



Rat Beyin Dokusunda Asitretin - Metotreksat Kombinasyonunun ve A-Lipolik Asit'in Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Fatma Gönül Sezgin^{1*}, Emine Dıraman², Emine İncilay Torunoğlu³

^{1*}Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye (ORCID: 0000-0002-9400-5173), gonul.solmaz@omu.edu.tr

²Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye (ORCID: 0000-0002-4677-1738), ediraman@omu.edu.tr

³Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Samsun, Türkiye (ORCID: 0000-0003-4641-0067), torunogluemineincilay@gmail.com

(5th International Symposium on Innovative Approaches in Smart Technologies– 28-29 May 2022)

(DOI: 10.31590/ejosat.1140517)

ATIF/REFERENCE: Sezgin, F. G., Dıraman, E. & İncilay Torunoğlu, E. (2022). Rat Beyin Dokusunda Asitretin - Metotreksat Kombinasyonunun ve A-Lipolik Asit'in Polifenol Oksidaz Aktivitesi Üzerine Etkileri. *European Journal of Science and Technology*, (37), 165-169.

Öz

Bu çalışmada asitretin (ACT) ve metotreksat (MTX) etken maddelerinin ve alfa lipoik asitin (ALA) rat beyin dokusunda Polifenol Oksidaz (PO) aktivitesine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, toplam 50 tane Wistar albino erkek rat kullanılmıştır. Çalışma grupları, Kontrol grubu (K), ALA grubu, ACT+MTX grubu ve ACT+MTX+ALA grubu olarak oluşturulmuştur. 24 saat aç bırakılmış olan ratlara yapılan enjeksiyon işlemleri her sabah aynı saatte gerçekleştirilmiştir. ACT, MTX ve ALA % 0.9'luk NaCl'de çözülmüştür. ACT (20mg/kg/gün), MTX (20mg/kg/hafta), ALA (50mg/kg/gün) ve bunların kombinasyonları da vücut ağırlığı düzeyinde intraperitoneal enjeksiyon ile ratlara verilmiştir. Ratlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş ve kalp perfüzyonundan sonra beyinleri çıkarılmıştır. Ratlardan alınan beyin doku örneklerinde, PO enzim aktivitesi ölçülmüştür. ACT+MTX verilen grupta 3. günde K'ya göre yaklaşık % 5 inhibisyon gözlenirken ALA'nın etkisi ile bu inhibisyon yerini aktivasyona bırakmıştır. ACT + MTX kullanımı beyin PO aktivitesinde 3. günde inhibisyona neden olurken bu inhibisyon ilerleyen günlerde aktivasyona dönüşmüştür. Tek başına ALA verilen grup K grubu ile karşılaştırıldığında; PO aktivitesi 3. günde %7 inhibisyon göstermiştir. 5. ve 7.günlerde inhibisyon seviyesinin yarı yarıya azaldığı gözlenmiştir. Böylece çalışmamızın sonucu olarak ALA'nın beyin dokusunda antioksidan etki gösterdiği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Beyin, Asitretin, Metotreksat, Polifenol Oksidaz

The Effects of Acetretin-Methotrexate Combination and A-Lipoic Acid on Polyphenol Oxidase Activity in Rat Brain Tissue

ABSTRACT

In this study, the effects of acetretin (ACT) and methotrexate (MTX) active ingredients and alpha lipoic acid (ALA) on Polyphenol Oxidase (PO) activity in rat brain tissue were investigated. A total of 50 Wistar albino male rats were used in the study. Study groups were formed as Control group (K), ALA group, ACT+MTX group and ACT+MTX+ALA group.

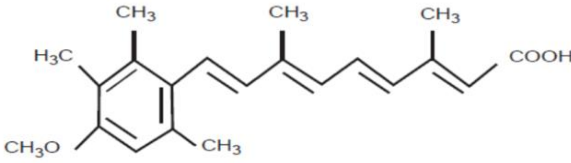
Injections made to rats that were fasted for 24 hours were performed at the same time each morning. ACT, MTX and ALA were dissolved in 0.9% NaCl. ACT (20mg/kg/day), MTX (20mg/kg/week), ALA (50mg/kg/day) and their combinations were given to the rats by intraperitoneal injection at body weight level. Rats were sacrificed by cervical dislocation and their brains were removed after cardiac perfusion. PO enzyme activity was measured in brain tissue samples taken from rats. While In the group given ACT+MTX, approximately 5% inhibition was observed on the 3rd day compared to K, this inhibition was replaced by activation with the effect of ALA. While the use of ACT + MTX caused inhibition in brain PO activity on the 3rd day, this inhibition turned into activation in the following days. When the group given ALA alone was compared with the K group; PO activity showed 7% inhibition on 3rd day. It was observed that this inhibition level decreased by half on the 5th and 7th days. Thus, as a result of our study, it can be said that ALA has an antioxidant effect in the brain tissue.

Keywords: Brain, Acitretin, Methotrexate, Polyphenol Oxidase

Giriş

Fenol oksidazlar, aktif bölgelerinde bakır içeren ve fenolik bileşiklerin moleküler oksijen ile oksidasyonunu katalizleyen enzimlerdir. Bu bakır iyonu, aromatik bir bileşiğin fenolik grubunun quinone olarak bilinen bir reaksiyon grubuna oksitlenmelerini sağlar (Whitaker, 1995).

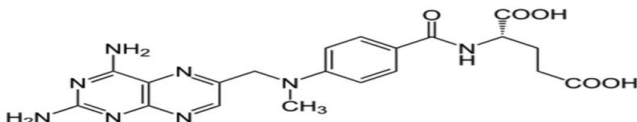
ACT, A vitaminin bir analogu olup sitolojik proliferasyonu ve hücre farklılaşmalarını düzenleyen monoaromatik bir retinoiddir (Şekil 1). Özelliği bakımından lipofilik zayıf bir asittir. Suda az çözünür. Kokusu çok hafiftir, sarı-yeşil bir rengi vardır.



Şekil 1. ACT'in kimyasal yapısı (Bhuiyan & Chowdhury, 2016)

ACT, etretinatın aktif ve baskın metabolitidir. Farmakokinetik olarak daha etkin ve avantajlı olmasından dolayı kullanımı oldukça yaygındır (Dogra & Yadav, 2014). Etki mekanizması tam olarak anlaşılmasını ile birlikte epitel hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasını düzenlediği düşünülen retinoidlerin, antiinflamatuvar ve immünmodulatuvar etkilerinin olduğu da araştırılmaktadır (Menter vd, 2008; Yamauchi vd, 2003). Alzheimer hastalığında retinoid sinyalleşmesinin biyokimyasal, genetik ve diyetel kanıtları vardır. Retinoidlerin, mikroglia tarafından gerçekleştirilen bağışıklığı azalttığı gösterilmiştir. Peptit fibrillerin stabilizasyonunu bozduğu gözlemlenmiştir. Toksik etkileri nedeniyle retinoid asitlerin kendisi insanlarda terapötik değere sahip olmadığı için lösemi ve/veya sedef hastalığı için kullanılan sentetik retinoidler Alzheimer hastalığı tedavi stratejilerinin odağı haline geldi. Yapılan bir çalışmada, bu onaylanmış ilaçlar ile ratlarda Alzheimer proteinlerinin üretiminde bir azalma olduğu gösterilmiştir (Holthoewer vd, 2012).

MTX (4-amino-10-metilpteroilglutamik asit), bir folik asit analogudur (Şekil 2.). Neoplastik olan veya olmayan hastalıklarda tedavi amacıyla kullanılan bir antimetabolittir. Romatoid artrit gibi hastalıklarda düşük doz kullanımı önerilir. MTX kullanımında dozun toksisiteye etkili olduğu iyi bilinmektedir. MTX, selektif olmaması nedeniyle kıl kökü, kemik iliği, beyin gibi sağlıklı dokularda da toksisiteye neden olabilmektedir (Vardi vd, 2010). Yapılan çalışmalarda, MTX ile tedavi olan hastalarda beyin omurilik sıvısı (BOS) içeriğinde S-Adenozil Metiyonin(SAM) eksilmesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu eksikliğin reaktif oksijen türlerinin artmasından kaynaklı olduğu vurgulanmıştır (Kumari vd, 2016).



Şekil 2. Metotreksat'ın Kimyasal yapısı (Lotfi vd, 2016)

Beyin, vücut ağırlığının %2'sinden daha azını oluşturmasına rağmen tüm vücudun kullandığı oksijenin %20'sini tüketmektedir. Bu nedenle beyin, büyük bir potansiyel oksidatif kapasiteye sahiptir. Fakat oksidatif strese karşı koyma yeteneğinin sınırlı olması, beyni oksidatif hasara karşı en duyarlı organ haline getirir (Kumar ve Khanum, 2013).

ALA; protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasında önemli fizyolojik etkileri olan besinsel bir koenzimdir. Serbest radikallerin süpürülmesinde de önemli rol oynayan ALA, yağda ve suda çözünür. Organik besin monomerlerinin ATP'ye dönüştürülmesi için gerekli olan multi enzim kompleksinin de parçasıdır (Data, 1995).

ALA, SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini artırıcı etkiye sahiptir. Aynı zamanda moleküler hasarların onarılmasında, asetilkolin üretiminin artırılmasında da görev alır. Serbest radikallere karşı koruma ve lipid peroksidasyonunun oluşmasına karşı koruma gibi görevleri de vardır (Tetikçok vd, 2015). Yapısında bulunan tiyol sayesinde antioksidan olarak etki gösterir. Serbest oksijen radikallerinin yakalanması ve ağırmetaller ile birlikte şelat oluşturmada ve antioksidanların etkilerini arttırmada önemli rol oynamaktadır. Kan-Beyin bariyeri (KBB) geçebilme özelliğine sahiptir ve merkezi sinir sistemi (MSS) içerisinde antioksidan olarak kullanılabilir (Patel & Roche, 1990).

Materyal ve Yöntem

Çalışmalar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurulu (2018/13) tarafından onaylanmıştır. Deneide kullanılan ratlar, Denei Hayvanları Araştırma Merkezi (DEHAM)'nde üretilip yetiştirilmiştir. Ağırlıkları 200 – 250 gram arasında değişen 50 adet *Winstar albino* tipi erkek rat kullanılmıştır.

Araştırma Gruplarının Oluşturulması:

Grup 1 (K) : Kontrol grubu, hiç bir işlem uygulanmayan grup,

Grup 2 (ALA grubu): 50 mg/kg/gün ALA verilen grup,

Grup 3 (ACT + MTX grubu): 20mg/kg/gün ACT ve 20mg/kg/hafta MTX verilen grup,

Grup 4 (ACT + MTX + ALA): 20mg/kg/gün ACT ve 20mg/kg/hafta MTX ve 50mg/kg/gün ALA verilen grup.

Grup 2, Grup 3, Grup 4'ün her birinde 15 adet, K Grubu ise 5 adet rat kullanılmıştır. Ratlar, enjeksiyondan önceki son 24 saat boyunca aç bırakılmıştır. Enjeksiyon işlemleri, her sabah aynı saatte yapılmıştır. Enjeksiyondan sonraki 3., 5. ve 7. Günlerde de ratlar, sakrifiye edilmiştir. % 0.9 NaCl ile kalp perfüzyonu yapıldıktan sonra beyin çıkarılmıştır. Elde edilen beyinler, deneysel işlemler için -80 °C'lik derin dondurucuda saklanmıştır. Daha sonra derin dondurucudan çıkarılmış olan beyinlere sırasıyla homojenizasyon, sonikasyon ve santrifüj işlemleri uygulanmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant, Polifenol oksidaz (PO) aktivite tayini için kullanılmıştır. PO aktivitesi Hung ve Boucias (1996) yöntemiyle belirlenmiştir.

PO aktivitesi için; 20 mM L-DOPA içeren 950 µL fosfat tampon çözeltisine 50 µL homojenat hızla ilave edilmiştir. Daha sonra, 420 nm'de eğriye karşı bir dakika içinde absorbans değişimi okunarak aktivite belirlenmiştir. Sonuçta bir enzim

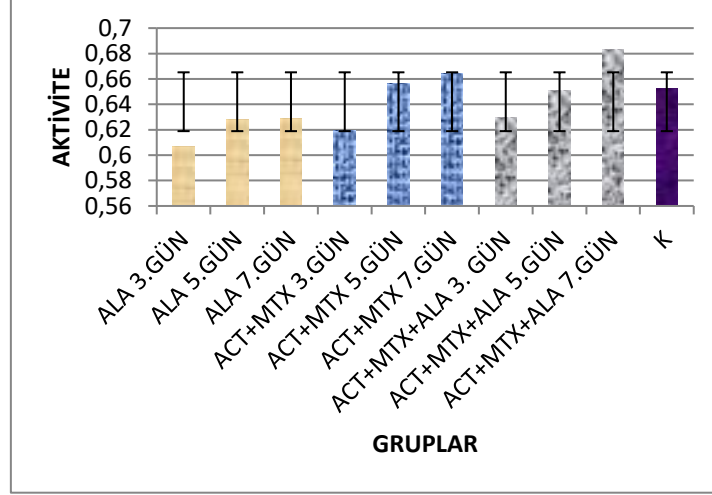
birimi, reaksiyonun meydana geldiği kuvvette 1 dakikada 0.001 artış olarak tanımlanmıştır.

Tüm veriler, SPSS 22.0 istatistik yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki fark Kruskal Wallis testi ile de kontrol edilmiştir.

Bulgular

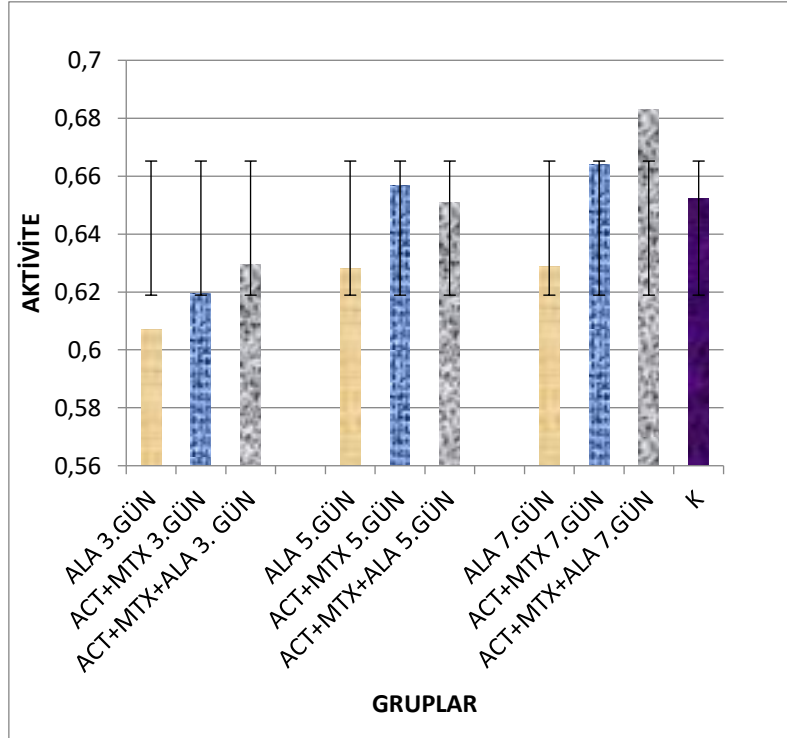
ALA'nın enjeksiyonunu takiben 3.günde PO aktivitesinin K'ya göre % 7 inhibisyon gösterdiği ($p>0,05$), 5.günde K ile hemen hemen aynı seviyede olduğu ve 7. günde ise tekrar

inhibisyon gösterdiği gözlenmiştir. ACT+MTX grubu K ile karşılaştırıldığında, 3.günde %5 inhibisyon ($p>0,05$) gösterirken 5.günde K ile aynı aktivitede olduğu ve 7.günde ise yaklaşık %5 civarında aktivasyon gösterdiği görülmüştür. ACT+MTX+ALA grubu K ile karşılaştırıldığında ise ACT+MTX grubunda olduğu gibi 3.günde %5'lik inhibisyon gözlenirken 5.günde K ile aynı aktiviteyi gösterdiği gözlenmiştir. 7.günde ise aktivitesinde %2'lik bir artış ($p>0,05$) olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.).



Şekil 3. ALA, ACT+MTX ve ACT+MTX+ALA verilmiş ratların beyin dokusundaki PO aktivitesinin günlere göre karşılaştırılması

ACT+MTX kombinasyonuna ALA eklenmesini takiben 3.günde PO aktivitesinde az bir artış görülmüştür. 5.günde aktivite değerleri hemen hemen aynı iken 7.günde aktivitenin daha da arttığı görülmüştür (Şekil 4.).



Şekil 4. Rat beyin dokusundaki PO aktivitesinin gruplar arası karşılaştırılması

Tartışma

Çalışmamızda tek başına ALA kullanımının beyin PO aktivitesini azalttığı gözlemlenmiştir. ACT+MTX grubunda PO aktivitesi K grubu ile karşılaştırıldığında 3. günde inhibisyon gözlenirken, 5. günde aktivitenin hemen hemen K ile aynı seviyeye geldiği fakat 7. günde yerini aktivasyona bırakmıştır. Bu kombinasyona ALA eklendiğinde ise 3.günde görülen inhibisyonun ALA'nın etkisiyle %2'lik bir aktivasyona dönüştüğü fakat 5. ve 7. günlerde önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Tek başına ALA verilen grupta da K'ya göre tüm günlerde inhibisyon gözlenirken inhibisyonda önemli değerin 3. günde görüldüğü, 5. ve 7. günlerde ise inhibisyonun azaldığı ve değerinin neredeyse birbirinin aynı olduğu da belirlenmiştir.

Doğal olarak üretilen hem hayvansal hem bitkisel bir antioksidan olan ALA (Gorça vd, 2011), E vitamini ve C vitamininin rejenerasyonunu sağlamada ve reaktif oksijen türlerinin nötralize edilmesinde oldukça önemli rollere sahiptir (Rochette vd, 2013). ALA'nın alzheimer ve bilişsel bozukluklar gibi hastalıklarda da koruyucu etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. ALA ile tedavi edilen hayvanlarda mitokondriyal fonksiyonların artışı ve bilişsel işlevlerin geliştiği de gösterilmiştir. ALA'nın bu denli bilişsel bozukluğu azaltıcı etkileri, alzheimer ve bunlarla ilişkili bir çok demans hastalığının tedavisinde başarılı olabileceğini düşündürmüştür (Head vd, 2009).

MTX, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan bir antimetabolit olmasına rağmen selektif olmaması nedeniyle kıl kökü, kemik iliği, beyin gibi sağlıklı dokularda toksisiteye neden olabilmektedir (Vardi vd, 2010). Yapılan bir çalışmada, MTX ile tedavi olan hastalarda beyin omurilik sıvısı (BOS) içeriğinde S-Adenozil Metiyonin (SAM) eksikliği bildirilmiştir. Bu eksikliğin reaktif oksijen türlerinin artmasından kaynaklı olduğu vurgulanmıştır (Kumari vd, 2016). An vd (2017)'de, farelerde ve hastalarda yaptığı çalışmalarda ACT ve ACT ile kombin olarak kullanılan MTX'in karaciğer ve diğer organlarda ciddi yan etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Athoumani Ali vd (2020) ise ACT ve MTX'in rat akciğer dokusunda fenol oksidaz aktivitesini arttırdığını, ACT+MTX kombinasyonuna bir antioksidan olan ALA ilavesi ile bu aktivitede azalma olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca Athoumani Ali vd (2020), ACT+MTX'in akciğer dokusunda fenolik bileşiklere neden olduğunu ALA'nın ise ACT+MTX türevi fenolik bileşiklere karşı koruyucu etkisinin olduğunu da belirtmişlerdir.

Sonuç

Çalışmamızda; ALA'nın, beyin dokusunda ilk günlerde PO aktivitesini azalttığı sonucuna dayanarak oksidatif strese karşı koyma yeteneği sınırlı olan beyin dokusu için antioksidan özelliğini gösterdiğini söyleyebiliriz. ACT+MTX kombinasyonunun da 5. güne kadar PO aktivitesini azalttığı 5. günden sonra ise aktiviteyi artırdığı fakat ACT+MTX kombinasyonuna ALA eklenmesi ile ilk günlerdeki inhibisyonun da yerini aktivasyona bıraktığı gözlemlenmiştir. Bu durum; kombinasyondaki ALA'nın, PO'ın bir parçası olarak görev yaptığını düşündürmektedir. Böylece beyin dokusunda ACT+MTX kaynaklı radikal oluşumuna karşı koruyucu etkisini gösterdiği de söylenebilir. Sonuç olarak gün aralıklarının sıklaştırılarak hatta saatlik değerlendirilmelerinin de yapılabileceği

yeni çalışmaların arttırılması soru işaretlerinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Kaynakça

- An J, Zhang D, Wu J, Li J, Teng X, Gao X, Xia Y (2017). The acitretin and methotrexate combination therapy for psoriasis vulgaris achieves higher effectiveness and less liver fibrosis. *Pharmacol Res* 121:158-168
- Athoumani Ali, S., Diraman, E., Solmaz, F., G., (2020). The investigation of the effect of alpha lipoic acid on lung polyphenol oxidase activity in acitretin and methotrexate given rats. *Bull Biotechnol* (2020) 1(1):19-22
- Bhuiyan, Z.H., Chowdhury, M.,K. (2016). Acitretin in dermatology a review. *Bangladesh Med J* 45(2): 98-100
- Data, P. (1995). Alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung*, 45, 872-874.
- Dogra, S., & Yadav, S. (2014). Acitretin in psoriasis: an evolving scenario. *International journal of dermatology*, 53(5), 525–538. <https://doi.org/10.1111/ijd.12365>.
- Gorça, A., Huk-Kolega, H., Piechota, A., Kleniewska, P., Ciejka, E., & Skibska, B. (2011). Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*, 63(4), 849-858.
- Head, E., Nukala, V., Fenoglio, K., Muggenburg, B., Cotman, C., & Sullivan, P. (2009). Effects of age, dietary, and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. *Experimental neurology*, 220(1), 171-176.
- Holthoewer, D., Endres, K., Schuck, F., Hiemke, C., Schmitt, U., & Fahrenholz, F. (2012). Acitretin, an enhancer of alpha-secretase expression, crosses the blood-brain barrier and is not eliminated by P-glycoprotein. *Neurodegenerative Diseases*, 10(1-4), 224-228.
- Hung SY, Boucias DG (1996). Phenoloxidase activity in the hemolymph of naive and Beauveria bassiana-infected *Spodoptera exigua* larvae. *J Invert Pathol* 67:35-40
- Kumar, K., H., Khanum, F., (2013). Hydroalcoholic Extract of *Cyperus rotundus* Ameliorates H2O2-Induced Human Neuronal Cell Damage via Its Anti-oxidative and Anti-apoptotic Machinery. *Cell Mol Neurobiol* (2013) 33:5–17
- Kumari, S., Kumari, S., Sharma, A. K., & Kaur, I. (2016). Methotrexate induced hepatotoxicity and its management. *Inter J Sci Res*, 5, 1477-1481.
- Lotfi, M., Moniruzzaman, M., Mutalib, M. A., Wilfred, C. D., Alitheen, N. B., & Goto, M. (2016). Analysis of multiple solvation interactions of methotrexate and ammonium based ionic liquids using COSMO-RS. *Procedia Engineering*, 148, 459-466.
- Menter, A., Gottlieb, A., Feldman, S. R., Van Voorhees, A. S., Leonardi, C. L., Gordon, K. B., Lebwohl, M., Koo, J. Y., Elmets, C. A., & Korman, N. J. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 58(5), 826-850.
- Patel, M. S., & Roche, T. E. (1990). Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes I. *The FASEB Journal*, 4(14), 3224-3233.
- Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2013). Direct and indirect antioxidant

- properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular nutrition & food research*, 57(1), 114-125.
- Tetikçok, R., Özçetin, M., ÇELTEK, N. Y., Oktay, G., Ufuk, Ü., & Şengül, M. (2015). Lipoic Acid. *Çağdaş Tıp Dergisi*, 5(3), 206-209.
- Data, P. (1995). Alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung*, 45, 872-874.
- Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., & Oflu, A. (2010). Metotreksatin Neden Oldugu Testiküler Hasara Karsi Klorogenik Asidin Koruyucu Etkileri/The Preventive Effects of Chlorogenic Acid Against to Testicular Damage Caused by Methotrexate. *Türkiye Klinikleri. Tıp Bilimleri Dergisi*, 30(2), 507.
- Whitaker JR (1995). Polyphenol oxidase. In: Wong DWS, In: food enzymes: structure and mechanism. pp. 271-307 New York: Chapman and Hall, 1995
- Yamauchi, P. S., Rizk, D., Kormeili, T., Patnaik, R., & Lowe, N. J. (2003). Current systemic therapies for psoriasis: where are we now? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 49(2), 66-77.