

Original Article / Araştırma Makalesi

**RENAL HÜCRELERDE METOTREKSAT KAYNAKLI SİTOTOKSİSİTE:
KURKUMİN'İN KORUYUCU ROLÜ**

Methotrexate-Induced Cytotoxicity in Renal Cells: The Protective Role of Curcumin

Bilal ÇİĞ¹ 

¹Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kırşehir

Geliş Tarihi / Received: 26.04.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 08.05.2020

Yayın Tarihi / Published: 21.06.2020

ÖZ

Metotreksat (MET), akciğer, meme kanserleri ve lenfoma gibi çeşitli malignitelerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu neoplastik ajanın hepatorenal toksisite gibi çeşitli komplikasyonlara neden olması onun tedavide kullanımını sınırlamaktadır. Antiinflatuar etkileri çok iyi bilinen kurkumin (KUR)'in hepatorenal toksisite üzerindeki koruyucu etkileri literatürde ifade edilmiştir. Bu çalışmada metotreksat ile indüklenen oksidatif stres, proinflatuar yanıtın kurkumin ile baskılanabileceğini varsaydık. Bu çalışma, metotreksat kaynaklı sitotoksiste ve oksidatif strese karşı kurkuminin koruyucu rolünü araştırmak için planlandı. Bu çalışmada metotreksat kaynaklı renal toksisite ve sonrasında gelişen moleküler olayları in-vitro araştırmak üzere fare böbrek kortikal toplama kanal hücreleri (mpkCCDc14) kullanıldı. Gruplar, Kontrol, KUR (10 µM ve 24 saat), MET (5 µM ve 24 saat) ve MET+KUR olarak dizayn edildi. Metotreksat kaynaklı oksidatif stres, mpkCCDc14 hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonu (MMD), sitozolik reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, apoptoz ve kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyon düzeyleri belirlenerek değerlendirildi. MET, oksidatif stresin hücre içinde artmasına neden olmasına rağmen, bu kurkumin tarafından azaltılmıştır. Kurkumin tedavisi, mitokondriyal disfonksiyonu düzenleyerek hücrelerde ROS oluşumunu bastırdı. Metotreksata maruz kalan hücrelerde apoptoz, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktiviteleri artmıştır. Bununla birlikte bu durum, kurkumin tedavisi ile modüle edildi. Sonuç olarak, metotreksat ile indüklenen oksidatif stres hücre hasarına ve proenflatuar yanıtı yol açarak kronik böbrek hastalığının ilerlemesinde mpkCCDc14 hücrelerinin rolünü güçlendirir. Kurkumin antioksidan, antienflatuar ve anti-apoptotik etki ederek metotreksat kaynaklı sitozolik toksisiteye karşı yardımcı bir tedavi olabilir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, Kurkumin, Metotreksat, Oksidatif stress, Sitotoksiste

ABSTRACT

Methotrexate (MET) is used in the treatment of various malignancies such as lung, breast cancers and lymphoma. The fact that it causes various complications such as hepatorenal toxicity limits its usage in treatment. The hepatorenal toxicity protective effects of Curcumin (CUR), whose anti-inflammatory effects are well known, have been expressed in the literature. In this study, we assumed that methotrexate-induced oxidative stress and proinflammatory response can be suppressed with curcumin treatment. This study was planned to investigate the protective role of curcumin against methotrexate-induced cytotoxicity and oxidative stress. In this study, mouse kidney cortical collection duct cells (mpkCCDc14) were used to investigate methotrexate-induced renal toxicity and subsequent molecular events in-vitro. The groups were designed as Control, CUR (10 µM and 24 hours), MET (5 µM and 24 hours) and MET+CUR. MET-induced oxidative stress was evaluated by determining mitochondrial membrane depolarization (MMD), cytosolic reactive oxygen species (ROS) production, apoptosis and caspase-3, caspase-9 activation levels in mpkCCDc14 cells. Although MET caused intracellular oxidative stress increase, this has been reduced by curcumin. Curcumin therapy regulated mitochondrial dysfunction and suppressed ROS formation in cells. Apoptosis, caspase-3 and caspase-9 activities have been increased in MET exposed cells. However, this condition was modulated by CUR therapy. As the result, MET-induced oxidative stress strengthens the role of mpkCCDc14 cells in the progression of chronic kidney disease, by leading to cell damage and creating a proinflammatory response. Curcumin can be an adjunctive therapy against methotrexate-induced cytosolic toxicity by antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects.

Keywords: Apoptosis, Curcumin, Cytotoxicity, Methotrexate, Oxidative stress

Bilal ÇİĞ✉, bilalcig@gmail.com
Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kırşehir

Bu makaleye atıf yapmak için(How to cite this article): Çiğ, B. (2020). Renal Hücrelerde Metotreksat Kaynaklı Sitotoksiste: Kurkumin'in Koruyucu Rolü. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi, 8(2), 281-292. doi: 10.33715/inonusaglik.727031

GİRİŞ

Metotreksat çeşitli malignitelerin tedavisinde etkili bir ilaçtır. Ancak bu ilacın neden olduğu toksisite önemli bir sorun olmaya devam etmektedir (Adamson ve Widemann, 2006). MET kaynaklı sitotoksosite sadece tümör hücrelerini değil, aynı zamanda karaciğer ve böbrekler gibi diğer hayati organları da etkiler (Al-Atrash, Atteya, Jeweely ve Tousson, 2014). Nefrotoksosite, MET'in en önemli yan etkilerinden biridir. MET'in neden olduğu böbrek toksisitesinin en sık görülen şekli akut böbrek yetmezliği, MET'in böbreklerde çökmesi ve oluşan asidik idrar metabolitleri ile karakterizedir (Asvadi, Hajipour, Khodadadi ve Roshangar, 2011). MET'in sitozolik toksisitesi, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir (Abdalla, Alhaider, El-Sheikh, Hamouda ve Morsy, 2015). MET kaynaklı bu toksisiteyi azaltabilecek ve aynı zamanda MET'in etkinliğini de azaltmayacak başka bir ilaçla birleşik bir tedavi protokolünün uygulanması zaruridir. MET aracılı böbrek toksisitesinin diğer mekanizmaları, MET'in doğrudan toksik etkisi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) gelişmesidir (Asvadi vd., 2011; Babiak, Campello, Carnieri ve Oliveira, 1998). Artan ROS, iyi bilinen 'oksidatif stres' terimi ile tanımlanan oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulduğu durumu ifade eder. Oksidatif stresin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunun bu ilaçların toksik etkilerinden sorumlu olduğuna dair kanıtlar vardır (Adamson ve Widemann, 2006; Carmo-Fonseca ve Jordan, 2000). Bu kemoterapötiklerin daha etkin bir tedavi sunması ve daha az toksisite oluşturması için doğal antioksidanlarla birlikte kullanımı tavsiye edilmektedir (Choudhury, Ghosh ve Palo, 2000).

Diyet antioksidanları, antikanser ilaçların kullanımına bağlı gelişen yan etkileri azaltarak veya önleyerek kemoterapinin antikanser etkilerini artırabilir (Antunes, Bianchi, Francescato ve Mora, 2002). Son zamanlarda, antikanser ilaçların toksik yan etkilerini iyileştirmek için polifenollerin antikanserojenik ve antimutagenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalar dikkat çekmektedir (Almeida, Antunes, Bianchi, Mercadante ve Serpeloni, 2013; Chinnapun, Palipoch, Punsawad ve Suwannalert, 2014). Bu polifenoller arasında, zerdeçalın major bileşeni Curcuma longa rizomlarından elde edilen sarı bir pigment olan kurkumin; immünomodülatör, antioksidan, antimutagenik ve antikarsinojenik özellikleriyle öne çıkmaktadır (Kaskey, Kawamori, Kelloff, Lubet ve Steele, 1999; Murray ve Pizzorno, 1999). Kurkumin'in reaktif oksijen türlerini temizlediği, lipit peroksidasyonu engellediği ve DNA dahil hücrel makromolekülleri oksidatif hasardan koruduğu bildirilmiştir (Becatti, Cecchi, Fiorillo, Lanzilao ve Pensafini, 2008). Faz I klinik çalışmalar kurkuminin

yüksek dozlarda bile (12 g/gün) güvenli olduğunu göstermiştir (Aggarwal, Anand, Kunnumakkara ve Newman, 2007). Ayrıca, in-vivo çalışmalar, kurkuminin çeşitli antikanser ilaçların genotoksitesini ve oksidatif stresin inhibe ettiğini göstermiştir (Chopra, Kaur, Tirkey, ve Vij, 2005; Cui, Huang, Wang, Xu ve Yang, 2011).

Özetle bu çalışma, kurkuminin memeli böbrek toplayıcı kanal hücrelerinde MET kaynaklı sitotoksosite ve oksidatif stres üzerindeki olası koruyucu etkilerini araştırmak için yapılmıştır. KUR tedavisinin MET'in sitotoksik etkileri üzerindeki etkisini değerlendirmek ve test edilen antikanser ilacın neden olduğu toksiteye karşı koruyucu rolünü ele almak için bazı moleküler parametreler araştırıldı. Bu parametreler, böbrek hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonu (MMD), sitozolik ROS üretimi, apoptoz ve kaspaz -3, -9 aktivite değişiklikleridir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

%90 Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen, İstanbul, Türkiye), %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco, İstanbul, Türkiye) içeren medium hücreleri büyütme için kullanıldı. Hücreler, 37° C'de ve % 5 CO₂'de nemli bir ortamda tutuldu. Hücrelerin sayılması için Casy Modell TT model otomatik hücre sayacı (Roche, Almanya) kullanıldı.

Gruplar

MPKCCD_{c14} hücreleri esas olarak aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı;

Kontrol grubu: Hücreler, KUR ve MET uygulaması yapılmadan 48 saat boyunca hücre kültürü ortamı ve koşulları altında tutuldu.

KUR grubu: Hücre kültür ortamında 24 saat tutulduktan sonra, bu gruptaki hücreler önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi 24 saat boyunca KUR (10 µM) ile inkübe edildi (Mandil, Parakash, Rahal, Singh ve Sharma, 2020).

MET grubu: Hücre kültür ortamında 24 saat tutulduktan sonra, bu gruptaki hücreler önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi 24 saat boyunca MET (5 µM) ile inkübe edildi (Dorota, Magdalena, Mariola, Monika ve Iwona, 2020).

MET+KUR grubu: 24 saat MET (5 µM) ile inkübasyondan sonra, bu gruptaki hücreler 24 saatlik bir süre boyunca KUR (10 µM) ile inkübe edildi.

KUR ve MET, Sigma-Aldrich Inc'den (İstanbul, Türkiye) satın alınmıştır. KUR ve

MET' in stok çözeltileri DMSO (% 1) içinde çözöldükten sonra serum fizyolojik içinde hazırlanarak kullanıldı.

Hücre Canlılığı (MTT)

Hücre canlılık deneyleri, önceki çalışmalarda anlatıldığı gibi MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich, İstanbul, Turkey) ile mitokondriyal redöktaz aktivitesinin ölçölmesiyle gerçekleştirildi (Cocomazzi, Farruggio, Marotta, Romitao ve Surico, 2020). Mikroplaka okuyucusundaki (Infinite pro200; Tecan Inc, Groedig, Avusturya) absorbans 550 nm'de okundu. Veriler kontrolün yüzdesi olarak sunuldu.

Kaspaz 3 - 9 Aktiviteleri ve Apoptoz Düzeyleri

Apoptoz seviyesini saptamak için Cell-APOPercentage apoptoz testi ticari kitini (Biocolor Ltd., Kuzey İrlanda) kullandık ve analizler bir spektrofotometrede (UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japonya) gerçekleştirildi. Kaspaz-3 ve -9 aktivitesini belirlemek için dört gruptaki hücreler, daha önce tarif edildiği gibi 37° C'de 1 saat boyunca 2 ml substrat çözeltisi ile inkübe edildi (Liu, Song, Yan, Yang ve Yao, 2020). Kaspaz-3 ve -9 aktivitelerinin tayini için, florojenik substratların ayrılmasında kaspaz-3 için AC-DEVD-AMC ve kaspaz-9 için ACDEVD-AMC kullanıldı (Bachem, Bubendorf, İsviçre). Substrat ayrılmaları, 360 nm eksitasyon dalga boyu ve 460 nm'de emisyon ile otomatik mikroplaka okuyucu (Infinite pro200) ile ölçölmüştür. Veriler kontrolün yüzdesi olarak sunuldu.

Mitokondriyal Membran Depolarizasyon Düzeyleri

5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Moleküler Problar, Eugene, OR, ABD) $\Delta\Psi_m$ seviyesine göre mitokondride birikir ve monomer veya geri dönüşömlü J-kümelenme olarak bulunur (Funke, Keil, Müller, Schild ve Zeug, 2011). $\Delta\Psi_m$ formasyon analizlerinin detayları önceki çalışmalarda verilmiştir (Bakowska ve Joshi, 2011; Farruggio vd., 2020). Kısaca, mikroplaka okuyucu analizlerindeki hücreler (1×10^6), 5 μ M JC-1 ile 37° C'de 30 dakika süreyle inkübe edildi. Mikroplaka (Infinite Pro200) MMD analizlerinde, yeşil (eksitasyon; 485 nm ve emilsiyon; 535 nm) ve kırmızı (eksitasyon; 540 nm ve emilsiyon; 590 nm) JC-1 sinyalleri, önceki çalışmalarımızda tarif edildiği gibi hücre hattında ölçöldü (Farruggio vd., 2020). Veriler, kontrolün yüzdesi olarak sunuldu.

Hücre İçi Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Üretim Düzeyleri

2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (DCFH-DA) oksidasyona duyarlı bir boyadır.

Floresan olmayan bir bileşiktir, ancak hücrelere alındığında hücre sitozolünde floresan forma dönüştürülür (Keil vd., 2011). ROS oluşumu, daha önce tarif edilen miktoplaka okuyucu (Infinite pro200) kullanılarak izlendi (Fu, Huang, Li, Liu ve Zhang, 2020). Kısaca hücreler (1×10^6), $10 \mu\text{M}$ DCFH-DA ile 37°C 'de 30 dakika inkübe edildi. Spesifik olmayan hücresel esteraz ile DCFH-DA'nın DCF'ye hidrolizinden ve bunun ardından peroksitlerle oksidasyonundan kaynaklanan floresan artışı, miktoplaka okuyucu (Infinite pro200) tarafından 488 nm'de (eksitasyon), 525 nm'de (emisyon) ölçüldü.

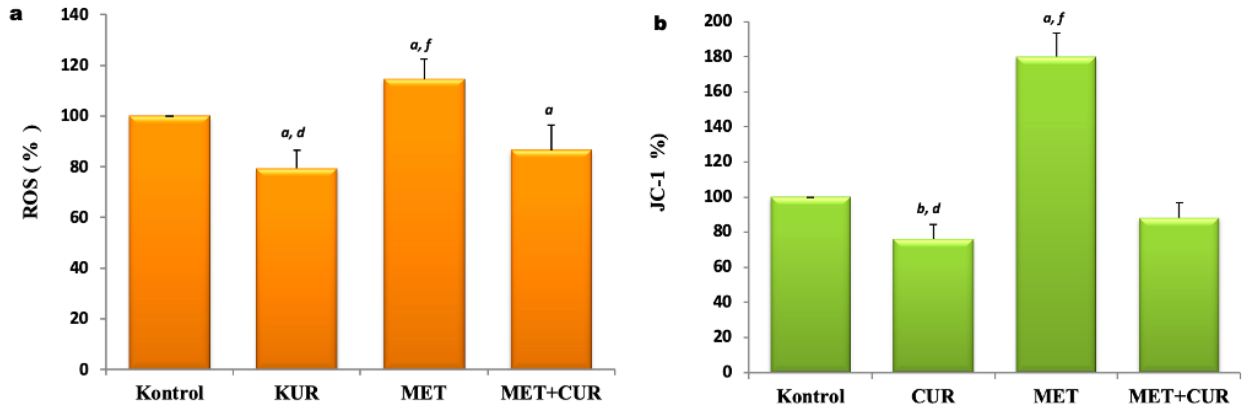
İstatistiksel Analiz

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

BULGULAR VE TARTIŞMA

Kurkumin, mpkCCD_{c14} hücrelerinde Metotreksat ile indüklenen mitokondriyal membran depolarizasyonu (MMD) ve sitozolik ROS üretimini düzenledi.

Mitokondride elektron taşıma sistemindeki sitokrom C normal kullarda çift membran arasında bulunur. İntrinsik apoptotik yolların tetiklenmesine neden olacak sitotoksitelerde mitokondri membran bütünlüğünün korunmasına yardımcı olan BCL2, BCLX proteinlerinin aktivasyonları engellenerek membranda BAX proteinleri aracılı kanallar açılarak bu sitokrom C'nin sitozole akması sağlanır. Neticede bu durum mitokondriyal membran depolarizasyonuna ve bu da sitozolde aşırı ROS birikimine neden olur (Bakowska ve Joshi, 2011). Bu durum apoptotik sinyallerin tetiklenmesine yol açar. Bu nedenle mitokondriyal membran depolarizasyonu, mitokondriyal fonksiyonun önemli bir parametresi ve hücrelerde ROS oluşumunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Burada MET kaynaklı toksite mitokondriyal depolarizasyon markeri olan JC-1 miktarlarının artışına (Şekil.1b) ve membran depolarizasyonu sonrası sitozolde artan reaktif oksijen türleri markeri olan DCFH-DA (Şekil.1a) seviyelerinin yüksek bulunmasına neden olmuştur. Kurkumin muamelesi bu durumları tersine çevirmiştir. Hücrelerdeki JC-1 ve DCFH-DA seviyeleri MET grubunda Kontrol ve KUR gruplarına göre daha yüksekti ($p \leq 0.001$). Ancak, JC-1 ve DCFH-DA seviyeleri MET+KUR grubunda MET grubuna göre daha düşüktü ($p \leq 0.001$).

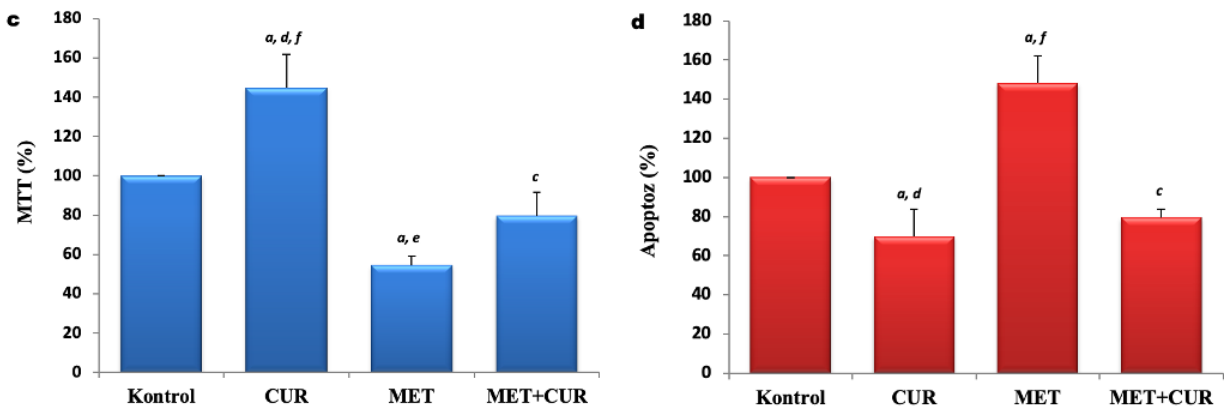


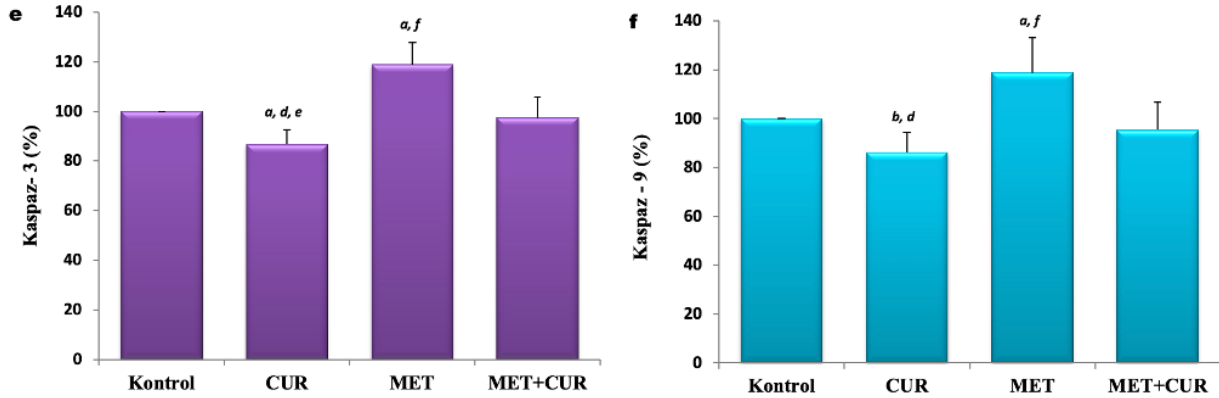
Şekil 1. Metotreksat uygulanan mpkCCD_{c14} hücrelerinde mitokondriyal membran depolarizasyonu ve sitozolik ROS değerlerine kurkumin'in etkisi (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu ve n=6).

MpkCCD_{c14} hücrelerinin tüm grupları, hücre kültürü koşullarında JC-1 ve DCFH-DA boyaları ile ayrı ayrı inkübe edildi. Daha sonra mikropilaka okuyucuda analiz edildi (Infinite pro200). JC-1 ve DCFH-DA değerleri kontrolün % si olarak ifade edildi. (^ap $\leq$ 0.001, ^bp $\leq$ 0.005, ^cp $\leq$ 0.01 Kontrol grubu ile karşılaştırma. ^dp $\leq$ 0.001 vs. MET grubu ile karşılaştırma. ^ep $\leq$ 0.005, ^fp $\leq$ 0.001 vs. MET+KUR grubu ile karşılaştırma). Gruplar arasındaki ilişkiler tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

Kurkumin mpkCCD_{c14} hücrelerinde MET kaynaklı apoptoz, kaspaz -3 ve -9 değerlerini düzenleyerek hücre canlılığına katkı sağladı

Aşırı sitozolik ROS üretimine ek olarak, mitokondriyal membran potansiyel kaybı, kaspaz-3, -9 aktivasyonlarının artmasıyla hücreyi apoptoza sürükler (Keil vd., 2011; Ureshino vd., 2019). Bu nedenle mitokondriyal membran depolarizasyonu, mitokondriyal fonksiyonlarının önemli bir göstergesi ve hücrelerde kaspaz aktivitelerinin ve apoptozun bir belirteci olarak kullanılmıştır. MTT (Şekil.2c), apoptoz (Şekil.2d), kaspaz -3 (Şekil.2e) ve kaspaz -9 (Şekil.2f) değerlerinin mikropilaka okuyucu analizlerinin sonuçları Şekil.2'de gösterilmektedir. Hücrelerdeki apoptoz seviyesi, kaspaz -3 ve kaspaz -9 aktiviteleri MET grubunda kontrol ve KUR gruplarına göre daha yüksekti, ancak MTT seviyesi MET grubunda kontrol ve KUR gruplarına göre daha düşüktü (p $\leq$ 0.001). Bununla birlikte, apoptoz seviyesi, kaspaz -3 ve kaspaz -9 aktiviteleri MET+KUR grubunda MET grubuna göre daha düşüktü (p $\leq$ 0.001), ancak MET+KUR grubunda MTT seviyesi KUR tedavisi ile artırıldı (p $\leq$ 0.005).





Şekil 2. Metotreksat uygulanan MPKCCD₁₄ hücrelerinde MTT, apoptos düzeyleri ve kaspaz -3, -9 aktiviteleri üzerine kurkuminin etkisi (Değerler ortalama ± SD olarak sunuldu ve n=6).

mpkCCD₁₄ hücrelerinin tüm grupları, hücre kültürü koşullarında MTT, Cell-APOPercentage apoptosis kit, kaspaz -3 (AC-DEVD-AMC) ve kaspaz -9 (ACDEVD-AMC) substratları ile ayrı ayrı inkübe edildi. Daha sonra mikrolaka okuyucuda analiz edildi (Infinite pro200). Tüm grupların değerleri kontrolün % si olarak ifade edildi. (^ap ≤ 0.001, ^bp ≤ 0.005, ^cp ≤ 0.01 kontrol grubu ile karşılaştırma. ^dp ≤ 0.001 vs. MET grubu ile karşılaştırma. ^ep ≤ 0.005, ^fp ≤ 0.001 vs. MET+KUR grubu ile karşılaştırma). Gruplar arasındaki ilişkiler tek yönlü ANOVA ile değerlendirilmiştir.

TARTIŞMA

Kemoterapide kullanılan antineoplastik kanser ilaçlarından birçoğunun doz sınırlayıcı toksik etkilere yol açtığı, tedavinin yarıda kesilmesine varan aksaklıklara neden olduğu belirtilmiştir (Antunes, Bianchi, Francescato ve Mora, 2003; Weijl vd., 2004). Ayrıca, birçok antikanser ilaçlarla yapılan çalışmalarda mutajenik, teratojenik etkiler ortaya çıkmıştır (Atessahin, Ceribasi, Karahan, Karaoglu ve Yilmaz, 2005). Kanserle mücadelede birincil hedef sağlıklı hücreleri kanserleşmeden korumakla birlikte, kemoterapi sırasında oluşabilecek uzun süreli hasarı önlemektir. Bugüne kadar yapılan çeşitli çalışmalar, doğal diyet antioksidanlarının kemoterapiye yanıtı ve antikanser ilaçlara bağlı gelişen yan etkilerin ve kromozomal hasarların gelişimini azaltabileceğini ve hatta anti-tümör etkilerini artırabileceğini ifade etmektedir (Fan, Jiang, Tian, Zhang, 2012; Mora vd., 2002; Norris, Premalatha ve Sriganth, 1999). Nefrotoksosite, MET'in en önemli yan etkilerinden biridir. MET'in neden olduğu böbrek toksisitesinin en sık görülen şekli akut böbrek yetmezliği ve MET'in böbreklerde çökmesidir. MET'in neden olduğu böbrek patofizyolojisinde asidik idrarda metabolitleri genel olarak belirlenir (Asvadi vd., 2011). MET kaynaklı sitotoksosite oksidatif stres, inflamasyon ve apoptoz gibi çeşitli faktörlerden

kaynaklanabilir (El-Sheikh vd., 2015). Raporlarla uyumlu olarak, MET kaynaklı mitokondriyal oksidatif stres ile mpkCCD_{c14} hücrelerinde aşırı ROS üretimi gözlemledik.

Metotreksat kaynaklı gelişen toksisiteye karşı etkili tedavi bulunmamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, anti-kanser etkilerine ek olarak sitotoksosite üzerine koruyucu etkilerinden dolayı kurkumin, potansiyel antioksidan veya anti-apoptotik özelliklerinden dolayı dikkat çekmiştir (Noshay, Said ve Said Salem, 2017). Bu çalışmada, kurkumin'in hücre içi homeostazın yeniden sağlanmasında, mitokondriyal oksidatif stresin önemli ölçüde ortadan kaldırılmasında, hücre canlılığı ve apoptoz yollarının modüle edilmesi ve MET kaynaklı zararlı etkilerin detoksifikasyonunda önemli katkılar sağladığını gözlemledik. Sonuçlarımıza dayanarak, metotreksatın klinikte kullanımına bağlı gelişen mitokondriyal oksidatif stress sonrası gelişebilecek renal disfonksiyonlarda kurkumin'in fayda sağlayabileceğini, artan sitozolik reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırabileceğini tahmin ediyoruz. Kurkumin, anti-enflamatuar, antikarsinojenik ve antioksidan etkilere sahip olduğu bildirilen bir diyet polifenolüdür (Menon ve Sudheer, 2007). Literatürde antioksidan etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada kurkumin'in bazı antikanser ilaçların yan etkilerini hafiflettiği bildirilmiştir (Biswas, Jimenez, McClure, Megson ve Rahman, 2005; Corona-Rivera vd., 2007).

Çalışmamızda, mpkCCD_{c14} hücrelerinde MET kaynaklı toksisiteyi in-vitro çalışabilmek için uygun bir doz olarak 5 µM metotreksat, 24 saat süreyle uygulanmıştır (Iwona vd., 2020). Çalışma sonuçlarımız, MET'in mpkCCD_{c14} böbrek hücrelerinde apoptoz ve ROS'u indüklediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, MET kaynaklı sitotoksik ve oksidatif stres gibi zarar verici etkilerini bildiren daha önceki çalışmalarla uyumludur (Said Salem vd., 2017; Serpeloni vd., 2013). Ayrıca burada MET kaynaklı artan ROS, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptoz düzeylerini KUR uygulanması baskılamıştır. Mitokondri hücresel enerji homeostazının devam ettirilmesinde etkin rol oynarken aynı zamanda oksidatif stres ve apoptotik yolların tetiklenmesinde çok önemli katkılar sağlar (Keil vd., 2011).

Kurkumin'in mitokondriyal biyogenezi modüle ettiği bildirilmiştir (Said Salem vd., 2017). KUR ile muamele sonrasında apoptoz, kaspaz-3, kaspaz-9, PARP-1, MMP ve hücre içi ROS azalırken, tedavilerle hücre canlılığı ve antioksidan seviyelerinin arttığı ifade edilmiştir (Mandil vd., 2020). Burada ilk kez böbrek toplayıcı kanal hücrelerinin MET kaynaklı apoptoz, kaspaz-3, kaspaz-9, MMD ve hücre içi ROS artışının kurkumin muamelesi ile zayıflatıldığını gösterdik. Bu veriler KUR'in mitokondriyal homeostazi modüle ederek hücresel fonksiyonu koruyabildiğini göstermektedir. 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 mekanizma kombinasyonu ile uygulanabilirler. Kemoprotektif bir ajan olarak KUR'in koruyucu etkisinin altında yatan kesin mekanizma hala tam olarak araştırılmamış olsa da, bu bileşiğin antioksidan aktivitesinin öne çıkması muhtemeldir (Surh ve Chun, 2007).

Sonuçlarımız KUR ile muamelenin, MET kaynaklı apoptoz ve mitokondriyal membran depolarizasyonunu önemli ölçüde azalttığı gibi kaspaz-3, -9 seviyelerinde de önemli ölçüde azalmaya neden olduğunu gösterdi. Sonuçlarımızla tutarlı olarak (Adaikala, Balasubramanayam, Finny Monickarac, Sampath ve Uma Maheswari, 2003), kurkuminin hücrel ROS oluşumunun inhibisyonunda önemli rolü olduğu bildirilmiştir. Ayrıca (Fiorillo vd., 2008), KUR'in ROS'u temizlediğini ve farklı hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu inhibe ettiğini, DNA dahil hücrel makromoleküllerin oksidatif hasardan korunmasında çok önemli katkılar sağladığı bildirilmiştir. KUR'in serbest radikal süpürücü olarak etkinliğinin yapısal özelliklerine doğrudan atfedilebileceği düşünülmektedir. Kurkumin benzen halkaları ve 1,3-diketon sistemi üzerindeki fenolik ve metoksi gruplarının, etkili oksijensiz radikal süpürme için önemli yapılar olduğu düşünülmektedir (Rao ve Sreejayan, 1996).

Bu çalışmada, mitokondriyal ROS üretiminin de mpkCCD_{c14} hücrelerinde MET'in zararlı etkisine dâhil olduğunu gösterdik. Ayrıca, hücre zarlarına entegre olan kurkumin'in, hücre içi kaspaz aktivasyonları ve ROS üretimi gibi MET ile uyarılmış sitotoksik etkileri etkili bir şekilde azalttığını gösterdik. Bildiğimiz kadarıyla, kortikal toplama kanalı hücre fonksiyonu üzerine kurkumin etkileri bildirilmemiştir. Bununla birlikte, kurkumin'in biyolojik etkileri birkaç hücre hattında araştırılmıştır. Örneğin, sıçan böbrek tübüllerinin apoptoz seviyesi ve kaspaz aktivitesi, nitrik oksit sentazın inhibisyonu yoluyla kurkumin tedavisi ile inhibe edilmiştir (Giaisi, Kliem, Köhler, Krammer ve Merling, 2012). SH-SY5Y nöroblastom hücrelerinde oksidatif strese bağlı GSH konsantrasyonu ve GPx aktivitesinde azalma kurkumin tedavisi ile azaldığı bildirilmiştir (Li, Liu, Ren, Wang ve Zhang, 2017). Böbrek toplama kanal hücrelerinde albumin kaynaklı apoptoz ve mitokondriyal oxidative stress ve kaspaz düzeylerindeki artışın KUR'in antioksidan özelliği ile azaldığı bildirilmiştir (Mandil vd., 2020).

Literatür sonuçları ile uyumlu olarak, mpkCCD_{c14} hücrelerinde kaspaz -3 ve -9 aktivasyonlarının inhibisyonu yoluyla KUR'in apoptoz ve inflamasyon üzerindeki modülatör rolünü gözlemledik. Mevcut bulgulara göre metotreksat ile tedavi sırasında gelişen böbrek

toksitesini azaltmak için KUR'in koruyucu terapötik bir ajan olarak etki ettiği görülmektedir. Özetle sonuçlar, kurkumin ile tedavinin, böbrek toplama kanal hücrelerinde MET kaynaklı oksidatif stresi ve hücre ölümünü azalttığını göstermektedir. Tüm bu bulgular kurkuminin MET kaynaklı hepatorenal toksiteye karşı koruyucu bir etkisi olabileceğini ve antikanser tedavisine iyi bir yardımcı bileşik olabileceğini düşündürmektedir. MET için, KUR'in antitümör aktivitesi üzerindeki etkisini aydınlatmak için ileri çalışmalar öneriyoruz.

KAYNAKLAR

- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.*, 4(6), 807-818.
- Asvadi, I., Hajipour, B., Asvadi, A., Asl, N. A., Roshangar, L., Khodadadi, A. (2011). Protective effect of pentoxifylline in renaltotoxicity after methotrexate administration. *European Reviewfor Medical and Pharmacological Sciences*, 15, 1003–1009.
- Atessahin, A., Yilmaz, S., Karahan, I., Ceribasi, A. O., Karaoglu, A. (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 212 (2), 116-123.
- Babiak, R. M., Campello, A. P., Carnieri, E. G., Oliveira, M. B. (1998). Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *CellBiochemistry and Function*, 16, 283–293.
- Balasubramanayam, M., Adaikala Koteswari, A., Sampath Kumar, R., Finny Monickaraj, S., Uma Maheswari, J., Mohan, V. (2003). Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. *J. Biosci.*, 28 (6), 715-721.
- Biswas, S. K., McClure, D., Jimenez, L. A., Megson, I. L., Rahman, I. (2005). Curcumin induces glutathione biosynthesis and inhibits NF-kB activation and interleukin-8 release in alveolar epithelial cells: mechanism of free radical scavenging activity. *Antioxidants redox Signal.*, 7 (1-2), 32-41.
- Choudhury, R. C., Ghosh, S. K., Palo, A. K. (2000). Cytogenetic toxicity of methotrexate in mouse bone marrow. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 8(3), 191-196.
- Corona-Rivera, A., Urbina-Cano, P., Bobadilla-Morales, L., Vargas-Lares Jde, J., Ramirez-Herrera, M. A., Mendoza-Magaua, M. L., . . . Corona-Rivera, J. R. (2007). Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assay. *JAppl Genet.*, 48(4), 389-96.
- El-Sheikh, A. A., Morsy, M. A., Abdalla, A. M., Hamouda, A. H., Alhaider, I. A. (2015). Mechanisms of thymoquinone hepatorenal protection in methotrexateinduced toxicity in rats. *Mediators Inflamm.*, 1–12.
- Farruggio, S., Cocomazzi, G., Marotta, P., Romito, R., Surico, D., Grossini, E. (2020). Genistein and 17β-Estradiol Protect Hepatocytes from Fatty Degeneration by Mechanisms Involving Mitochondria. Inflammasome and Kinases Activation, *Cell Physiol Biochem*, 54(3), 401-416.
- Fiorillo, C., Becatti, M., Pensafini, A., Cecchi, C., Lanzilao, L., Donzelli, G., . . . Nassi, P. (2008). Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF-kB, and JNK pathways. *Free Radic. Biol. Med.*, 45, 839.
- Huang, B., Liu, J., Fu, S., Zhang, Y., Li, Y., He, D., . . . X, Liu. (2020). D. α-Cyperone Attenuates H(2)O(2)-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SH-SY5Y Cells via Activation of Nrf2, *Front Pharmacol*, 8(11), 281.
- Huang, C. F., Cui, X. Q., Yang, C. F., Wang, X. B., Xu, H., Sha, Y. Y., Niu, J. Z. (2011). Effects of curcumin on micronuclei formation and chromosome aberration induced by cyclophosphamide in mice. *J. Traditional Chin. Med. Pharm*, 6, 42.

-
- Jordan, P., Carmo-Fonseca, M. (200). *Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 57, 1229-1235.
- Joshi, D. C., Bakowska, J. C. (2011). *Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons*. *J Vis Exp.*, 51, 2704.
- Iwona, P. C., Monika, G. G., Dorota, N. C., Mariola, H., Marcin, S., Magdalena, I., . . . Jarosław, D. (2020). *Pioglitazone as a modulator of the chemoresistance of renal cell adenocarcinoma to methotrexate*. *Oncology Reports*, 43(3), 1019-1030.
- Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Kaskey, R. B., Rao, C. V., Reddy, B. S. (1999). *Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer*. *Cancer Res.*, 59(3), 597-601.
- Keil, V. C., Funke, F., Zeug, A., Schild, D., Müller, M. (2011). *Ratiometric high-resolution imaging of JC-1 fluorescence reveals the subcellular heterogeneity of astrocytic mitochondria*. *Pflugers Arch.*, 462, 693-708.
- Kliem, C., Merling, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P. H., Li-Weber, M. (2012). *Curcumin suppresses T cell activation by blocking Ca^{2+} mobilization and nuclear factor of activated T cells (NFAT) activation*, *J Biol Chem.*, 287(13), 10200–10209.
- Liu, F., Ni, W., Zhang, J., Wang, G., Li, F., Ren, W. (2017). *Administration of curcumin protects kidney tubules against renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) by modulating nitric oxide (NO) signaling pathway*. *Cell Physiol Biochem*, 44(1), 401–411.
- Menon, V. P., Sudheer, A. R. (2007). *Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin*. In: *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Springer, 105-125.
- Mandil, R., Prakash, A., Rahal, A., Singh, S. P, Sharma, D., Kumar, R., Garg, S. K. (2020). *In vitro and in vivo effects of flubendiamide and copper on cyto-genotoxicity, oxidative stress and spleen histology of rats and its modulation by resveratrol, catechin, curcumin and α -tocopherol*. *BMC Pharmacol Toxicol*, 21(1), 29.
- Mora, L. D. O., Antunes, L. M. G., Francescato, H. D. C., Bianchi, M. D. L. P. (2002). *The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells*. *Mutat. Res.*, 518(1), 65-70.
- Mora, L. D. O., Antunes, L. M. G., Francescato, H. D. C., Bianchi, M. D. L. P. (2003). *The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. *Pharmacol. Res.*, 47(6), 517-522.
- Murray, M. T., Pizzorno, J. E. (1999). *Curcuma longa (turmeric)*. In: *Textbook of Natural Medicine*. Churchill Livingstone Inc., 689.
- Norris, I., Sriganth, P., Premalatha, B. (1999). *Dietary curcumin with cisplatin administration modulates tumour marker indices in experimental fibrosarcoma*. *Pharmacol Res.*, 39(3), 175-179.
- Palipoch, S., Punsawad, C., Chinnapun, D., Suwannalert, P. (2014). *Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by curcumin and α -tocopherol*. *Trop. J. Pharm. Res.*, 12(6), 973-979.
- Said Salem, N. I., Noshay, M. M., Said, A. A. (2017). *Modulatory effect of curcumin against enotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice*. *Food Chem Toxicol*, 105, 370-376.
- Serpeloni, J. M., Almeida, M. R., Mercadante, A. Z., Bianchi, M. L. P., Antunes, L. M. G. (2013). *Effects of lutein and chlorophyll b on GSH depletion and DNA damage induced by cisplatin in vivo*. *Hum. Exp. Toxicol.*, 32 (8), 828-836.
- Sreejayan, N., Rao, M. N. (1996). *Free radical scavenging activity of curcuminoids*. *Arzneim.*, 46(2), 169-171.

-
- Surh, Y. J., Chun, K. S. (2007). *Cancer chemopreventive effects of curcumin*. In: *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*. Springer, 149-172.
- Tian, F., Fan, T., Zhang, Y., Jiang, Y., Zhang, X. (2012). *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*, 44(10), 847-855.
- Tirkey, N., Kaur, G., Vij, G., Chopra, K. (2005). *Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys*. *BMC Pharmacol*, 5(1), 15.
- Tousson, E., Atteya, E., El-Atrash, E., Jeweely, O. I. (2014). *Abrogation by Ginkgo Byloba leaf extract on hepatic and renal toxicity induced by methotrexate in rats*. *J Cancer Res Treat*, 2(3), 44-51.
- Ureshino, R. P., Erustes, A. G., Bassani, T. B., Wachilewski, P., Guarache, G. C., Nascimento, A. C., . . . Pereira, G. J. D. S. (2019). *The Interplay between Ca²⁺ signaling pathways and neurodegeneration*. *Int J Mol Sci*, 20(23), E6004.
- Weijl, N. I., Elsendoorn, T. J., Lentjes, E. G. W. M., Hopman, G. D., Wipkink-Bakker, A., Zwinderman, A. H. (2004). *Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study*. *Eur.J. Cancer*, 40(11), 1713-1723.
- Widemann, B. C., Adamson, P. C. (2006). *Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity*. *Oncol*, 11(6), 694-703.
- Yao, L., Yang, L., Song, H., Liu, T. G., Yan, H. (2020). *Silencing of lncRNA XIST suppresses proliferation and autophagy and enhances vincristine sensitivity in retinoblastoma cells by sponging miR-204-5p*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 24(7), 3526-3537.