



Puerarin AML-12 Hücrelerinde Metotreksatın Neden Olduğu Hepatoksisiteden Korur

Puerarin Protects from Methotrexate Induced Hepatotoxicity in AML-12 Cells

Melek AKINCI¹, Çağatay OLTULU², Elvan BAKAR³, Zatiye Ayça ÇEVİKELLİ YAKUT⁴

¹Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Temel Bilimleri Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

⁴Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Edirne; Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Amaç: Puerarinin (PR) metotreksat (MTX) nedenli hepatotoksisite üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız AML-12 hücre hattında kontrol, PR, MTX, PR+MTX olacak şekilde dört grup olarak planlandı. Hücre hatlarına uygulanacak madde konsantrasyonları MTT yöntemi ile belirlendi. Oksidatif stresi irdelemek amacıyla süperoksid dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon ekspresyon düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) analizi ile ölçüldü. MTX'in neden olduğu hepatotoksisitede ve PR'nin hepatoprotektif etkilerinde apoptoz yollarının rolünü değerlendirmek amacıyla qRT-PZR analizi ile kaspaz-3 (Cas-3), Cas-9, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1, Bax, Bcl-2, p53, ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatörü/doğrudan apoptoz bağlayıcı protein inhibitörü (smac/DIABLO), topoizomeraz (Top) I, Top II gen ekspresyonları incelendi.

Bulgular: MTX SOD üzerinden antioksidan savunmayı zayıflattı, fakat serbest radikal artışı nedeni ile katalaz ve glutatyon ekspresyonunu artırdı. PR+MTX grubunda, MTX grubuna göre, SOD ekspresyonu arttı, katalaz ve glutatyon ekspresyonları azaldı. PR grubunda, Cas-9, Apaf-1 ve Top I gen ekspresyon düzeyleri azaldı. PR+MTX grubunda PR uygulaması Bax, p53 ve smac/DIABLO ekspresyonunu artırarak ve Bcl2 ekspresyonunu azaltarak hasarlı yapıların apoptozla ortadan kaldırılmasını sağladı.

Sonuç: PR, MTX'in neden olduğu hepatotoksisiteyi antioksidan etkileri ve apoptoz yollarındaki olumlu etkileri ile hafifletmiştir. Fakat PR MTX'e bağlı gelişen DNA'daki çift iplik hasarını önleyemediği ve PR grubunda Top I ekspresyonunda artış geliştiği için, farklı doz çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, puerarin, hepatoprotektif, oksidatif stres, apoptoz

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to look into the effects of puerarin (PR) on methotrexate (MTX)-induced hepatotoxicity *in vitro*.

Materials and Methods: We designed our research with four groups in the AML-12 cell line: control, PR, MTX, and PR+MTX groups. Administered concentration levels to the cell lines were determined with the MTT test. To investigate oxidative stress, the expression levels of glutathione, superoxide dismutase, and catalase were determined with quantitative real-time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis. To evaluate the role of apoptosis pathways in MTX induced hepatotoxicity and the hepatoprotective effects of PR, gene expressions of caspase 3 (Cas-3), Cas-9, apoptotic protease activating factor-1, Bcl-2, Bax, p53, second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein (smac/DIABLO), topoisomerase (Top) I, and Top II were investigated with qRT-PCR.

Results: MTX impaired the antioxidant defense through SOD but elevated the expression of catalase and glutathione due to an increase in free radicals. In the PR+MTX group, SOD expression increased and catalase and glutathione expression decreased compared to the MTX group. Cas-9, Apaf-1, and Top I gene expression levels were reduced in group PR. In the group of PR+MTX, PR application increased the expression of Bax, p53, and smac/DIABLO while decreasing the expression of Bcl-2, which resulted in the elimination of damaged structures by apoptosis.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Melek AKINCI, Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Tel.: +90 505 896 45 58 **E-posta:** melektamer@trakya.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-3879-4232

Geliş tarihi/Received: 17.03.2023 **Kabul tarihi/Accepted:** 11.05.2023



©Telif Hakkı 2023 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2023 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

Conclusion: PR alleviated the hepatotoxicity caused by MTX with its antioxidant effects and positive effects on apoptosis pathways. However, different dose studies are needed because PR could not prevent double-strand damage in DNA due to MTX and there is an increase in Top I expression in the PR group.

Keywords: Methotrexate, puerarin, hepatoprotective, oxidative stress, apoptosis

GİRİŞ

Dünyada ikinci ölüm nedeni olan kanser, hücrel homeostazis ve fonksiyonun geri dönüşümsüz bozulmasıyla karakterize heterojen bir hastalıktır. Kanser tedavisi seçenekleri arasında ameliyat, kemoterapi, radyasyon ve palyatif bakım yer almaktadır¹. Kemoterapi, kanseri tedavi etmek için kemoterapi ilaçlarının kullanılmasıdır. Metotreksat (MTX), farklı malignitelerin ve psoriatik dermatomiyozit ve romatoid artrit gibi otoimmün bozuklukların tedavisinde kullanılan antineoplastik ve immünoşüpresif bir ajandır². Bir folat antagonisti olan MTX, dihidrofolat redüktazı kompetitif olarak inhibe ederek nükleik asit sentezini etkiler³.

Etkili ve yaygın olarak kullanılan kanser tedavilerinden kemoterapötik ilaçlar sitotoksik yan etkilere yol açmaktadır. Düşük doz MTX alan kişilerde hepatotoksisite, nefrotoksisite, testis fonksiyon bozukluğu ve kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkiler belgelenmiştir⁴. Alkol alımı, anormal karaciğer enzim düzeyleri, karaciğer hastalığı öyküsü ve obezite, diyabet ve hiperlipidemi gibi kronik bozuklukların varlığı, MTX'in neden olduğu hepatotoksisite riskini artırır⁴. MTX'in kan aminotransferaz düzeylerini yükselttiği bilinmektedir ve uzun süreli MTX tedavisinin fibrozis, yağlı karaciğer hastalığı ve sirozun başlangıcı ile ilişkisi bulunmuştur⁵. MTX'in neden olduğu hepatotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılmamasına rağmen, son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar oksidatif stres ve enflamasyonun önemli faktörler olduğunu öne sürmektedir. Çalışmalar, aşırı reaktif oksijen türlerinin ve nitrik oksitin yetersiz antioksidan savunmayla birleştiğinde, MTX'in neden olduğu karaciğer hasarının gelişiminde önemli bir rol oynadığını göstermiştir². Bu nedenle antioksidan ve anti-enflamatuvar özelliklere sahip doğal ürünlerin, MTX'in neden olduğu hepatotoksisiteyi potansiyel olarak azaltabileceği öne sürülmüştür². Bir izoflavon glikozit olan puerarin (PR), geleneksel Çin tıbbında karaciğer hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan *Pueraria lobata*'da bulunan primer antioksidandır. Çeşitli araştırmalarda PR'nin karaciğer üzerindeki olumlu etkileri bulunmuştur. Örneğin; PR, sıçanlarda karbon tetraklorür ile oluşturulan deneysel bir karaciğer hasarı modelinde hepatoprotektif etkiler göstermiştir⁶. Chen ve ark.'nın⁷ sıçanlar üzerinde yaptığı bir başka deneysel çalışmada (2013), PR'nin kronik alkol tüketimiyle tetiklenen karaciğer hasarını onardığı bildirilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak araştırmamızda oksidatif stres, apoptoz ve DNA hasarını da dikkate alarak PR'nin MTX ile birlikte AML-12 hücre hattında karaciğer hasarına etkilerini araştırdık.

Araştırmamızda PR'nin MTX'in hepatotoksik etkileri üzerindeki koruyucu etkisi incelenmiştir. Glutasyon (GSH), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri ve genleri kodlayan kaspaz-3 (Cas-3), kaspaz-9 (Cas-9), apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), Bcl-2, Bax, p53, ikinci mitokondri türevli kaspaz aktivatör/düşük pI'li (smac/DIABLO) apoptoz bağlayıcı proteinin direkt inhibitörü ve Top I ve Top II proteinleri araştırıldı. Böylece apoptozda rol oynayan yollar arasındaki etkileşimler ve bunların nükleer gen ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Gruplar

Çalışmamız kontrol grubu, PR grubu, MTX grubu ve PR+MTX grubu olmak üzere 4 gruptan oluştu.

Kimyasallar

Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (320-026-CL), HAMS F 12 (318-010-CL) ve trypsin/EDTA (325-542-EL), Multicell'den (Wisent Bioproducts, St-Bruno, QC, Kanada) satın alındı. Dulbecco'nun modifiye Eagle medyum (DMEM) (320-026-CL), penisilin-streptomisin (Gibco 15070063), fetal siğir serumu (FBS) (Gibco 26140079) ve L-glutamin (Gibco 25030081) Gibco'dan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) temin edildi. Tiazolil Mavi Tetrazolyum Bromür (MTT), Biocompare'den (New York, ABD) alındı. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck 67-68-5) ve Fosfat tamponlu salin (PBS) (Merck 524650), Merck-Millipore'dan (Darmstadt, Almanya) elde edildi. PureLink RNA Mini Kiti (121-830-18A), Invitrogen'den (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) alındı. SYBR Select Master Mix ve Yüksek Kapasiteli cDNA Reverz Transkripsiyon Kiti (8368814), Applied Biosystems'den (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) sağlandı.

PR ve MTX çözeltileri %0,01 DMSO içeren sulu çözelti içerisinde, PR+MTX karışımı ise 1:1 oranında hazırlandı.

Hücre Kültürü

AML-12 (alfa fare karaciğeri 12) hücreleri, 3 aylık bir farenin normal karaciğerinden izole edilen hepatositlerdir. AML-12 (ATCC®, CRL-2254™), %5 ısıyla inaktive edilmiş FBS; 100 IU/mL penisilin, 10 mg/mL streptomisin ve %1 L-glutamin içeren besin ortamı, 1:1 oranında EMEM, DMEM, HAMS F12 şişelere ekilir ve

37 °C'de %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilir. Çalışmamız 5. pasajda başlayıp 12. pasajda sona erdi.

MTT Yöntemiyle Dozun Belirlenmesi

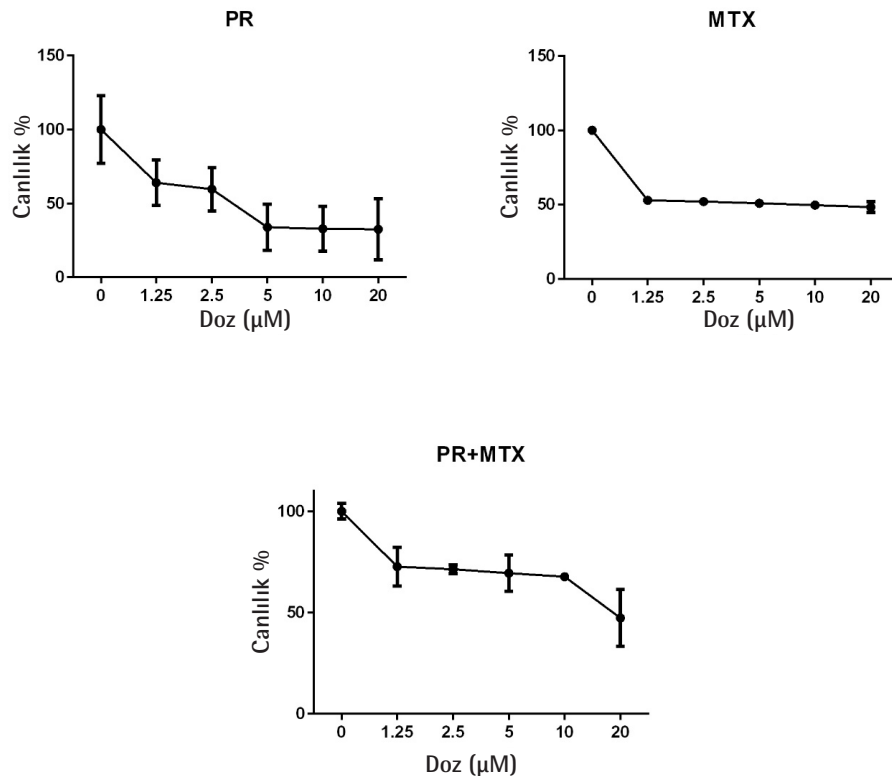
Çalışmada kullanılacak tüm grupların IC₅₀ değerlerini belirlemek için 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucukta 1x10⁶ hücre olacak şekilde 180 µL AML-12 hücresi ekildi. Hücrelerin plaka kuyucuklarına yapışmasını sağlamak için 24 saat inkübasyona bırakıldılar. Kontrol grubu dışındaki tüm gruplara tüm maddeler uygulanmış olup, dozları Şekil 1'de gösterilmiştir (20 µL hacimde). Daha sonra tüm gruplar 24 saat süreyle inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) bırakıldı. Kontrol grubuna %0,01 DMSO içeren sulu çözelti uygulandı. %0,01 DMSO içeren sulu PR ve MTX çözeltileri hazırlandı. 1:1 (v/v) oranında PR ve MTX birleştirildi. Her kuyucuğa 20 µL MTT (5 mg/mL) solüsyonu verildi. Formazan kristallerini çözmek için 3 saat sonra 200 µL %0,01 DMSO ilave edildi. Emilim değeri, 492 nm'de bir mikropilaka tarayıcı (Thermo Scientific Multiskan Go) kullanılarak hesaplandı. Kontrol grubunun %100 canlı olduğu kabul edildi ve IC₅₀ dozu probit analizi ile hesaplandı. MTT testi tüm gruplarda dört tekrarlı olarak yapıldı.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

AML-12 hücreleri, her kuyucukta 3x10⁶ hücre olacak şekilde kültür plakalarına 3 kez ekildi. 24 saat sonra deney gruplarının kimyasal uygulamaları AML-12 hücrelerine IC₅₀ dozunda 24 saat süreyle uygulandı. Elde edilen hücrelerden RNA izole edildi (PureLink RNA Mini Kit). Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonları ve saflık değerleri nanodrop (NaNoQ OPTIZEN) ile belirlendi. RNA örneklerinden (yüksek kapasiteli cDNA reverz transkripsiyon kiti) cDNA sentezi gerçekleştirildi.

qRT-PZR Analizi

SOD, CAT, GSH ile ilişkili hücrelerin enzim ekspresyonları ve Cas-3, Cas-9, Apaf-1, Bax, Bcl-2, p53, smac/DIABLO, Top I, Top II ile ilişkili hücrelerin gen ekspresyonlarının kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) analizi için SYBR Select Master Mix'in Quant Studio 6 Flex cihazı kullanıldı. PZR koşulları şu şekilde belirlendi: 1 döngü, 50 °C'de 2 dakika ve 95 °C'de 10 dakika, ardından denatürasyon için 50 döngü, 95 °C'de 15 saniye ve tavlama ve uzatma için 60 °C'de 1 saniyeydi. mRNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırmalı eşik döngüsü (2-ΔΔCt) yöntemi (Kullanıcı Bülteni 2, Applied Biosystems) ile



Şekil 1. Her tedavi grubunun MTT tahlil sonuçları. Dikey çubuklar standart sapmayı temsil etmektedir (n=4, ortalama±standart sapma) (canlılık %'si=Örneklem absorbans ortalaması/kontrol absorbans ortalaması × 100)

PR: Puerarin, MTX: Metotreksat, PR+MTX: Puerarin+metotreksat kombinasyonu

analiz edildi. GSH gen dizilerinin bir kopyasını elde etmek için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nden "Nükleotid" seçildi. Daha sonra ilgili organizma/gen adı arama kutusuna girilerek FASTA belirlenerek ilgili genler dizayn edildi. Deney grupları kontrol grubuyla karşılaştırılarak gen ekspresyonundaki rölatif kat değişimleri hesaplandı ve β -aktin mRNA ifadesine normalize edildi (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz

MTT testi ile elde edilen canlılık yüzde verilerine probit analizi uygulanarak IC_{50} değeri hesaplandı. IC_{50} dozlarında AML-12 hücre hattının 24 saat süreyle AML-12 hücrelerine uygulanmasının ardından, gen ekspresyonlarının rölatif kat değişim değerlerine one-way ANOVA testi ve post-hoc Tukey uygulandı. $P<0,05$ 'teki değerler anlamlı kabul edildi. Probit analizi ve ANOVA testi Statistical Package for the Social Sciences 20 yazılımı (IBM) ile yapıldı.

BULGULAR

PR, MTX ve PR+MTX kombinasyonunun AML-12 hücre hatlarının canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için 24 saatlik bir süre boyunca MTT analizleri yapıldı. MTT tahlili

sonuçları, AML-12 hücre hattının 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda PR, MTX ve PR+MTX kombinasyonuna maruz bırakılmasının, Şekil 1'de gösterildiği gibi, doza bağlı olarak hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğunu gösterdi. IC_{50} dozları PR'de 3,28 μ M, MTX'te 7,97 μ M ve PR+MTX'de 18,98 μ M olarak belirlendi.

PR uygulaması SOD ekspresyon düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede artırdı ($p<0,0001$). MTX uygulaması SOD ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı artışa yol açsa da ($p<0,01$), PR grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,0001$). PR grubuyla karşılaştırıldığında PR+MTX grubunda SOD ekspresyon düzeyleri anlamlı derecede düşüktü ($p<0,0001$). PR+MTX ve MTX grupları arasında anlamlı bir fark bulunmazken, Şekil 2A'da gösterildiği gibi SOD ifadesi PR+MTX'te daha yüksekti.

Kontrol, MTX ve PR grupları arasındaki CAT ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, MTX grubunda CAT ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ortaya çıktı ($p<0,0001$). Kontrol ve PR gruplarıyla karşılaştırıldığında PR+MTX grubu, Şekil 2B'de gösterildiği gibi anlamlı ölçüde daha yüksek düzeyde CAT ekspresyonu sergiledi (sırasıyla; $p<0,0001$ ve $p<0,001$).

GSH ekspresyon düzeylerinin istatistiksel analizi, MTX uygulanan gruplarda hem kontrol hem de PR gruplarına göre bir artış olduğunu ortaya çıkardı ($p<0,0001$). Kontrol grubuna göre PR uygulaması, Şekil 2C'de gösterildiği gibi GSH ekspresyon düzeylerini artırdı ($p<0,01$).

Cas-3 gen ekspresyonu PR ($p<0,0001$), MTX ($p<0,05$) ve PR+MTX ($p<0,0001$) gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksekti. MTX uygulaması, PR grubuyla karşılaştırıldığında Cas-3 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde azalttı ($p<0,0001$). Cas-3 gen ekspresyonu PR+MTX grubunda PR grubuna göre daha yüksek belirlendi ($p<0,0001$) (Şekil 2D).

MTX uygulamasıyla Cas-9 gen ekspresyonu kontrol grubu ve PR grubuna göre anlamlı düzeyde arttı ($p<0,0001$). PR+MTX grubunda Cas-9 gen ekspresyonu MTX grubuna göre azalsa da bu fark anlamlı değildi. Cas-9 gen ekspresyonu PR+MTX grubunda PR grubuna göre daha yüksekti ($p<0,0001$). PR tek başına uygulandığında Cas-9 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,001$) (Şekil 2E).

Kontrol ve PR grupları ile karşılaştırıldığında MTX uygulaması Apaf-1 gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde artırdı ($p<0,0001$). Apaf-1 gen ekspresyonu PR+MTX grubunda MTX grubuna göre azalsa da bu fark anlamlı değildi. Kontrol ve PR grupları ile karşılaştırıldığında PR+MTX grubunda Apaf-1 gen ekspresyonu daha yüksekti ($p<0,0001$) (Şekil 2F).

Bax gen ekspresyonu PR uygulamasıyla kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttı ($p<0,0001$). MTX uygulaması Bax gen ekspresyonunu PR grubuna göre azalttı ($p<0,0001$). PR+MTX

Tablo 1. qRT-PZR analizi için değerlendirilen genlerin primer dizilimleri

Gen	Primer dizilimler (ileri/geri)
SOD	F: AGCTGCACCACAGCAAGCAC ⁸ R: TCCACCACCCTTAGGGCTCA
CAT	F: TCCGGGATCTTTTAACGCCATTG ⁹ R: TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC
GSH	F: ACTTGGCACTCCTCTCTGA R: AGGCACTAGAACCTGCTGGA
Cas-3	F: GGTATTGAGACAGACAGTGG ¹⁰ R: CATGGGATCTGTTCTTTGC
Cas-9	F: GAGTCAGGCTCTTCCTTG ¹⁰ R: CCTCAAACCTCAAGAGCAC
Apaf-1	F: GATATGGAATGTCTCAGATGGCC ¹¹ R: GGTCTGTGAGGACTCCCCA
Bax	F: TTCATCCAGGATCGAGCAGA ¹⁰ R: GCAAAGTAGAAGGCAACG
Bcl-2	F: ATGTGTGTGGAGAGCGTCA ¹⁰ R: ACAGTCCACAAAGGCATCC
p53	F: CACGAGCGCTGCTCAGATAGC ¹⁰ R: ACAGGCACAAACACGCACAAA
Smac/DIABLO	F: CTCTGTGGCTGAGGGTGAT ¹² R: TTGTAGATGATGCCACAGG
Top I	F: TCATACTGAACCCAGCTCC ¹⁰ R: GTCCTGCAAGTGCTTGTCA
Top II	F: CTTCTCTGATATGGACAAACATAAGATTCC ¹⁰ R: GGACTGTGGGACAACAGGACAATAC

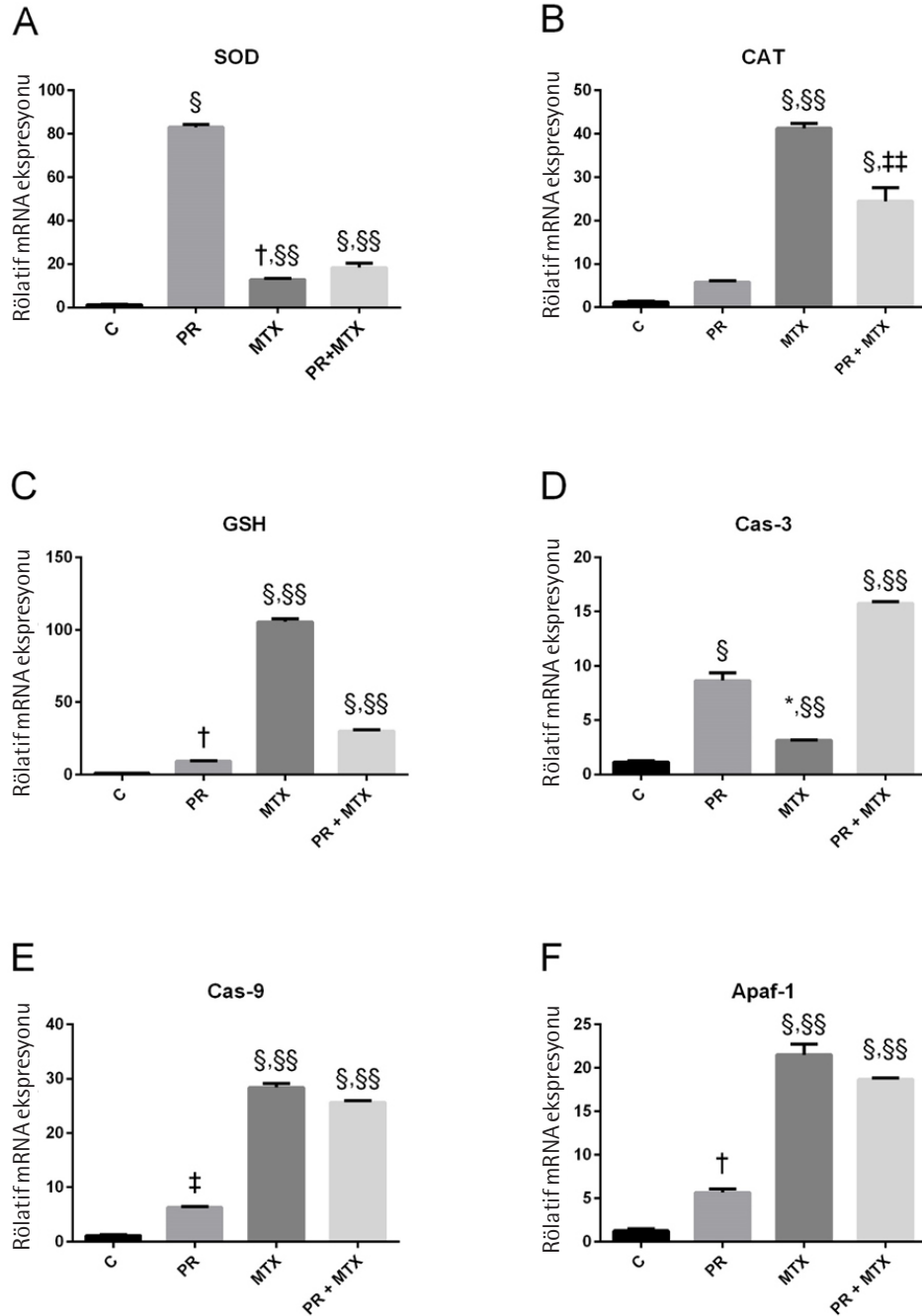
qRT-PZR: Kantitatif gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu, Cas: Kaspaz

grubunda Bax gen ekspresyonu kontrol grubuna göre daha yüksek ($p<0,05$), PR grubuna göre ise anlamlı derecede düşüktü ($p<0,0001$) (Şekil 3A).

MTX uygulaması Bcl-2 ekspresyonunu PR grubuna göre anlamlı derecede arttırdı ($p<0,001$). Bcl-2 ekspresyonu PR grubunda

kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0,05$) (Şekil 3B).

PR ve MTX uygulamaları p53 gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttırdı. Bu artışın istatistiksel anlamlılığı PR grubu ve MTX grubunda $p<0,001$, PR+MTX



Şekil 2. SOD (A), CAT (B), GSH (C), Cas-3 (D), Cas-9 (E) ve Apaf-1 (F) rölatif mRNA ekspresyonu

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p<0,05$, †: $p<0,01$, ‡: $p<0,001$, \$: $p<0,0001$.

**PR grubuyla karşılaştırıldığında $p<0,05$, ††: $p<0,01$, †††: $p<0,001$, \$\$\$: $p<0,0001$.

C: Kontrol grubu, PR: Puerarin grubu, MTX: Metotreksat grubu, PR+MTX: Puerarin+Metotreksat kombinasyon grubu

grubunda $p<0,0001$ olarak belirlendi. p53 üzerindeki gen ekspresyonunun PR+MTX grubunda PR grubu ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 3C).

PR uygulaması smac/DIABLO gen ekspresyon düzeyini kontrol grubuna göre artırdı ($p<0,0001$). PR+MTX grubunda smac/DIABLO gen ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p<0,001$). PR+MTX grubunda smac/DIABLO gen ekspresyon düzeyi PR grubuna göre daha düşüktü ($p<0,0001$). PR MTX ile uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da smac/DIABLO gen ekspresyon düzeyinin MTX grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 3D).

Top I gen ekspresyonu MTX uygulamasıyla kontrol grubu ve PR grubuna göre anlamlı düzeyde arttı ($p<0,001$ ve $p<0,05$). PR+MTX grubunda MTX grubuna göre Top I ekspresyonunda azalma gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. PR grubunda Top I gen ekspresyonu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksekti ($p<0,01$) (Şekil 3E).

PR ve MTX uygulamaları Top II gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre arttırdı. Bu artışın istatistiksel anlamlılığı PR grubunda $p<0,01$, MTX grubunda $p<0,001$, PR+MTX grubunda $p<0,0001$ olarak belirlendi. Top II ekspresyonu PR+MTX grubunda PR grubuna göre daha yüksekti ($p<0,001$) (Şekil 3F).

TARTIŞMA

Sonuçlarımıza göre PR uygulamasının *in vitro* olarak MTX kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi vardır. Çalışmamız PR'nin MTX ile ilişkili karaciğer hasarı gelişimi üzerindeki etkilerini araştırarak ilk çalışmadır. Ayrıca araştırmamız, MTX kaynaklı karaciğer hasarının altında yatan mekanizmalara ışık tutarak özgünlüğünü korumaktadır.

SOD ve CAT hücrelerde bulunan antioksidan enzimlerdir. SOD, süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştürerek uzaklaştırır ve bu da CAT tarafından H_2O 'ya indirgenir. Önceki araştırmalar MTX'in SOD düzeylerini azaltarak oksidatif strese neden olduğunu ortaya çıkarmıştır³. Çalışmamızda PR uygulaması antioksidan etki göstererek SOD ekspresyonunu artırırken, MTX uygulaması PR grubuna göre SOD düzeylerini anlamlı düzeyde azalttı. Literatüre göre PR sinir sistemi hastalıkları, solunum hastalıkları, osteoporoz ve karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalıkta antioksidan ve anti-enflamatuvar aktiviteyi sağlamaktadır¹³. Ayrıca PR, deneysel çalışmada MTX'in neden olduğu böbrek hasarını hafifletmiştir¹⁴.

Literatüre göre hücredeki süperoksit anyonu miktarı detoksifikasyon kapasitesini aştığında, CAT aktivitesi artarak antioksidan savunmayı güçlendirir ve CAT, GSH redüktaz aktivitesini artırarak GSH oluşumuna katkıda bulunur¹⁵. Hücrelerin hidrojen peroksit maruz bırakılmasının CAT fonksiyonunu arttırdığı da bilinmektedir¹⁶. Çalışmamızda MTX

uygulamasının hücrenin serbest radikallere maruziyetini ve CAT ekspresyonunu arttırdığı görüldü. MTX ile PR uygulaması CAT seviyelerindeki bu artışı hafifletti.

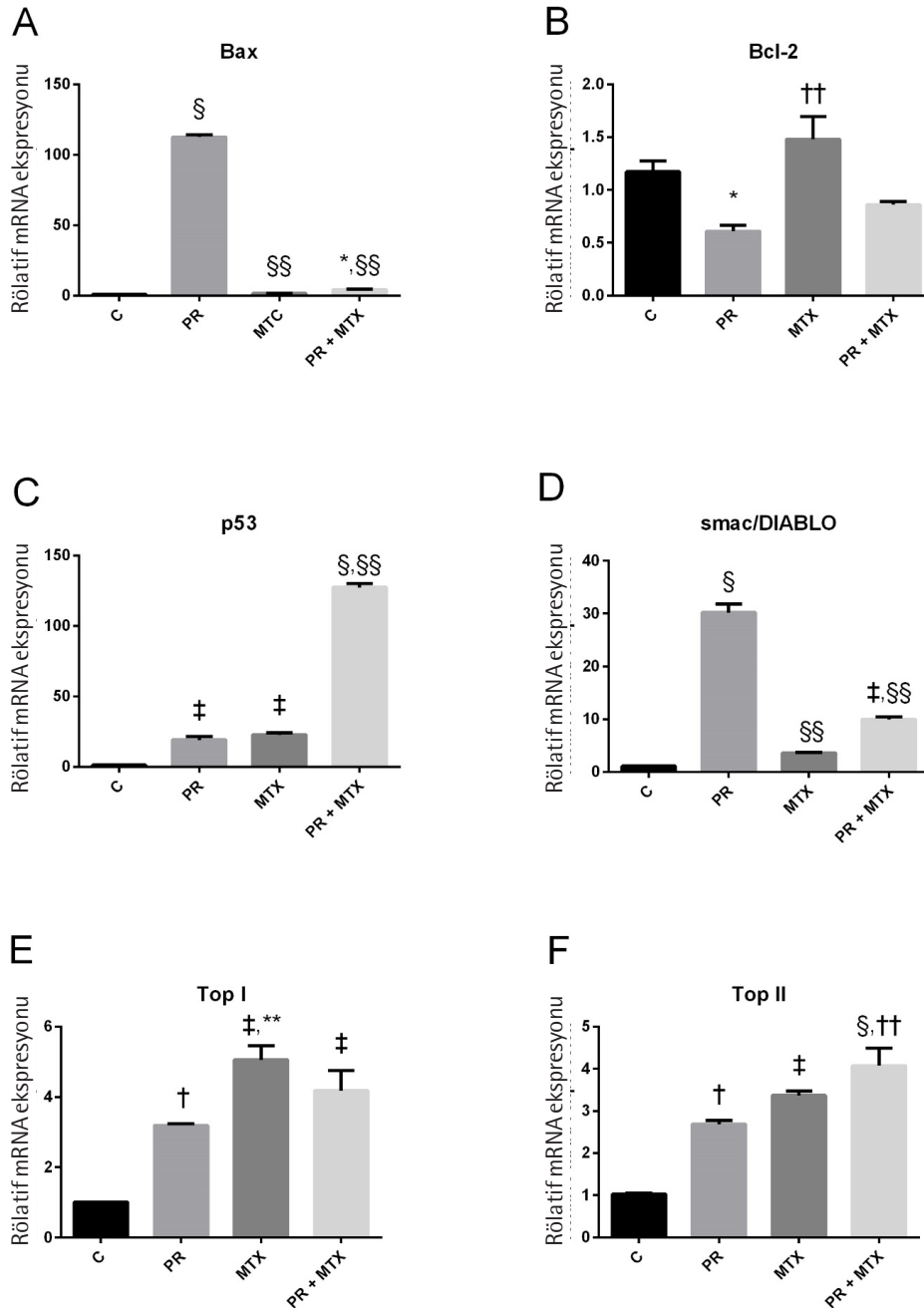
GSH, antioksidan görevi gören düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. GSH serbest radikallerle birleştiğinde oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve diğer disülfidler üretir³. Oksidatif stresin hastalığa neden olmasını önlemek için yüksek miktardaki serbest radikallere yanıt olarak GSH düzeyleri yükselir¹⁷⁻¹⁹. Araştırmamızda GSH düzeylerinin MTX grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu. Bu durum, MTX uygulamasıyla seviyeleri artan serbest radikallere tepki olarak gelişti ve hücre, oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olan GSH seviyelerini artırabildi. Bu gruptaki yüksek CAT ekspresyonu aynı zamanda GSH düzeylerinin artmasına da katkıda bulunmuştur¹⁵. PR+MTX grubunda PR'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkisine bağlı olarak GSH düzeylerinin, tek başına MTX uygulanan gruba göre daha düşük olduğu görüldü. Hücreler sürekli olarak serbest radikallere maruz kaldığında, indirgenmiş GSH'nin disüfidlere dönüşmesinin bir sonucu olarak bunların miktarları düşebilir. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda MTX uygulamasının karaciğer dokusundaki GSH düzeyini azalttığı gösterilmiştir. GSH eksikliğinin MTX kaynaklı karaciğer dokusu hasarına etki ettiği düşünülmektedir³.

Apoptoz, canlı organizmalarda homeostazı sağlayan programlanmış hücre ölümünü ifade etmektedir. Apoptozun düzenlenmesinde genlerin yanı sıra RNA, protein sentezi ve enerji de anahtar rol oynamaktadır. Oksidatif stres ve enflamasyondan etkilenen diyabet, enfeksiyon ve tümör gibi birçok hastalıkta apoptotik yolaktaki anormalliklerin ortaya çıktığı bilinmektedir. Hem iç (mitokondriyal) hem de dış yollar apoptozun gelişimine katkıda bulunur. DNA hasarı ve hipoksi, apoptozu tetikleyen hücre içi sinyallerdir. Kemoterapötik ilaçlar, radyasyon gibi dış faktörler ve ölüm reseptörlerinin aktivasyonu hücre dışı sinyallere örnek olarak gösterilebilirler²⁰. MTX çeşitli dokularda apoptozu indükler³. MTX'in indüklediği apoptoz, kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlayarak kanser tedavisinde faydalı bir etkiye sahiptir. Ancak apoptoz yollarındaki anormalliklerin karaciğer de dahil olmak üzere çeşitli organlarda olumsuz etkileri olabilir. Örneğin; bir dizi deneysel araştırmada MTX'in sıçanlara uygulanması, apoptoz mekanizmaları yoluyla karaciğer dokusu hasarına yol açmıştır^{3,21}.

Birbirlerini proteolitik şekilde aktive eden kaspazlara sistein proteazlar denmektedir. Cas-9 başlatıcı kaspazlardan biri iken efektör kaspaza örnek olarak Cas-3 verilebilir. DNA onarımı ve replikasyonunda rol oynayan enzimleri etkisiz hale getirirler²⁰. Bir hücre apoptoza uğradığında mitokondriden sitokrom-c salınımı artar. Sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP, sitozolde "apoptozom" olarak bilinen bir kompleks oluşturur. Cas-9 apoptozom ile ve Cas-3 Cas-9 ile aktive edilir. Araştırmamızda MTX grubunda

Apaf-1 ve Cas-9 ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu tespit edildi. Bu grupta Cas-3 ekspresyon düzeyinin yüksek olmaması yolağın Cas-3'e kadar ilerlemediğini göstermektedir. Sıçanlarda MTX uygulamasıyla oluşturulan deneysel karaciğer hasarı modeli, MTX'in Cas-9 ve Cas-3 aktivitesini artırarak

karaciğer dokusunda apoptoza neden olduğunu göstermiştir²². Çalışmamızda, PR ile MTX birlikte uygulandığında hem Apaf-1 hem de Cas-9 gen ekspresyonunun MTX grubuna göre azalması, PR'nin MTX'in neden olduğu hepatotoksositeye karşı koruyucu etkisine işaret etmektedir.



Şekil 3. Bax (A), Bcl-2 (B), p53 (C), smac/DIABLO (D), Top I (E) ve Top II (F) rölative mRNA ekspresyonu

*Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$, †: $p < 0,01$, ‡: $p < 0,001$, §: $p < 0,0001$.

**PR grubuyla karşılaştırıldığında $p < 0,05$, ††: $p < 0,01$, †††: $p < 0,001$, §§: $p < 0,0001$.

C: Kontrol grubu, PR: Puerarin grubu, MTX: Metotreksat grubu, PR+MTX: Puerarin+Metotreksat kombinasyon grubu

Bcl-2 ailesi, kaspazlar, p53 ve sitotom-c gibi proteinler apoptozu regüle ederler. Bcl-2 ailesi hem proapoptotik hem de antiapoptotik proteinleri içerir. Çalışmamızda araştırdığımız parametrelerden biri Bax'ın proapoptotik etkiye sahip olması, Bcl-2'nin ise antiapoptotik proteinlerden biri olmasıdır²⁰. Çalışmamızda MTX ile birlikte PR uygulaması, kontrol grubuna göre Bax gen ekspresyonunu artırdı ve hasarlı yapıların apoptozunu indükledi. Chen ve ark.'na²³ göre (2012), iskemik pulmoner arter düz kas hücrelerinde PR tedavisi Bax seviyelerini yükselterek apoptozu artırmıştır. Son araştırmalar, izoflavonların ve flavon glikozitlerin, kanser hücrelerinin yok edilmesine katkıda bulunan Bax proteininin üretimini desteklediğini göstermiştir^{24,25}.

Çalışmamızda hücre hasarının bir göstergesi olarak, MTX grubunda hücre ölümünü önleyecek şekilde Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerinin yükseldiği görüldü. Bu sonuç, daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen, kronik hepatitli bireylerde kan transaminaz düzeylerine paralel olarak Bcl-2 ekspresyonunun arttığı bulgusuyla desteklenmektedir²⁶. Ayrıca otoimmün hepatitli hastaların karaciğerindeki enflamasyon ile Bcl-2 ekspresyon düzeyinin korele olduğu belirlenmiştir²⁷. Ek olarak, Bcl-2 düzeylerindeki artış hepatokarsinogenez gelişiminde rol oynamaktadır²⁸. Yapılan bir klinik araştırmada hepatit hastalarında antiviral tedavi ile Bcl-2 ekspresyonunun düştüğü tespit edilmiştir²⁶. Çalışmamızda MTX+ PR grubunda Bcl-2 gen ekspresyonunun MTX grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. P53, hücrelere hasarlı DNA'yı onarma fırsatı veren bir transkripsiyon ögesidir. Hasar onarılamaz olduğunda Bcl-2'yi baskılayarak Bax ve Apaf-1 üretimini artırarak apoptozu tetikler²⁰. Çalışmamızda PR+MTX grubunda DNA hasarına karşı bir savunma mekanizmasının sonucu olarak p53 düzeyleri arttı. Hayvanlarda asetaminofenin neden olduğu deneysel hepatotoksisite modeli, p53'ün karaciğer hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir ve bu da bizim sonuçlarımızla tutarlıdır^{29,30}.

Yakın zamanda tanımlanmış bir apoptoz protein inhibitörü (IAP) bağlayıcı proteini olan Smac/DIABLO, apoptoz sırasında mitokondriden salınır ve kaspazlar üzerindeki IAP inhibisyonunu hafifleterek apoptozu güçlendirir³¹. Araştırmamızda PR uygulamasıyla güçlendirilmiş smac/DIABLO ekspresyonunun hasarlı yapıların giderilmesinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu varsayıyoruz. Bcl-2 smac/DIABLO salınımını azaltır³². Araştırmamızın bulguları gruplarda Bcl-2 ve smac/DIABLO transkript düzeylerinin ters orantılı olduğunu göstermektedir.

DNA-Top'lar, DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve kromozom segregasyonu dahil olmak üzere DNA yapısının metabolizmasında ve düzenlenmesinde önemli enzimlerdir. Top I enzimleri genellikle bir monomerden oluşur ve DNA çift sarmalının tek zincirini kırar. İki veya daha fazla alt üniteye sahip Top II enzimleri, DNA'nın her iki sarmalını da sarmalını

da kırabilir³³. Top'ların düzeyi, enfeksiyon, enflamasyon veya oksidatif stres gibi hücre hasarına neden olan çeşitli koşullara hücresel yanıt olarak yükselir³⁴. Çalışmamızda MTX ile PR uygulandığında Top I düzeyinin, MTX grubuna göre azalması DNA'daki tek zincir hasarının azaldığını göstermektedir. PR grubunda Top I seviyesinin artması bu hücreye uygulanan PR dozunun yüksek olduğunu göstermektedir. Araştırmamızda MTX ile birlikte uygulanan PR miktarının çift zincirli DNA hasarını onarmada yetersiz kaldığı görüldü. Sonuç olarak PR+MTX grubunda Top II düzeyinin yüksek olduğu belirlendi.

SONUÇ

Araştırmamız, çeşitli kanser hastalıklarında yaygın olarak kullanılan bir tedavi seçeneği olan MTX'in hepatotoksisitesinde PR'nin etkili olabileceğini ortaya koydu. PR, MTX uygulamasına bağlı olarak karaciğer dokusunda oksidatif stres, apoptotik yollardaki anormallikleri ve DNA tek sarmal hasarını hafifletti. Çalışmamız hayvanlar üzerinde yapılacak deneyler ve klinik çalışmalar için yol gösterici olacaktır. PR, MTX'in neden olduğu çift sarmallı DNA hasarını önleyemediği ve PR grubunda Top I ekspresyonunda artış olduğu için farklı doz çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Etik

Etik Kurul Onayı ve Hasta Onayı: Çalışmamız hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul onayı ve hasta onamı gerekli değildir.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: M.A., Ç.O., E.B., Konsept: M.A., Ç.O., E.B., Dizayn: M.A., Ç.O., E.B., Veri Toplama veya İşleme: M.A., Ç.O., E.B., Analiz veya Yorumlama: M.A., Ç.O., E.B., Z.A.Ç.Y., Literatür Arama: M.A., E.B., Z.A.Ç.Y., Yazan: M.A., Z.A.Ç.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komitesi tarafından 2018/274 hibe numarasıyla finanse edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. McCahill LE, Krouse RS, Chu DZ, Juarez G, Uman GC, Ferrell BR, et al. Decision making in palliative surgery. J Am Coll Surg. 2002;195:411-22.
2. Alfwaures MA. Galangin mitigates oxidative stress, inflammation, and apoptosis in a rat model of methotrexate hepatotoxicity. Environ Sci Pollut Res Int. 2022;29:20279-88.
3. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Sultana S. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. Mol Cell Biochem. 2014;385:215-23.

4. Bath RK, Brar NK, Forouhar FA, Wu GY. A review of methotrexate-associated hepatotoxicity. *J Dig Dis*. 2014;15:517-24.
5. Methotrexate. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548219/>
6. Xia DZ, Zhang PH, Fu Y, Yu WF, Ju MT. Hepatoprotective activity of puerarin against carbon tetrachloride-induced injuries in rats: a randomized controlled trial. *Food Chem Toxicol*. 2013;59:90-5.
7. Chen X, Li R, Liang T, Zhang K, Gao Y, Xu L. Puerarin improves metabolic function leading to hepatoprotective effects in chronic alcohol-induced liver injury in rats. *Phytomedicine*. 2013;20:849-52.
8. Tam NN, Gao Y, Leung YK, Ho SM. Androgenic regulation of oxidative stress in the rat prostate: involvement of NAD(P)H oxidases and antioxidant defense machinery during prostatic involution and regrowth. *Am J Pathol*. 2003;163:2513-22.
9. Dkhil MA, Moneim AE, Al-Quraishy S. Indigofera oblongifolia Ameliorates Lead Acetate-Induced Testicular Oxidative Damage and Apoptosis in a Rat Model. *Biol Trace Elem Res*. 2016;173:354-61.
10. Oltulu C, Akinci M, Elvan B. Antitumor Activity of Etoposide, Puerarin, Galangin and Their Combinations in Neuroblastoma Cells, *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*. 2022;5:407-23.
11. Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, et al. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2001;21:7439-46.
12. Tokatlı C, Doğanlar O, Doğalar ZB. Meriç Delta Balıklarında Çevre Kirliliğinin Genotoksik Etkileri: Antioksidan Savunma, Isı Şok Protein Sinyali ve DNA Hasar-Onarım Mekanizmaları. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*. 2020;6:14-24.
13. Liu Q, Liu Z, Huo X, Wang C, Meng Q, Sun H, et al. Puerarin improves methotrexate-induced renal damage by up-regulating renal expression of Oat1 and Oat3 in vivo and in vitro. *Biomed Pharmacother*. 2018;103:915-22.
14. Wang D, Bu T, Li Y, He Y, Yang F, Zou L. Pharmacological Activity, Pharmacokinetics, and Clinical Research Progress of Puerarin. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11:2121.
15. Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Córdova A, Pons A. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*. 2005;84:1-7.
16. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Tran A, Carballo M, Saghizadeh M, et al. Increased levels of catalase and cathepsin V/L2 but decreased TIMP-1 in keratoconus corneas: evidence that oxidative stress plays a role in this disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:823-32.
17. Chakravarthi S, Jessop CE, Bulleid NJ. The role of glutathione in disulphide bond formation and endoplasmic-reticulum-generated oxidative stress. *EMBO Rep*. 2006;7:271-5.
18. Stijns MM, Weseler AR, Bast A, Haenen GR. Time in Redox Adaptation Processes: From Evolution to Hormesis. *Int J Mol Sci*. 2016;17:1649.
19. Chowdhury FA, Mahboob S, Saha A, Jahan A, Islam MN. Effect of oxidative stress on glutathione reductase activity of Escherichia coli clinical isolates from patients with urinary tract infection. *J Immunol Clin Microbiol*. 2017:2.
20. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv*. 2011;20:145-58.
21. Khalaf MM, Hassanein EHM, Shalkami AS, Hemeida RAM, Mohamed WR. Diallyl Disulfide Attenuates Methotrexate-Induced Hepatic Oxidative Injury, Inflammation and Apoptosis and Enhances its Anti-Tumor Activity. *Curr Mol Pharmacol*. 2022;15:213-26.
22. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem Biol Interact*. 2017;272:80-91.
23. Chen C, Chen C, Wang Z, Wang L, Yang L, Ding M, et al. Puerarin induces mitochondria-dependent apoptosis in hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One*. 2012;7:e34181.
24. Li Y, Kong D, Bao B, Ahmad A, Sarkar FH. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients*. 2011;3:877-96.
25. Abusaliya A, Ha SE, Bhosale PB, Kim HH, Park MY, Vetrivel P, et al. Glycosidic flavonoids and their potential applications in cancer research: a review. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2022;18:9-16.
26. Anatol P, Danuta P, Janusz D, Bozena P. Expression of bcl-2 protein in chronic hepatitis C: effect of interferon alpha 2b with ribavirin therapy. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2949-52.
27. Yachida M, Kurokohchi K, Arima K, Nishioka M. Increased bcl-2 expression in lymphocytes and its association with hepatocellular damage in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:140-5.
28. MaS, Chen GG: Lai PBS: Bcl-2 Family Members in Hepatocellular Carcinoma (HCC) – Mechanisms and Therapeutic Potentials. In: Chen GG, Lai PBS (eds), *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy*. Springer. 2009;219-35.
29. Huo Y, Yin S, Yan M, Win S, Aung Than T, Aghajan M, et al. Protective role of p53 in acetaminophen hepatotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 2017;106:111-7.
30. Sun J, Wen Y, Zhou Y, Jiang Y, Chen Y, Zhang H, et al. p53 attenuates acetaminophen-induced hepatotoxicity by regulating drug-metabolizing enzymes and transporter expression. *Cell Death Dis*. 2018;9:536.
31. Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M, Cohen GM. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol*. 2001;153:221-8.
32. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J*. 2001;20:6627-36.
33. Mastrangelo S, Attina G, Triarico S, Romano A, Maurizi P, Ruggiero A. The DNA-topoisomerase Inhibitors in Cancer Therapy. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2022;15:553-62.
34. Rialdi A, Campisi L, Zhao N, Lagda AC, Pietzsch C, Ho JSY, et al. Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation. *Science*. 2016;352:aad7993.