

Ibrahim Yılmaz^{1,2}, Hakan Somay³, Hanefi Özbek⁴

¹T.C. Rumeli Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İlk ve Acil Yardım Bölümü, İstanbul
²T.C. Sağlık Bakanlığı, Dr. İsmail Fehmi Cümaliolu Şehir Hastanesi, Farmakovijilans Birimi, Tekirdağ

³Medicana Kadıköy Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul

⁴İzmir Bakırçay Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir
✉ dryilmazi@yahoo.com

Derleme / Review

Geliş tarihi : 04.07.2023

Kabul tarihi : 08.08.2023

İntervertebral Disk Dokusuna *in Vitro* Uygulanan Farmakolojik Ajanların Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Cytotoxicity of Pharmacological Agents Applied *in Vitro* to Intervertebral Disc Tissue

ÖZ

Hastalıkların tanı veya tedavisinde kullanılan; bitkiler, mikroorganizmalar, mineraller ve hayvanlar gibi kaynaklardan doğal olarak hazırlanan ya da yarı sentetik veya sentetik olarak hazırlanan ilaçlar, hücreleri etkileyerek sitotoksitesine neden olabilirler. İlaç olması muhtemel bir farmasötüğün ya da toksik etkisi bilinmeyen herhangi bir farmakolojik ajanın, hücreye toksik etki gösterip göstermediği, canlı memeli denekler üzerinde *in vivo* olarak test edilmeden önce, *in vitro* olarak hücre kültürlerinde sitotoksitesine testleri sayesinde belirlenir. Bunun için öncelikle toksisitesi araştırılacak olan ilacın etkinlik göstereceği minimum konsantrasyona ait dozundan başlanır. Devamında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ilaçlar, hücre kültürlerine uygulanır. Hücre kültürlerine uygulanacak olan farmakolojik ajanın, yarılanma ömrü dikkate alınarak, belirli zaman aralıklarında, farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip sitotoksitesine testlerinden herhangi biri uygulanır. Bu çalışmada bir yandan *in vitro* olarak hücre kültürlerine uygulanan farmakolojik ajanların sitotoksitesinin nasıl test edildiği ve yorumlandığının anlatılabilmesi amaçlanırken diğer yandan kolorimetrik, fluorometrik ve luminometrik gibi birçok farklı farmakomoleküler analizlere yer verilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Hücre canlılık testleri, İlaç sitotoksitesini, Otofaji, Proliferasyon

ABSTRACT

Used in the diagnosis or treatment of diseases; prepared naturally from sources such as plants, microorganisms, minerals and animals or drugs prepared semi-synthetic or synthetically can cause cytotoxicity by affecting cells. Whether a pharmaceutical that is likely to be a drug or any pharmacological agent whose toxic effect is unknown has a toxic effect on the cell is determined by *in vitro* cytotoxicity tests in cell cultures before testing it *in vivo* on living mammalian subjects. For this, it is started from the dose of the minimum concentration at which the drug, whose toxicity will be investigated, will be effective. Subsequently, drugs prepared at different concentrations are applied to cell cultures. Considering the half-life of the pharmacological agent to be applied to cell cultures, any of the cytotoxicity tests with different mechanisms and sensitivities are applied at certain time intervals. In this research, on the one hand, it was aimed to explain how the cytotoxicity of pharmacological agents applied to cell cultures *in vitro* was tested and interpreted, on the other hand, many different pharmacomolecular analyzes such as colorimetric, fluorometric and luminometric were included.

Keywords: Apoptosis, Cell viability tests, Drug cytotoxicity, Autophagy, Proliferation

GİRİŞ

Literatürde kanıt düzeyi birçok araştırmada, hücrelerin canlılığını değerlendirmek için çok sayıda metodoloji bulunmakla birlikte, sitotoksiste çalışmalarına ait her bir tekniğin kendine göre avantaj ya da dezavantajları bulunmaktadır (1).

Bununla birlikte sitotoksiste testlerinden elde edilecek olan verilerin doğruluğu ve güvenilirliği oldukça önemlidir. Çoğu denemelerde, yüksek maliyetinden dolayı hassasiyeti ve kalitesi güvenilir olan gerçek zamanlı biyoluminesans görüntüleme testi kullanılmaz. Bunun yerine; uygulama kolaylığı ve düşük maliyetinden dolayı, eski ve birçok dezavantaja sahip, 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) ya da 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum (MTS), testleri gibi ticari kitlerin kullanıldığı görülmektedir (11).

Yapılan bir araştırmada (16), araştırmacıların genelinin, metodolojiyi seçerken maliyeti de göz önünde bulundurduğu ancak, sitotoksiste testlerinden elde edilen dataların öneminin göz önüne alınmasının ön planda olmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Aynı çalışmada bazı araştırmacıların ise hem kullandıkları metodolojinin hassasiyetine yönelik kaygılarını giderebilmek hem de güvenilir sonuçlar elde edebilmek amacı ile farklı metodolojilerden oluşan testlerin kombinasyonunu tercih ettiklerinden bahsedilmiştir (16).

Ancak en az bunlar kadar önemli olan diğer bir husus ise sitotoksiste testlerinde; sadece kullanılacak olan sarf malzemesinin kalitesi ya da metodolojisi değil, aynı zamanda araştırmacının bilgi birikim, tecrübe ve deneysel ortam ile deneylerinde kullandığı hücreleri nasıl elde ettiği ya da elde ettiği bu hücrelerin tipinin de önemli olduğudur. Şöyle ki, araştırmacılar, ilaç sitotoksitesini *in vitro* değerlendirirken genellikle “*cell line*” adı verdiğimiz ticari hücre hatlarını ya da hayvansal dokulardan elde ettikleri hücre sınıflarını kullanmaktadırlar. Oysa ticari hücre hatları tek tip hücre içerdiği bilinmektedir ve mikro ortamda karmaşık koordinasyon mekanizmaları yoktur (21). Dahası, bu tip hücrelerin çeşitli işlemler ve pasajlamalar sonrasında genotipik ve/veya fenotipik özelliklerinin değiştirilmiş olduğu da bilinmektedir (6, 19).

Buna ek olarak hayvan dokusunun hassasiyetinin insan dokusunun hassasiyetinden farklı olduğu bilinen bir gerçektir (18).

Bu yüzden de hayvan dokularından elde edilen hücre kültürlerinin kullanıldığı araştırmalarda, yapılan testlerden elde edilen sonuçlar yanıltıcı olabilir (8).

Bunun sonucunda da hem hayvansal dokulardan kurulan hücre kültürlerinden hem de ticari hücre hatlarının kullanılarak yapıldığı araştırmalardan elde edilen sonuçlar yanıltıcı olabilmektedir (7,20).

Bu yüzden mümkün mertebe ilaç sitotoksiste araştırmalarında, kendinizin hazırlayacağı primer hücre kültürlerinin kullanılması önem arz eder.

In vitro sitotoksiste sonuçlarındaki başarı, tüm bu bahsi geçen değişkenlerin bir arada bulundurulmasını gerektirmektedir (16).

Operasyonla rezeke edilen yağ doku, kan ve nekrotik hücrelerin temizlenmesi amacı ile diseke edilen intervertebral disk dokusu steril *flow* kabin içerisinde pH=7,4'e ayarlanmış steril fosfat tampon salin solüsyonu veya %0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi ile petri kabı içerisine alınarak, üç kez ardışık irrigasyon tekniği ile yıkanır.

Ardından dokuların mekanik olarak parçalanması sağlanır. MEM olarak bilinen “*Minimal Essential Medium*” ya da DMEM olarak bilinen “*Dulbecco's Modified Eagle's medium*” özel hücre besiyeri medyumunda içinde çözülmüş kolajenazların ilavesi sonrasında, %5 CO₂'li ortamda bir gece inkübasyon sağlanarak, dokuların enzimatik parçalanması da sağlanır.

Santrifüjlemeler sonrasında, hücre pelletleri yeniden süspansiyon edilerek önce flasklara aktarılır. Proliferasyon arttıkça, belirli sayıda pasajlamalar sonrasında, Trypan blue yardımı ile Thoma lamında sayımı gerçekleştirilen primer intervertebral disk dokusu hücre kültürlerinde sitotoksiste analizleri için ilaç uygulamalarına geçilir (9).

Toksik etkisini merak ettiğimiz ilaç, uygun çözücüsünde çözüldürülerek, ana stok solüsyonu hazırlanır ve birazdan anılacak olan tüm bu işlemler de yine steril laminar *flow* kabin içerisinde gerçekleştirilir.

Deney düzeneğinde optimum ilaç dozunu araştırabilmek için; 1, 50, 100 ve 1.000 uM ilaç konsantrasyonları olacak şekilde, ana stok solüsyonlarından dilüsyonlar ile farklı konsantrasyonlarda ilaç çözeltileri hazırlanır. “*Well plate*” olarak bilinen kuyucuklu plakalarda hazırlanmış olduğunuz ve içerisindeki hücre sayısının belli olan primer hücre kültürlerine, hazırlanmış olan farklı konsantrasyondaki ilaç solüsyonları ilave edilir.

Bu kuyucuklu plakaların; kontrol gruplarını oluşturması amacı ile hiçbir ilaç uygulanmayan, %0,9 izotonik sodyum klorür ilave edilen ve de ilacın çözünmesini sağladığınız çözücü maddenin, -örneğin dimetil sülfoksit gibi ilavelerin gerçekleşeceği, kuyucukları da içermesine özen gösterilir. Araştırmamızda kaç adet analiz yapacak iseniz, ona göre her bir hücre sınıfından birer adet fazla olacak şekilde kuyucuklu plakalar hazırlanır.

Hazırlamış olduğunuz konsantrasyonlardan hangisi (örneğin 100 µM'lık solüsyonun üzerindeki ilaç solüsyonu, hücre proliferasyonunu tamamen inhibe ediyor ise 100 µM'lık ilaç dozu esas alınır) hücrelerin proliferasyonunu inhibe ediyor ise o doz esas alınarak deneyler gerçekleştirilir.

Hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı kolorimetrik metotlarda, MTT ve MTS testleri yanında araştırmacılar; 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak da renk değişikliğine göre testleri yorumlayabilmektedir.

Ticari kit yardımı ile (örneğin MTT gibi, hücre canlılık, toksisite ve proliferasyon test kiti) hücre canlılığı testleri, tetrazolyum tuzları kullanılarak, -formazanı inhibe eden ve ölü hücrelerde bu formazan kristalinin oluşup oluşmaması esasına dayanan, kolorimetrik testler- aşamasında ilaç uygulamasından önce ve sonra gerçekleştirilir. Canlı hücreler, MTT'nin tetrazolyum halkalarını sindirmek için aktif mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinden formazan kristallerini üretirken, ölü hücreler de bu kristaller oluşmaz (12).

Bu işlemler genellikle 540-570 nm aralığında ve bir ELISA mikropłaka okuyucusu kullanılarak gerçekleştirilir. Verilerin değerlendirilmesinde, ilaç ilavesi yapılmayan kontrol grubu örneklerinden elde edilen verilerin viabilitesi dediğimiz yaşayabilirliği, %'de 100 olarak kabul edilir. Buna göre diğer kuyucuklar içerisinde elde edilen absorbans değerlerinden blank değerler düşürüldükten sonra, "Test OD/Kontrol ODX100" ve "1-Test OD/Kontrol OD" formülleri kullanılarak, proliferasyona ait veriler, istatistiksel analizler yapılmak üzere kayıt altına alınır (5).

Hücre yaşayabilirliğini belirlemek ve tetrazolyum testinin sonuçlarını doğrulamak için nükleik asit bağlayıcı boyaların kullanılması tavsiye edilir. Akridin oranj (AO)

ve propidyum iyodür (PI) gibi floresan boyalar DNA'ya bağlanarak kromatine dayalı bir şekilde hücrelerin çekirdek yapısının mikroskopik olarak değerlendirilmesine yardım eder.

Örneğin AO, canlı veya ölü tüm çekirdekli hücreleri yeşil flüoresans oluşturarak boyar. PI ise yalnızca zayıf zar bütünlüğüne sahip ölü hücrelere nüfuz eder ve çekirdekli hücrelerin kırmızı floresan oluşturması esasına dayalı renk reaksiyonudur. Özetle AO ve PI ile boyandığında, tüm canlı çekirdekli hücreler yeşil flüoresans sergiler ve tüm ölü çekirdekli hücreler kırmızı flüoresans gösterir (15).

Tripan mavisi, Eozin, Kongo kırmızısı ve eritrosin B gibi flüoresan olmayan boyamalar ya da alamar mavisi floresans testi ve AO ve PI boyamaya ek olarak 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), nil mavisi, lektin, *pico-green*, *Hoechst-33342*, *Annexin-V FITC*, gibi flüoresan boyaların kullanılacağı lüminesans metotlar uygulanabilmektedir (2, 13). Adenozin trifosfat (ATP) biyölüminesans testi ve gerçek zamanlı (*real time*) biyölüminesans analizler de pratikte yerini almış durumdadır.

Bilindiği üzere, hücrenin yaşamını yitirmesini takiben, hücre içerisinde ATP molekülünün sentez mekanizmaları kaybolmakta ve endojen ATPaz'lar, halihazırda bulunan ATP'yi hızlı bir şekilde yıkmaya başlar. İntrasellüler ATP, hücre canlılığının temel göstergesi şeklinde nitelenir ve hücre canlılığının belirlenmesi metodolojilerinde ATP biyölüminesans testi kullanılır. Real time biyölüminesans yöntemi de ATP biyölüminesans testine benzemekle birlikte, bu testte lusiferaz enzimi ve coelenterazin adı verilen ve oksijen ile reaksiyona girince ışık yayan, lusiferin pro-substratı olan fotoproteinler kullanılır (14).

Hücre hasarı ya da ölümü sonrası mikro çevrede yer alan enzimler de ölü hücre sayısının belirteci olarak kullanılabilir. Bu enzimler arasında, stabilitesinden dolayı, hücre ölüm belirteci olarak, sıklıkla laktat dehidrogenaz, canlılık testleri arasında ilk sıralarda yerini almıştır (22,23).

Laktat dehidrogenaz; organizma içerisinde neredeyse tüm hücrelerde yer alan sitoplazmik bir enzim olup, hücreler, toksik bir maddeye maruz kaldığında, plazma membran bütünlükleri bozulmakta ve laktat dehidrogenaz, hücrelerden sızarak hücre medyumuna geçmektedir. Bu spektrofotometrik olarak, hücrelerden sızarak hücre medyumuna geçen laktat dehidrogenazın ölçümüdür (3).

Tüm bunlara ek olarak, invert ışık mikroskopisi yardımı ile de hem hücrelerin yüzey morfolojisi hem de hücrelerin mikro-çevresinde yer alan ekstra selüler matriks gibi yapılar da değerlendirilebilir (18-20).

Özetle farklı metodoloji mekanizma ve hassasiyetlere sahip MTT, MTS, XTT ve WST gibi tetrazolyum testleri ve de laktat dehidrogenaz testi, alamalar mavisi testi ve biyoluminesans testlerin, hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesinde, literatürde yoğun olarak kullanıldığı görülmektedir. Hücrenin viabilite, proliferasyon ve sitotoksitesite açısından değerlendirilebilmesinde; boyama, kolorimetrik, fluorometrik ve luminometrik metodolojiler ile birlikte 3-, 8- ve -9 kaspazların aktivite ve seviyeleri ile birlikte, terminal deoksiniükleotidil (TdT)2'-deoxyuridine, 5'-triphosphate transferaz (dUTP)'in birleşmesinden oluşan, "TdT-dUTP nick-end-labelling" olarak da bilinen TUNEL metodolojisi sayesinde apoptoz belirlenebilir (4,10)

Otofajinin belirlenmesi için de Beclin-1, p62, LC-3 gibi otofajide önem arz eden yolakların gen/protein ifadelerinin düzeyleri değerlendirilerek de analizler yapılabilmektedir (17). Ayrıca, sadece farmakolojik ajanların değil, neredeyse tüm farmasötik/kozmetik/kozmesötik preparatlar, ağır metaller/fungusit/pestisit gibi kimyasallar ve biyolojik ya da fiziksel ajanlar da *in vitro* olarak sitotoksitesite açısından, bu bölümde bahsi geçen test yöntemleri kullanılarak değerlendirmeye alınabileceği unutulmamalıdır. Ayrıca, herhangi bir farmasötüğün sadece hücrenin canlılığına, proliferasyonuna etkisi ya da hücreye toksitesitesinin değil, aynı zamanda, test edilecek olan farmakolojik ajanın, genlere ve transkripsiyon faktörlerine de etkisinin, kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu ve/veya sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi sonrası "Western Blot" yöntemi ile test edilmesi önemlidir (18-20).

KAYNAKLAR

- Aslanturk OS: In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. In: Larramendy ML and Soloneski S (eds), Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World, cilt 1, birinci baskı. IntechOpen 2018:1-18
- Cai XY, Xiong LM, Yang SH, Shao ZW, Xie M, Gao F, Ding F: Comparison of toxicity effects of ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine on rabbit intervertebral disc cells in vitro. Spine J 14: 483-490, 2014
- Erkekoglu P, Baydar T: Current *In Vitro* cytotoxicity tests. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy 41: 45-63, 2021
- Guo HT, Yang SD, Zhang F, Liu S, Yang DL, Ma L, Wang H, Ding WY: 17 β -Estradiol protects against interleukin-1 β -induced apoptosis in rat nucleus pulposus cells via the mTOR/caspase-3 pathway. Mol Med Rep 20:1523-1530, 2019
- Kaplan N, Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Akgun FS, Caliskan T, Simsek AT, Ozbek H: Are intervertebral disc tissue cells damaged when attempting to prevent thrombus formation using dabigatran, a new oral anticoagulant? Turk Neurosurg 29:470-477, 2019
- Kaplan N, Yilmaz I, Karaarslan N, Kaya YE, Sirin DY, Ozbek H: Does nimodipine, a selective calcium channel blocker, impair chondrocyte proliferation or damage extracellular matrix structures? Curr Pharm Biotechnol 20:517-524, 2019
- Karaarslan N, Yilmaz I, Ozbek H, Yasar Sirin D, Kaplan N, Caliskan T, Ozdemir C, Akyuva Y, Ates O: Are radio-contrast agents commonly used in discography toxic to the intact intervertebral disc tissue cells? Basic Clin Pharmacol Toxicol 124:181-189, 2019
- Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY: Toxicity of the acetyl-para-aminophenol group of medicines to intact intervertebral disc tissue cells. Exp Ther Med 21:147, 2021
- Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Ozbek H, Kaplan N, Kaya YE, Akyuva Y, Gurbuz MS, Oznam K, Ates O: Pregabalin treatment for neuropathic pain may damage intervertebral disc tissue. Exp Ther Med 16:1259-1265, 2018
- Li B, Yang X, Zhang P, Guo J, Rong K, Wang X, Cao X, Zhou T, Zhao J: Engeletin alleviates the inflammation and apoptosis in intervertebral disc degeneration via inhibiting the NF- κ B and MAPK pathways. J Inflamm Res 15:5767-5783, 2022
- Liu J, Yu P, Dai F, Jiang H, Ma Z: Tetrandrine reduces oxidative stress, apoptosis, and extracellular matrix degradation and improves intervertebral disc degeneration by inducing autophagy. Bioengineered 13:3944-3957, 2022
- Ozdam K, Sirin DY, Yilmaz I, Kaya YE, Isyar M, Gumustas SA, Ozbek H, Akkaya S, Kayhan A, Mahirogullari M: Iopromide- and gadopentetic acid-derived preparates used in MR arthrography may be harmful to chondrocytes. J Orthop Surg Res 12:98, 2017

13. Pereira DR, Silva-Correia J, Caridade SG, Oliveira JT, Sousa RA, Salgado AJ, Oliveira JM, Mano JF, Sousa N, Reis RL: Development of gellan gum-based microparticles/hydrogel matrices for application in the intervertebral disc regeneration. *Tissue Eng Part C Methods* 17:961-972, 2011
14. Qian K, Tang CY, Chen LY, Zheng S, Zhao Y, Ma LS, Xu L, Fan LH, Yu JD, Tan HS, Sun YL, Shen LL, Lu Y, Liu Q, Liu Y, Xiong Y: Berberine reverses breast cancer multidrug resistance based on fluorescence pharmacokinetics in vitro and in vivo. *ACS Omega* 6:10645-10654, 2021
15. Sirin DY, Karaarslan N: Evaluation of the effects of pregabalin on chondrocyte proliferation and CHAD, HIF-1 α , and COL2A1 gene expression. *Arch Med Sci* 14:1340-1347, 2018
16. Tokur O, AKSOY A: *In vitro* sitotoksosite testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg* 6:112-118, 2017
17. Yang G, Li Z, Mei H, Ye W, Huang S, Liu K, Tan Q: Bupivacaine at clinically relevant concentrations induces toxicity in human intervertebral disc cells via the induction of autophagy in vitro. *Mol Med Rep* 20:837-843, 2019
18. Yılmaz I, Karaarslan N, Yasar Sirin D, Ozbek H: Pharmacomolecular assessment of the effects of anandamide and its antagonists on hippocampal tissue in Wistar albino rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24:11871-11882, 2020
19. Yılmaz I, Akalan H, Karaarslan N, Yasar Sirin D, Kaplan N, Dogan M, Ozbek H, Ates O: Can transcription factors in the intervertebral disc of lopinavir/ritonavir prevent degeneration in the nucleus pulposus by mediating the regulation of inflammation through signaling pathways? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26: 6845-6855, 2022
20. Yılmaz I, Akalan H, Oznam K, Karaarslan N, Yasar Sirin D, Ozbek H: Does oseltamivir protect human chondrocyte and nucleus pulposus cells from degeneration by inhibiting senescence and proinflammation mediated by the NLRP3 inflammasome and NF- κ B? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26: 4816-4827, 2022
21. Yılmaz I, Karaarslan N: Examining the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on anabolic and catabolic signaling pathway proteins associated with degenerative disc disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 26: 2990-3000, 2022
22. Yuan X, Li T, Shi L, Miao J, Guo Y, Chen Y: Human umbilical cord mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-26a-5p via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell pyroptosis through METTL14/NLRP3. *Mol Med* 27:91, 2021
23. Zamboni F, Ren G, Culebras M, O'Driscoll J, O'Dwyer J, Ryan EJ, Collins MN: Curcumin encapsulated polylactic acid nanoparticles embedded in alginate/gelatin bioinks for in situ immunoregulation: Characterization and biological assessment. *Int J Biol Macromol* 221:1218-1227, 2022