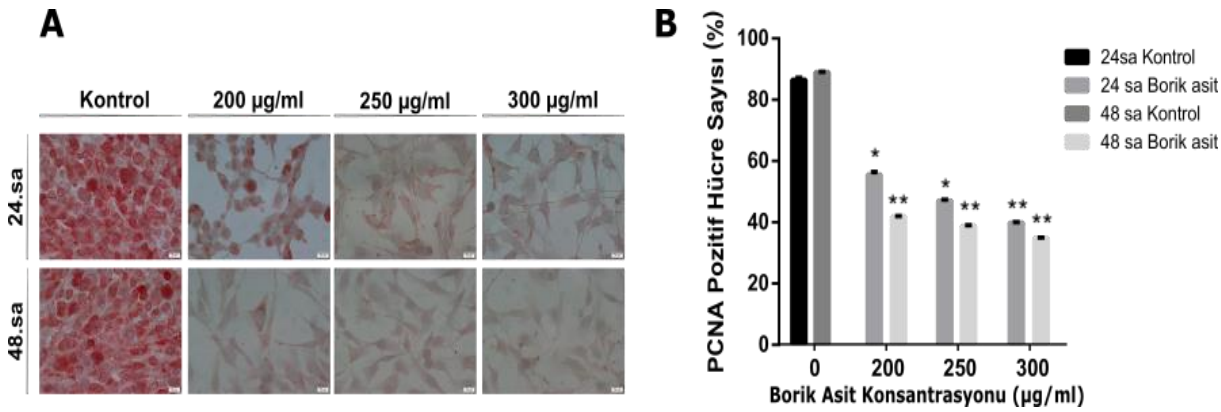
Borik asitin indüklediği hücre canlılığı MTT testiyle mitokondriyal aktivitede azalma ile değerlendirildi. Şekil 1'de gösterildiği gibi, 8305C insan ATK hücrelerinde borik asitin artan konsantrasyonlarına ve uygulama sürelerine bağlı olarak hücre canlılığı azaldı ($p<0,05$). 8305C insan ATK hücrelerinde borik asitin IC_{50} değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 238 µg/mL, 116 µg/mL ve 70 µg/mL olarak hesaplandı. Hacıoğlu ve ark., borik asitin DU-145 insan prostat kanseri hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak (0-12,5 mM) hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olduğunu bildirilmişlerdir.[24] Yapılan bir başka çalışmada; artan konsantrasyona (0-50 mM) bağlı olarak borik asitin, SK-MEL28 insan cilt melanom hücrelerinde hücre canlılığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir.[25] Bu sonuçlar, borik asitin 8305C insan ATK hücreleri üzerinde bir sitotoksisiteye sahip olabileceğini göstermektedir ve elde edilen sonuçlar önceki çalışmalardaki sonuçları desteklemektedir.



Şekil 1. Borik Asitin (24, 48 ve 72 Saatte) 8305C İnsan Anaplastik Tiroit Kanseri Hücre Canlılığına Etkisi ($p<0,05$).

Borik Asitin Hücre Proliferasyonuna Etkisi

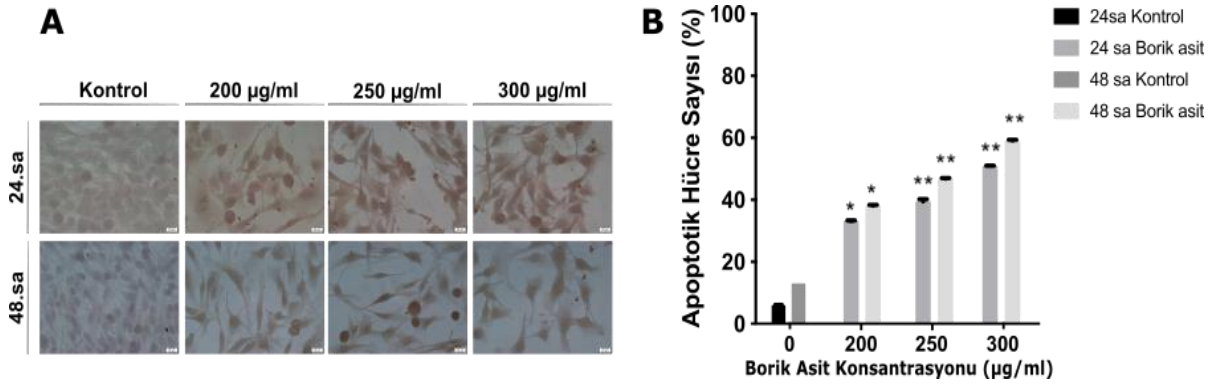
Borik asitin 8305C insan ATK hücrelerinde hücre proliferasyonunu belirlemek için immünositokimyasal olarak PCNA etiketlemesi uygulandı. 24 ve 48 saatlik uygulamada, borik asit tüm konsantrasyonlarında 8305C insan ATK hücrelerinin proliferasyon oranında azalma gösterdi (Şekil 2A). ATK hücrelerine borik asitin 48 saat uygulanması, PCNA pozitif hücrelerin yüzdesini tüm konsantrasyonlarda muamele edilmeyen kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak azalttığı görüldü ($p<0,01$) (Şekil 2B). Proliferasyon, kanser gelişimi ve ilerlemesinin önemli bir parçasıdır.[26] DNA sentezi için gerekli ve DNA polimeraz için kofaktör bir nükleer protein olan PCNA, hücre döngüsünün geç G1 fazında çekirdekte yükselir, S fazı sırasında maksimum hale gelir ve seviyesi hücresel proliferasyon ve DNA sentezleri hızıyla doğrudan orantılıdır.[15, 27] PCNA seviyelerinde artış, büyüme faktörleri tarafından veya hücre döngüsü yokluğunda DNA hasarının bir sonucu olarak da indüklenebilir. Çalışmalarda borik asitin doza bağımlı olarak PC-3, DU 145 ve LNCaP prostat kanseri hücre soylarında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.[11, 15] Sonuçlara göre borik asit ATK hücrelerinde hücre döngüsü ilerlemesine giren hücrelerin proliferasyon oranını önemli ölçüde azaltır ve bu hücrelerin borik asit ile apoptoza daha duyarlı olma olasılığını ortaya çıkarır.



Şekil 2. Borik Asitin (24 ve 48 Saatte) 8305C İnsan Anaplastik Tiroit Kanseri Hücrelerinde Hücre Proliferasyonuna Etkisi. (A) Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni (PCNA) Pozitif İşaretli Hücreler (B) PCNA Pozitif Hücre Yüzdesi (*p<0,05 Kontrol Grubuna Göre, **p<0,01Kontrol Grubuna Göre).

Borik Asitin Apoptotik Etkisi

TUNEL testi, apoptozun geç aşamalarında kapsamlı DNA degradasyonuna uğrayan apoptotik hücreleri saptar.[28] Şekil 3A'ya göre uygulanan tüm dozlarda ve sürelerde apoptozla uyumlu morfolojiye sahip hücrelerde spesifik nükleer boyanma gerçekleşti. Borik asitin 250 ve 300 µg/mL konsantrasyonlarında 24 ve 48 saatlik muamelesi, muamele edilmeyen kontrol hücrelerine kıyasla 8305C ATK hücrelerinde apoptotik hücre sayısında anlamlı artış gösterdi (Şekil 3B) ($p<0,01$).

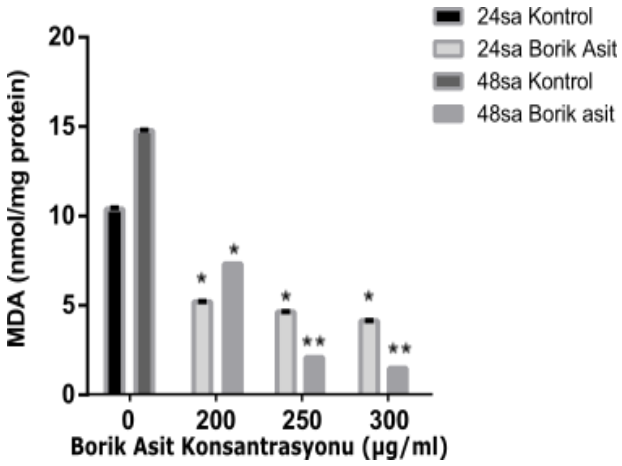


Şekil 3. 8305C İnsan Anaplastik Tiroit Kanseri Hücrelerinde Borik Asitin (24 ve 48 Saatte) Apoptotik Etkisi. (A) TUNEL (Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP-Biotin Uç Etiketleme) Pozitif İşaretli Hücreler (B) TUNEL Pozitif Hücre Yüzdesi (*p<0,05 Kontrol Grubuna Göre, **p<0,01Kontrol Grubuna Göre).

Deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar borik asitin insan prostat kanseri hücreleri üzerindeki olumlu etkilerini göstermiştir.[29, 30] Yüksek dozda (12,5-50 mM) borik asit hücre replikasyonunu yavaşlatırken, meme kanseri hücrelerinde (MDA 231) ve melanoma hücrelerinde apoptozisin indüksiyonuna neden olur.[16] Sonuçlar, borik asitin artan konsantrasyonları ile muamele edilmiş 8305C ATK hücrelerinin apoptoza maruz kaldığını göstermektedir.

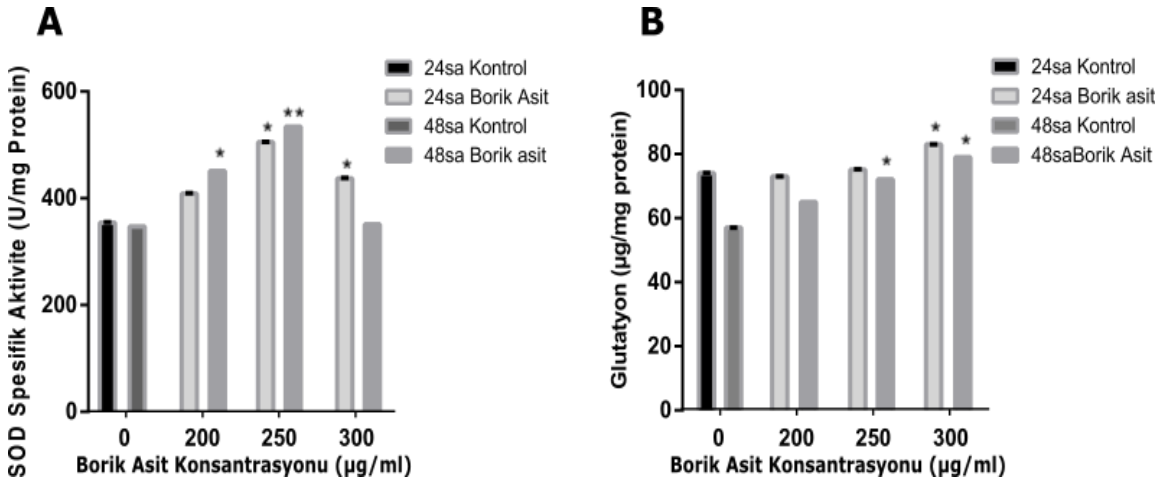
Borik Asitin Oksidatif Stres ve Antioksidan Aktivitesi

Kemoterapötik ajanların, ROS oluşumunda artış veya ROS temizleme kapasitesi ile kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyebileceği bildirilmiştir.[31] Onkogenler için uyarıcı olan ve kanser fenotipinden sorumlu olan ROS, kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha fazladır.[32] Oksidatif hasar sonucu oluşan MDA'nın, 24 saat borik asit uygulanan tüm dozlarda 8305C ATK hücrelerinde kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0,05$). En düşük MDA seviyesi 48 saat 300 µg/mL konsantrasyonda uygulanan hücrelerde saptandı ($p<0,01$) (Şekil 4). Diyetle alınan bor bileşiklerinin takviyesinin lipid peroksidasyonunu azalttığını ve antioksidan savunma mekanizmasının etkinliğini artırdığı rapor edilmiştir.[33] Sonuçlar borik asitin indüklediği apoptozun ROS'u temizleme yoluyla gerçekleştirilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4. Borik Asit Uygulanan (24 ve 48 Saat) 8305C İnsan Anaplastik Tiroit Kanseri Hücrelerinde Malondialdehit (MDA) Seviyeleri (*p<0,05 Kontrol Grubuna Göre, **p<0,01 Kontrol Grubuna Göre).

Antioksidanlar baskılama, onarma, zincir koparma ya da temizleme etkisi ile oksidatif hasar oluşumunun önüne geçerler.[34] SOD ve GSH oksidadif strese karşı önemli antioksidan savunma sistemidir. Hücre oksidasyonu ve lipid peroksidasyonu süreci, hücresel SOD ve GSH seviyesinde azalmayı yansıtır.[35, 36] 24 ve 48 saat borik asit uygulanan 8305C insan ATK hücrelerinde SOD seviyesi, kontrol hücrelerine göre artmıştır. En yüksek SOD seviyesinde ki artış hem 24. saat hem de 48. saat de 250 µg/mL borik asit uygulanan hücrelerde olmuştur ($p<0,05$, $p<0,01$). (Şekil 5A). 24 ve 48. saat GSH seviyesi 8305C ATK hücrelerinde, 300 µg/mL borik asit uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak arttı ($p<0,05$). 24. saat de ise GSH seviyesinde önemli bir değişiklik saptanmadı (Şekil 5B). Buna göre; borik asit uygun doz ve sürede bu hücrelerde antioksidan etki göstererek serbest radikal oluşumunu önleyebilir.



Şekil 5. 8305C İnsan Anaplastik Tiroit Kanseri Hücrelerinde 24 ve 48 Saat Borik Asit Uygulamasının (A) Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi ve (B) Glutatyon Seviyeleri Üzerindeki Etkisi. (*p<0,05 Kontrol Grubuna Göre, **p<0,01 Kontrol Grubuna Göre).

ATK mevcut uygulanan tedavilere dirençli olup, çalışmalarda standart uygulanan tedavilere dirençli olan kanser türlerinde yeni kemoterapötik ajanlara ve destek takviyelere ilgi oldukça artmıştır. Bu çalışmada tıpta yaygın kullanılan borik asitin ATK'de anti-kanser ve antioksidan etkinliği gösterildi. Sonuçlara göre borik asit 8305C hücrelerinde doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azaltmıştır. Ayrıca uygun doz ve sürelerde proliferasyonu baskılayarak apoptozu indüklemiştir. Bu çalışma borik asitin insan anaplastik tiroit kanseri hücreleri üzerinde biyolojik aktivitelerini gösteren ilk çalışmadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen verilere göre, borik asitin 8305C insan ATK hücrelerinde anti-proliferatif ve anti-kanser aktivitesine sahip olduğu belirlendi. Antioksidan özelliğe sahip borik asitin ATK hücrelerinde, hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek koruyucu etki gösterebileceği saptandı. Çalışmanın sonuçları, borik asitin tiroit kanseri tedavisinde alternatif kemoterapötik bir ajan olarak kullanılabileceğine dair bulgular içerdiğini göstermektedir. Ayrıca diğer kanser türlerinin tedavisinde de alternatif ajan ya da destekleyici takviye olarak kullanımının yapılacak özgün çalışmalarla tespit edilmesine ışık tutabilir. Bu araştırma sonuçları *in vivo* ve klinik deneylerle zenginleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Molinaro, E, Romei, C, Biagini, A, Sabini, E, Agate, L, Mazzeo, S, Materazzi, G, Sellari-Franceschini, S, Ribechini, A, Torregrossa, L, Basolo, F, Vitti, P. and Elisei, R. (2017). "Anaplastic Thyroid Carcinoma: From Clinicopathology to Genetics and Advanced Therapies". Nature Reviews Endocrinology, 13, 644–660.
2. Saini, S, Tulla, K, Maker, A.V, Burman, K.D. and Prabhakar, B.S. (2018). "Therapeutic Advances in Anaplastic Thyroid Cancer". Molecular Cancer, 17 (1), 154-168.
3. Smallridge, R.C, Ain, K.B, Asa, S.L, Bible, K.C, Brierley, J.D, Burman, K.D, Kebebew, E, Lee, N.Y, Nikiforov, Y.E, Rosenthal, M.S, Shah, M.H, Shaha, A.R. and Tuttle, R.M. (2012). "American Thyroid Association Anaplastic Thyroid Cancer Guidelines Taskforce". Practice Guideline Thyroid, 22 (11), 1104-1139.
4. Ito, T, Seyama, T, Hayashi, Y, Hayashi, T, Dohi, K, Mizuno, T, Iwamoto, K, Tsuyama, N, Nakamura, N. and Akiyama, M. (1994). "Establishment of 2 Human Thyroid-Carcinoma Cell-Lines (8305C, 8505C) Bearing p53 Gene-Mutations". International Journal of Oncology, 4 (3), 583-586.
5. Nadi, S, Monfared, AS, Zabihi, E, Mahmoudzadeh, A, Eyvazzadeh, N. ve Tahamtan, R. (2019). "Combined Effect of Iodine Contrast Media, Cisplatin and External Beam Radiotherapy on Anaplastic Thyroid Cancer Cells". Journal of Biomedical Physics and Engineering, 9 (2), 217-226.
6. Bilgiç, M. ve Dayık, M. (2013). "Borun Özellikleri ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımıyla Sağladığı Avantajlar". Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi, 7 (2), 27-37.
7. Baker, S.J, Tomsho, J.W. and Benkovic, S.J. (2011). "Boron-Containing Inhibitors of Synthetases". Chemical Society Reviews, 40 (8), 4279–4285.
8. Devirian, T.A. and Volpe, S.L. (2003). "The Physiological Effects of Dietary Boron". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 43 (2), 219–231.
9. Marsiccobetre, S, Rodríguez-Acosta, A, Lang, F, Figarella, K. and Uzcátegui, N.L. (2017). "Aquaglyceroporins are The Entry Pathway of Boric Acid in Trypanosoma Brucei". Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 1859 (5), 679-685.
10. Hakki, S.S, Bozkurt, B.S. and Hakki, E.E. (2010). "Boron Regulates Mineralized Tissue-Associated Proteins in Osteoblasts (MC3T3-E1)". Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 24, 243–250.
11. Barranco, W.T. and Eckhert, C.D. (2006). "Cellular Changes in Boric Acid-Treated DU-145 Prostate Cancer Cells". British Journal of Cancer, 94, 884–890.
12. Movahedi Najafabadi, B.H. and Abnosi, M.H. (2016). "Boron İnduces Early Matrix Mineralization Via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells". Cell Journal, 18 (1), 62–73.
13. Iztleuov, M, Umirzakova, Z, Sambaeva, S, Yesmukhanova, D, Akhmetova, A, Medeuova, R, Kolıshbaeva, I. and Iztleuov, E. (2017). "The Effect of Chromium and Boron on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Status (in Experiment)". BioTechnology Indian Journal, 13 (1), 125-132.
14. Türkeza, H, Geyikoglu, F, Tatar, A, Keles, S. and Özkan, A. (2007). "Effects of Some Boron Compounds on Peripheral Human Blood". Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences, 62, 889–896.
15. Barranco, W.T. and Eckhert, C.D. (2004). "Boric Acid Inhibits Human Prostate Cancer Cell Proliferation". Cancer Letters, 216 (1), 21-29.
16. Scorei, R.I. and Popa, R. (2010). "Boron-Containing Compounds as Preventive and Chemotherapeutic Agents for Cancer". Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 10 (4), 346-351.
17. Nikkhah, S. and Naghii, M.R. (2017). "Using Boron Supplementation in Cancer Prevention and Treatment". The Cancer Press, 3 (3), 113-119.
18. Kane, R.C, Bross, P.F, Farrell, A.T. and Pazdur, R. (2003). "Velcade((R)): USFDA Approval for The Treatment of Multiple Myeloma Progressing on Prior Therapy". The Oncologist, 8 (6), 508–513.
19. Uluisik, I, Karakaya, H.C. and Koc, A. (2018). "The Importance of Boron in Biological Systems". Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 45, 156-162.
20. Walker, J.M. (2002). The Protein Protocols Handbook. Totowa: Humana Press.
21. Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). "Determination of Aldehydiclipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-hydroxyno-nenal". Methods in Enzymology, 186, 407–421.
22. McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). "Superoxide Dismutase an Enzymic Function for Erythrocuprein (hemocuprein)". The Journal of Biological Chemistry, 244, 6049–6055.
23. Boyne, A.F. and Ellman, G.L. (1972). "A Methodology for Analysis of Tissue Sulfhydryl Components". Analytical Biochemistry, 46, 639–653.
24. Hacioglu, C, Kar, F, Kacar, S, Sahinturk, V. and Kanbak, G. (2020). "High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line". Biological Trace Element Research, 193 (2), 400-409. https://doi.org/ 10.1007/s12011-019-01739-x.
25. Acerbo, A.S. and Miller, L.M. (2009). "Assessment of the Chemical Changes Induced in Human Melanoma Cells by Boric Acid Treatment Using Infraredimaging". The Analyst, 134, 1669-1674.
26. Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001). "Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer". Nature, 411, 342-348.
27. Bologna-Molina, R, Mosqueda-Taylor, A, Molina-Frechero, N, Mori-Estevez, A.D. and Sánchez-Acuña, G. (2013). "Comparison of the Value of PCNA and Ki-67 as Markers of Cell Proliferation in Ameloblastic Tumors". Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal, 18 (2), 174-179.
28. Kyrylkova, K, Kyryachenko. S, Leid, M. and Kioussie, C. (2012). "Detection of Apoptosis by TUNEL Assay". Methods in Molecular Biology, 887, 41-47.
29. Barranco, W.T, Kim, D.H, Stella, S.R. and Eckhert, C.D. (2009). "Boric Acid İnhibits Stored Ca^{2+} Release in DU-145 Prostate Cancer Cells". Cell Biology and Toxicology, 25 (4), 309–320.
30. Cui, Y, Winton, M.I, Zhang, Z.F, Rainey, C, Marshall, J, De Kernion, J.B. and Eckhert, C.D. (2004). "Dietary Boron Intake and Prostate Cancer Risk". Oncology Reports, 11 (4), 887–892.
31. Khoshtabiat, L, Mahdavi, M, Dehghan, G. and Rashidi, M.R. (2016). "Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Chronic Myelogenous Leukemia K562 Cells by an Active Compound from the Dithio- Carbamate Family". Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 17 (9), 4267-4273.
32. Tandon, V.R, Sharma, S, Mahajan, A. and Bardi, G.H. (2005). "Oxidative Stress: A Novel Strategy in Cancer Treatment". Journal of Cancer Therapy, 7 (1), 1-3.

33. Ince, S, Kucukkurt, I, Cigerci, I.H, Fidan, A.F. and Eryavuz, A. (2010). "The Effects of Dietary Boric Acid and Borax Supplementation on Lipid Peroxidation, Antioxidant Activity, and DNA Damage in Rats". Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 24 (3), 161-164.

34. Valko, M, Leibfritz, D, Monco, l.J, Cronin, M.T.D, Mazur, M. and Telser, J. (2007). "Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease". The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44–84.

35. Morry, J, Ngamcherdtrakul, W. and Yantasee, W. (2017). "Oxidative Stress in Cancer and Fibrosis: Opportunity for Therapeutic Intervention with Antioxidant Compounds, Enzymes, and Nanoparticles". Redox Biology, 11, 240–253.

36. Aslankoc, R, Demirci, D, Inan, U, Yildiz, M, Ozturk, A, Cetin, M, Savran, E.S. and Yilmaz, B. (2019). "The Role of Antioxidant Enzymes in Oxidative Stress-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx)". Medical Journal of Suleyman Demirel University, 26 (3), 362-369.