

İntervertebral Disk Dejenerasyonunda Ferroptozun Rolü

The Role of Ferroptosis in Intervertebral Disc Degeneration

ÖZ

Patofizyolojisi incelendiğinde, intervertebral disk dejenerasyonunun, demire bağımlı bir mekanizma ve reaktif oksijen türlerinin birikmesiyle ortaya çıkan düzenlenmiş hücre ölümü olan ferroptoz ile güçlü bağlantısı dikkat çekmektedir. Bir oligometalloprotein olan hemoglobin, demir taşıyan dört adet "hem" molekülü ile iki alfa-iki beta polipeptit zincirinden oluşan "globin" molekülünden meydana gelmektedir. Özellikle herniye olan nükleus pulpozusdaki neovaskülarizasyon neticesi yükselen hem değerleri, sitotoksikite ve ferroptozu indükleyerek dejenerasyonu hızlandırabilir. Bu çalışmada, intervertebral disk dejenerasyonunda ferroptozun rolü üzerine odaklanılması amaçlandı.

Anahtar Sözcükler: Anulus fibrozus, Ferroptoz, İntervertebral disk dejenerasyonu, Nükleus pulpozus

ABSTRACT

Examination of its pathophysiology points to a strong connection of intervertebral disc degeneration with ferroptosis, a regulated cell death that occurs through an iron-dependent mechanism and the accumulation of reactive oxygen species. Hemoglobin, an oligometalloprotein, consists of four iron-carrying heme molecules and a globin molecule consisting of two alpha-two beta polypeptide chains. Increased heme values, especially as a result of neovascularization in the herniated nucleus pulposus, can accelerate degeneration by inducing cytotoxicity and ferroptosis. This study aimed to focus on the role of ferroptosis in intervertebral disc degeneration.

Keywords: Annulus fibrosus, Ferroptosis, Intervertebral disc degeneration, Nucleus pulposus

GİRİŞ

İntervertebral disk (İVD) dejenerasyonu (İVDD)'nin bel ağrısına yol açan önemli bir faktör olduğu araştırmalarda gösterilmiştir. Mevcut tedavi modalitelerinde bu fizyopatolojik duruma karşı kullanılan analjezik ajanlar ile ağrı yönetiminin tamamen yüz güldürücü sonuçlar vermemesi ya da uygulanan cerrahi girişimlerin azımsanmayacak nüks oranı ile iyileşmeyi tam olarak gerçekleştirememesi kaçınılmaz olabilmektedir. Anulus fibrozus (AF), nükleus pulpozus (NP) ve kırıldak uç plakası (*end-plate*)'ndan meydana gelen avasküler İVD yapısı, fenotipik ve genotipik birçok farklı sebepten dejenerasyona uğrayabilmektedir. İVDD fizyopatolojisinin ortaya konulması ile farklı tedavi prosedürlerinin gelişmesi ve bu sayede İVD rejenerasyonu fayda sağlanması beklenmektedir.

Ferroptoz, lipid peroksidlerin demir (Fe^{2+})'e bağlı birikimi ile karakterize edilen, düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Apoptoz veya nekroz gibi diğer hücre ölümü türlerinden farklı olup son dönem araştırmalarda nörodejeneratif bozukluklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojiler ile ilişkilendirilmiştir. İVD hücrelerinde yapılan oksidatif stres çalışma mo-

dellerinde, ferroptozun İVDD'ye yol açtığı ve ferroptoz inhibitörlerinin kullanımıyla düzelmenin görüldüğü bildirilmiştir (8).

Bu çalışmada, İVDD'de ferroptozun etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı. Literatürün özetlenmesi esnasında, MEDLINE (*National Library of Medicine*[®] ve PubMed[®]) ve Google Akademik veri tabanları kullanıldı. Konuya ilişkin anahtar kelimeler ile ardışık taramalar gerçekleştirildi ve 28.01.2024 tarihine kadar yayımlanmış kanıt düzeyi yüksek olan araştırmalardan elde edilen veriler değerlendirmeye alındı. Sadece "Ferroptosis" anahtar kelimesi ile arama gerçekleştirildiğinde 2002-2024 yılları arasında 10.551 adet araştırmaya rastlandı. Bunlardan sadece altısının randomize kontrollü çalışma olduğu anlaşıldı. "Ferroptosis" anahtar kelimesi ile *and/or* varlığında "intervertebral disc degeneration" anahtar kelimesi eklenerek gerçekleştirilen ardışık taramalar sonucunda ise 2020-2024 yılları arasında sadece 49 adet araştırma gerçekleştirildiği ve bunlardan hiçbirinin randomize kontrollü çalışma olmadığı görüldü. Benzer taramalar "ferroptosis" *and/or* "nucleus pulposus" anahtar kelimeleri ile literatür incelendiğinde ise 30 adet ve randomize kontrollü olmayan araştırmaya rastlandı. İVDD'de, hücre dışı matriksi (ECM) bozulması,

enflamasyon, apoptoz ve hücre yaşlanma (*cell senescence*) şeklinde patolojik değişiklikler görülür. ECM metabolizmasının dengesinin korunması önemli olup, bozulduğunda İVD hücreleri, otofaji ve apoptozu neden olan agrekan ve tip II kolajen (Col2A1) sentezinin azalması ile artan ekspresyona yol açan tip I kolajen (Col1A1) ve matriks metalloproteinaz (MMP)'lar gibi çok sayıda proinflatuar faktör salgılayabilir. Bu sitokinler, İVDD'yi daha da hızlandıran nötrofil, makrofaj, bağışıklık hücreleri olan T ve B hücrelerini uyabilir (3).

Apoptoz gibi düzenlenmiş hücre ölümü (RCD), organogenez ve homeostazisin sürdürülmesi gibi fizyolojik süreçlerde kritik öneme sahiptir. RCD türü olan ferroptoz, Fe^{2+} bağımlı, kaspazdan (apoptoz enzim sistemi) bağımsız, apoptotik olmayan bir hücre ölümüdür. Ferroptoz ilk olarak Dixon ve ark. tarafından 2012 tarihinde apoptoz ve nekrozdan farklı, düzenlenmiş hücre ölümünün yeni bir formu olarak tanımlanmıştır. Ferroptozun; hücre zarının Fe^{2+} 'ye bağlı lipid peroksidasyonu, kararsız Fe^{2+} birikimi, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu, glutatyonun tükenmesi, mitokondriyal büzülme ve mitokondriyal zarın artan yoğunluğu ile karakterize edilen süreçleri kapsadığı bildirilmiştir (2).

Ferroptoz, dejeneratif, onkolojik ve iskemik vasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynarken, son zamanlarda İVDD'deki rolü artan bir ilgi görmektedir (10,13). İVD'nin merkezinde bulunan NP hücreleri, proteoglikanlar ve aksiyel kompresyon kuvvetlerine direnme fonksiyonu olan Col-2A1'den oluşur. NP, İVDD'nin en önemli ögesi olarak görülür. Araştırmalarda insan NP dokularının tek hücreli sekans analizi yapılarak İVDD patogenezinde ferroptozun rolü açıklanmaya çalışılmıştır (14). İVD'nin dışını sararak intradiskal basıncı koruyan fibröz bir doku olan AF, NP'nin laterale doğru genişlemesini önlemede önemli bir rol oynar. Çok sayıda AF hücresi ve kolajenden zengin bir matriks içermektedir. AF hücre dejenerasyonunda, İVD hücrelerinde azalma, matriks parçalayıcı enzimlerde artış ve enflamasyon gibi patolojik olaylar meydana gelebilir (1).

Kondrositler ve ECM'den oluşan, hiyalin kırıkdağa benzeyen kırıkdağ uç plakaları, omurga boyunca mekanik yükleri dağıtıp, İVD'lere besin sağlar. Oksidatif stres ile uç plak kondrosit otofajisinin, kırıkdağ uç plak dejenerasyon ve kalsifikasyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. AF yırtılması ve enflamasyon, kırıkdağ uç plak dejenerasyonu ile ROS üretimini

indükleyerek NP hücrelerinde oksidatif stresi artırır bu da mitokondriyal apoptozu tetikleyerek, hücre yaşlanmasına sebep olur denilmiştir (4). ROS, oksidatif stres ve otofajinin, ferroptoz sürecine katıldığı belirtilmiştir (6) (Şekil 1).

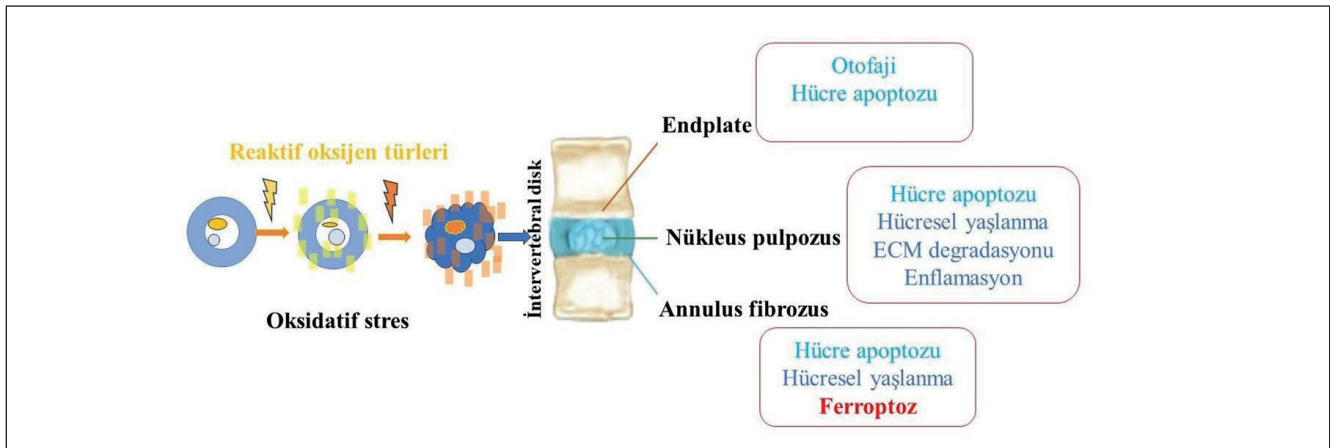
Demir eksikliği apoptozu aktive ederek İVDD patogenezinde yer alırken, aşırı demir seviyesi de ROS aracılığı ile asidik şartlarda Fe^{2+} iyonunun hidrojen peroksitle reaksiyonu olan, toksikolojik açıdan da önemli bir radikal oluşum reaksiyonu, Fenton oksidasyonu sonucu ferroptozu neden olabilmektedir.

Ferritinofaji olarak tanımlanan süreç ise, spesifik reseptör protein olan ve androjen reseptör aktivatörü olarak da bilinen nükleer reseptör koaktivatörü 4 (NCOA4)'ün aracılık ettiği ferritin, yeni bir otofajik bozulması olarak kabul edilmektedir. Bu otofajik formunda NCOA4; ferritini otofagozomlara taşıyan ve oksidatif stres sırasında lipid peroksidasyonuna bağlı serbest Fe^{2+} 'in salınmasına aracılık eden ferritinofajiyi başlatabilen seçici bir ferritin kargo reseptörüdür. İVD hücrelerinde oksidatif stres oluştuğunda NCOA4, otofagozomlara daha fazla ferritin taşıyıp serbest Fe^{2+} miktarını artırarak, ferroptozu neden olmaktadır şeklinde belirtilmiştir (5,11).

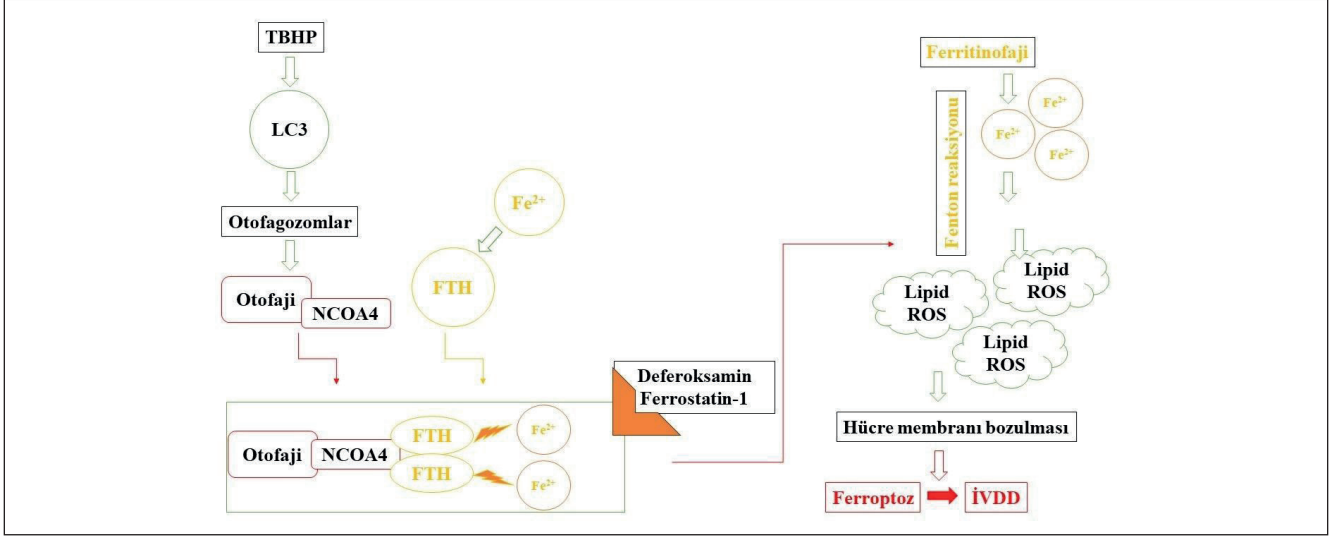
Kanser kemoterapisi için bir ilaç adayı prototipi olan Ras seçici öldürücü küçük molekül 3 (*RAS-selective lethal-3*; RSL-3)'ün, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4)'ü etkisiz hâle getirerek ferroptozu tetikleyebileceğine dair raporlar literatürde yerini almıştır (9).

Tert-butyl hidroperoksit (TBHP), RSL3 gibi ferroptozu indükleyen ajanlar ile gerçekleştirilen indüklenmiş oksidatif strete, artan lipid peroksidasyonunun ferroptoz belirteci olan protein seviyelerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, İVDD patogenezinde ferritinofaji aracılı ferritin bozulmasının ardından lipid peroksidasyonunun olası rolünü desteklemiştir. Lipid onarım enzimi olan GPX4'ün lipid hidroperoksidasyonunu azaltarak ferroptozu baskılayan önemli bir biyobelirteç olduğu raporlanmıştır.

Dolaşımdaki transferrine bağlı olan ferrik demir (Fe^{3+}), transferrin reseptörü-1 (TFR1) vasıtasıyla hücrelere aktarılabilir ve ferroz demir (Fe^{2+})'e indirgenir. İki değerlikli metal taşıyıcı (*Divalent metal transporter 1*; DMT1), endozomdan Fe^{2+} salınımı ile sitoplazmada kararsız Fe^{2+} birikimine yol açar. Aşırı Fe^{2+} , ferritin



Şekil 1: Oksidatif stresin aşırı ROS birikimine bağlı İVD hücrelerinde, hücre yaşlanmanın, apoptozun ve ferroptozun indüklenmesi (11).



Şekil 2: İVDD sürecinde TBHP'nin indüklediği AF ve NP hücrelerinin ferroptozunun altında yatan mekanizma. LC3, mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir-3'ü simgelemektedir (12).

hafif zincir (FTL) ile ferritin ağır zincir-1 (FTH1) şeklinde Fe²⁺ depolama protein kompleksi ferritininde depolanır. Demirin dışarı verilmesi membran proteini olan ve demiri oksitleyebilen ferroportin aracılığı ile olur. Ferrostatin-1, deferoksamin gibi Fe²⁺ şelatörleri ile aşırı Fe²⁺ yükünün azaltılması ve glutaminyolizinin inhibe edilmesi yoluyla miyokardiyal, böbrek hasarı modellerinde hasarın önlenildiği belirtilmiştir (Şekil 2). Bu tür çalışmalar İVDD tedavisinde, ferroptozun inhibe edildiği yeni yöntemlerin kullanılmasının, mümkün olabileceğini göstermektedir (12).

Siçanlardan ve omurga ameliyatı geçiren kişilerden alınan NP dokuları analiz edilerek İVDD'de ferroptoz ve immün infiltrasyonun rolünün araştırıldığı, NP dokusu immün infiltrasyonunda rolü olan majör genler ile ferroptoz ilişkili genlerin incelendiği bir çalışmada İVDD dokusu ve kontrol grup karşılaştırılmıştır (7). Bu çalışmada 1815 genin up-regüle, 1241 genin down-regüle olmak üzere toplam 3056 genin İVDD ve normal dokuda diferansiyel olarak eksprese edildiği belirlenmiştir. Bu genlerin çoğunun ise hücre döngüsünün düzenlenmesi, apoptoz, nekroptoz, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K/Akt), hipoksiyle indüklenen faktör 1 (HIF-1) sinyal yollarında fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (7).

Aynı çalışmada ferroptoz ile ilişkili 16 genin up-regüle, beş genin ise down-regüle edildiği raporlanmıştır. IL-1 β tedavisi sonrası NP hücrelerinde NCOA4 ve poli C bağlayıcı protein 1'in protein ekspresyon seviyelerinin yükseldiği, GPX4'ün protein ekspresyon seviyesinin azaldığı belirtilerek, ciddi İVDD'nin; prekürsör T-hücrelerinde yüzey farklılaşma antijeni CD8A, hafıza CD4⁺ hücrelerinde CCR7, doğal öldürücü (NK) hücrelerde Granzyme B (GZMB), makrofajlarda CD163 ve CD45 ekspresyonunda kayda değer artışa yol açtığı ileri sürülmüştür. Bu durumun, İVDD'de meydana gelen ferroptozun, immün infiltrasyonu tetikleyerek dejeneratif sürecin ilerlemesine neden olacağı kabul edilmiştir (7).

Hem kaynaklı ferroptoz etkisini açıklamak için yapılan araştırmalarda; yüksek çözünürlüklü, Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI) – Uçuş Zamanlı (TOF) Kütle Spektrometresi (MS) ve farklı moleküler yöntemlere ek klinik uygunluk analizi kullanılarak, hemoglobin ve hem piklerinin

yoğunluğu ile Pfirrmann disk dejenerasyon sınıflandırması arasındaki yakın ilişki gösterilmeye çalışılmıştır. İlave olarak glutatyon, araşidonik asit, sfingozin, çoklu doymamış yağ asidi, Krebs döngüsü metabolitleri gibi ferroptozla ilişkili metabolit düzeylerindeki farklılıklar da kaydedilmiştir. Bu şekilde dejenerasyon disk dokusunda prooksidan bir ortam olduğu gösterilmektedir. İnsan nükleus pulpozus hücrelerinde hem kaynaklı ferroptozun doğrulandığı ve bunun mekanizmasının çentik (Notch) geni sinyal yolağı üzerinden olabileceği bildirilmiştir (8).

Sonuç olarak; ferroptoz ve hücre yaşlanması arasındaki ilişki karmaşıktır ve tam olarak anlaşılabilir değildir. Bazı çalışmalar, ferroptozun, özellikle oksidatif stres ve ROS birikimi bağlamında hücre yaşlanmasının uyarılmasına katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir. Ek olarak yaşlanan hücreler, metabolik durumlarındaki değişiklikler ve artan oksidatif stres nedeniyle ferroptozla karşı daha savunmasız olabilir. Ancak bu alandaki araştırmalar devam etmektedir ve ferroptoz ile hücre yaşlanması arasındaki kesin etkileşim, moleküler farmakoloji alanında hâlen aktif bir araştırma alanıdır. Ferroptoz, İVDD patogenezinde suçlanmıştır. Ferroptozun temel özellikleri olan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu, dejenerasyon intervertebral disklerde gözlenir. Bu, ferroptoz ile İVDD'nin ilerlemesi arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu göstermektedir. İVDD'yi hafifletmek/durdurmak ya da tersine çevirmek için terapötik potansiyele sahip hedef yollar olabileceğinden, ferroptoz mekanizmalarını anlamak ve hedeflemek amacıyla farmakorejeneratif araştırmalar devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chen J, Yang X, Feng Y, Li Q, Ma J, Wang L, Quan Z: Targeting ferroptosis holds potential for intervertebral disc degeneration therapy. *Cells* 11:3508, 2022
2. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B 3rd, Stockwell BR: Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 149:1060-1072, 2012

3. Fan C, Chu G, Yu Z, Ji Z, Kong F, Yao L, Wang J, Geng D, Wu X, Mao H: The role of ferroptosis in intervertebral disc degeneration. *Front Cell Dev Biol* 11:1219840, 2023
4. Kang L, Liu S, Li J, Tian Y, Xue Y, Liu X: Parkin and Nrf2 prevent oxidative stress-induced apoptosis in intervertebral endplate chondrocytes via inducing mitophagy and antioxidant defenses. *Life Sci* 243:117244, 2020
5. Kang R, Kroemer G, Tang D: The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network. *Free Radic Biol Med* 133:162-168, 2019
6. Lee YS, Kalimuthu K, Seok Park Y, Makala H, Watkins SC, Choudry MHA, Bartlett DL, Tae Kwon Y, Lee YJ: Ferroptotic agent-induced endoplasmic reticulum stress response plays a pivotal role in the autophagic process outcome. *J Cell Physiol* 235: 6767-6778, 2020
7. Liu XW, Xu HW, Yi YY, Zhang SB, Wang SJ: Role of ferroptosis and immune infiltration in intervertebral disc degeneration: Novel insights from bioinformatics analyses. *Front Cell Dev Biol* 11: 1170758, 2023
8. Shan L, Xu X, Zhang J, Cai P, Gao H, Lu Y, Shi J, Guo Y, Su Y: Increased hemoglobin and heme in MALDI-TOF MS analysis induce ferroptosis and promote degeneration of herniated human nucleus pulposus. *Mol Med* 27:103, 2021
9. Vučković AM, Bosello Travain V, Bordin L, Cozza G, Miotto G, Rossetto M, Toppo S, Venerando R, Zaccarin M, Maiorino M, Ursini F, Roveri A: Inactivation of the glutathione peroxidase GPx4 by the ferroptosis-inducing molecule RSL3 requires the adaptor protein 14-3-3 ϵ . *FEBS Lett* 594:611-624, 2020
10. Wang W, Jing X, Du T, Ren J, Liu X, Chen F, Shao Y, Sun S, Yang G, Cui X: Iron overload promotes intervertebral disc degeneration via inducing oxidative stress and ferroptosis in endplate chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 190:234-246, 2022
11. Xiang Q, Zhao Y, Lin J, Jiang S, Li W: The Nrf2 antioxidant defense system in intervertebral disc degeneration: Molecular insights. *Exp Mol Med* 54:1067-1075, 2022.
12. Yang RZ, Xu WN, Zheng HL, Zheng XF, Li B, Jiang LS, Jiang SD: Involvement of oxidative stress-induced annulus fibrosus cell and nucleus pulposus cell ferroptosis in intervertebral disc degeneration pathogenesis. *J Cell Physiol* 236:2725-2739, 2021
13. Yu X, Xu H, Liu Q, Wang Y, Wang S, Lu R, Jiang Y, Kang H, Hu W: circ_0072464 shuttled by bone mesenchymal stem cell-secreted extracellular vesicles inhibits nucleus pulposus cell ferroptosis to relieve intervertebral disc degeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2022:2948090, 2022
14. Zhang Y, Han S, Kong M, Tu Q, Zhang L, Ma X: Single-cell RNA-seq analysis identifies unique chondrocyte subsets and reveals involvement of ferroptosis in human intervertebral disc degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 29:1324-1334, 2021