



Nar Kabuğu Ekstresinin Sıçanlarda Paklitakselle İndüklenen Primer Nöron Hasarına Karşı Koruyucu Etkisi

Protective Effects of Pomegranate Peel Extract on Paclitaxel Induced Primary Neuron Damage in Rats

Muhammed Yayla¹, Damla Çetin¹, Çağlar Demirbağ², Pınar Aksu Kılıçle³

¹Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars; ²Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tekirdağ; ³Kafkas Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Kars; Türkiye

ABSTRACT

Aim: The combination of chemotherapeutics and pomegranate peel extract has been shown to have a stronger anti-cancer effect. However, there is no information about how pomegranate peel extract will affect the neurotoxicity that may develop due to cancer chemotherapy. In this study, we aimed to the effects of strong antioxidant pomegranate peel extract on paclitaxel induced primary neuron damage in newborn rats by biochemical and molecular analysis.

Material and Method: Paclitaxel toxicity was induced in the primary neuron cell culture derived from newborn rats. PPE 200, 300 and 400 mg/ml doses were applied 2 hours before the paclitaxel for protective effect.

Results: In the MTT analysis, paclitaxel reduced cell viability by caused neuronal damage at the end of 24 hours. PPE has demonstrated significant protective effect on cell viability by preventing paclitaxel toxicity at all doses. PPE was demonstrated its effects by reducing oxidative stress, increasing antioxidant capacity, and also by suppressing the TNF- α expression which is pro-inflammatory cytokine, and caspase 9 and 3 expression which are apoptotic proteins.

Conclusion: PPE prevents primary neuron damage caused paclitaxel by its antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effect.

Key words: apoptosis; pomegranate; neuron; oxidative stress; paclitaxel

ÖZET

Amaç: Potansiyel bir anti-karsinojen olan nar kabuğunun kemoterapötikler ile tedavisinin tedaviyi desteklediği ve daha güçlü anti kanser etki oluştuğu gösterilmiştir. Ancak nar kabuğunun kanser kemoterapisine bağlı gelişebilecek nörotoksositeye karşı nasıl bir etki göstereceği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Çalışmamızda güçlü antioksidan olan nar kabuğunun sıçanlarda paklitakselle ile indüklenen primer nöron hasarındaki etkilerini biyokimyasal ve moleküler analizler ile ortaya koymayı amaçladık.

Muhammed Yayla, Kafkas Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye, 36100, Tel. 0534 210 50 42 Email. muhammed.yayla@gmail.com
Geliş Tarihi: 02.08.2018 • Kabul Tarihi: 22.10.2018

Materyal ve Metot: Yeni doğan sıçan yavrularından elde edilen primer nöron hücre kültüründe paklitakselle toksisitesi indüklendi. PPE 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında koruyucu etki için paklitakselden 2 saat önce uygulandı.

Bulgular: Hücre canlılığı için yapılan MTT analizinde paklitakselle 24 saat sonunda nöron hasarı oluşturarak hücre canlılığını azaltmıştır. PPE ise tüm dozlarda anlamlı bir şekilde paklitakselle toksisitesini önleyerek hücre canlılığını korumuştur. PPE bu etkilerini oksidatif stresi azaltarak, antioksidan kapasiteyi artırarak ve aynı zamanda pro-inflamatuar sitokin olan TNF- α ekspresyonunu ve apoptotik proteinler olan caspase 9 ve 3 ekspresyonunu baskılayarak ortaya koymuştur.

Sonuç: PPE antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etki ile paklitakselle bağlı gelişen primer nöron hasarını önlemiştir.

Anahtar kelimeler: apoptozis; nar; nöron; oksidatif stres; paklitakselle

Giriş

Mevcut antikanser ilaçlar aynı zamanda sitotoksik etkileri ile bilinmektedirler. Pek çok kanser türünde kemoterapi imkanı sağlayan bu ilaçların ciddi yan etkileri tedavi sonrasında yaşamı olumsuz etkilemektedir. Çalışmamızda kullandığımız taksan sınıfı bileşikler son yıllarda önemli kemoterapötikler arasına girmiştir. Paklitakselle ve yarı sentetik türevi olan dosetaksel over, meme, akciğer ve peççok kanser hasta grubunda tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombine olarak kullanılmaktadır¹⁻³. Nötropeni, periferik nöropati gibi ciddi yan etkilere yol açan paklitakselin yapılan çalışmalar sonucunda nöron hasarına da yol açtığı görülmüştür⁴⁻⁶. Bu yüzden antikanser ilaçların toksisitelerini önlemek için antioksidan ve sitoprotektif etkiye sahip ajanlar kombine edilerek kullanılmaktadır^{7,8}. Ancak halen kemoterapiye bağlı gelişen organ hasarlarının önüne geçilememiştir. Bu yüzden antikanser ilaçların

toksik etkilerini önlemeye yönelik yeni stratejiler geliştirilmekte ve güçlü antioksidan maddeler keşfedilerek aktiviteleri denenmektedir.

Punicaceae ailesinin önemli bir üyesi olan nar (*Punica granatum*); antik çağdan beri bilinen pek çok özelliklere sahip bir meyvedir. Nar, tohum (ağırlığın %3'ü), su (ağırlığın %30'u) ve kabuk olmak üzere 3 bölümden oluşan güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Günümüzde yapılan çalışmalarda narın kimyasal bileşenlerinin ve terapötik etkilerinin tanımlanmasında kayda değer ilerlemeler sağlanmıştır. Narın ihtiva ettiği önemli biyoaktif maddeler kabuk, meyve ve çekirdeğinde farklılıklar göstermekte ve bu durum narın hipolipidemik, antioksidan, anti diyabetik, anti-neoplastik etkilerden faydalanmamız için çeşitlilik sunmaktadır⁹⁻¹¹. Nar kabuğundaki yüksek miktarda (Punikalagin) PNG, narın anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-apoptotik ve daha birçok faydalı biyolojik etkiler ortaya çıkarmasını sağlamaktadır^{12,13}. Yine kabuğunda bulunan diğer yağ asitleride hem antioksidan hemde anti-inflamatuvar etkilere sahiptir¹⁴. Aynı zamanda yapılan son çalışmalar incelendiğinde nar kabuğunun potansiyel bir anti-karsinojen olabileceğini görülmektedir¹⁵. Kemoterapötikler ile nar kabuğu ekstresinin kombine tedavisinin tedaviyi desteklediği ve daha güçlü anti kanser etki oluştuğu da önceki çalışmalarda gösterilmiştir¹⁶. Ancak nar kabuğunun kanser kemoterapisine bağlı gelişebilecek nörotoksositeye karşı nasıl bir etki göstereceği konusunda bir bilgi bulunmamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda güçlü antioksidan olan nar kabuğunun sıçanlarda paklitaksel ile indüklenen primer nöron hasarındaki etkilerini biyokimyasal ve moleküler analizler ile ortaya koymayı amaçladık.

Materyal ve Metot

Ekstrenin hazırlanması

Punica granatum (Nar), ülkemizde hicaz narı olarak bilinen türü Mersin ilinden 2016 yılında temin edilmiştir.

Bitkilerin ekstresi, Clevenger (Wisdom-Wise Therm) cihazında, su buharı distilasyonu yöntemiyle elde edildi. Bu amaçla meyveler gölgede kurutulduktan sonra kabukları ayrıldı. 160 gr bitki parçalayıcıda ince toz haline getirildi. Öğütülen örnek cam balon içerisine konularak üzerine 1600 ml distile su ilave edildikten sonra Clevenger cihazına yerleştirilip cihaz çalıştırıldı. Buharlaştırma başladıktan sonra üç saat süre boyunca bekletildi. Bu süre boyunca Clevengerin toplama borusunda biriken hidrosol steril edilmiş ayrı bir şişeye alındı. Bu sürenin sonunda toplama borusunda biriken

son hidrosolde alındıktan sonra, geriye kalan ekstre kullanılıncaya kadar koyu renkli şişelerde, ağzı kapalı olarak, +4°C'de buzdolabında muhafaza edildi.

Ekstrede bulunan maddelerin HPLC-DAD ile analizi

Ekstrede gallik asit, ellajik asit ve punikalajin A ve B maddeleri tespit edildi ve miktar tayinleri Agilent 1200 Serisi HPLC-DAD cihazında yapıldı.

Örnek hazırlama

Sabit tartıma getirilen ekstre, konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde metanol ile çözüldü ve stok çözelti elde edildi. 10000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant fosfat tamponu (pH=2,5, 0,025 M) ile seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlandı. Çalışma çözeltileri enjeksiyon filtresinden geçirildikten sonra sisteme enjekte edildi. Her enjeksiyon üçer kez tekrarlandı.

Etik kurul izinleri ve hayvanların temini

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 10 adet yeni doğan Sprague dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. (Bağlı bulunduğum üniversitede deney hayvanları üretimi olmadığı için çalışma Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden (ATADEM) temin edildi). Çalışmanın etik kurallara uygunluğu Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (KAÜ-HADYЕК) tarafından onaylanmıştır (HADYЕК 2017-004).

Kültür yapımı

Yeni doğan Sprague dawley sıçan yavruları hızlı bir şekilde dekapite edildikten sonra korteks nöronları alınarak 1:1 tripsin ilave edildi ve inkübatörde 30 dakika süreyle bekletildikten sonra 3 defa santrifüj yapıp ve her defasında süpernatant atıldı ve yeni medyum ilave edildi. Ayrı bir tüpte nörobasal medyum 1000:1 penisilin 50:1 B27 supplement ve 10:1 fetal bovine serum ilave edilerek medyum hazırlandı. Hazırlanan medyumun içine hücreler eklendi. 96 kuyucuklu plate'in her odacığına 150 µl medyum eklendi. Hücrelerin odacıkların tabanına yapışması ve tabanını kaplaması ve büyümesi için 10 gün inkübatörde bekletildi⁷.

İlaç uygulaması

Kurulan korteks primer kültürüne distile su ile çözülen PPE 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında uygulandıktan

2 saat sonra 10^{-7} ve 10^{-8} M dozlarında paklitaksel ile toksisite oluşturuldu.

Gruplar:

1. Grup; Sağlıklı kontrol (herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı)
2. Grup Paklitaksel 10^{-7} M (Toksosite grubu yüksek doz)
3. Grup Paklitaksel 10^{-8} M (Toksosite grubu düşük doz)
4. Grup PPE 200 mg/ml
5. Grup PPE 300 mg/ml
6. Grup PPE 400 mg/ml
7. Grup PPE 200 mg/ml + Paklitaksel- 7 M
8. Grup PPE 300 mg/ml + Paklitaksel- 7 M
9. Grup PPE 400 mg/ml + Paklitaksel- 7 M
10. Grup PPE 200 mg/ml + Paklitaksel- 8 M
11. Grup PPE 300 mg/ml + Paklitaksel- 8 M
12. Grup PPE 400 mg/ml + Paklitaksel- 8 M

Canlılık testleri

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) proliferasyon kiti (CAYMAN-10009365) ile ölü/canlı hücre sayısı ortaya kondu. Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra kitte yer alan direktiflere uygun bir şekilde ölçüm yapıldıktan sonra her bir numunenin absorbansı 570 nm'de mikropate okuyucu kullanılarak ölçüldü.

Oksidan ve antioksidan kapasite ölçümleri

Total antioksidan kapasite (TAK) analizi: Primer nöron kültür hücreleri üzerindeki TAK seviyelerini belirlemek amacıyla ticari TAK kiti kullanılmıştır (RELASSAY-Mega01). Kiti uygulamasında amaç, kullanılan örneklerin bir serbest radikal olan 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) bileşiğinin oluşumunu inhibe etmek suretiyle sahip oldukları antioksidan düzeylerini belirlemektir. Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra medyumlar toplanarak TAK ölçümü yapıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

Total oksidan kapasite (TOD) Analizi: Primer nöron kültür hücreleri üzerindeki TOD düzeylerini belirlemek amacıyla ticari TOD kiti kullanılmıştır (RELASSAY-Mega02). Hücrelere paklitaksel uygulandıktan 24 saat sonra medyumlar toplanarak TOD ölçümü yapıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

Moleküler analizler: Çalışmamızda Qiagenrat takımın problemleri caspase 3, caspase 9 ve TNF α mRNA ekspresyon düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı. Çalışmadan en iyi belirlenen sonuçlar arasında karşılaştırma yapıldı.

Hücrelerden RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi: Önceki yapmış olduğumuz çalışmalardaki¹⁷ direktiflere uygun bir şekilde hücrelere paklitaksel uygulandıktan 6 saat sonra hücreler kazınarak RNA izolasyonu (Qiagen RNaeasy mini kit-74104) ve cDNA sentezi (Qiagen RT-HT First Strand cDNA sentezi kiti-330404) gerçekleştirilmiştir.

Real-Time PCR ile mRNA ekspresyonlarının kantitatif olarak belirlenmesi: Caspase 9, caspase 3 ve TNF- α mRNA ekspresyonu, Taq Man Gene Expression Master Mix kiti kullanılarak kantifiye edildi. Amplifikasyon ve kantifikasyon işlemi StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) cihazında yapıldı. 100ng cDNA için TaqMan® Gene Expression Assays'ler pipetlendi ve 40 siklus ile yürütüldü. Cycle threshold (C_t) değerleri cihazda otomatik olarak $2^{-\Delta\Delta C_p}$ ye çevrildi.

İstatistiksel analiz: Çalışmamızın verileri IBM 21,00 SPSS paket programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki anlamlılık için One Way Anova çoklu karşılaştırma testinden Tukey testine göre yapıldı. Şekillerde sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise aralarında anlamlı bir fark vardır, harfler birbiri ile aynı ise aralarındaki fark anlamsızdır. Analiz için ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

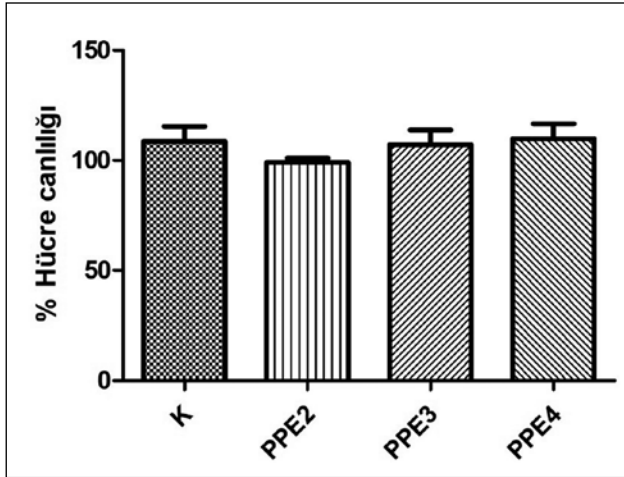
Bulgular

HPLC sonuçları

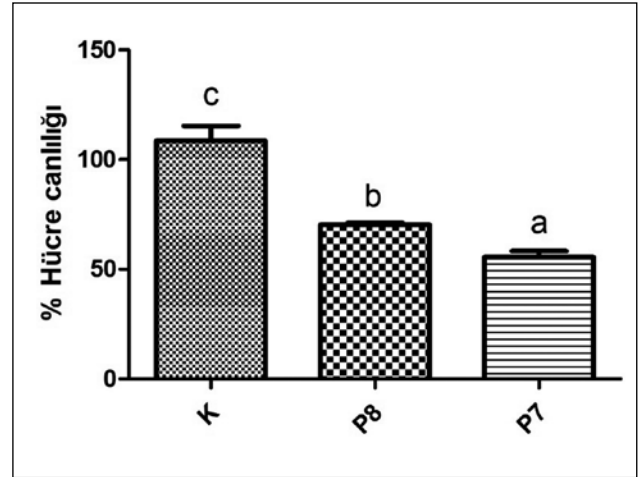
Tablo 1'de görüldüğü gibi nar kabuğu yüksek miktarda punikalajin A ve B ihtiva etmektedir. Aynı zamanda nar kabuğunda güçlü antioksidan biyoaktif maddelerden gallik asit ve ellajik asit yeterli miktarda bulunmaktadır.

Tablo 1. 1,00 gr ekstrede bulunan madde miktarları

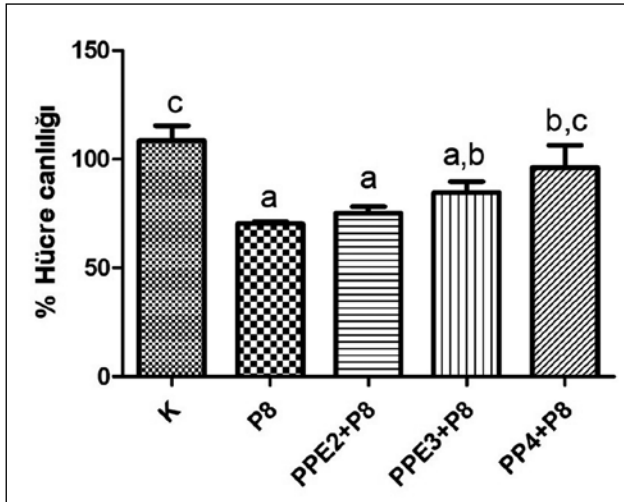
Madde Adı	Miktarı (mg/g)
Gallik Asit	14,45±0,53
Punikalajin A	191,56±0,36
Punikalajin B	189,48±0,62
Ellajik Asit	68,02±0,42



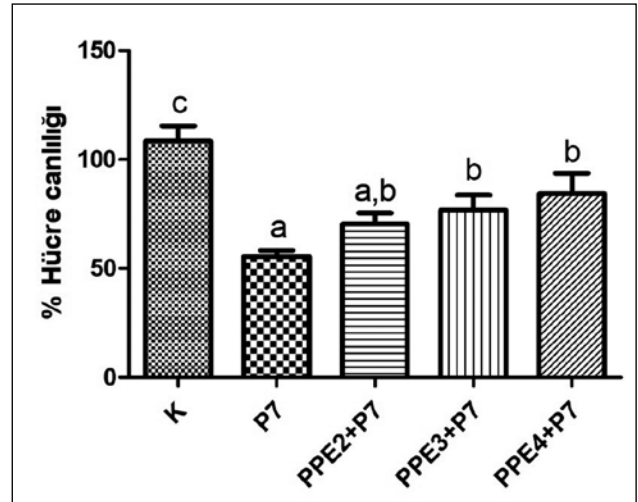
Şekil 1. Nar kabuğu ekstresinin 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarındaki nöron hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi.



Şekil 2. Paklitakselin 10^{-7} ve 10^{-8} M dozlarındaki nöron hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).



Şekil 3. Paklitakselin 10^{-8} M dozu ile induktelen nörotoksistide PPE'nin koruyucu etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).

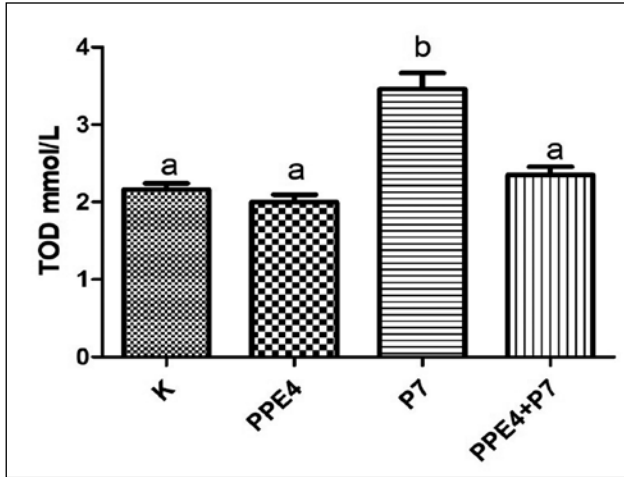


Şekil 4. Paklitakselin 10^{-7} M dozu ile induktelen nörotoksistide PPE'nin koruyucu etkisinin MTT analizi ile gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir).

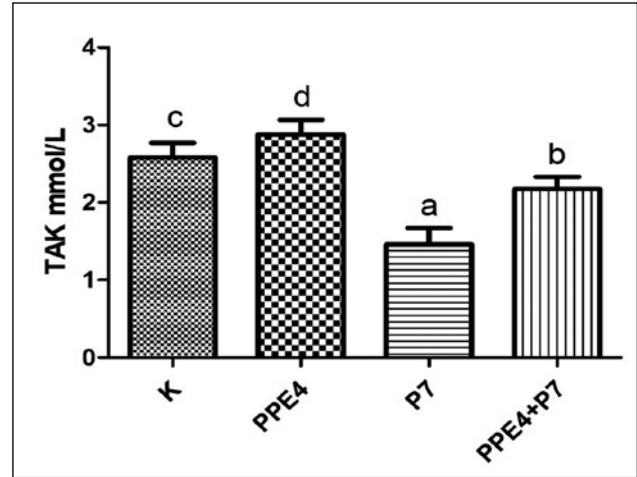
Hücre canlılığı sonuçları

Çalışmamızda ilk olarak nar kabuğunun uyguladığımız dozlardaki primer nöronların canlılığı üzerindeki etkisini gösterdik. Şekil 1'de görüldüğü üzere 200, 300 ve 400 mg/ml dozlarında PPE'nin hücre canlılığı üzerine herhangi bir toksik etkisi görülmemiştir. Hatta sayısal olarak doza bağlı bir şekilde hücre proliferasyonunda artış gözlenmiştir. Çalışmamızda paklitakselle induktelen toksisite gruplarında ise doza bağlı bir şekilde hücre canlılığı anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 2) ($p < 0,05$).

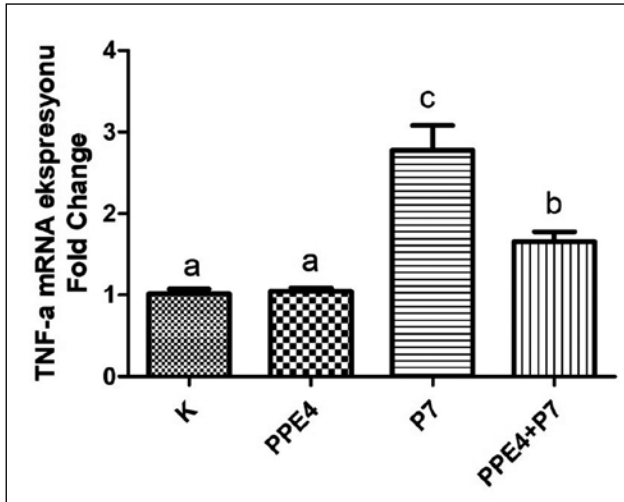
Şekil 3 incelendiğinde paklitakselin 10^{-8} M dozunda PPE'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. PPE artan dozlarda paklitakसेle bağlı gelişen toksisiteyi önlemiştir ($p < 0,05$). Yine Şekil 4'te paklitakselin 10^{-7} M olan daha toksik dozuna karşı PPE anlamlı bir etki ortaya koyarak hücre canlılığını önemli ölçüde korumuştur ($p < 0,05$). Bu durumda toksik etki bakımından paklitakselin 10^{-7} M dozu ve koruyucu etki olarak da PPE'nin 400 mg/ml dozu biyokimyasal ve moleküler çalışmalarda denenmiştir.



Şekil 5. Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının Total oksidan düzey (TOD) üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10⁻⁷ M).



Şekil 6. Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının Total antioksidan kapasite (TAK) üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10⁻⁷ M).



Şekil 7. Paklitaksel ile indüklenen nörotoksistide PPE uygulamasının pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10⁻⁷ M).

Toplam oksidan düzeyin (TOD) belirlenmesi

Şekil 5'te gruplar arasındaki TOD düzeyleri karşılaştırılmıştır. PPE nöron kültürünün oksidan düzeyi üzerinde tek başına bir etki oluşturmamıştır ($p > 0,05$). Ancak paklitaksel uygulaması oksidan düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p < 0,05$). Bu durum paklitakselin oksidatif stresi artırdığını ve nöron hasarında etkili bir mekanizma olabileceğini göstermektedir. PPE ise paklitakselin artırmış olduğu oksidatif stresi sağlıklı gruba yaklaştırmış ve koruyucu etki ortaya koymuştur ($p < 0,05$).

Toplam antioksidan kapasitenin (TAK) belirlenmesi

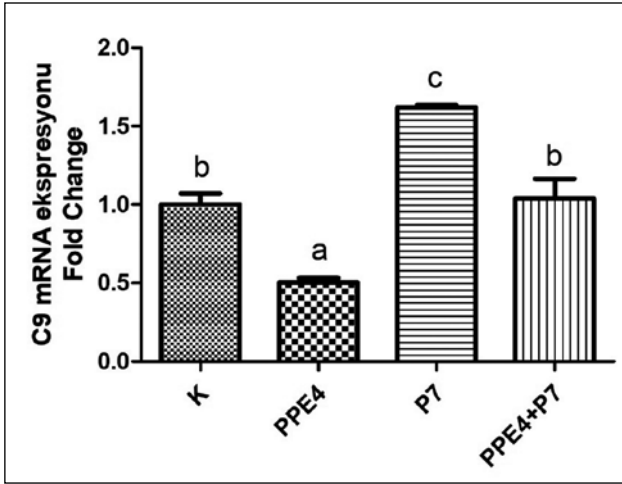
Şekil 6'ya göre PPE tek başına toplam antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artırmıştır ($p < 0,05$). Paklitaksel uygulaması ise kontrol grubuna göre anlamlı şekilde antioksidan kapasiteyi azaltmıştır ($p < 0,05$). PPE, paklitakसेle bağlı gelişen azalmış antioksidan kapasiteyi düzelterek hücre toksitesini önemli ölçüde önlemiştir ($p < 0,05$).

TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri

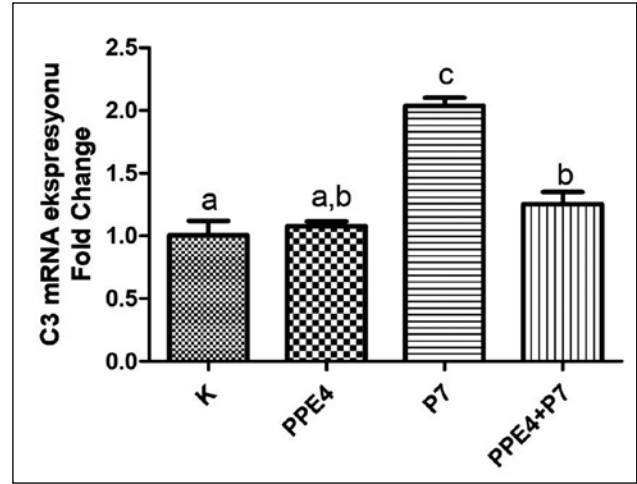
Paklitakसेle bağlı gelişen hasarın mekanizmasında inflamasyonun rolünü gösterebilmek için TNF- α seviyeleri ölçüldü (Şekil 7). PPE uygulaması tek başına kontrol grubuna göre herhangi bir etki ortaya koymamıştır ($p > 0,05$). Ancak paklitaksel uygulaması TNF- α mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde artırmıştır ($p < 0,05$). Bu durum paklitakselin oksidatif stres ile birlikte inflamasyonda artırdığını göstermektedir. PPE ise paklitakसेle bağlı gelişen inflamasyonu önemli ölçüde azaltarak anti-inflamatuvar etki ortaya koymuş ve nöron hasarını önlemiştir ($p < 0,05$).

Apoptotik etkinin gösterilmesi

Caspase 9 mRNA ekspresyon düzeyleri: Paklitaksel kanser hücrelerinde azalmış olan apoptozisi artırarak kanser hücreleri ile savaşmaktadır. Ancak sağlıklı hücreler üzerinde de bu etkisi ile ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda paklitaksel



Şekil 8. Paklitaksel ile indüklenen nörotoksisitede PPE uygulamasının apoptotik protein olan caspase 9 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10⁻⁷ M).



Şekil 9. Paklitaksel ile indüklenen nörotoksisitede PPE uygulamasının apoptotik protein olan caspase 3 mRNA ekspresyonu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ($p < 0,05$ anlamlı Kabul edilmiştir. Sütunlardaki harfler birbirinden farklı ise istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık var demektir. PPE4:400 mg/ml, P7:10⁻⁷ M).

uygulaması caspase 9 ve caspase 3 mRNA ekspresyonlarını primer nöron hücrelerinde anlamlı şekilde artırmıştır ($p < 0,05$). Bu durum oksidatif stress ve inflamasyon ile birlikte hücrelerin apoptoza uğradığı ve bu şekilde ciddi toksik etki ortaya koyabileceğini göstermektedir (Şekil 8 ve 9). Tek başına PPE uygulaması caspase 9 mRNA ekspresyonunu baskılayarak caspase 3 mRNA ekspresyonu üzerinde herhangi bir etki ortaya koymamıştır. Ancak, PPE uygulamasından sonra paklitaksel verildiğinde PPE, paklitakselin yapmış olduğu apoptotik proteinlerin gen düzeyindeki ekspresyon artışlarını önlemiş ve hücre canlılığını korumuştur.

Tartışma

Çalışmamızda güçlü antioksidan ve antikanser etkinliği olan nar kabuğu ekstresinin sıçanlarda paklitaksel ile indüklenen primer nöron hasarındaki koruyucu rollerini biyokimyasal ve moleküler olarak gösterdik.

Son zamanlarda kanser kemoterapisindeki yaygınlığı artan paklitaksel aynı zamanda pek çok kemoterapötik ajan ile de birlikte kullanılabilir. Ancak son zamanlarda kanser hastalarının tedavi sonrasında ilaca bağlı gelişen toksisite riskinin artması kemoterapötik ilaçlara destekleyici alternatif yaklaşımların artmasına yol açmıştır. Paklitakselin pek çok yan etkisi olmasına rağmen konumuzla ilgili olarak nörotoksisiteye yol açması yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir.

Çalışmalar paklitakselin doza ve zaman bağlı olarak nörotoksisiteye yol açabileceğini göstermektedir^{4,5}. Paklitaksel maruziyeti sonrasında da aksonlar şişerek¹⁸ parçalanır ve nöron ölümü gerçekleşir^{6,19,20}. Aynı zamanda paklitakselin akson uzunluğunu azalttığı ve doğrudan çevresel faktörleri uyararak aksonal dejenerasyona yol açtığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir²⁰. Ancak hasarın mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yapılan çalışmalarda toksisitenin önemli göstergelerinden birisi hücre canlılığı testidir. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) hücre canlılığı için yaygın olarak kullanılan önemli yöntemlerden birisidir. Canlı hücrelerde mitokondride yer alan süksinat-dehidrogenaz enzimi tetrazolyum halkasını parçalayarak çözünmeyen formazan tuzları oluşturur. Hücreler çoğaldıkça formazon tuzu oluşumuna bağlı olarak absorban değeri de artar^{21,22}.

Önceki yapılan çalışmalarda paklitakselin sitotoksik etkisine bağlı olarak primer nöron canlılığını azalttığı gösterilmiştir^{7,23}. Çalışmamızda da paklitaksel uygulaması doza bağlı olarak primer nöron hücrelerinin canlılığını önemli ölçüde azaltmıştır. PPE'nin ise tek başına verildiği zaman tüm dozlarda herhangi bir toksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Hatta sayısal olarak hücre proliferasyonunu artırmıştır. PPE, paklitakselle bağlı gelişen primer nöron hasarını önemli ölçüde önleyerek

hücre canlılığını korumuştur. Daha önceki yapılan çalışmalarda nar kabuğu ekstresi kullanımının pek çok farklı modelde oluşturulan toksisiteyi önlediği gösterilmiştir^{24,25}. PPE genel olarak bu etkilerini antioksidan ve antiinflamatuvar etkinliği ile ortaya koymuştur.

Bizde çalışmamızda paklitakselin primer nöron üzerindeki toksik etkisinin ve PPE'nin ise göstermiş olduğu bu protektif etkinin hangi mekanizmalar üzerinden olduğunu anlamak için biyokimyasal ve moleküler analizler ile bulgularımızı destekledik.

Paklitakselin nörotoksositeye yol açan en önemli etkilerinden birisi oksidatif stresin artması ve antioksidan sistemin ise azalmasıdır^{7,26-27}. Oksidatif strese bağlı olarak artmış serbest radikaller membran hasarına yol açarak hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Vücudumuzda ise serbest radikallerin bu zararlı etkilerinden korunmak için anti-oksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Eğer antioksidan savunma sistemi azalır ise oksidatif stresin vereceği hasar daha da şiddetlenir. Bu yüzden antioksidan etkinliğe sahip olan maddelerin oksidatif strese bağlı gelişebilecek hasarı önlediği düşünülmektedir^{28,29}. Yapılan çalışmalarda oksidatif stres ve antioksidan sistemin göstergesi olarak pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan özellikle doğrudan toplam oksidan ve antioksidan düzeyi belirlememize yardımcı olan TAK ve TOD ölçümleri literatürde yaygın olarak kullanılmaktadır³⁰⁻³². Paklitakselle indüklenen nörotoksitede TOD seviyesinin arttığı, TAK seviyesinin ise azaldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir⁷. Çalışmamızda tek başına PPE uygulaması toplam oksidan düzeyi etkilemezken, toplam antioksidan kapasiteyi kontrol grubuna göre artırmıştır. Ancak paklitaksel uygulaması oksidan düzeyi artırırken, antioksidan düzeyi de anlamlı şekilde azaltmıştır. PPE 400+paklitaksel grubunda ise PPE, paklitakselin etkisini önleyerek oksidatif stresin azalmasını sağlamış ve nöron hasarını korumuştur.

Çalışmamızda ikincil olarak hasarın önemli bir göstergesi olan inflamasyonun varlığı gösterilmiştir. Bilindiği üzere ilaca bağlı gelişen toksisitelere oksidatif strese inflamasyonda eşlik etmekte ve hasarın şiddeti artmaktadır. Membrana yerleşmiş bir sitokin olan TNF- α vücudumuzda hem proinflamatuvar etkileri ile hem de ekstrinsik apoptotik etkisi ile bilinmektedir³³. Artmış olan TNF- α makrofajlar ve monositler ile birlikte inflamatuvar süreci başlatarak gelişen hasarın şiddetlenmesine yol açmaktadır. Aynı zamanda hücre yüzeyindeki TNF- α reseptör 1 (TNFR1) veya 2 (TNFR2)'ye bağlanarak apoptozisin başlamasına yol

açmaktadır^{34,35}. Yapılan nörotoksosite çalışmalarında paklitakselin proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α üretimini artırdığını göstermektedir³⁶⁻³⁸. Bu durum paklitakselin hem inflamasyona yol açtığı hem de nöron hücrelerinin apoptozisine yol açabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda da paklitaksel uygulaması kontrol grubuna göre anlamlı şekilde TNF- α ekspresyonunu indüklerken PPE uygulaması bu etkiyi önemli ölçüde düzeltmiştir. PPE'nin artmış olan TNF- α ekspresyonunu önlemesi antioksidan etkisinin yanında önemli anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda da PPE'nin antiinflamatuvar etkinliği desteklenmektedir^{39,40}. Bu yüzden PPE'nin pek çok faydalı etkiler ortaya koyduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda son olarak paklitakselin indüklediği nörotoksitede apoptozis mekanizmasının rolünü ortaya koyduk. Paklitaksel bilindiği üzere mikrotübülleri stabilize ederek hücrenin bölünmesini durdurur ve en sonunda hücre apoptozise uğrar⁴¹. Paklitakselin bu etkisi kanser hücrelerinde seçici olamadığı için sağlıklı hücrelerimizi de etkilemektedir. Paklitaksel apoptozisin hem intrinsik hemde ekstrinsik yollarını aktive ederek apoptozisi indüklemektedir. Ekstrinsik yolağı da özellikle TNF- α 'yı indükleyerek göstermektedir. Hücrelerde apoptozisin pek çok farklı belirteçleri bulunmaktadır. Bunlardan hem intrinsik hemde ekstrinsik mekanizmanın sorumlusu caspase proteinleridir⁴². Paklitakselin yapılan çalışmalarda nöronlarda caspase proteinlerini indükleyerek nöron hasarına yol açabileceği gösterilmiştir^{43,44}. Literatüre paralel bir şekilde çalışmamızda da paklitakselin kontrol grubuna göre hem caspase 3 hem de caspase 9 ekspresyonunu artırdığı ve bu yüzden hücre ölümüne yol açtığı da gösterilmiştir. PPE'nin tek başına uygulaması ilginç bir şekilde caspase 9 ekspresyonunu baskılamıştır. Ancak caspase 3 üzerinde bir etkisi olmamıştır. Paklitaksele bağlı artmış olan caspase 9 ve 3 ekspresyonunu ise PPE uygulaması anlamlı şekilde baskılayarak hücre canlılığını korumuştur. Bu durum PPE'nin sağlıklı hücreler üzerinde önemli anti-apoptotik etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Liu ve ark.⁴⁵ yaptığı çalışmada PPE, amikasin ile indüklenen ototoksitede caspase proteinlerini anlamlı şekilde baskılayarak anti-apoptotik etki göstermiş ve organ hasarını önlemiştir.

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak paklitakselin pek çok farklı mekanizma ile nörotoksositeye yol açtığı görülmektedir. PPE ise göstermiş olduğu güçlü antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkisi ile

paclitakselin neden olduğu nörotoksisteyi önlemiştir. Bu çalışmamız nar kabuğunun sağlık alanındaki fizyolojik önemini artırmış olup ileri klinik çalışmalar ile desteklenmesi sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

- Schwab CL, English DP, Roque DM, Santin AD. Taxanes: their impact on gynecologic malignancy. *Anticancer Drugs* 2014;25:522-5.
- Bachegowda LS, Makower DF, Sparano JA. Taxanes: impact on breast cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2014;25:512-1.
- Joshi M, Liu X, Belani CP. Taxanes, past, present, and future impact on non-small cell lung cancer. *Anticancer Drugs* 2014;25:571-3.
- Letourneau P, Ressler A. Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. *J. Cell Biol* 1984;98:1355-2.
- Scuteri A, Nicolini G, Miloso M, Bossi M, Cavaletti G, Windebank A, et al. Paclitaxel toxicity in post-mitotic dorsal root ganglion (DRG) cells. *Anticancer Res* 2006;26:1065-70.
- Yang I, Siddique R, Hosmane S, Thakor N, Höke A. Compartmentalized microfluidic culture platform to study mechanism of paclitaxel-induced axonal degeneration. *Exp Neurol* 2009;218:124-8.
- Cetin D, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Turkez H, Togar B. The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology* 2016;68:1361-7.
- Ramezani F, Samadi N, Mostafavi-Pour Z. Sequential therapy of breast cancer cell lines with vitamin C and quercetin improves the efficacy of chemotherapeutic drugs. *Nutr Cancer* 2017;69:881-91.
- Syed DN, Afaq F, Mukhtar H. Pomagranate derived products for cancer chemoprevention. *Semi. Cancer Biol* 2007;17:377-85.
- Borochoy NH, Judeinstein S, Tripler E, Harari M, Greenberg A, Shomer I, et al. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomagranate (*Punica granatum L.*)fruit. *J Food Compos Anal* 2009;22:189-95.
- Chandra R, Jadhav VT, Shrama J. Global scenario of pomagranate (*Punica granatum L.*)culture with special reference to India. *Fruit Veg Cereal Sci* 2010;4:17-8.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomagranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 2000;48:4581-9.
- Xu J, Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Pang W, et al. Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 2005;39:80-3.
- Singh B, Singh JP, Kaur A, Singh N. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomagranate (*Punica granatum L.*)peel: A review. *Food Chem* 2018;261:75-6.
- Bagheri M, Fazli M, Saeednia S, Kor A, Ahmadiankia N. Pomegranate peel extract inhibits expression of β -catenin, epithelial mesenchymal transition, and metastasis in triple negative breast cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018;64:86-91.
- Chen XX, Lam KK, Feng YB, Xu K, Sze SC, Tang SC, et al. Ellagitannins from Pomegranate Ameliorates 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Mucositis in Rats while Enhancing Its Chemotoxicity against HT-29 Colorectal Cancer Cells through Intrinsic Apoptosis Induction. *J Agric Food Chem* 2018;66:7054-64.
- Cadirci E, Halici Z, Yayla M, Toktay E, Bayir Y, Karakus E, et al. Blocking of urotensin receptors as new target for treatment of carrageenan induced inflammation in rats. *Peptides* 2016;82:35-43.
- Shemesh O, Spira M. Paclitaxel induces axonal microtubules polar reconfiguration and impaired organelle transport: implications for the pathogenesis of paclitaxel-induced polyneuropathy. *Acta Neuropathol* 2010;119:235-48.
- Malgrange B, Delree P, Rigo JM, Baron H, Moonen G. Image analysis of neuritic regeneration by adult rat dorsal root ganglion neurons in culture: quantification of the neurotoxicity of anticancer agents and of its prevention by nerve growth factor or basic fibroblast growth factor but not brain-derived neurotrophic factor or neurotrophin-3. *J Neurosci Methods* 1994;53:111-22.
- Wang M, Davis A, Culver D, Glass J. Wild mice are resistant to paclitaxel (taxol) neuropathy. *Ann Neurol* 2002;52:442-7.
- Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006;160:171-7.
- Van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods* 1994;174:31-20.
- Duggett NA, Griffiths LA, McKenna OE, de Santis V, Yongsanguanchai N, Mokori EB, Flatters SJ. Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy. *Neuroscience* 2016;333:13-26.
- Liu S, Zhang X, Sun M, Xu T, Wang A. FoxO3a plays a key role in the protective effects of pomegranate peel extract against amikacin-induced ototoxicity. *Int J Mol Med* 2017;40:175-81.
- Wang T, Men R, Hu M, Fan X, Yang X, Huang X, et al. Protective effects of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis in mice. *Biomed Pharmacother* 2018;100:213-20.
- Hara Y, Sakagami H, Shi H, Abe T, Tamura N, Takeshima H, et al. Partial Protection of Paclitaxel-induced Neurotoxicity by Antioxidants. *In Vivo* 2018;32:745-52.
- Kim HK, Zhang YP, Gwak YS, Abdi S. Phenyl N-tert-butyl nitron, a free radical scavenger, reduces mechanical allodynia in chemotherapy-induced neuropathic pain in rats. *Anesthesiology* 2010;112:432-9.

28. Doyle T, Chen Z, Muscoli C, Bryant L, Esposito E, Cuzzocrea S, et al. Targeting the overproduction of peroxynitrite for the prevention and reversal of paclitaxel-induced neuropathic pain. *J Neurosci* 2012;32:6149–60.
29. Motor S, Ozturk S, Ozcan O, Gurpınar AB, Can Y, Yüksel R, et al. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. *Int J Clin Exp Med* 2014;7:1089–93.
30. Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E. The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking Author links open overlay panel. *Clin Biochem* 2014;47:393–7.
31. Abundan M, Çelik M, Almaz V, Geter S, Selek S, Koca B, et al. Evaluation of S-100B and Oxidative Status before and after Treatment in Children with Bacterial Meningitis. *Klin Derg* 2012;25:67–70.
32. Meloni F. Tumor necrosis factor α . Biological aspects. *Gior Itali di Chemi* 1989;36:29–37 40.
33. MacEwan D J. TNF ligands and receptors - a matter of life and death. *Brit J Pharm* 2002;135 855–5.
34. MacEwan D J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Sig* 2002;14:477–92.
35. Bogdan C, Ding A. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages. *J Leuk Biol* 1992;52:119–21.
36. Wood SC, Tang X, Tesfamariam B. Paclitaxel potentiates inflammatory cytokine-induced prothrombotic molecules in endothelial cells. *J Card Pharma* 2010;55:276–85.
37. Wu Z, Wang S, Wu I, Mata M, Fink DJ. Activation of TLR-4 to produce tumor necrosis factor- α in neuropathic pain caused by paclitaxel. *Eur J Pain* 2015;19:889–98.
38. Zhu Y, Yao Z, Wu Z, Mei Y, Wu M. Role of tumor necrosis factor alpha-induced protein 1 in paclitaxel resistance. *Oncogene* 2014;33:3246–55.
39. Soojin P, Jin KS, Jun Yup K, Hwa-Jin S, YoungMi K, Yong CB. Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extract in THP-1 Cells Exposed to Particulate Matter PM10. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016;16:683–0.
40. Maressa CM, Joceleem MS, Milena T, Danilo M, Patricia B, Hudson SB, et al. Neuroprotective Effects of Pomegranate Peel Extract after Chronic Infusion with Amyloid- β Peptide in Mice. *PLoS One* 2016;9:11.
41. Jordan M, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:53–65.
42. Christian W, Spencer G, Gary LJ. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 1998;273:7141–7.
43. Hitoshi T, Daisuke K, Tsubasa O, Masatoshi T, Takashi K. Paclitaxel induces neurotoxicity through endoplasmic reticulum stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;437:151–5.
44. Giorgia M, Michela T, Francesca C, Angelo Q, Franco T, Giuseppe L. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol* 2008;214:276–84.
45. Shuangyue L, Xiao Z, Meiling S, Tao X, Aimei W. FoxO3a plays a key role in the protective effects of pomegranate peel extract against amikacin-induced ototoxicity. *Int J Mol Med* 2017;40:175–81.