

PAPER DETAILS

TITLE: Gossypin'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Hidrojen Peroksit Hasarına Karsi Koruyucu Etkilerinin Degerlendirilmesi

AUTHORS: Irfan ÇINAR

PAGES: 15-23

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/1150999>



Gossypin'in L929 Fibroblast Hücrelerindeki Hidrojen Peroksit Hasarına Karşı Koruyucu Etkilerinin Değerlendirilmesi

Evaluation of Protective Effects of Gossypin against Hydrogen Peroxide Damage in L929 Fibroblast Cells

İrfan Çınar

Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye

ABSTRACT

Aim: In this study, we evaluated the capacity of Gossypin in H_2O_2 -induced oxidative stress and wound healing model in mouse L929 fibroblast cells.

Material and Method: In vitro wound healing activity, cell viability and cytotoxicity indexes of Gossypin (5–200 $\mu g/mL$) and H_2O_2 (0.3–0.9 mM) were evaluated in the mouse fibroblast cell line L929 using the MTT assay. Migration test was performed as an in vitro wound healing test model. The concentration of H_2O_2 (0.5 mM) was used to evaluate the antioxidant activity. SOD activity and MDA level were determined. We also analyzed IL-1 β and TNF- α mRNA expression levels in L929 cells using real-time PCR to assess whether Gossypin doses could reduce H_2O_2 -induced damage.

Results: H_2O_2 (0.3–0.9 mM) was dose-dependent and gossypin (5–200 $\mu g/mL$) inhibited proliferation to L929 cells after 75 $\mu g/mL$. 25 and 50 $\mu g/mL$ doses of Gossypin protected L929 cells at 48 and 72 hours against the administration of H_2O_2 (0.5 mM). These results were confirmed by migration test. Gossypin administration significantly increased antioxidant activity and decreased MDA formation. especially 50 $\mu g/mL$ group and increased the SOD compared to H_2O_2 group. Gossypin doses significantly decreased IL-1 β and TNF- α mRNA expression compared to the evaluated H_2O_2 group.

Conclusion: In this study, a strong effect on fibroblast viability and migration by protecting against oxidative stress induced by H_2O_2 in L929 cells was demonstrated. This indicates the potential effect of Gossypin on the prevention of oxidative stress-related diseases caused by H_2O_2 . This shows that gossypin can be used in the treatment of diseases caused by oxidative stress-like damage caused by H_2O_2 of skin tissue.

Key words: Gossypin, L929, H_2O_2 ; oxidative stress; wound healing

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, fare L929 fibroblast hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı oksidatif stresi önlemede ve yara iyileşme modelinde Gossypin'in kapasitesini değerlendirdik.

Materyal ve Metot: Gossypin'in (5–200 $\mu g/mL$) ve H_2O_2 'nin (0,3–0,9 mM) in-vitro yara iyileşme aktivitesi, hücre canlılığı ve sitotoksitesinde indeksleri MTT tahlili kullanılarak fare fibroblast hücre hattı L929'da değerlendirildi. Çalışmada, in-vitro yara iyileşme testi modeli olarak migrasyon testi yapıldı. Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi amacı ile H_2O_2 'nin (0,5 mM) konsantrasyonu kullanıldı. SOD aktivitesi ve MDA seviyesi belirlendi. Ayrıca Gossypin dozlarının H_2O_2 'nin neden olduğu hasarı azaltıp azaltmadığını değerlendirmek için, gerçek zamanlı PCR kullanarak L929 hücrelerinde IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettik.

Bulgular: H_2O_2 (0,3–0,9 mM) uygulamasının doz bağımlı olarak, Gossypin'in (5–200 $\mu g/mL$) ise 75 $\mu g/mL$ 'den sonra L929 hücrelerine proliferasyonu inhibe ettiği belirlenmiştir. Gossypin'in 25 ve 50 $\mu g/mL$ dozları H_2O_2 (0,5 mM) uygulamasına karşı 48. ve 72. saatlerde L929 hücrelerini korumuştur. Bu sonuçlar migrasyon testi ile doğrulanmıştır. Gossypin uygulanması, antioksidan aktivitesini önemli ölçüde arttırmış, MDA oluşumunu azaltmıştır. Özellikle 50 $\mu g/mL$ grubu ve H_2O_2 grubuna kıyasla SOD'u arttırmıştır. Gossypin dozları değerlendirilen H_2O_2 grubuna kıyasla IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, L929 hücrelerinde H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif stresinden koruyarak fibroblast canlılığı ve migrasyonu üzerinde güçlü bir etki göstermiştir. Bu, Gossypin'in H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif stres ile ilişkili hastalıklarının önlenmesinde potansiyel etkisini ortaya koymaktadır. Buda cilt dokusunun H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif stres benzeri hasarlanmalara bağlı hastalıkların tedavisinde Gossypin'in kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Gossypin, L929, H_2O_2 ; oksidatif stres; yara iyileşmesi

İletişim/Contact: İrfan Çınar, Kafkas Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Kars, Türkiye • **Tel:** 0506 303 24 90 • **E-mail:** atairfan.nar@gmail.com • **Geliş/Received:** 12.09.2019 • **Kabul/Accepted:** 09.01.2020

ORCID: İrfan Çınar, 0000-0002-9826-2556

Giriş

Deri, vücudun en büyük organıdır ve ultraviyole ışınımı, kimyasal toksikler, mikroorganizmalar ve benzeri gibi çeşitli dış etkenlerden gelen saldırılara karşı bir duvar görevi görür¹. Bu nedenle deri, eritem, ödem, kırışıklık, foto-yaşlanma, iltihaplanma ve yara iyileşmesi gibi olumsuz etkilere neden olan toksik yaralanmalardan doğrudan etkilenir^{2,3}.

Yara iyileşmesi hemostaz ile başlayan ve üç sıralı faz içeren (inflamasyon, doku oluşumu veya proliferasyonu ve doku remodelingi) dinamik ve etkileşimli bir süreçtir⁴. İyileşme yollarındaki tıkanıklık sıklıkla yara kronikliğine neden olur ve bu nedenle iyileşme oranını günlerden aylara kadar geciktirir. Yaralanma bölgesinde uzun süreli inflamasyon, fibroblast göçünü durdurur ve ekstra hücrel matriks (ECM) oluşumunu önler, sonuçta iyileşme sürecini engeller⁵. Kronik inflamasyon aynı zamanda yara bölgesine oksidatif stresin indüklenmesi ve yara kenarında bulunan sağlıklı hücrelerin yaşlanması ve göçü durdurması için etkilenmesiyle de ilişkilidir⁵. Bu nedenle, iyileşme sürecinin iltihaplanma aşaması uzatılmamalı ve kronik deri yaralarını tedavi etmek için kalıcı iltihabı önleyen terapotik tedaviler uygulanmalıdır.

L929 fibroblast hücreleri, oksidatif stres kaynaklı sitotoksisiteyi araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır⁶⁻⁸. Bu nedenle reaktif radikal üretiminin inhibisyonu; onarım veya yara iyileşme sürecinin proliferatif fazını başlatmak için bölgeye çekilen fibroblast alımı için önemli bir husustur. Flavonoidler, antioksidan özellikleri ile bilinen ve sadece bitkilerde sentezlenen bir grup polifenolik bileşiktir. Flavonoidlerin insan sağlığı üzerindeki yararlı etkileri, kısmen antioksidan özelliklerine göre açıklanmaktadır. Antioksidan özelliklerinden dolayı flavonoidlerin serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların başlangıcını geciktirebileceği veya önleyebileceği öne sürülmektedir. Flavonoidlerin antienflamatuvar, antioksidan, antialerjik, hepatoprotektif, antitrombotik, nöroprotektif ve antikanserojenik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir⁹. Bu nedenle araştırmacılar, bitki kaynaklı doğal antioksidanların araştırılmasına yönelik çalışmalarını yoğunlaştırmışlardır. Gossypin ise bu bitkisel kaynaklı maddelere en iyi örnektir.

Orijinal olarak Hibiscus vitifolius'dan izole edilen Gossypin, (3,5,8,3,4-pentahidroksi-7-O-glukosil flavon 8-glukozit). Antioksidan¹⁰, antienflamatuvar¹¹ ve analjezik¹² özelliklere sahiptir. Ayrıca, gossypin hem

aminolevulinat dehidrataz hem de antioksidan savunma enzimlerini aktive ederek savunma kaynaklı oksidatif strese karşı önemli bir savunma sağlar¹³. Bununla birlikte, şimdiye kadar, gossypinin, H₂O₂ kaynaklı hasara karşı etkileri araştırılmamıştır.

Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, L929 fibroblast hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı hasarda gossypinin olası etkilerini inceleyerek; bu etkileri biyokimyasal, moleküler ve mikroskopik yöntemler kullanarak araştırmaktır.

Materyal ve Metot

L929 Fibroblast Hücre Proliferasyonu ve Canlılık Analizi

L929 hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC, USA) temin edilmiştir. Sıvı nitrojen tankında Cryotube de bulunan hücre hatları tanktan çıkartılarak su banyosunda 37° C de kısa bir süre çözünmesi için bekletildi. Çözünen hücreleri T75 cm² olan flaska alındı. Kırk sekiz saat sonra L929 hücreleri %10 FBS içeren DMEM'de 2×10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde sayım yapıp 96 kuyucuklu well playte ekilerek %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Yirmi dört saat sonra H₂O₂ ve Gossypin'in toksik dozlarının belirlenmesi amacı ile H₂O₂ 'nin (0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 mM) konsantrasyonları ile gossypinin (5–200 µg/mL) konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerindeki etkileri MTT yöntemi ile incelendi. Uygun dozlar belirlendikten sonra 96 kuyucuklu well playte tekrar ekim yapıldı. Yirmi dört saat sonra, hücreler farklı konsantrasyonlarda (5–100 µg/mL) Gossypin'e maruz bırakıldı ve üç saat sonra da H₂O₂ (0,5 mM) ortama ilave edildi¹⁴. Sonrasında 24, 48 ve 72 saattlerde hücrelere MTT yöntemi uygulandıktan sonra da mikropalak okuyucu spektrofotometre (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) ile 620 nm absorbans değerinde ölçümleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Canlılık oranları kontrol kuyucukları ile karşılaştırılarak analiz edildi.

Migrasyon Testi

Fibroblast L929'un göçü, bir yara iyileşme yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Kısaca, %10 FBS içeren DMEM içindeki L929 hücrelerine (2×10⁵ hücre/mL), altı kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna ekilmiş ve 37°C ve %5 CO₂'de inkübe edilmiştir. L929 hücreleri kuyucukta tam tabaka oluşturulduktan sonra, steril bir pipet ucu ile yatay olarak her bir kuyucukta bir çizik oluşturuldu. Hücrel artıklar, PBS ile yıkılarak çıkarıldı ve test numuneleri eklenmeden 2 mL taze

ortam ile değiştirildi. İlk gün Leica Inverted Mikroskop (Leica, DMIL LED) kullanılarak görüntüleri çekildi, inkübatörde muhafaza edilerek kuyucukların 24, 48 ve 72 saatlerde fotoğrafları çekildi.

Antioksidan Parametrelerin (SOD, MDA) Tayini

Hücreler altı kuyucuklu plaklara 200 000/kuyucuk ekildi (SOD, MDA için ayrı ayrı) ve 37°C'de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildiler. Hücreler kazıma yöntemi ile 6'lık well playtlerden kaldırılarak -80°C'de saklandı. Her gruptan yaklaşık 100 mg hücre lisatı spesifik homojenat tamponunda, buz üzerinde Tissue Lyser ile homojenize edildi. Daha sonra kitteki direktiflere göre santrifüj edildiler. Biyokimyasal çalışmalar için her süpernatanttan MDA seviyeleri ve SOD aktivitesi manuel ölçüm metotlarıyla ölçüldü.

Protein Tayini

Protein konsantrasyonları ticari protein standartları kullanılarak Lowry metodu ile tespit edildi. (Sigma Aldrich, Total protein kit-TP0300-1KT-ABD).

MDA Ölçümü

Fibroblastlar %1,15 KCL soğukta homojenize edildi. Yüz elli mikrolitre damıtılmış su, 50 µL süpernatant, 50 µL SDS, 375 µL TBA ve 375 µL asetik asit karıştırıldı ve bir saat 95°C'de ısıtıldı. Soğutulduktan sonra her bir numuneye 1,250 µL n-bütanol/piridin (15:1) ilave edildi ve 4,000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Nihai ürünün pembe/kırmızı rengin yoğunluğu 532 nm'de belirlendi. Standart olarak malondialdehit bisdietil asetat kullanıldı¹⁵.

SOD Aktivite Testi

Hücreler damıtılmış su içinde homojenize edildi (1:10); 2,9 mL reaksiyon karışımı (40 mL 3 mmol/L ksantin, 20 mL 150 µmol/L Nitro mavi tetrazolium (NBT), 12 mL 400 mmol/L Na₂CO₃ ve 6 mL 1 g/L BSA), 50 µL süpernatant ve 50 µL ksantin oksidaz karıştırıldı ve oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edildi. Kuluçkadan sonra, 1 mL 0,8 mM CuCl₂ uygulandı ve 560 nm'de spektrofotometrik olarak izlendi. Bir SOD birimi, NBT azalması oranının %50 inhibisyonuna neden olan protein miktarı olarak tanımlandı¹⁶.

Hücre Hatlarında Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Hücreler 6-kuyucuklu plaklara 200000/well ekilecek ve 37°C de %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe

edildi. Hücreler tripsinizasyon yöntemi ile 6'lık well playtlerden kaldırılarak Tissue Lyser II (Qiagen) cihazında ((1*105 hücreye 350 µL RLT buffer koyularak) homojenize edildi ve QIAcube RNA izolasyon cihazında RNA ekstraksiyonu üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde sürdürüldü.

Revers Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA'dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon 10 µL RNA ile gerçekleştirilerek cDNA sentezi aşağıdaki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nano drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C'de saklandı.

cDNA sentez reaksiyonu:

total RNA	10 µL
10 X RT Buffer	2 µL
25 X dNTPs mix	0,8 µL
10 X RT Random Primers	2 µL
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µL
DEPC-H ₂ O	4,2 µL

Real Time PCR ile mRNA Ekspresyonlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

TNF- α (Mm00443258_m1) ve IL-1 β (Mm00434228_m1) 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. Referans gen olarak β -actin (Mm02619580_g1) kullanıldı. 200 ng cDNA için tablo halinde aşağıda verilen TaqMan® Gene Expression Assays'ler yine aşağıda gösterildiği gibi pipetlendi ve 40 siklus yürütüldü. Ct değerleri cihazda otomatik olarak delta-delta Ct'ye çevrilecek ve çalışmalarımız sonucunda elde edilen bulgular istatistiksel olarak IBM SPSS 20,0 paket programında değerlendirildi.

Pipetleme:

cDNA (200 ng)	X µL
TaqMan Master Mix	10 µL
Assay	1 µL
RNase free H ₂ O ile 20 µL'ye tamamlandı.	

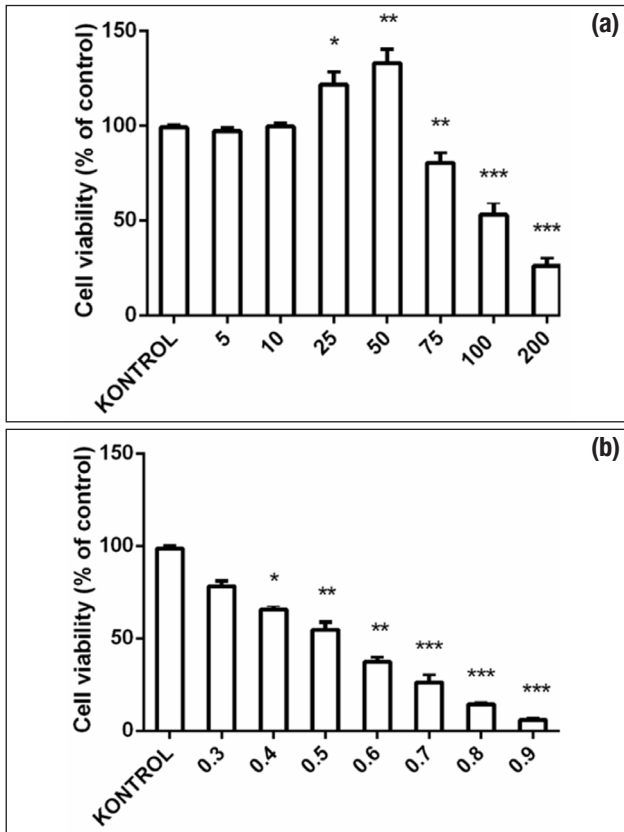
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için tüm veriler Microsoft Excel programı kullanılarak hesaplandı ve Elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Veri analizi tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ardından Dunnett testi ile yapıldı. $p < 0,05$ önemli olarak kabul edildi.

Bulgular

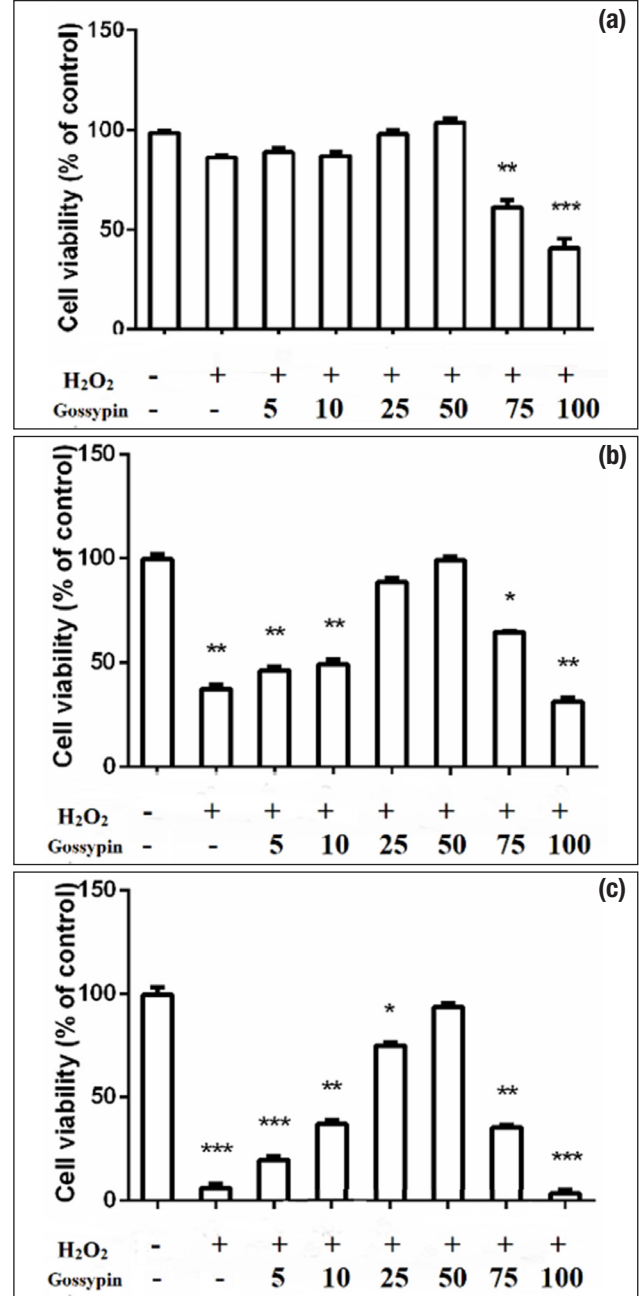
L929 Proliferasyonu ve Canlılık Analizi

0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 mM konsantrasyonlarda H_2O_2 , L929 hücrelerinin dozaj bağımlı bir şekilde canlılığını önemli ölçüde azalttı. Bu nedenle, sonraki deneylerde çalışma konsantrasyonu olarak 0,5 mM H_2O_2 konsantrasyonu kullanıldı. Gossypin dozlarında ise doz bağımlı olarak proliferatif etki ortaya çıkmış fakat bu etki 75 $\mu\text{g/mL}$ sonrasında toksisiteye dönüşmüştür (Şekil 1). Gossypin'in H_2O_2 'ye karşı hem hücre



Şekil 1. a, b. Gossypin'in ve H_2O_2 'nin L929 fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi. Fibroblast hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5–100 $\mu\text{g/mL}$) Gossypin ve (0,3–0,9 mM) H_2O_2 'nin hücre canlılığına etkileri MTT tahlili kullanılarak sonuçlar kontrole göre % olarak hesaplanmıştır (a, Gossypin; b, H_2O_2 ; MTT deney grupları arasındaki anlamlı farklılıklar: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

proliferasyonu hem de canlılığı üzerindeki etkisi, MTT yöntemi kullanılarak 24., 48. ve 72. saatlerde L929 fare fibroblast hücre hattında farklı konsantrasyonlarda (5–100 $\mu\text{g/mL}$) incelenmiştir (Şekil 2). L929 fibroblast hücreleri oksidatif stres için bir model çalışması olarak



Şekil 2. a–c. Gossypin'in ve H_2O_2 'nin L929 fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi. Fibroblast hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (5–100 $\mu\text{g/mL}$) Gossypin ile üç saat sonra 0,5 mM H_2O_2 eklenmiş ve işlemiden sonra hücrelerin canlılığı MTT tahlili kullanılarak sonuçlar kontrole göre % olarak hesaplanmıştır (a, 24. saat; b, 48. saat; c, 72. saat; MTT deney grupları arasındaki anlamlı farklılıklar: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

0,5 mM H_2O_2 ile muamele edildi ve 24 saatlik maruz kalmadan sonra hücre canlılığının H_2O_2 grubunda azalmasına karşın anlamlı bir fark görülmemiştir. Fakat 48 ve 72. saatlerde H_2O_2 L929 hücreleri üzerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak inhibisyon yapmıştır. Gossypin'in antioksidan potansiyeli, Şekil 2'de gösterildiği gibi, Gossypin'in 5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ dozları H_2O_2 'nin inhibitör etkisine karşı yetersiz kalırken, 75 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ dozları ise L929 fibroblast hücreleri üzerinde toksik etki göstermiştir. Hatta 100 $\mu\text{g/mL}$ Gossypin grubunda 72 saatte canlılık yaklaşık olarak %8'e düşmüştür ($p < 0,01$). Fakat 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozları H_2O_2 'nin inhibitör etkisini hem 48. hem de 72. saatlerde ortadan kaldırarak canlılık oranlarını korumuşlardır (sırası ile %75 ve %93). Buradan yola çıkarak sonraki aşamalarda mRNA ekspresyon seviyesi ve migrasyon testlerinde 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarını seçtik.

Migrasyon Testi Sonuçları

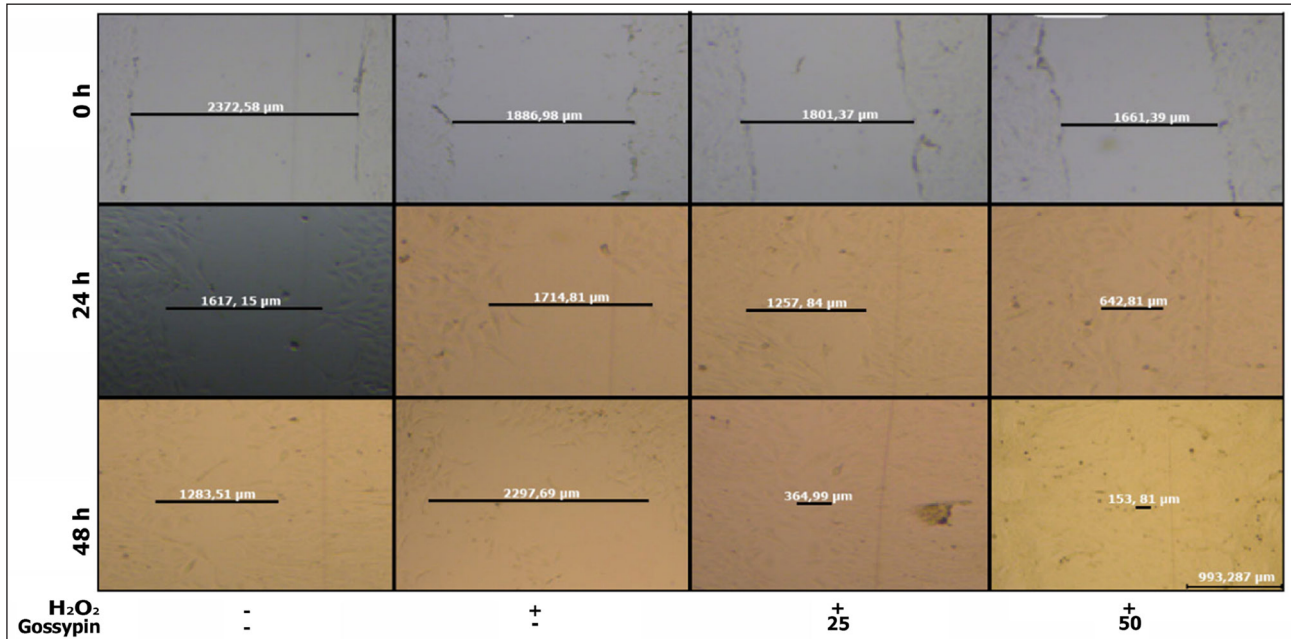
Gossypin'in L929 hücrelerinin çizilen alana, yaralı bölüm adı verilen bölgeye göçü üzerindeki etkisini araştırmak için standart bir in vitro yöntem olan Migrasyon testi (yara iyileşme testi) yapılmıştır. Sonuçlara göre, gossypin, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozlarda, fibroblast hücrelerinin yaralı bölgeye göçünü önemli ölçüde arttırabilmiştir. Hata 50 $\mu\text{g/mL}$ 'lik dozu yara bölgesini tama yakın kapatmıştır. Migrasyon testi sonuçları Şekil 3'te görülmektedir.

Antioksidan Parametrelerin (SOD, MDA) Analizi

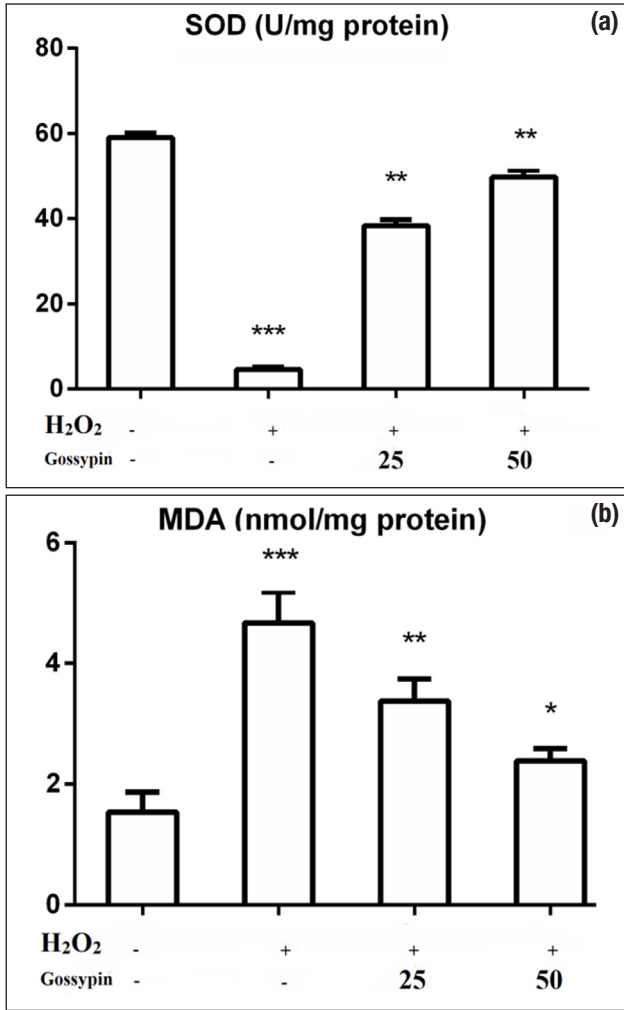
Hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif stres, ekstremin hücrelerde antioksidan aktivitesini değerlendirmek için iyi bir alternatif olarak sıkça kullanılmaktadır. Oksidatif stresin düzenlenmesinin gossypin için L929 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı hasarı inhibe etmesinin önemli yollarından biri olduğunu göstermektedir. Burada, gossypinin, L929 hücrelerinde H_2O_2 kaynaklı hasarı oksidatif stres üzerindeki etkisini göstermek için oksidatif stresin derecesi değerlendirildi. Sonuçlar, H_2O_2 , antioksidan kapasitede anlamlı bir düşüşe neden olduğunu, MDA'yı arttırdığını ve kontrol grubuna kıyasla SOD'u azalttığını göstermiştir. Buna karşılık, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ gossypin ile ön muamele edilen gruplar, antioksidan aktivitesini önemli ölçüde arttırmış, MDA oluşumunu azaltmıştır. Özellikle 50 $\mu\text{g/mL}$ grubu ve H_2O_2 grubuna kıyasla SOD'u arttırmışlardır (Şekil 4).

Hücre Hatlarında İnflamatuvar Gen Ekspresyonlarının Analizi

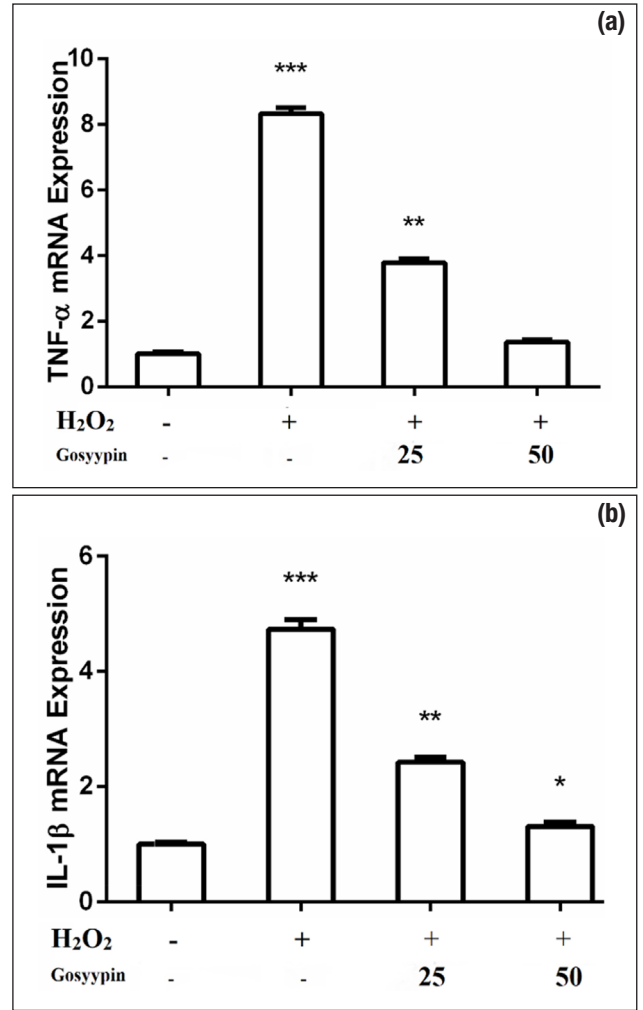
Gossypinin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ dozlarının H_2O_2 'nin neden olduğu hasarı azaltıp azaltmadığını değerlendirmek için, gerçek zamanlı PCR kullanarak L929 hücrelerinde IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettik. Grupların IL-1 β ve TNF- α mRNA ifadeleri, Şekil 5'te gösterilmektedir. IL-1 β ve TNF- α mRNA ifadeleri, H_2O_2 grubunda kontrol



Şekil 3. L929 fibroblast hücrelerinin 0., 24. ve 48. saatlerdeki migrasyon testi mikroskopi görüntüleri.



Şekil 4. a, b. L929 hücrelerinde H₂O₂ ve Gossypin tedavisinin SOD enzim aktivitesi (a) ve MDA düzeyleri (b) üzerine etkileri (SOD enzim aktivitesindeki deney grupları arasındaki anlamlı farklılıklar: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).



Şekil 5. a, b. Tüm deney gruplarının 24 saatlik TNF-α (a) ve IL-1β (b) mRNA ekspresyon seviyeleri (TNF-α ve IL-1β mRNA ekspresyon seviyelerinde deney grupları arasındaki anlamlı farklılıklar: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$).

grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$). Gossypin her iki doz tedavisi de, değerlendirilen H₂O₂ grubuna kıyasla IL-1β ve TNF-α mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır ($p < 0,05$). Özellikle, Gossypin 50 µg/mL uygulaması, TNF-α mRNA ekspresyon seviyesini düşürerek ($p < 0,05$) kontrol grubu seviyesine getirmiştir (Şekil 5a).

Tartışma

Bu çalışmada, fare L929 fibroblast hücrelerinde H₂O₂ kaynaklı oksidatif stresi önlemede ve yara iyileşme modelinde gossypinin kapasitesini değerlendirdik. Oksidatif stres, membran lipid peroksidasyonuna¹⁷, proteinlere ve nükleik asitlere doğrudan zarar verir.

H₂O₂, vücudun redoks reaksiyonunda¹⁸ önemli bir ara maddedir ve bir hücreyi tedavi etmek için eksojen H₂O₂ kullanmak, hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve hücre hasarını etkin bir şekilde indükleyebilen oksidatif stres hasarı modelini oluşturmak için en yaygın yöntemlerden biridir^{14,19}.

Hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri gibi ROS'lar biyolojik olarak moleküllere kolayca zarar verir, bu durum sonuçta apoptik veya nekrotik hücre ölümüne yol açabilir²⁰⁻²². Bu nedenle, aşırı ROS'un hücre dışına çıkarılması veya üretimlerinin antioksidanlar tarafından bastırılması oksidatif hücre ölümünün önlenmesinde etkili olabilir.

Gossypin'in en iyi bilinen özelliklerinden birisi güçlü bir antioksidan madde olmasıdır ve Gossypin'in güçlü anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip olduğu birçok çalışma ile gösterilmiştir^{11,13,23,24}.

Çalışmamız ilk kez Gossypin ön işleminin L929 hücrelerini H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruyabildiğini ve yara iyileşmesinde etkili olduğunu; gen düzeyinde, protein düzeyinde ve mikroskopik görüntüleme teknikleri ile gösteriyor. Bu, L929 fibroblast hücrelerinde gossypinin etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda ilk önce, Gossypin'in farklı konsantrasyonlardaki L929 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini tespit ettik. Çünkü fibroblastların, doku onarımı mimarisinin temel taşları olarak büyük önem taşımaktadır. İyileşme sürecinin ilk günlerinde, fibroblastlar çoğalır ve yaralı bölgeye göç eder. Daha sonra, yaralanmadan sonraki üçüncü günden itibaren, fibroblastlar yaklaşık üç haftaya kadar devam eden yeni bir kollajen üretimi sorumluluğunu alır^{25,26}. Sonuçlarımız, Gossypin'in, konsantrasyon değeri belirli bir seviyenin üzerinde olduğunda L929 hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibe edici etkiler gösterebileceğini göstermiştir. Flavonoidlerin, hücrelerin büyümesinde, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında genellikle önemli rol oynayan bazı protein kinaz ve lipid kinaz sinyal yollarını modüle etmek için sinyal molekülleri görevi gördüğü bildirilmiştir²⁷. Bu nedenle, yüksek dozlarda, Gossypin önemli sinyal yollarını aşırı baskılayarak veya aktive ederek L929 hücrelerinin büyümesini inhibe edebilir. Ek olarak, sonuçlarımız hastalıkların tedavisi için kesin ilaç dozunun önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızda Gossypin, konsantrasyonu 75 $\mu g/mL$ 'den düşük olduğunda sitotoksikite göstermedi. Daha sonra, H_2O_2 'nin farklı konsantrasyonlardaki L929 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini inceledik ve sonuçlar benzer çalışmalar ile uyumluluk göstererek H_2O_2 'nin, hücre konsantrasyonunda 0,3–0,9 mM arasında değişen stimülasyon konsantrasyonları ile doza bağlı inhibitör bir etkiye sahip olduğunu gösterdi²⁸. Bununla birlikte, yüksek H_2O_2 seviyelerinin neden olduğu hücre sağ kalım oranının düşmesi, hücrelerin gossypin ile ön işleme tabi tutulmasıyla önlenebildi, bu da gossypinin oksidatif hasar kaynaklı hücre ölümüne karşı güçlü koruyucu etkileri olduğunu gösterir. Gossypin'in muhtemelen hücre içi ROS seviyelerini değiştirerek L929 hücrelerini oksidatif hasardan koruduğunu varsaydık. Daha önceki in-vitro çalışmalar da bu hipotezi desteklemektedir²⁹. Mevcut hipotezimizi

test etmek için, Gossypin'in ön tedavisi olsun ya da olmasın H_2O_2 ile uyarılmış L929 hücrelerinde oksidatif hasar belirteçlerindeki değişiklikleri belirledik. Bunlar MDA ve SOD aktivite seviyeleri ile gerçek zamanlı PCR kullanarak L929 hücrelerinde IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerini analiz ettik.

Hücre proliferasyonu ve göç, yara iyileşmesinde ve doku oluşumu aşamasında son derece önemli iki özelliğdir. Migrasyon testi, bir yarayı in vitro taklit etmek ve hücre göç oranını değerlendirmek için kullanılan bir formdur. Hücre tek tabakası bozulduktan sonra, hücre-hücre etkileşiminin kaybı, hücrelerin göçünü ve çoğalmasını başlatarak, yara kenarındaki büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin konsantrasyonunun artmasına neden olur²⁶. Çalışmamızdaki migrasyon testi bulgularına göre gossypin, 25 ve 50 $\mu g/mL$ 'lik dozlarda, fibroblast hücrelerinin yaralı bölgeye göçünü önemli ölçüde arttırabilmiştir. Gossypin'in 50 $\mu g/mL$ 'lik dozu yara bölgesini tama yakın kapatmıştır. Bu mitojenik etki, yara iyileşmesi süreci için olumlu bir olaydır, çünkü fibroblastlar, yara büzülmesinde ve ekstraselüler matriks üretiminde önemli hücrelerdir³⁰.

İn-vitro çalışmalarda çeşitli toksik maddelerin uyarımı ile oksidan ve antioksidan sistemler üzerinde değişimler meydana gelmektedir. Örneğin bu çalışmalarda; MDA seviyesi yükselirken SOD enzim aktivitesi düşmüştür. Flavonoid ve benzeri bitkisel kökenli aktif maddeler ile hücre hatlarındaki bu değişimler normalize edilebilmiştir^{31–33}. MDA, serbest radikallerin biyomembran çoklu doymamış yağ asitleri ile lipid peroksidasyonunun ürünüdür ve içeriği, oksijensiz radikallerin seviyesini ve lipid peroksidasyon derecesini yansıtmaktadır. Ek olarak, MDA nükleik asit ve proteinlerle çapraz bağlanır ve onlara zarar verir. MDA bu nedenle yalnızca hücre hasarının metabolitlerinden biri değil aynı zamanda hücre hasarına yol açan maddelerden biridir³⁴. SOD, H_2O_2 ve diğer serbest radikalleri bozabilen ve çıkarabilen ana antioksidan enzimdir. Bu çalışma, H_2O_2 'nin, MDA içeriğini arttırabileceğini ve SOD aktivitesini azaltabileceğini, gossypinin H_2O_2 ile indüklenen oksidatif hasarda, MDA içeriğini azalttığını ve SOD aktivitesini arttırabileceğini tespit etti. Bu, H_2O_2 'nin L929 üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu gösterirken, Gossypin, H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı koruyucu bir rol üstlendiğini göstermiştir.

Birçok faktör, bağışıklık ve inflamasyonun yanı sıra serbest radikallerin üretilmesi ve mikrobiyal enfeksiyon üretimi gibi yara onarımı sürecini önleyerek ve

geciktirerek yara iyileşmesini etkiler³⁵. Bunları göz önünde bulundurarak, anti-enflamatuar aktivite üzerine etkilerini değerlendirdik. Çalışmamızda, H_2O_2 pro-enflamatuar sitokinlerin IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde artırdığı gözlemlendi. Yapılan in-vitro çalışmalarda hücrelerin H_2O_2 ile muamelesi sonucunda benzer sonuçlarla karşılaşılmaktadır³⁶. Gossypin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ doz tedavisi de, değerlendirilen H_2O_2 grubuna kıyasla IL-1 β ve TNF- α mRNA ekspresyonunu anlamlı şekilde azaltmışlardır. Özellikle, Gossypin 50 $\mu\text{g/mL}$ uygulaması, TNF- α mRNA ekspresyon seviyesini düşürerek kontrol grubu ile aynı seviyeye getirmiştir.

Sonuç

Bu çalışmada, H_2O_2 tarafından indüklenen oksidatif stresin, cilt fibroblastlarının canlılığı ve migrasyonu üzerinde güçlü bir olumsuz etkisi olduğunu gözlemlerken, gossypinin fibroblastları oksidatif hasardan koruyarak muhtemel aşırı ROS birikimine bağlı oksidatif stresi etkili bir şekilde azalttığını gözlemledik. Ayrıca, gossypin, yara iyileşmesi sürecinde önemli bir özellik olan fibroblastların mitojenik aktivitesini indüklemiştir. Gossypin'in koruyucu etkileri iki faktörü içerir: serbest radikal temizleme aktiviteleri ve bazı antioksidan-anti-inflamatuar ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenlemesini destekleyen sinyal benzeri özelliklere işaret eder. Buda cilt dokusunun çeşitli nedenlerle hasarlanmasına bağlı hastalıkların tedavisinde gossypinin kullanılabileceğini göstermektedir. Etkili Gossypin'in L929 hücreleri üzerindeki H_2O_2 'ye karşı etki mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak incelemek için daha ileri çalışmalar gerekecektir.

Kaynaklar

- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008;17:1063–72.
- Nachbar F, Korting HC. The role of vitamin E in normal and damaged skin. *J Mol Med (Berl)* 1995;73:7–17.
- Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns* 2008;34:6–17.
- Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999;341:738–46.
- Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med* 2014;6:265sr6.
- Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, Tanaka T. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2002;274:16–24.
- Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Kroncke KD. Influence of nitric oxide on the intracellular reduced glutathione pool: different cellular capacities and strategies to encounter nitric oxide-mediated stress. *Free Radic Biol Med* 1999;27:773–80.
- Gardner A, Xu FH, Fady C, Sarafian T, Tu Y, Lichtenstein A. Evidence against the hypothesis that BCL-2 inhibits apoptosis through an anti-oxidant effect. *Cell Death Differ* 1997;4:487–96.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160:1–40.
- Katary M, Salahuddin A. Ameliorative effect of gossypin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2017;176:75–81.
- Cinar I, Sirin B, Aydin P, Toktay E, Cadirci E, Halici I, Halici Z. Ameliorative effect of gossypin against acute lung injury in experimental sepsis model of rats. *Life Sci* 2019;221:327–334.
- Viswanathan S, Thirugnanasambantham P, Ramaswamy S, Bapna JS. A study on the role of cholinergic and gamma amino butyric acid systems in the anti-nociceptive effect of gossypin. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1993;20:193–6.
- Gautam P, Flora SJ. Oral supplementation of gossypin during lead exposure protects alteration in heme synthesis pathway and brain oxidative stress in rats. *Nutrition* 2010;26:563–70.
- Sudsai T, Wattanapiromsakul C, Tewtrakul S. Wound healing property of isolated compounds from Boesenbergia kingii rhizomes. *J Ethnopharmacol* 2016;184:42–8.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988;34:497–500.
- Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* 2017;39:73–82.
- Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008;117:2270–8.
- Starke PE, Farber JL. Endogenous defenses against the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1985;260:86–92.
- Gorman AM, McGowan A, O'Neill C, Cotter T. Oxidative stress and apoptosis in neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences* 1996;139 Suppl:45–52.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999;18:7719–30.
- Gardner AM, Xu FH, Fady C, Jacoby FJ, Duffey DC, Tu Y, Lichtenstein A. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1997;22:73–83.
- Chandrashekhhar VM, Ganapaty S, Ramkishan A, Narsu ML. Neuroprotective activity of gossypin from Hibiscus vitifolius against global cerebral ischemia model in rats. *Indian J Pharmacol* 2013;45:575–80.

24. Kunnumakkara AB, Nair AS, Ahn KS, Pandey MK, Yi Z, Liu M, Aggarwal BB. Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood* 2007;109:5112–21.
25. Schafer M, Werner S. Transcriptional control of wound repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:69–92.
26. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007;2:329–33.
27. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004;36:838–49.
28. Cao XP, Chen YF, Zhang JL, You MM, Wang K, Hu FL. Mechanisms underlying the wound healing potential of propolis based on its in vitro antioxidant activity. *Phytomedicine* 2017;34:76–84.
29. O'Brien NM, Woods JA, Aherne SA, O'Callaghan YC. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. *Biochem Soc Trans* 2000;28:22–6.
30. Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtae K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J Ethnopharmacol* 2012;141:817–24.
31. Hu YN, Sung TJ, Chou CH, Liu KL, Hsieh LP, Hsieh CW. Characterization and Antioxidant Activities of Yellow Strain *Flammulina velutipes* (Jinhua Mushroom) Polysaccharides and Their Effects on ROS Content in L929 Cell. *Antioxidants (Basel)* 2019;8.
32. Bian YY, Guo J, Majeed H, Zhu KX, Guo XN, Peng W, Zhou HM. Ferulic acid renders protection to HEK293 cells against oxidative damage and apoptosis induced by hydrogen peroxide. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2015;51:722–9.
33. Dash R, Acharya C, Bindu PC, Kundu SC. Antioxidant potential of silk protein sericin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in skin fibroblasts. *BMB Rep* 2008;41:236–41.
34. Radi R, Turrens JF, Freeman BA. Cytochrome c-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:118–25.
35. Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: wound healing as an example. *J Ethnopharmacol* 2005;100:100–7.
36. Okoko T. Kolaviron and selenium reduce hydrogen peroxide-induced alterations of the inflammatory response. *J Genet Eng Biotechnol* 2018;16:485–490.