

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Silimarin SLIT2 Proteinini Aktive Ederek ve CXCR4 Ekspresyonunu Baskılayarak A549 Hücrelerini İnhibe Etti

Sedat KAÇAR¹, Nuriye Ezgi BEKTUR AYKANAT²

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.

² Atılım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ÖZET

Akciğer kanseri, dünya çapında hem erkeklerde hem de kadınlarda kansere bağlı önde gelen ölüm nedenlerindedir. SLIT2/ROBO1 sinyali, çeşitli kanser tiplerini inhibe ettiği bildirilen çok önemli bir yolaktır. CXCR4, kanser ilerlemesinde rol oynayan bir kemokin reseptörüdür. Silimarin, başta karaciğer hastalıkları olmak üzere akciğer kanseri de dahil çeşitli kanserlerde anti-kanserojen aktivitesi öne sürülen bir fitokimyasaldır. Ancak silimarinin akciğer kanserinde SLIT2-ROBO1-CXCR4 eksenindeki etkisini inceleyen çalışma bulunmamaktadır. Burada amacımız silimarinin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik ve morfolojik etkilerini araştırmak ve SLIT2-ROBO1-CXCR4 yolundaki rolünü ortaya çıkarmaktır. İlk olarak, silimarinin doz analizi için 24, 48 ve 72 saat uzunluğunda sitotoksikite testleri yapıldı. Ardından değişen dozlarda silimarin ile morfolojik değerlendirme için hücreler H-E ile boyandı. Daha sonra SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 proteinleri için western blot ve immünohistokimya analizleri yapıldı. MTT analizine göre, A549 hücrelerine karşı silimarinin IC₅₀ konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaları için sırasıyla 930.1, 432.1 ve 99.8 µM olarak saptandı. H-E boyama yapılarak morfolojik olarak incelendiğinde sitoplazmik vakuoller, küçülmüş heterokromatin çekirdek ve bazofilik sitoplazmalı hücreler gözlemlendi. 750 µM silimarin ile SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 proteinleri için Western blot ve immünohistokimya analizleri yapıldı. 750 µM silimarin, kontrol grubuna kıyasla SLIT2 ve ROBO1 ekspresyonlarını artırırken CXCR4'ü azalttı. Sonuç olarak silimarin, SLIT2 ve ROBO1 protein ekspresyonunu aktive ederek ve CXCR4 ekspresyonunu inhibe ederek A549 hücrelerini doza bağlı olarak inhibe etmiştir. Silimarinin akciğer kanseri üzerindeki etkileri literatürde belirtilmiştir. Ancak bu çalışma, A549 hücrelerinde SLIT2-ROBO1-CXCR4 proteinleri ile silimarin arasındaki etkileşimi inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızın bundan sonraki araştırmalara yeni ufuklar açacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri. A549. Silimarin. SLIT 2. ROBO 1. CXCR4.

Silymarin Inhibited A549 Cells by Activating SLIT2 Protein and Suppressing Expression of CXCR4

ABSTRACT

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death in both men and women worldwide. SLIT2/ROBO1 signaling is a crucial pathway that has been reported to inhibit various types of cancer. CXCR4 is a chemokine receptor involved in cancer progression. Silymarin is a phytochemical that has been suggested to have anti-carcinogenic activity in various cancers, especially liver diseases and lung cancer. However, there is no study examining the effect of silymarin on the SLIT2-ROBO1-CXCR4 axis in lung cancer. Here, our aim is to investigate the cytotoxic and morphological effects of silymarin on A549 cells and to reveal its role in the SLIT2-ROBO1-CXCR4 pathway. Firstly, 24, 48 and 72 hour long cytotoxicity tests were performed for silymarin dose analysis, followed by H-E staining for morphological evaluation with varying doses of silymarin. According to MTT analysis, IC₅₀ concentrations of silymarin against A549 cells were determined as 930.1, 432.1 and 99.8 µM for 24, 48 and 72 hours administration, respectively. When stained with H-E, cytoplasmic vacuoles, shrunken heterochromatin nuclei and cells with basophilic cytoplasm were observed. Then, western blot and immunocytochemistry analyzes were performed for SLIT2, ROBO1 and CXCR4 proteins with 750 µM silymarin. 750 µM silymarin increased SLIT2 and ROBO1 expressions while decreased CXCR4 compared to control group. In conclusion, silymarin dose-dependently inhibited A549 cells by activating SLIT2 and ROBO1 protein expression and inhibiting CXCR4 expression. The effects of silymarin on lung cancer have been reported in the literature. This is the first study to examine the interaction between SLIT2-ROBO1-CXCR4 proteins and silymarin in A549 cells. We believe that our study will open new horizons for future researches.

Key Words: Lung cancer. A549. Silymarin. SLIT2. ROBO1. CXCR4.

Geliş Tarihi: 14.Temmuz.2021

Kabul Tarihi: 11.Ekim.2021

Dr. Sedat KAÇAR
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Oduņpazarı,
Eskişehir
Tel: 0507 520 40 56
E-posta: skacar@ogu.edu.tr

Yazarların ORCID Bilgileri

Sedat KAÇAR: 0000-0002-0671-8529

Nuriye Ezgi BEKTUR AYKANAT: 0000-0003-1453-7311

Akciğer kanseri, dünya çapında gelişmiş ve az gelişmiş ülkelerde hem erkeklerde hem de kadınlarda kansere bağlı önde gelen ölüm nedenlerindedir. Yeni teşhis edilen tüm kanserlerin yaklaşık %13'ünü oluşturan ikinci en yaygın kanserdir¹. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) ve küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur. NSCLC, adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomu içeren tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini temsil eder^{2,3}. Klinik uygulamada, akciğer kanserinde uygulanan klasik kemoterapi tek başına tedavide etkin bir başarı sağlamamakta ve hatta birçok kanser tipinin direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu nedenle alternatif tedavi araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır².

Apoptoz ve nekroz hücreler arası mekanizmalarla yürütülen hücre ölüm tipleridir. Apoptoz, esas olarak vücudun doku homeostazını düzenleyen hücre kaynaklı veya hücre dışı tetikleyiciler yoluyla meydana gelen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır⁴. Nekroz ise hücre içi materyallerin hücreler arası alana sızarak inflamatuvar doku tepkisini indükleyen bir hücrel yaralanma şeklidir⁵. Antikanser aktivite gösteren ilaçların üretiminde apoptozisin tetiklenmesi ilaç geliştirilmenin ana araştırma odaklarından biridir⁶. Bir antikanser ajana maruz kalan hücreler apoptotik süreçte girdiğinde hücre membranlarının parçalanması, kromatin ve nükleer yoğunlaşma gibi apoptozun fizyolojik ve morfolojik değişiklikleri meydana gelir⁵.

Deve dikenini ya da *S. marianum* [L.] Gaertn tohumlarından ekstre edilen silimarin, binlerce yıldır çeşitli hastalıklarda kullanılan bir bitkidir⁷. Silimarin içerisinde HPLC tekniği ile belirlenmiş silibin A, silibin B, izosilibin A, izosilibin B, silikristin, izosilikristin, siliadinin ve bir flavonoid olan taksifolinini içeren 7 adet flavonolignan bulunur^{7,8}. Günümüzde Avrupa'da karaciğer hasarına neden olan ilaçları kullanan hastalarda tamamlayıcı tedavi/koruma ajanı olarak silimarin kullanılmaktadır⁹. 2014-2020 yılları arasında uluslararası alanda yapılan çalışmalarda silimarine 15000'den fazla atıfta bulunulmuştur. Bunlar arasında silimarinin kronik karaciğer hastalıkları, siroz ve hepatosellüler karsinom gibi çeşitli karaciğer hastalıklarının yanı sıra anti-inflamatuvar, anti-oksidan, anti-viral ve meme, gastrointestinal, melanoma, ovarian, prostat gibi farklı kanser tiplerinde anti-kanser özellik gösterdiği belirtilmiştir^{5,7,10-16}. Daha spesifik olarak silimarin ve türevleri kanserin gelişimi veya ilerlemesinde yer alan çeşitli yollar üzerinde kemosenitize özelliği ile rol oynayabilir¹⁷⁻¹⁹.

Bir tümör baskılayıcı gen olan *Slit guidance ligand 2* (SLIT2)'den sentezlenen SLIT2 proteini, reseptörü ROBO1'e bağlanarak ve daha sonra hücre içi sinyal yollarını tetikleyerek birçok malignitenin apoptoz, anjiyogenezinde ve nörogenezde çeşitli roller oynadığı belirtilmiştir²⁰. C-X-C kemokin reseptörü tip 4 (CXCR4), stromal kaynaklı faktör 1'in (SDF1) bağlandığı bir kemokin reseptördür²¹. Epitelial hücreler,

hematopoitik kök hücreler, lenfositler ve kanser hücreleri de dahil olmak üzere sayısız hücre bu reseptörü ekspres eder²². Normal hücrel süreçlerle ilgili olayların yanı sıra, metastaz, kanser ilerlemesi, anjiyogenez ve sağkalım gibi kanserojeniz olaylarında da rol oynar^{16,21}.

Silimarinin akciğer kanseri üzerindeki etkileri literatürde belirtilmiştir^{23,24}. Bu çalışmamızda, A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde silimarinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi ve SLIT2-ROBO1-CXCR4 sinyal mekanizması üzerindeki rolünü araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Hücre Kültürü

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri ATCC firmasından satın alındı. A549 hücre hattı %10 (h/h) Fetal Bovine Serum ve %1 (h/v) penisilinstreptomisin içeren F-12K hücre medyumunda 37 °C'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatör içerisinde çoğaltıldı. Medyum, hücre ortamındaki fenol kırmızısının renk değişimine bağlı olarak haftada 2-3 kez yenilendi. Pasajlama işleminde, hücreleri kaldırmak için %0.05 tripsin/0.53 mM EDTA solüsyonu kullanıldı.

MTT testi

MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıklıkla kullanılan ve spektrofotometre ile ölçülen kolorimetrik sitotoksitesite testidir. MTT, hücreler tarafından aktif olarak emilen bir maddedir. Mitokondriyal reaksiyonla renkli, suda çözünmeyen bir formazana indirgenir. Hücre canlılığı, her hücrenin MTT indirgeme özelliği ile ölçülür ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile orantılıdır²⁵.

Silimarin A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksitesitesi veya hücreler üzerindeki canlılığı arttırıcı etkisi MTT yöntemi ile belirlendi. MTT testinde deney her bir örnek grubu için 3 defa tekrarlandı. A549 hücreleri kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra hücelere silimarinin farklı dozları (0, 75, 100, 125, 200, 250, 500, 750 ve 1000 µM) uygulandı. Hücreler, 96'lı plakanın her bir kuyusuna 1/10 MTT eklenecek şekilde 37 °C'de 4 saat inkübe edildi (Boster Biyolojik Teknoloji, Pleasanton, CA, USA, Katalog # AR1156). Kuyucuklarda oluşan formazan tuzu kristalleri mikroskop altında kontrol edildi ve ardından bu kristalleri çözmek için 100 µL DMSO uygulandı. Sonunda, 96 kuyucuklu plaka bir mikropilaya okuyucusunda (800TS, BioTek Instruments, Winooski, VT, US) 570 nm'de analiz edildi. Silimarin ile muamele edilmiş kuyulardan okunan optik yoğunluk, kontrole karşı canlı hücrelerin yüzdesine dönüştürüldü. Elde edilen veriler,

Silimarin ve Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonu

kontrolün ortalama % fraksiyon±standart hata sapması olarak ifade edildi^{16,26}. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalarda $\sim 5 \times 10^3$ hücre/kuyu yoğunluğunda çoğaltıldı ve değişen silimarin dozlarına (0, 500, 600, 750, 800 ve 1000 μM) maruz bırakıldı. Daha sonra plakalardaki silimarin uygulanmamış ve uygulanmış hücreler, inverted mikroskopla (ZEISS Axiovert 135, Oberkochen, Almanya), morfolojik değişiklikler ve hücre yoğunluğu açısından incelendi.

Sitokimyasal Boyama

A549 hücreleri morfolojik analiz için hematoksilen ve eozin (H-E) ile boyandı. Hücreler, 6 kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde 5×10^3 hücre/kuyu yoğunluğunda çoğaltıldı ve 24 saat boyunca değişen silimarin dozlarına (0, 500, 600, 750, 800 ve 1000 μM) maruz bırakıldı. Daha sonra, soğuk %100 metanol ile 10 dakikalık fiksasyonun ardından hücreler ardışık olarak 4 dakika hematoksilen ve 5 dakika eozin ile boyandı. Sonunda, hücreleri içeren lameller distile su ile yıkayıp kurutuldu ve su bazlı kapama maddesi ile kapatıldı. Hücrelerdeki değişimler morfolojik olarak çekirdek, sitoplazma ve hücre uzantılarındaki değişimlere göre değerlendirildi^{27,28}.

İmmünotokimyasal Boyama

Hücreler, 6 kuyucuklu plakalarda lameller üzerinde 5×10^3 hücre/kuyu yoğunluğunda çoğaltıldı ve 24 saat boyunca 750 μM silimarin uygulandı (IC₅₀'den daha düşük ancak anlamlı hücre ölümünün görüldüğü doz olmasından dolayı bu doz seçilmiştir.). Silimarin uygulanmayan grup, kontrol grubu olarak görev yaptı. Daha sonra hücreler, 10 dakika boyunca soğuk %100 metanol ile sabitlendi, ardından 5 dakika boyunca %0.1 Triton X-PBS ile inkübe edildi. 10 dakikalık Ultra-V ile bloklandıktan sonra, ROBO1 (1:1000, ab7279, Abcam, Cambridge, MA, ABD), SLIT2 (1:1000, GTX118220, GeneTex, Irvine, CA, ABD) ve CXCR4 (1:1000, YID1000, YL biont, Şangay, Çin) primer antikorları hücrelere gece boyunca +4 °C'de uygulandı. Biotinli sekonder antikor ile 10 dakika muamele edildikten sonra PBS ile yıkandı. Ardından streptavidin-peroksidaz reaktifi (TP-125-HL, Thermo Scientific, USA) ile 10 dakika inkübe edildi. 5 dakika AEC ile inkübe edildikten sonra çeşme suyu ile yıkayarak reaksiyon durduruldu. Hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı. Su bazlı kapama maddesi ile kapatıldıktan sonra 40× büyültmede mikroskopik görüntüler Olympus BX51 mikroskobu kullanılarak alındı.

Hücre lizatının hazırlanması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda büyütüldü ve hücrelere 24 saat boyunca silimarin uygulandı. Silimarin uygulanmamış hücrelerden oluşan bir flask kontrol grubu olarak görev yaptı. Flasktaki hücreler soğuk PBS ile hassas bir şekilde yıkandı, flask yüzeyinden kaldırıldı ve 300x g'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Daha sonra pelet soğuk RIPA lizis tamponunda (sc-

24948, Santa Cruz Biotechnology, CA, ABD) proteaz inhibitör kokteyli (K284-1, BioVision, Milpitas, CA, ABD) ile buz üzerinde toplam 30 saniye aralıklarla 5 dakika şiddetli çalkalanarak süspansiyon edildi. Hücre kalıntılarında kurtulmak için +4 °C'de 16.000 x g'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Protein seviyeleri, Qubit® Protein Test Kiti (Q33211, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kılavuzuna göre Qubit® Fluorometer (Qubit 2.0 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) ile ölçüldü. Hazırlanan hücre lizatları -20 °C'de saklandı.

Western blot

Western blot ile SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 proteinlerinin ifadeleri ölçülmüştür. β -merkaptoetanol ve yükleme tamponu içerisinde hücre lizatı eritildi ve kaynar suda 100 °C'de 5 dakika ısıtılarak lineerleştirildi. Her kuyucuğa 50 μg protein yüklendi ve %7,5 sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel kullanıldı. Jeldeki proteinler Poliviniliden Florür (PVDF) Transfer Membrana aktarıldı. Transferin etkinliği jelin coomassie blue ile boyanmasıyla kontrol edildi. Transferden sonra membranlar taze hazırlanmış %5 bovine serum albümin (BSA) içinde oda sıcaklığında 1 saat bloke edildi. Her biri 10 dakika süreyle 3 kez TBST (Tris-tamponlu salin, %0.1 Tween 20) yıkamasından sonra membranlar, immün boyamada kullanılan aynı marka antikorlar olan SLIT2, ROBO1 ve CXCR4'e karşı primer antikorlarla +4°C'de gece boyu çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün, her biri 10 dakika süreyle 3 kez TBST yıkamasından sonra, membranlar bir keçi anti-tavşan, HRP ile konjuge sekonder antikor (1:5000, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, CA, ABD) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, zarlardaki ilgili protein bantları, C-DiGit Blot Tarayıcı (LICOR Biosciences, Lincoln, NE, ABD) aracılığıyla kemoluminesans olarak gösterildi. Protein bantları, Image Studio Lite Yazılımının 5.2 sürümü kullanılarak analiz edildi. Silimarin uygulanan grupların kat değişimi, kontrolün kat değişimi bir olarak kabul edilerek hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıp dağılmadığını belirlemek için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Tüm verilerin normal olarak dağıldığı gözlemlendi. Normal olarak dağılan veriler tek yönlü ANOVA ile analiz edildi, ardından varyansın homojenliğine göre Tukey veya Games-Howell testi yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

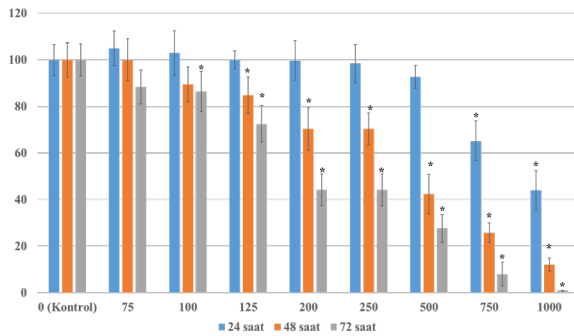
Bulgular

MTT Sitotoksosite Sonuçları

A549 hücrelerinde süreye (24, 48 ve 72 saat) ve doza (0, 75, 100, 125, 200, 250, 500, 750 ve 1000 μM) bağlı silimarin analizi gerçekleştirdik. Şekil 1'de hücre

canlılığının yüzdeleri ve istatistiksel anlam düzeyi gösterilmektedir.

24 saat uzunluğundaki MTT sonucuna göre IC₅₀ dozu 930.1 µM'dır. 75 ve 100 µM silimarin hücre proliferasyonuna neden olsa da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Kontrol, 125 ve 200 µM silimarin uygulaması sonucunda hücre canlılığı birbirine yakın olarak bulundu. 250 ve 500 µM silimarin uygulaması hücrelerde bir miktar ölüme neden olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Ancak 750 ve 1000 µM silimarin hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür (p<0.05) (Şekil 1).



Silimarin Dozları (µM)	24 h		48 h		72 h	
	Hücre Canlılığı (ortalama±SS)	p	Hücre Canlılığı (ortalama±SS)	p	Hücre Canlılığı (ortalama±SS)	p
Kontrol (0 µM)	100.0 ± 6.7	1.05	100.0 ± 7.3	1.08	100.0 ± 6.9	1.07
75	105 ± 7.5	1.15	100.1 ± 9	1.08	88.4 ± 7.3	1.07
100	103 ± 9.6	1.13	89.5 ± 7.5	0.085	86.5 ± 8.7	0.047*
125	100 ± 3.9	1.12	84.9 ± 7.8	0.043*	72.5 ± 7.8	0.044*
200	99.78 ± 8.5	0.99	70.4 ± 9.2	0.041*	44.3 ± 6.8	0.04*
250	98.45 ± 8.2	1.02	70.4 ± 6.9	0.042*	44.3 ± 6.8	0.038*
500	92.7 ± 5	0.85	42.4 ± 8.4	0.03*	27.7 ± 5.9	0.027*
750	65.2 ± 8.5	0.049*	25.8 ± 4.2	0.026*	8.0 ± 5	0.024*
1000	44.1 ± 8.4	0.028*	12.2 ± 2.8	0.026*	0.9 ± 0.1	0.019*

Şekil 1.

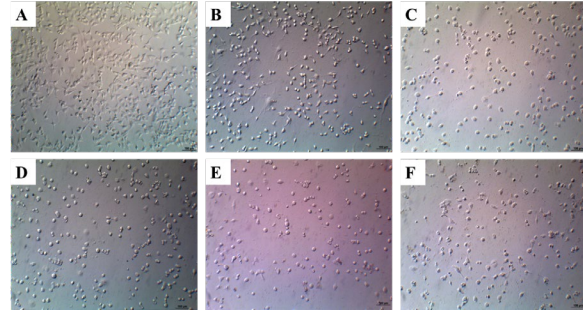
24, 48 ve 72 saat boyunca farklı silimarin dozları uygulanmış A549 hücrelerinin canlılığı ve istatistiksel anlamlılık dereceleri. Sonuçlar ortalama±SS olarak görüntülenir. *kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında p<0.05'lik istatistiksel farklılıkları gösterir.

48 saat süren MTT sonucunda IC₅₀ dozu 432.1 µM'dır. Kontrol ve 75 µM silimarin uygulaması sonucunda hücre canlılığı birbirine yakındı. 100 µM silimarin uygulaması hücrelerde bir miktar ölüme neden olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Ancak 125- 1000 µM aralığındaki silimarin dozları hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür (p<0.05) (Şekil 1).

72 saatlik MTT'de IC₅₀ dozu 99.8 µM'dır. 75 µM silimarin uygulaması hücrelerde bir miktar ölüme neden olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Ancak 100- 1000 µM aralığındaki silimarin dozları hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür (p<0.05) (Şekil 1).

İnverted mikroskoptaki mikrograflar 3 tekrarlı olarak alındı. Şekil 2'de inverted mikroskoptan alınan görüntüler gösterilmektedir. Görüntülerde görüldüğü gibi silimarin (0, 500, 600, 750, 800 ve 1000 µM dozların-

da) A549 hücrelerinin yoğunluğunu azaltmıştır. Kontrol grubunda (0 µM) iğ şeklindeki hücreler çok miktarda bulunurken, artan dozlarda silimarin (500-1000 µM) hücre sayısını azaltmış ve hücreler yuvarlak morfolojiye sahip olmuştur (Şekil 2).

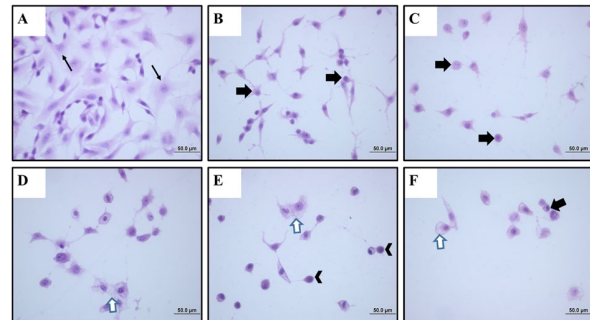


Şekil 2.

Inverted mikroskoptan alınan silimarin uygulanmış A549 hücrelerinin mikrografları. Silimarin uygulanmamış (0 µM) hücreler (A), 500 µM (B), 600 µM (C), 750 µM (D), 800 µM (E) ve 1000 µM (F) silimarin uygulanmış A549 hücreleri. Silimarin uygulanan hücrelerde hücre yoğunluğunda bir azalma belirginidir. (Bar= 100 µm, 100x).

Sitokimya Bulguları

Kontrol grubundaki (0 µM silimarin) A549 hücreleri asidofilik sitoplazmaya, ökromatik çekirdeklere ve sitoplazmik uzantılara sahiptir. Artan dozlarda uygulanan silimarinin (500, 600, 750, 800, 1000 µM) hücre ölümüne neden olduğu süreç içerisinde meydana gelen hücre hasarları, hücre uzantılarının geri çekilmesi, heterokromatin çekirdek, yuvarlak hücre morfolojisi, sitoplazmada vakuoller ve bazofilik sitoplazma şeklindedir (Şekil 3).



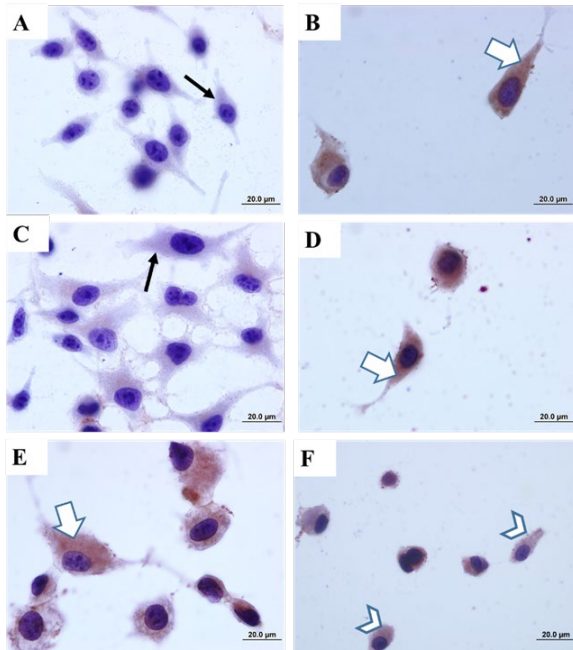
Şekil 3.

Silimarin uygulanmış A549 hücrelerinin hematoxilen-eozin (H-E) ile boyanmış mikrografları. Silimarin uygulanmamış (0 µM) ökromatik çekirdekli ve düzenli sitoplazmalı A549 hücreleri (A). 500 µM (B), 600 µM (C) ve 1000 µM (F) silimarin uygulaması sonucunda büzülmüş hücreler (siyah kalın ok). 750 µM (D) uygulanan silimarinin neden olduğu küçülmüş heterokromatin çekirdek ve bazofilik sitoplazma (ok başı). 750 µM (D), 800 µM (E) ve 1000 µM (F) silimarin uygulaması sonucunda sitoplazmada görülen vakuoller (beyaz kalın ok). (Bar= 50 µm, 400x).

Silimarin ve Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonu

İmmünohistokimya Bulguları

Silimarin uygulanmamış kontrol grubu ve 750 µM silimarin (IC₅₀'den daha düşük ancak anlamlı hücre ölümünün görüldüğü doz olmasından dolayı bu doz seçilmiştir.) uygulanan A549 hücreleri SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 ekspresyonları karşılaştırıldığında kontrol grubu hücrelerinde minimal reaksiyon gözlenirken, 750 µM silimarin hücre sitoplazmalarında yoğun reaksiyona sebep olmuştur. Bu da silimarinin hücre ölümüne neden olurken SLIT2- ROBO1 yolağını aktive ettiğini göstermektedir. CXCR4 ekspresyonuna baktığımızda ise kontrol grubunda yoğun boyanma gözlenirken, 750 µM silimarin CXCR4 ekspresyonunu oldukça azaltmıştır. Silimarinin bu etkisi anti-metastatik etkisi olduğunu düşündürmektedir²⁹⁻³² (Şekil 4).



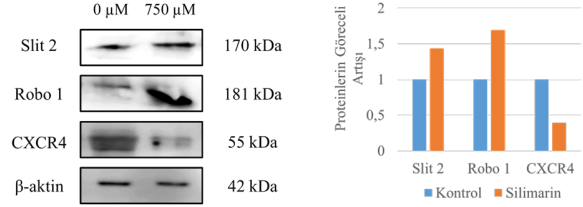
Şekil 4.

Silimarin uygulanmış A549 hücrelerinin immünohistokimya boyanması. SLIT2 boyanması (A-B). Kontrol grubu hücreleri (A), Boyanma göstermeyen hücreler (ince ok). 750 µM silimarin uygulanmış (B) ve yoğun boyanma gösteren hücreler (kalın ok). ROBO1 boyanması (C-D). Kontrol grubu hücreleri (A), Boyanma göstermeyen hücreler (ince ok). 750 µM silimarin uygulanmış (B) ve yoğun boyanma gösteren hücreler (kalın ok). CXCR4 boyanması (E-F). Kontrol grubu hücreleri (E) yoğun boyanma gösteren hücreler (kalın ok). 750 µM silimarin uygulanmış (F) kısmen boyanma gösteren hücreler (ok başı). (Bar= 20µm, 1000x).

Western Blot Bulguları

Silimarin uygulanmamış kontrol grubu ve 750 µM silimarin (IC₅₀'den daha düşük ancak anlamlı hücre ölümünün görüldüğü doz olmasından dolayı bu doz seçilmiştir.) uygulanan A549 hücreleri SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 protein ekspresyonlarındaki deği-

şim western blot yöntemiyle karşılaştırılmıştır. 750 µM silimarin SLIT2 miktarını kontrol grubuna göre 1.43 kat artırırken, ROBO1 miktarını 1.69 kat arttırmıştır. CXCR4 protein ekspresyonuna baktığımızda ise 750 µM silimarin CXCR4 protein ekspresyonunu yaklaşık 0.6 kat düşürmüştür (Şekil 5).



Şekil 5.

750 µM silimarin uygulandıktan sonra kontrol grubu ile karşılaştırılan SLIT2, ROBO1 ve CXCR4 protein bantları.

Tartışma ve Sonuç

Silybum marianum'un biyoaktif bir bileşeni olan flavonolignan silimarin, kemosenitize edici, antioksidan ve anti-inflamatuvar potansiyellere sahiptir³³. Ayrıca bir fitokimyasal olarak konsantrasyona bağlı anti-apoptotik ve hücre taşıyıcıları değiştirici, serbest radikal süpürücü, lipid peroksidasyonunu inhibe edici, hücrel membran stabilitesini artırıcı ve steroid benzeri aktivitelere sahiptir³⁴. Son zamanlarda, doğal kaynaklardan elde edilen bileşiklerin, hücrelerin hiperproliferasyonunu, bunların neoplastik dönüşümünü ve ayrıca karsinogenezi engellediği rapor edilmiştir³.

Yüzlerce yıl önce hepatoprotektan ve zehirli yılanların ısırıklarına karşı tedavi ajanı olarak kullanılan silibinin, yeni oral biyoyararlı formülasyonlarda kullanıldığında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve beyin metastazı olan hastalarda yakın zamanda önemli klinik aktivite göstermiştir³⁵.

Mekanik olarak, silibinin kanser önleyici aktivitesi, başlangıçta, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzenleyicilerinin baskılanmasına aracılık edip akciğer tümörü ekspresyonunun azalmasına neden olduğu belirtilmiştir³⁶.

Silibininin kanser hücre kültürü çalışmalarında ve tümör ksenograftlarında inhibitör etki gösterdiği, diğer terapötik ajanların etkinliğini arttırdığı ve prelinik akciğer kanseri modellerinde kanser ilacı direncinin ortaya çıkmasını engellediğini gösteren çalışmaların sayısı günbegün artmaktadır³⁷. A/J farelerinde üretanın neden olduğu akciğer adenokarsinomuna karşın oral silibinin uygulaması, tümörün sayısı ve çapının baskılanmasına neden olmuştur^{23,38}.

Silibininin farklı NSCLC hücre hatlarında etkisinin araştırdığı çalışmalarda mikromolar konsantrasyonların, hücre döngüsünün durmasını indükleyerek ve

sikline bağımlı kinazlar ve bunlara karşılık gelen siklinler dahil çoklu hücre döngüsü düzenleyicilerini modüle ederek hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği belirtilmiştir³⁹. Silibinin yüksek derecede metastatik NSCLC hücrelerinin invazyon ve motilitesi üzerinde doz ve zamana bağlı olarak inhibitör etki göstermiştir⁴⁰.

Diğer çalışmalara paralel olarak bizim çalışmamızda da artan dozlarda uygulanan silimarin NSCLC hücrelerinin ölümüne neden olmuştur. 24 saatte IC₅₀ dozu 930.1 µM, 48 saatte IC₅₀ dozu 432.2 µM ve 72 saatte IC₅₀ dozu 99.8 µM olarak bulunmuştur. Silimarin uygulanmamış kontrol grubunda hücre uzantıları gözlenirken, artan dozlarda silimarin uygulanan hücreler yuvarlaklaşmış, sitoplazmik vakuoller meydana gelmiştir.

SLIT/ROBO sinyal yolu keşfedildiğinde nöron migrasyonunda yön gösterici fonksiyonuyla bulunmuştur⁴¹. Daha sonra non-nöronal hücrelerde *SLIT2*'nin lökositlerin ve vasküler düz kas hücrelerinin kemotaksisini ve medulloblastom hücrelerinin ve meme kanseri hücrelerinin göçünü engellediği bulunmuştur^{42,43}. Ayrıca, *SLIT2* promotör bölgesinin hipermetilasyonu sıklıkla akciğer, meme, kolorektal, nöroblastom, böbrek ve servikal tümörlerde gözlenmiştir⁴⁴. Son zamanlarda, artan sayıda çalışma, SLIT2/ROBO1 sinyal yolunun, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu inhibe ederek tümör oluşumuyla yakından ilgili olduğunu bulmuştur⁴⁵⁻⁴⁷.

SLIT2/ROBO1 yolu, AKT/GSK3β/βTrCP yolundaki β-katenin ve E-kadherin seviyelerinin koordineli regülasyonu ile NSCLC hücre göçünün kontrol edilmesinde önemlidir. *SLIT2*'nin düşük ekspresyonu β-katenin birikimi, düşük E-kadherin seviyesi ve zayıf sağkalım ile ilişkilidir. Bu durum da *SLIT2*'nin NSCLC metastazında prognostik bir biyobelirteç olarak fonksiyon göstereceğini düşündürmektedir⁴⁴. Önceki çalışmalar *SLIT2*'nin tümör baskılayıcı bir gen olduğunu belirtmişlerdir. Tseng ve arkadaşları ilk kez *SLIT2* kaybının NSCLC hastalarında evre ilerlemesi ve öngörülen postoperatif kanser nüksü ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. *SLIT2* içeren besi yeri ortamında hücre motilitesi azalmıştır. Ancak *SLIT2* geninin susturulduğu akciğer kanseri modelinde hücre hareketliliği artmıştır⁴⁴. Invaziv servikal kanser⁴⁸ ve özefagus yassı gücre karsinomunda⁴⁹ *SLIT2* geninin düşük ekspresyonu olduğu gözlenmiştir. *SLIT2* ekspresyonu, medulloblastom hücrelerinin⁴³ invazyonunu ve meme kanseri hücrelerinin göçünü inhibe etmektedir⁴⁴.

Çalışmamızda 750 µM silimarin SLIT2 protein ekspresyonunu kontrol grubuna göre 1.43 kat arttırırken, ROBO1 ekspresyonunu 1.55 kat arttırmıştır. Aynı zamanda immünotokimya yönteminde de 750 µM silimarin SLIT2 ve ROBO1 boyanmasını arttırmıştır. Bu durum silimarinin SLIT2 ve ROBO1 ekspresyonunu arttırdığını ve hücre ölümüne neden olduğunu göstermiştir.

CXCR4 ekspresyonu, çeşitli kanserlerde metastazı indükler⁵⁰. İnhibisyonu, kanseri tedavi etmenin veya kanser ilerlemesini azaltmanın yollarından biri olabilir¹⁶. Çalışmamızda 750 µM silimarin uygulanan hücreler kontrol grubu hücreleri ile kıyaslandığında CXCR4 protein ekspresyonu 2.5 kat düşmüştür. Aynı zamanda kontrol grubu hücreleri şiddetli CXCR4 boyanması gösterirken; 750 µM silimarin uygulanan hücrelerde bu reaksiyon oldukça azalmıştır.

Sonuç olarak devedikeni bitkisinin tohumlarından elde edilen bir flavonoid olan silimarinin, SLIT2 proteinini aktive edip ve metastazla ilişkili bir protein olan CXCR4'ün ekspresyonunu inhibe ederek A549 hücrelerini doza bağlı olarak inhibe ettiğini gözlemledik. Bu çalışma, A549 hücrelerinde SLIT2-ROBO1-CXCR4 proteinleri ile silimarin arasındaki etkileşimi inceleyen ilk çalışmadır. Çalışmamızın bundan sonraki araştırmalara yeni ufuklar açacağına inanıyoruz.

Etik Kurul Onay Bilgisi:

Hücre kültürü çalışması olmasından dolayı Etik Kurul onayına gerek yoktur.

Araştırmacı Katkı Beyanı: Fikir ve tasarım: N.E.B.A., S.K.; Veri toplama ve işleme: S.K.; Analiz ve verilerin yorumlanması: N.E.B.A.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: N.E.B.A, S.K.

Destek ve Teşekkür Beyanı: Bu makalede yer alan çalışmalar herhangi bir proje tarafından desteklenmemiştir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

Kaynaklar

1. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Annals of global health* 2019;85(1).
2. Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Therapeutic intervention of silymarin on the migration of non-small cell lung cancer cells is associated with the axis of multiple molecular targets including class 1 HDACs, ZEB1 expression, and restoration of miR-203 and E-cadherin expression. *Am J Cancer Res* 2016;6(6):1287.
3. Sezer CV. An In Vitro Assessment of the Cytotoxic and Apoptotic Potency of Silymarin and Silymarin Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Pakistan Journal of Zoology* 2021;53(4).
4. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 2019;43(6):582-92.
5. Kim S-H, Choo G-S, Yoo E-S, Woo J-S, Lee J-H, Han S-H, et al. Silymarin inhibits proliferation of human breast cancer cells via regulation of the MAPK signaling pathway and induction of apoptosis. *Oncol Lett* 2021;21(6):1-10.
6. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci* 2018;19(2):448.
7. Bijak M. Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.)—Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules* 2017;22(11):1942.
8. Hackett E, Twedt D, Gustafson D. Milk thistle and its derivative compounds: a review of opportunities for treatment of liver disease. *J Vet Intern Med* 2013;27(1):10-6.
9. Abenavoli L, Izzo AA, Milić N, Cicala C, Santini A, Capasso R. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res* 2018;32(11):2202-13.

Silimarin ve Akciğer Kanseri Hücre Proliferasyonu

10. Esmaeil N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int Immunopharmacol* 2017;50:194-201.
11. Hosseinabadi T, Lorigooini Z, Tabarzad M, Salehi B, Rodrigues CF, Martins N, et al. Silymarin antiproliferative and apoptotic effects: insights into its clinical impact in various types of cancer. *Phytother Res* 2019;33(11):2849-61.
12. Montgomery A, Adeyeni T, San K, Heuertz RM, Ezekiel UR. Curcumin sensitizes silymarin to exert synergistic anticancer activity in colon cancer cells. *J Cancer* 2016;7(10):1250.
13. Kalla PK, Chitti S, Aghamirzaei ST, Senthilkumar R, Arjunan S. Anti-cancer activity of silymarin on MCF-7 and NCIH-23 cell lines. *Adv Biol Res* 2014;8(2):57-61.
14. Kim SH, Choo GS, Yoo ES, Woo JS, Han SH, Lee JH, et al. Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells. *Oncol Rep* 2019;42(5):1904-14.
15. Fan L, Ma Y, Liu Y, Zheng D, Huang G. Silymarin induces cell cycle arrest and apoptosis in ovarian cancer cells. *Eur J Pharmacol* 2014;743:79-88.
16. Kacar S, Aykanat NEB, Sahinturk V. Silymarin inhibited DU145 cells by activating SLIT2 protein and suppressing expression of CXCR4. *Med Oncol* 2020;37(3):1-9.
17. Liakopoulou C, Kazazis C, Vallianou NG. Silimarin and cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 2018;18(14):1970-4.
18. Jahanafrooz Z, Motamed N, Rinner B, Mokhtarzadeh A, Baradaran B. Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator. *Life Sci* 2018;213:236-47.
19. Delmas D, Xiao J, Vejux A, Aires V. Silymarin and cancer: A dual strategy in both in chemoprevention and chemosensitivity. *Molecules* 2020;25(9):2009.
20. Shen X, Li L, He Y, Lv X, Ma J. Raddeanin A inhibits proliferation, invasion, migration and promotes apoptosis of cervical cancer cells via regulating miR-224-3p/Slit2/Robo1 signaling pathway. *Aging (Albany NY)* 2021;13(5):7166.
21. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16(11):2927-31.
22. Lombardi L, Tavano F, Morelli F, Latiano TP, Di Sebastiano P, Maiello E. Chemokine receptor CXCR4: role in gastrointestinal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;88(3):696-705.
23. Verdura S, Cuyàs E, Ruiz-Torres V, Micol V, Joven J, Bosch-Barrera J, et al. Lung Cancer Management with Silibinin: A Historical and Translational Perspective. *Pharmaceuticals* 2021;14(6):559.
24. Mateen S, Raina K, Agarwal R. Chemopreventive and anti-cancer efficacy of silibinin against growth and progression of lung cancer. *Nutr Cancer* 2013;65(sup1):3-11.
25. Khojaste E, Ahmadizadeh C. Catechin Metabolites along with Curcumin Inhibit Proliferation and Induce Apoptosis in Cervical Cancer Cells by Regulating VEGF Expression In-Vitro. *Nutr Cancer* 2021:1-10.
26. Aykanat NEB, Kacar S, Karakaya S, Sahinturk V. Silymarin suppresses HepG2 hepatocarcinoma cell progression through downregulation of Slit-2/Robo-1 pathway. *Pharmacol Rep* 2020;72(1):199-207.
27. Gao T, Zhou X-L, Liu S, Rao C-X, Shi W, Liu J-C. In vitro effects of nicotine on the non-small-cell lung cancer line A549. *J Pak Med Assoc* 2016;66(4):368-72.
28. Tang Y, Fu Q, He W, Sun Y, Wang Y, Wang X. Non-apoptotic programmed cell death induced by extract of *Spatholobus suberectus* in human lung cancer A549 cells. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica* 2008;33(16):2040-4.
29. Shanmugam MK, Manu KA, Ong TH, Ramachandran L, Surana R, Bist P, et al. Inhibition of CXCR4/CXCL12 signaling axis by ursolic acid leads to suppression of metastasis in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Int J Cancer* 2011;129(7):1552-63.
30. Shanmugam MK, Ahn KS, Hsu A, Woo CC, Yuan Y, Tan KHB, et al. Thymoquinone inhibits bone metastasis of breast cancer cells through abrogation of the CXCR4 signaling axis. *Front Pharmacol* 2018;9:1294.
31. Zhu WB, Zhao ZF, Zhou X. AMD3100 inhibits epithelial-mesenchymal transition, cell invasion, and metastasis in the liver and the lung through blocking the SDF-1 α /CXCR4 signaling pathway in prostate cancer. *J Cell Physiol* 2019;234(7):11746-59.
32. Liu Y, Ren C-C, Yang L, Xu Y-M, Chen Y-N. Role of CXCL12-CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis and CXCL12-CXCR4 blockade with AMD3100 suppresses tumor cell migration and invasion in vitro. *J Cell Physiol* 2018;234(4):3897-909.
33. Shah M, Jan H, Drouet S, Tungmunthum D, Shirazi JH, Hano C, et al. Chitosan Elicitation Impacts Flavonolignan Biosynthesis in *Silybum marianum* (L.) Gaertn Cell Suspension and Enhances Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Cell Extracts. *Molecules* 2021;26(4):791.
34. Lama S, Vanacore D, Diano N, Nicolucci C, Errico S, Dallio M, et al. Ameliorative effect of Silybin on bisphenol A induced oxidative stress, cell proliferation and steroid hormones oxidation in HepG2 cell cultures. *Sci Rep* 2019;9(1):1-10.
35. Rugamba A, Kang DY, Sp N, Jo ES, Lee J-M, Bae SW, et al. Silibinin Regulates Tumor Progression and Tumorsphere Formation by Suppressing PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells. *Cells* 2021;10(7):1632.
36. Singh RP, Deep G, Chittezhath M, Kaur M, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM, et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(12):846-55.
37. Bosch-Barrera J, Queralt B, Menendez JA. Targeting STAT3 with silibinin to improve cancer therapeutics. *Cancer Treat Rev* 2017;58:61-9.
38. Tyagi A, Singh RP, Ramasamy K, Raina K, Redente EF, Dwyer-Nield LD, et al. Growth inhibition and regression of lung tumors by silibinin: modulation of angiogenesis by macrophage-associated cytokines and nuclear factor- κ B and signal transducers and activators of transcription 3. *Cancer Prevention Research* 2009;2(1):74-83.
39. Mateen S, Raina K, Jain AK, Agarwal C, Chan D, Agarwal R. Epigenetic modifications and p21-cyclin B1 nexus in anticancer effect of histone deacetylase inhibitors in combination with silibinin on non-small cell lung cancer cells. *Epigenetics* 2012;7(10):1161-72.
40. Chu SC, Chiou HL, Chen PN, Yang SF, Hsieh YS. Silibinin inhibits the invasion of human lung cancer cells via decreased productions of urokinase-plasminogen activator and matrix metalloproteinase-2. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center* 2004;40(3):143-9.
41. Jiang Z, Liang G, Xiao Y, Qin T, Chen X, Wu E, et al. Targeting the SLIT/ROBO pathway in tumor progression: molecular mechanisms and therapeutic perspectives. *Ther Adv Med Oncol* 2019;11:1758835919855238.
42. Qin F, Zhang H, Ma L, Liu X, Dai K, Li W, et al. Low expression of Slit2 and Robo1 is associated with poor prognosis and brain-specific metastasis of breast cancer patients. *Sci Rep* 2015;5(1):1-11.
43. Werbowetski-Ogilvie T, Sadr MS, Jabado N, Angers-Loustau A, Agar N, Wu J, et al. Inhibition of medulloblastoma cell invasion by Slit. *Oncogene* 2006;25(37):5103-12.
44. Tseng R-C, Lee S-H, Hsu H-S, Chen B-H, Tsai W-C, Tzao C, et al. SLIT2 attenuation during lung cancer progression deregulates β -catenin and E-cadherin and associates with poor prognosis. *Cancer Res* 2010;70(2):543-51.

45. Wang LJ, Zhao Y, Han B, Ma YG, Zhang J, Yang DM, et al. Targeting Slit–Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008;99(3):510-7.
46. Mertsch S, Schmitz N, Jeibmann A, Geng J-G, Paulus W, Senner V. Slit2 involvement in glioma cell migration is mediated by Robo1 receptor. *J Neurooncol* 2008;87(1):1-7.
47. Wang Y, Zhang S, Bao H, Mu S, Zhang B, Ma H, et al. MicroRNA-365 promotes lung carcinogenesis by downregulating the USP33/SLIT2/ROBO1 signalling pathway. *Cancer Cell Int* 2018;18(1):1-14.
48. Narayan G, Goparaju C, Arias-Pulido H, Kaufmann AM, Schneider A, Dürst M, et al. Promoter hypermethylation-mediated inactivation of multiple Slit-Robo pathway genes in cervical cancer progression. *Mol Cancer* 2006;5(1):1-10.
49. Kim HK, Zhang H, Li H, Wu T-T, Swisher S, He D, et al. Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma. *Neoplasia* 2008;10(12):1411-20.
50. Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res* 2014;124:31-82.