



ARAŞTIRMA MAKALESİ
RESEARCH ARTICLE
CBU-SBED, 2021, 8(1): 38-43

Kurkumin HEK-293 Hücre Hattında Metotreksat Kaynaklı Hücresel Hasarı Düzenledi

Curcumin Regulated of Methotrexate-Induced Cell Damage in HEK-293 Cell Line

Betül Yazğan^{1*}

¹ Kastamonu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye

e-mail: betul4774@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-4029-2007

*Sorumlu yazar/ Corresponding Author: Betül Yazğan

Gönderim Tarihi / Received: 21.06.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 23.09.2020

DOI: 10.34087/cbusbed.755807

Öz

Giriş ve Amaç: Klasik bir antifolat olan metotreksat (MTX), çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve yan etkilerinden dolayı üzerinde çalışılan antikanser ajanlardan biridir. Ne yazık ki, MTX'in hücre üzerine toksik etkisi, sadece tümör hücreleri ile sınırlı olmayıp diğer hayati organları da etkilemektedir. Bu durum MTX'in antikanser etkinliğini azaltmadan, hücresel toksik etkilerini azaltabilecek başka ajanlarla birlikte kullanımını zorunlu kılmaktadır. Antikanser ilaçların istenmeyen yan etkilerini azaltabilecek doğal antioksidanların kullanımıyla ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda, kurkuminin (KUR) çeşitli dokularda meydana gelen hücresel toksisite üzerindeki koruyucu etkileri, onun antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser etkilerinin olmasına atfedilebilir. Bu çalışma, MTX'in neden olduğu hücresel toksisitenin, KUR ile azaltılabileceği varsayılarak yapıldı. MTX'e maruz bırakılan insan embriyo böbrek (HEK-293) hücre serisinde, antioksidan bir ajan olan KUR'un düzenleyici rolü araştırıldı.

Gereç ve Yöntemler: HEK-293 hücreleri, Kontrol, KUR, MTX ve MTX+KUR olarak dört gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki hücrelere herhangi bir uygulama yapılmadan, kültür ortamında 48 saat boyunca tutuldu. Diğer gruplardaki hücreler kültür ortamında 24 saat tutulduktan sonra, KUR grubundaki hücrelere 10 µM KUR, MTX grubundaki hücrelere 5 µM MTX ve MTX+KUR grubundaki hücrelere ise 5 µM MTX ve 10 µM KUR uygulandı. Uygulamaları takiben hücreler 24 saat boyunca kültür ortamında tutuldu.

Bulgular: HEK-293 hücrelerindeki MTX kaynaklı lipit peroksidasyon (Lip-Px) aktivitesi Placer ve arkadaşlarının yöntemine göre, glutatyon (GSH) seviyeleri Sedlak ve Lindsay yöntemine göre ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) seviyeleri Lawrence ve Burk yöntemine göre spektrofotometrik (UV-1800) olarak ölçüldü. MTX ile inkübe edilen hücrelerde Lip-Px aktivitesinin arttığı, GSH ve GSH-Px aktivitelerinin ise önemli ölçüde azaldığı belirlendi. KUR uygulamasının ise Lip-Px aktivitesini önemli ölçüde azaltırken, GSH ve GSH-Px aktivitelerini önemli ölçüde artırdı.

Sonuç: Bu sonuçlar, KUR uygulamasının MTX kaynaklı hücresel stres ve toksisiteyi, antioksidan mekanizmalarla düzenleyerek, MTX kemoterapisine etkili bir yardımcı ajan olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Glutatyon peroksidaz, Kurkumin, Lipit peroksidasyon, Metotreksat.

Abstract

Objective: Methotrexate (MTX), a conventional anti-folate, is an anti-cancer agent that is widely used for treatment of various types of cancers and it has been researched due to its side effects. Unfortunately, toxic effects of MTX is not limited just with tumour cells. It has also a toxic effect on healthy cells and organs. That is why it is an indispensability that MTX should be combined with other agents which can reduce the cellular toxicity of it at the same time not reducing its anti-cancer effectiveness. Exhaustive investigations have been performed to reveal the usage of natural antioxidants that can be reduce the unwanted side effects of anti-cancer drugs. It is postulated that Curcumin (CUR) has a protective effect on cellular toxicity in various types of cells due to its antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer effects. This study was designed presuming that cellular toxicity induced by MTX can be reduced by Curcumin. In this study the regulatory role of curcumin, an antioxidant agent, was investigated on MTX treated Human Embryonic Kidney Cell lines (HEK-293).

Materials and Methods: HEK-293 cells were divided into four groups as Control, CUR, MTX and MTX+CUR. Cells in the control group were incubated in cell culture medium for 48 hours without any application. After the cells in the other groups were incubated in cell culture medium for 24 hours cells in CUR group was treated with 10 μ M CUR, cells in MTX group treated with 5 μ M MTX and cells in the MTX+CUR group were incubated with 5 μ M MTX + 10 μ M CUR. After the treatments, the cells were kept incubated 24 hours in cell culture medium.

Results: MTX-induced lipid peroxidation (Lip-Px) activity (according to method of Placer et al.), glutathione (GSH- according to Sedlak and Lindsay method) and glutathione peroxidase (GSH-Px - according to the Lawrence and Burk method) levels were measured spectrophotometrically (UV-1800) in HEK-293 cells. It has been determined that Lip-Px activity increased and GSH and GSH-Px activities decreased significantly in cells incubated with MTX. It is established that CUR treatment caused a significant decrease on the Lip-Px activity while causing a significant increment on GSH and GSH-Px activities.

Conclusion: Consequently, these findings showed that curcumin (CUR) administration, triggering the antioxidant mechanisms, can be an effective adjuvant therapy for MTX chemotherapy by regulating MTX-induced cellular stress and toxicity.

Keywords: Curcumin, Glutathione peroxidase, Methotrexate, Lipid peroxidation.

1. Giriş

Metotreksat (MTX), klasik bir antifolat bileşimidir. Çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak ciddi yan etkilerinden dolayı üzerinde çalışılan antikanser ajanlardan biridir [1,2]. MTX'in hücreler üzerindeki toksik etkisi sadece tümör hücreleri ile sınırlı olmayıp, diğer hayati organları da etkilemektedir [3]. Yüksek dozlarla tedavi, böbrek tübüllerinde kristal çökmesi ve tübüler hasarın indüksiyonu nedeniyle akut böbrek hasarına neden olabilmektedir. Ayrıca afferent arteriyolleri daraltması nedeniyle glomerüler filtrasyon hızını düşürebilir. Pemetrexed, küçük hücreli dışı akciğer kanserini tedavi etmek için kullanılan bir MTX türevidir ve nefrotoksik etkileri arasında; akut tübüler nekroz, interstisyel ödem, tübüler asidoz ve diyabet insipidus bulunduğu rapor edilmiştir [4,5,6]. MTX'in idrardaki çözünürlüğünü arttırmak için hasta kuvvetli bir şekilde hidratize / alkalize edilir ve MTX'in ölümcül olabilen toksik etkisini önlemek için folik asit veya Lökovorin kullanılır [7]. Bu önleyici tedbirlere rağmen, MTX kaynaklı nefrotoksisite meydana gelmeye devam etmektedir. MTX'in hücrel toksik etkileri lipid peroksidasyonu (Lip-Px), oksidatif stres ve inflamasyon gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir [2,8]. Bu yan etkilerinden dolayı, MTX'in antikanser etkinliğini azaltmadan, hücrel toksik etkilerini azaltabilecek başka ajanlarla birleştirmesini zorunlu kılmaktadır. MTX kaynaklı böbrek toksisitesi mekanizmaları arasında, doğrudan toksik etkisi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması sayılabilir [5,6,9]. ROS seviyelerindeki artış vücuttaki oksidan/antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulmasına neden olmaktadır. Antikanser ilaçların oksidatif stres artışı ve ROS oluşumu gibi toksik etkilerinden sorumlu olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [1,2,6]. Bu ilaçların çoğu hedefe özgü olmadığı için tümör hücreleri ile sağlıklı hücreler ve özellikle proliferatif hücreler arasında ayırım yapamaz. Bu açıklananlar ışığında MTX'in toksik etkilerini önlemek için antioksidan ajanlarla birlikte kullanımı önerilmektedir. Antikanser etkinliği yüksek ancak daha az toksik ilaçlar geliştirmek veya mevcut antikanser ilaçların istenmeyen yan etkilerini azaltmak için doğal

antioksidanlarla birlikte kullanımı ile ilgili kapsamlı araştırmalar yapılmaktadır [10,11,12].

Zerdeçalın ana aktif bileşeni olan kurkumin (KUR) Curcuma longa Linn'nin (Zingiberaceae) kuru rizomundan çıkarılır. Curcuma longa çok yıllık bir bitki olup Asya'nın tropikal bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir [11,12]. Zerdeçalın en önemli kimyasal bileşenleri, kurkumin (diferuloilmetan), dimetoksikurumin ve bismetoksikürimini içeren kurkuminoit adı verilen bir bileşikler grubudur. KUR, güçlü antioksidan ve antienflamatuar etkiye sahip doğal bir polifenoldür [12]. KUR'un hem in vitro hem de in vivo modellerde antioksidan ve antikanser etkileri sergilediği gösterilmiştir [12,13,14,15]. KUR uygulamasının, MTX kaynaklı böbrek hasarını ve oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir [6]. KUR'un hücrede oluşan stresi azalttığı, Lip-Px engellediği, oksidatif hasardan koruduğu ve antikanser ilaçların genotoksisitesini inhibe ettiği güncel çalışmalarda bildirilmiştir [2,6,14,16].

Fenol grupları ve biyofiziksel özellikleri bakımından zengin bir moleküler yapıya sahip olan KUR, antioksidan ve antikanser etkilerini açıklayabilen farklı aşamalarda birçok farklı hücrel proteinle etkileşime girebilir [17]. Enzimlerin düzenlenmesi, büyüme yollarının aktivasyonu/deaktivasyonu ve programlanmış hücre ölümü, KUR'u geniş bir kanser yelpazesi için potansiyel bir terapötik ajan haline getirir [6,18]. KUR'daki fenolik analogların ROS temizleme aktivitesinde önemli olduğunu gösteren deneysel modeller vardır [13,19,20]. KUR'un, O₂•-, OH• ve singlet oksijen de dahil olmak üzere ROS'un güçlü bir temizleyicisi olduğu ve bir diketon KUR grubunun OH• ve H₂O₂ ile reaksiyona girebileceği öne sürülmektedir [17]. KUR, hücrel yolaklarla etkileşime girerek oksidatif stresi ve inflamasyon yanıtı azaltır. Bu şekilde birçok kronik hastalığın gelişimini etkiler ve hem koruyucu hem de tedavi edici etkiler gösterme potansiyeli taşır [11,20]. ROS artışı, hücreye ve hücre zarına verdiği zararlar Lip-Px neden olur ve hücrel yıkıma ve ardından hücre ölümüne yol açabilir [21]. Yüksek ROS seviyeleri hücrede oksidatif strese sebep olur, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya zarar verir [22]. Hücrel savunma sistemine özgü antioksidan enzim sistemi ROS'a karşı en önemli

savunma mekanizmasıdır. [23]. Bu sistemin önemli elemanları olan Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon (GSH), hidro ve organik peroksidlerin azaltılmasından sorumludur [24]. GSH-Px, hücrelerdeki oksidatif hasarları ortadan kaldıran en önemli doğal antioksidan enzimlerden biridir [23,25]. Bu nedenle, ROS dolaylı olarak GSH-Px ve GSH gibi çeşitli antioksidanların ölçümü ile değerlendirilebilir. Hücresel modülasyon yoluyla hücredeki GSH ve GSH-Px değerleri üzerinde KUR'un koruyucu bir rol oynadığı birçok çalışmada bildirilmiştir [23,26]. Bu nedenle bu çalışma ile, MTX tedavisinin Lip-Px aktivitesi, GSH-Px ve GSH düzeyleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve ayrıca KUR'un bu parametreler üzerindeki düzenleyici etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MTX'in ve bir çok antikanser ilacın vücuttaki sağlıklı hücrelerde de oksidatif stres ve ROS artışına neden olarak toksik etkiler oluşturduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [2,6,20]. Özellikle, MTX'in ciddi nefrotoksik etkisi artık bilinmektedir [1,2,6] Antioksidan savunma sisteminin güçlü bir düzenleyicisi olduğu belirlenen KUR'un [11,17,19], MTX kaynaklı hasarı tedavi etmek için kullanımı önerilebilir. Ayrıca antikanser etkileri de olduğu belirlenen KUR'un [17,18] MTX'in antikanser etkilerini de güçlendirebileceği kabul edilebilir. Bu bağlamda bu çalışma, İnsan embriyo böbrek hücreleri (HEK-293) kullanılarak oluşturulan in-vitro deneysel araştırma modeliyle; MTX'in antikanser tedavisi sürecinde oluşabilecek nefrotoksistide, antioksidan bir ajan olarak KUR uygulamasının olası etkilerini araştırmak için yapılmıştır.

2. Materyal ve Metot

KUR, dimetil sülfoksit (DMSO), L-glutamin, Tripsin-EDTA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD'den satın alındı. HEK-293 hücreleri, Isparta Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim dalından temin edildi.

2.1. Hücre Kültürü

Bu çalışmada HEK-293 hücre hattı kullanıldı. Hücreler, % 90 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), % 10 Fetal Bovine Serum (FBS, sığır serumu) ve %1 penisilin-streptomisin kombinasyonu içeren medium içine kondu. Hücreler 37° C'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde 25 cm² kültür flasklarında tutuldu. İnkübatörde bulunan hücreler % 80-85 yoğunluğa ulaştıktan sonra, taze 1 × Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS, Biochrom, Berlin, Almanya) ile yıkandıktan sonra, % 0.25 Tripsin-EDTA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) ile flasktan ayrıldı. Bu hücrelerin gruplara göre inkübasyonları yapıldı ve Spektrofotometre cihazında (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japonya) tüm gruplara ait numuneler okundu.

2.2 Gruplar

Deneydeki HEK-293 hücreleri aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı;

- *Kontrol grubu:* Hücreler, KUR ve MTX uygulaması yapılmadan 48 saat boyunca kültür ortamında tutuldu.
- *KUR grubu:* Hücreler kültür ortamında 24 saat

tutulduktan sonra, bu gruptaki hücrelere 10 µM KUR uygulandı, ve hücreler 24 saat boyunca kültür ortamında tutuldu [27,28,29].

- *MTX grubu:* Hücreler kültür ortamında 24 saat tutulduktan sonra, bu gruptaki hücrelere 5 µM MTX uygulandı, ve hücreler 24 saat boyunca kültür ortamında tutuldu [20,30].
- *MTX+KUR grubu:* Hücreler kültür ortamında 24 saat tutulduktan sonra, bu gruptaki hücrelere 5 µM MTX uygulandı. Sonra hücreler 24 saat boyunca kültür ortamında tutuldu ve ardından 10 µM KUR uygulandıktan sonra hücreler 24 saat boyunca kültür ortamında tutuldu. Uygulanan dozlar literatür ışında belirlendi

2.3 Analizler

Bu çalışmada KUR uygulamasının MTX'in toksik etkileri üzerindeki etkisini değerlendirmek ve test edilen antikanser ilacın neden olduğu toksiteye karşı koruyucu rolünü değerlendirmek için bazı analizler yapıldı. Bu analizler, HEK-293 hücrelerinde Lip-Px, GSH ve GSH-Px değişiklikleridir. HEK-293 hücrelerindeki (mL başına 10⁶ hücre) Lip-Px aktivitesi, Placer ve ark. [31] yöntemleri kullanılarak 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH aktivite ölçümü Sedlak ve Lindsay (1968) yöntemine göre, GSH-Px aktiviteleri Lawrence ve Burk yöntemine (1976) göre 412 nm'de ölçüldü [32,33].

2.3.1 Lipid Peroksidasyon Analizleri

HEK-293 hücrelerinde MTX kaynaklı nefrotoksistide MDA salınımı olarak bilinen Lip-Px aktivitesinin belirlenmesi için Placer ve arkadaşlarının yöntemine göre, tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı. Tüm hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 °C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu [31]. Daha sonra buz üzerinde soğutuldu ve 1000 g devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip kuvvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler µmol/gram protein olarak belirlendi.

2.3.2 İndirgenmiş Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz Analizleri

HEK-293 hücrelerinin GSH seviyeleri, Sedlak ve Lindsay yöntemi kullanılarak 412 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. [32]. Her mL başına 10⁶ hücre, % 10 trikloroasetik asit ile karıştırıldı ve proteinleri ayırmak için santrifüj edildi. Bu süpernatanın 0.1 mL'sine, bir cam tüpe 2 mL fosfat tamponu (pH 8.4), 0.5 mL 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) ve 0.4 mL distile su ilave edildi. Elde edilen numune spektrofotometrede 412 nm'de okundu. GSH seviyesi µmol / g protein olarak ifade edildi. HEK-293 hücrelerinin GSH-Px seviyeleri, Lawrence ve Burk'un [33] yöntemi ile 412 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. GSH-Px'in aktivitesi, oksitlenmiş glutasyon /

g proteinin uluslararası birimi (IU) olarak ifade edildi. Hücrelerdeki toplam protein spektrofotometrik olarak 595 nm'de Bradford reaktifi kullanılarak değerlendirildi.

3.3.3 İstatistiksel Analiz

Tüm veriler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak belirtildi. Grupları arasındaki farkları değerlendirmek için tek yönlü ANOVA kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu tüm verilerde Post-hoc testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1 Bulgular

3.1.1 Lipid Peroksidasyon Sonuçları

Tüm gruplardaki Lip-Px değerleri Tablo 1'de

gösterilmiştir. MTX ile tedavi edilen HEK-293 hücrelerindeki Lip-Px düzeyleri MTX grubunda Kontrol ve KUR gruplarına göre daha yüksekti ($p < 0.005$ ve $p < 0.001$), ancak MTX + KUR grubunda Lip-Px düzeyleri KUR uygulaması ile önemli düzeyde azalmıştı ($p < 0.01$) (Tablo 1).

3.1.2 İndirgenmiş Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz Sonuçları

Tüm gruplardaki GSH ve GSH-Px seviyeleri Tablo 1'de gösterilmiştir. MTX ile tedavi edilen HEK-293 hücrelerdeki GSH ve GSH-Px seviyeleri MTX grubunda Kontrol ve KUR gruplarına göre daha düşüktü ($p < 0.001$), ancak MTX + KUR grubunda GSH ve GSH-Px seviyeleri KUR uygulaması ile önemli ölçüde artmıştı ($p < 0.01$) (Tablo 1).

Tablo 1. MTX ve KUR'un HEK-293 hücrelerinde Lip-Px, GSH seviyesi ve GSH-Px aktivitesi üzerindeki etkisi. (Değerler ortalama \pm SD olarak verildi, n=6).

Değerler	Kontrol	MTX	KUR	MTX+KUR
Lip-Px (mmol/ g protein)	16.89 \pm 1.54	20.77 \pm 0.43 ^{b,d,e}	13.25 \pm 0.44 ^{b,f}	17.43 \pm 0.94
GSH (mmol/ g protein)	12.28 \pm 0.32	10.83 \pm 0.15 ^{a,d,e}	13.56 \pm 0.38 ^{b,g}	11.77 \pm 0.26
GSH-Px (IU/ g protein)	18.19 \pm 1.23	11.21 \pm 1.64 ^{a,d,f}	22.78 \pm 0.72 ^{b,g}	15.52 \pm 0.24 ^c

^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.005$, ^c $p < 0.05$ Kontrol grubu ile karşılaştırma. ^d $p < 0.001$ KUR grubu ile karşılaştırma. ^e $p < 0.01$, ^f $p < 0.005$ ve ^g $p < 0.001$ MTX+KUR grubu ile karşılaştırma. Gruplar arasındaki ilişkiler tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

3.2 Tartışma

Güncel çalışmalarda birçok antikanser ilacın istenmeyen yan etkilere ve bir dizi toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir [2,6,28,34]. Antikanser olarak kullanılan MTX'in toksik etkisine karşı etkili bir koruyucu madde bulunmamaktadır. KUR'un antikanser etkilerine ek olarak, güçlü antioksidan etkileri nedeniyle potansiyel bir terapötik ajan olarak dikkat çekmiştir ve antikanser tedavinin toksik etkilerini azaltmak üzere kullanımı araştırılmaktadır [11,35]. İnsan embriyo böbrek hücreleri (HEK-293) kullanılarak in-vitro deneysel araştırma modeli oluşturulan bu çalışmada; MTX'in antikanser tedavisi sürecinde oluşabilecek nefrotoksisitede, antioksidan bir ajan olarak KUR uygulamasının olası etkileri araştırıldı. MTX kaynaklı böbrek toksisitesi mekanizmaları arasında, doğrudan toksik etkisi ve oksidatif strese yol açması literatürde gösterilmiştir [5,6,8]. Bu çalışmanın sonuçları, literatürle uyumlu olarak HEK-293 hücrelerinde MTX ile indüklenen oksidatif stres artışına bağlı Lip-Px artışı, GSH ve GSH-Px enzim aktivitelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. KUR'un antioksidan etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda antikanser ilaçların yan etkilerini düzenlediği bildirilmiştir [2,36,37]. KUR'un, hücre modülasyonu yoluyla hücredeki GSH ve GSH-Px değerleri üzerinde koruyucu bir rol oynadığı birçok çalışmada bildirilmiştir [11,14,38,39]. Tiyol grupları bakımından zengin GSH seviyelerini artırdığı [40] rapor edilmiştir. Çalışmamda, HEK-293 hücrelerinde toksisiteyi indüklemek için 5 μ M

doz ile [20,30] hücreler 24 saat MTX inkübasyonuna bırakılmıştır. Bu çalışmada, KUR inkübasyonunun Lip-Px'e bağlı oksidatif stresi ve hücre içi homeostazı modüle etmesiyle MTX kaynaklı zararlı etkileri düzenlediği gözlenmiştir. Böylece bu çalışma sonuçları, MTX'in sitotoksik etki ve oksidatif stres artışı gibi zarar verici durumları bildiren daha önceki çalışmalarla uyumludur [2,20,35].

KUR'un hem in-vitro hem de in-vivo modellerde antioksidan ve antikanser etkileri sergilediği, hücrede oluşan stresi azaltarak, Lip-Px engellediği, oksidatif hasardan koruduğu ve antikanser ilaçların genotoksisitesini inhibe ettiği güncel çalışmalarda bildirilmiştir [2,11,12,16,28]. Literatürde, İnsan embriyo böbrek hücresi olan HEK-293 hücrelerinde MTX kaynaklı oksidatif stres aktivasyonu hakkında rapor yoktur. Bu çalışmada ilk kez HEK-293 böbrek hücrelerinin MTX kaynaklı oksidatif stres artışının KUR muamelesi ile zayıflatıldığı gösterildi. Mevcut bulgularla uyumlu olarak çalışmamda, MTX'e maruz bırakılan hücrelerde Lip-Px aktivitesi artmış, tiyol redoks döngüsü antioksidan enzimi GSH-Px seviyesi azalmış ve bu durum KUR uygulaması ile tamamen tersine dönmüştür. Bu veriler, KUR'un hücre homeostazını modüle ederek hücre fonksiyonunu koruyabildiğini gösterebilir. Genel olarak kemoprotektif ajanlar, antigenotoksik etkilerini, reaktif kanserojen metabolitlerin oluşumunu inhibe etme, kanserojenleri detoksifiye eden enzimleri indüklemeye, reaktif oksijen türlerini temizleme, hücre

proliferasyonunu inhibe etme gibi bir mekanizma kombinasyonu ile uygulayabilir. KUR'un bu ilaçların toksisitesini düzeltici etkisinin altında yatan kesin mekanizma hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, bu bileşiğin antioksidan aktivitesinin buna dahil olması muhtemeldir [41].

Sonuçlar, KUR ile muamelenin, MTX ile tedavi edilen gruplara kıyasla Lip-Px düzeylerinde önemli bir azalma olduğunu gösterdi. Sonuçlarla uyumlu olarak Balasubramanayam ve ark. [42], KUR kaynaklı hücrel ROS oluşumunun inhibisyonunun olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Fiorillo ve ark. [43], KUR'un ROS'u temizlediğini ve Lip-Px'i inhibe ettiğini ve DNA yapısını oksidatif hasardan koruduğunu bildirmiştir. KUR benzen halkaları ve 1,3-diketon sistemi üzerindeki fenolik ve metoksi gruplarının, serbest radikal temizleyici olarak rol alıyor olabileceği düşünülmektedir [44]. Bu çalışmada HEK-293 hücrelerinde, MTX'in zararlı etkisine, Lip-Px aktivitesi artışına bağlı hücrel toksisitenin de dahil olduğu gösterildi. Bu çalışmada, KUR uygulaması yapılan HEK-293 hücre hattında oksidatif stres azalmış, GSH seviyeleri ve GSH-Px aktivitesi artmıştır. Benzer şekilde, Biswas ve ark. [26], KUR uygulaması yapılan alveoler epitel hücrelerinde oksidatif stres seviyelerinin, antioksidan sistem ve GSH seviyelerini destekleyerek azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca RAW264.7 hücrelerinde oksidatif strese bağlı GSH ve GSH-Px aktivitesinde azalmanın KUR uygulaması ile düzeldiği bildirilmiştir [45] Ayrıca bir fare modelinde, KUR ön uygulaması kadmiyum'un neden olduğu hepatik Lip-Px'i aktivite artışını hafifletmiş, ve GSH, GSH-Px hepatik aktivitesini arttırmıştır [23].

Bu çalışmada, HEK-293 hücrelerinde, MTX uygulamasıyla indüklenen oksidatif stres; Lip-Px, GSH ve GSH-Px seviyeleri belirlenerek değerlendirildi. KUR muamelesinin MTX'in neden olduğu hasarı azalttığı gösterildi. Çalışma bulgularım, KUR'un MTX kaynaklı renal toksisiteye karşı tedavi edici bir etkisi olabileceğini ve antikanser tedavisine iyi bir yardımcı bileşik olabileceğini önermektedir.

4. Sonuç

Bu çalışmada, MTX uygulanan HEK-293 hücre hattında Lip-Px aktivitesinin arttığı, bununla birlikte GSH-Px ve GSH değerlerinin azaldığı belirlendi. Bununla birlikte, MTX tedavisi uygulanan HEK-293 hücre hattında, Lip-Px aktivitesinin KUR uygulaması ile azaltıldığı ve GSH, GSH-Px değerlerinin arttığı gözlemlendi. Bu bulgular, MTX kemoterapisi sürecinde oluşacak hasarın, KUR'un kemoterapiye ek olarak kullanımı durumunda, azaltılabileceği tezini doğrular niteliktedir. MTX ile kemoterapi sırasında oksidatif stres kaynaklı böbrek toksisitesinin KUR uygulamasıyla azaltılabileceğini göstermesi bakımından bu sonuçlar önemlidir. İnsan embriyo böbrek hücreleri kullanılarak oluşturulan bu in-vitro deneysel araştırma modelinin sonuçları, HEK-293 hücrelerinde MTX kaynaklı oksidatif hasara karşı KUR uygulamasının böbrekte koruyucu rolünü göstermesi bakımından önemlidir. Ancak KUR takviyesinin, MTX kemoterapisi etkinliği üzerindeki rolünü aydınlatmak

için ileri düzey çalışmalar önerilebilir.

Referanslar

1. Widemann, B.C, Adamson, P.C, Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity, *Oncology*, 2006, 6, 694-703.
2. Noha, I.S.S, Magda, M.N, Azza, A.S, Modulatory effect of curcumin against genotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice, *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 370-376.
3. Tousson, E, Atteya, E, El-Atrash, E, Jeweely, O.I, Abrogation by Ginkgo Byloba leaf extract on hepatic and renal toxicity induced by methotrexate in rats, *Journal of Cancer Research and Treatment*, 2014, 2(3), 44-51.
4. Santos, M.L.C, de Brito, B.B, da Silva, F.A.F, Botelho, A.C.D.S, de Melo, FF, Nephrotoxicity in cancer treatment: An overview, *World Journal of Clinical Oncology*, 2020, 24, 11(4), 190-204.
5. Asvadi, I, Hajipour, B, Asvadi, A, Asl, NA, Roshangar, L, Khodadadi, A, Protective effect of pentoxifylline in renaltotoxicity after methotrexate administration, *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2011, 15, 1003-1009.
6. Farkhondeh, T, Samarghandian, S, Azimi-Nezhad, M, Shahri, A.M.P, Protective Effects of Curcumin Against Nephrotoxic Agents, *Cardiovascular Hematologic Disorder Drug Targets*, 2019, 19(3), 176-182.
7. Shi, H, Hou, C, ve ark., Influence of pretreatment of piperazine ferulate on pharmacokinetic parameters of methotrexate in methotrexate-induced renal injury model rats by HPLC-MS, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 12(2), 202-208.
8. El-Sheikh, A.A, Morsy, M.A, Abdalla, A.M, Hamouda, A.H, Alhaider, I.A, Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexate-induced toxicity in rats, *Mediators Inflammation*, 2015, 1-12.
9. Babiak, R.M, Campello, A.P, Carnieri, E.G, Oliveira, M.B, Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress, *CellBiochemistry and Function*, 1998, 16, 283-293.
10. Mora, L.D.O, Antunes, L.M.G, Francescato, H.D.C, Bianchi, M.D.L.P, The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Pharmacological Research*, 2003, 47 (6), 517-522.
11. Daverey, A, Agrawal, S.K, Pre and post treatment with curcumin and resveratrol protects astrocytes after oxidative stress, *Brain Research*, 2018, 1, 1692, 45-55.
12. Somparn, P, Phisalaphong, C, Nakornchai, S, Unchern, S, Morales, N.P, Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30, 74-78.
13. Ebrahimifar, M, Roudsari, M.H, Kazemi, S.M, Shahmabadi, H.E, Kanaani, L, Alavi, S.A, Vasfi, M.I, Enhancing Effects of Curcumin on Cytotoxicity of Paclitaxel, Methotrexate and Vincristine in Gastric Cancer Cells, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2017, 18 (1), 65-68.
14. Aslanturk, A, Uzunhisarcikli, M, Protective potential of curcumin or taurine on nephrotoxicity caused by bisphenol A, *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, doi: 10.1007/s11356-020-08716-1.
15. Palipoch, S, Punsawad, C, Chinnapun, D, Suwannalert, P, Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by curcumin and a-tocopherol. *Trop. Journal of Pharmacological Research*, 2014, 12(6), 973-979.
16. Huang, C.F, Cui, X.Q, ve ark., Effects of curcumin on micronuclei formation and chromosome aberration induced by cyclophosphamide in mice, *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2011, 6, 42.
17. Sandur, S.K, Pandey, M.K, ve ark., Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydro-curcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism, *Carcinogenesis*, 2007, 28, 1765-1773.
18. Vallianou, N.G, Evangelopoulos, A, Schizas, N, Kazakis, C, Potential Anticancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin, *Anticancer Research*, 2015, 35, 645-652.
19. Kunnumakkara, A.B, Bordoloi, D, ve ark., Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways, *Clinical Science*, 2017, 131, 1781-1799.
20. Curcio, M, Cirillo, G, ve ark., Dextran-Curcumin Nanoparticles as a Methotrexate Delivery Vehicle: A Step Forward in Breast Cancer

- Combination Therapy, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 25, 13-20.
21. Halliwell, B, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 2006, 97, 1634–1658.
 22. Schieber, M, Chandel, N.S, ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress, *Current Biology*, 2014, 24(10), 453–462.
 23. Eybl, V, Kotyzova, D, Koutensky, J, Comparative study of natural antioxidants curcumin, resveratrol and melatonin in cadmium-induced oxidative damage in mice, *Toxicology*, 2006, 225, 150-156.
 24. Schweizer, U, Bräuer, A.U, Köhrle, J, Nitsch, R, Savaskan, N.E, Selenium and brain function: a poorly recognized liaison, *Brain Research Reviews*, 2004 45, 164–178.
 25. Legallacier, B, Leclere, C, ve ark., The cellular toxicity of two antitumoural agents derived from platinum, cisplatin versus oxaliplatin, on cultures of tubular proximal cells, *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 1996, 22(2), 41-50.
 26. Biswas, S.K, McClure, D, Jimenez, L.A, Megson, I.L, Rahman, I, Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF- κ B activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, 7(1-2), 32-41.
 27. Hollborn, M, Chen, R, Wiedemann, P, Cytotoxic effects of curcumin in human retinal pigment epithelial cells, *PLoS One*, 2013, 8:e59603.
 28. Fayi, M.A, Otfi, H, Alshyarba, M, Dera, A.A, Rajagopalan, P, Thymoquinone and curcumin combination protects cisplatin-induced kidney injury, nephrotoxicity by attenuating NF κ B, KIM-1 and ameliorating Nrf2/HO-1 signalling, *Journal of Drug Targeting*, 2020, 5;1-10.
 29. Hu, A, Huang, J.J, ve ark., Curcumin suppresses invasiveness and vasculogenic mimicry of squamous cell carcinoma of the larynx through the inhibition of JAK-2/STAT-3 signaling pathway, *American Journal of Cancer Research*, 2015, 5(1), 278–288.
 30. Iwona, P.C, Monika, G.G, ve ark., Pioglitazone as a modulator of the chemoresistance of renal cell adenocarcinoma to methotrexate, *Oncology Reports*, 2020, 43(3), 1019-1030.
 31. Placer, Z.A, Cushman, L, Johnson, B.C, Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biological fluids, *Analytical Biochemistry*, 1966, 16, 359–364.
 32. Sedlak, J, Lindsay, R.H.C, Estimation of total, protein bound and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann' s reagent, *Analytical Biochemistry*, 1968, 25, 192–205.
 33. Lawrence, R.A, Burk, R.F, Glutathione peroxidase activity in seleniumdeficient rat liver, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1976, 71, 952–958.
 34. Weijl, N.I, Elsendoorn, T.J, ve ark., Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study, *European Journal of Cancer*, 2004, 40 (11), 1713-1723.
 35. Tian, F, Fan, T, Zhang, Y, Jiang, Y, Zhang, X, Curcumin potentiates the antitumor effects of 5-FU in treatment of esophageal squamous carcinoma cells through downregulating the activation of NF- κ B signaling pathway in vitro and in vivo, *Acta biochimica biophysica Sinica*, 2012, 44 (10), 847-855.
 36. Antunes, L.M, Araújo, M.C, Darin, J.D, Bianchi, M.L, Effects of the antioxidants curcumin and vitamin C on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells, *Mutation Research*, 2000, 16, 465(1-2), 131-7.
 37. Corona-Rivera, A, Urbina-Cano, P, Bobadilla-Morales, L, Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays, *Journal of Applied Genetic*, 2007, 48 (4), 389-396.
 38. Liu, F, Ni, W, ve ark., Administration of curcumin protects kidney tubules against renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) by modulating nitric oxide (NO) signaling pathway, *Cell Physiology Biochemistry*, 2017, 44(1), 401–411.
 39. Abarikwu, S.O, Durojaiye, M, Alabi, A, Asonye, B, Akiri, O, Curcumin protects against gallic acid-induced oxidative stress, suppression of glutathione antioxidant defenses, hepatic and renal damage in rats, *Renal Failure*, 2016, 38(2), 321–329.
 40. Banji, O.J, Banji, D, Ch, K, Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain, *Food Chemical Toxicology*, 2014, 74, 51-9.
 41. Surh, Y.J, Chun, K.S, Cancer chemopreventive effects of curcumin. In: The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, *Springer US*, 2007, 149-172.
 42. Balasubramanyam, M, Adaikala, K.A, Sampath, K.R, Finny, M.S, Uma, M.J, Mohan, V, Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications, *Journal of Bioscience*, 2003, 28(6), 715-721.
 43. Fiorillo, C, Becatti, M, ve ark., Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF- κ B, and JNK pathways, *Free Radical Biology & Medicine*, 2008, 45, 839.
 44. Sreejayan, N, Rao, M.N, Free radical scavenging activity of curcuminoids, *Arzneim*, 1996, 46(2), 169-171.
 45. Lin, X, Bai, D, ve ark., Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway, *PLoS One*, 2019, 21, 14(5), e0216711. doi: 10.1371/journal.pone.0216711.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Alıntı-Gayriticari4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

