

Deneysel Araştırma

Adriamisin Uygulanan Sıçanların Böbrek Dokusunda Alfa Lipoik Asit'in Koruyucu Etkisinin DRP1 ile İlişkisi

Elif ERDEM GÜZEL^{1,a}, Nalan KAYA TEKTEMUR², Ahmet TEKTEMUR³, Ramazan Fazıl AKKOÇ⁴

¹Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü, Mardin, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

³Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

⁴Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye

ÖZ

Amaç: Çalışmada, adriamisin (ADR) uygulanan sıçanların böbrek dokularında meydana gelen değişiklikler üzerine alfa lipoik asit (ALA)'nın korucu etkisinin dinamin bağımlı protein 1 (DRP1) ile ilişkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları 4 eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubuna deney süresi olan 28 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. ADR grubuna; 15 mg/kg ADR intraperitoneal (i.p) tek doz uygulandı. ADR+ALA grubuna 15 mg/kg i.p tek doz ADR verilmesinden sonra 50/mg/kg/gün dozunda ALA oral olarak gün aşırı verildi. ALA grubuna ise 50 mg/kg/gün dozunda ALA oral olarak gün aşırı uygulandı. Deney sonunda sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından böbrek dokuları hızla çıkarıldı ve histolojik ve kantitatif RT-PCR analizleri için kullanıldı.

Bulgular: ADR grubuna ait böbrek kesitlerinde inflamatuvar hücre artışı, bowman boşluğunda artış, tübül lümeninde hiyalin birikimi gibi yapısal değişikliklere rastlandı. ALA uygulaması ile histopatolojik bulguların büyük bir çoğunluğunda azalma gözlemlendi. ADR grubunda DRP1 immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterdiği, ADR+ALA grubunda ise ADR grubuna göre anlamlı derecede azalma olduğu belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla ADR grubunda DRP1, BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde istatistiki açıdan anlamlı bir artış tespit edildi. ADR+ALA grubunda ise ADR grubuna kıyasla DRP1, BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde anlamlı bir azalma tespit edildi.

Sonuç: Bu çalışma ADR'nin böbrek dokularında yapısal hasarla birlikte apoptozis ve DRP1 ekspresyon artışına yol açtığı, ALA'nın apoptozis ve DRP1 aktivitelerini düzenleyerek ADR'nin bu zararlı etkilerine karşı büyük oranda koruma sağladığı ortaya koyuldu.

Anahtar Sözcükler: Adriamisin, Böbrek, Apoptozis, Alfa Lipoik Asit, Dinamin Bağımlı Protein 1.

ABSTRACT

The Relation of the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid with DRP1 in the Kidney Tissue of Adriamycin Administered Rats

Objective: In this study, we aimed to investigate the association with DRP1 the protective effect of ALA on kidney tissue of the rats administered with adriamycin.

Material and Method: Twenty eight Sprague-Dawley male rats were used in this study. Animals were divided to four groups. No administration was made to the control group during 28 days. A single dose of 15 mg / kg ADR was given intraperitoneally to the ADR group. After 15 mg / kg ADR was given to ADR + ALA group, 50 mg / kg ALA was given by oral gavage every other day. In the ALA group, 50 mg / kg ALA was administered orally every other day. At the end of the experiment, the rats were decapitated. Following decapitation, histological and quantitative RT-PCR analyzes were done.

Results: Histopathological findings such as inflammatory cell increase, enlargement bowman distance were observed in the ADR group. ALA treatment was found to reduce the majority of histopathological findings. DRP1 immunoreactivity was significantly increased in the ADR group compared to the control group, whereas in the ADR+ALA group, DRP1 immunoreactivity was significantly lower than ADR group. A statistically significant increase was found in DRP1, BAX and CASP3 mRNA levels in the ADR group compared to the control group. A significant decrease was detected in DRP1, BAX and CASP3 mRNA levels in ADR + ALA group compared to the ADR group.

Conclusion: This study revealed that ADR causes apoptosis and increases in DRP1 expression together with histopathological damages in kidney tissues, whereas ALA provides major protection against these effects of ADR by regulating apoptosis and DRP1 activities.

Keywords: Adriamycin, Kidney, Apoptosis, Alfa Lipoic Acid, Dynamine-Related Protein 1.

Bu makale atıfta nasıl kullanılır: Erdem Güzel E, Kaya Tektemur N, Tektemur A, Akkoç RF. Adriamisin Uygulanan Sıçanların Böbrek Dokusunda Alfa Lipoik Asit'in Koruyucu Etkisinin DRP1 ile İlişkisi. Fırat Tıp Dergisi 2021; 26(4): 190-197.

How to cite this article: Erdem Güzel E, Kaya Tektemur N, Tektemur A, Akkoç RF. The Relation of the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid with DRP1 in the Kidney Tissue of Adriamycin Administered Rats. Fırat Med J 2021; 26(4): 190-197.

ORCID IDs: E.E.G. 0000-0002-2097-7818, N.K.T. 0000-0001-8880-4932, A.T. 0000-0002-2476-0413, R.F.A. 0000-0002-0559- 8932.

Adriamisin (ADR), solid tümörler dahil olmak üzere çeşitli hematolojik malignitelerin tedavisinde antineoplastik ajan olarak uzun yıllardır kullanılan bir antineoplastik grubu antibiyotiktir (1). Böbrekler üzerindeki ciddi

yan etkileri ve çeşitli organlardaki toksisitesi nedeniyle klinik kullanımı sınırlıdır (2-4). ADR kaynaklı böbrek toksisitesinin kesin mekanizması bilinmemekle birlikte ana patolojik mekanizmanın oksidatif stres ve reaktif

^aYazışma Adresi: Elif ERDEM GÜZEL, Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Ebelik Bölümü, Mardin, Türkiye

Tel: 0482 213 4002

Geliş Tarihi/Received: 15.10.2020

e-mail: eliferdem@artuklu.edu.tr

Kabul Tarihi/Accepted: 23.09.2021

oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu içerdiği görülmektedir (5). ROS, pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerini etkileyerek ya doğrudan ya da dolaylı olarak mitokondriyal hasara yol açar (6). ROS üretiminin primer kaynağı olan mitokondri metabolik ve hücrel stres tepkilerine hızla yanıt veren, sürekli olarak antagonistik fisyon ve füzyon süreçlerinden geçen son derece dinamik organellerdir (7, 8). Füzyon, artan ATP üretimi ile ilişkiliyken, fisyon bozulmuş oksidatif fosforilasyon ve ROS üretimi ile ilişkilidir (9). Dengeli mitokondriyal dinamikler, fonksiyonel mitokondrinin korunması, enerji üretimi ve apoptozun önlenmesi için kritik rol oynarken, anormal mitokondriyal dinamikler tümör, diabetes mellitus ve pulmoner fibroz gibi çeşitli hastalıkların patogenezi ile ilişkilidir (10, 11). Dinamin bağımlı protein 1 (DRP1), fragmentasyonu sağlamak için mitokondriyal dış zara katılarak fisyonu gerçekleştiren sitoplazmik bir proteindir (11). Artan ROS ile ilişkili mitokondriyal fisyonun mitokondriyal hasara ve fragmentasyona yol açtığı bildirilmiştir (12). Ek olarak, in-vitro ve in-vivo mide kanseri modellerini kullanan çalışmalarda, ADR ile indüklenen apoptozun mitokondriyal fisyon aracılığıyla gerçekleştiği gösterilmiştir (13, 14). Bununla birlikte, ADR kaynaklı mitokondriyal fisyon aracılı apoptozun kesin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır.

Mitokondriyal disfonksiyonu ve oksidatif stresi azaltmak için antioksidan ajanlar ve mitokondriyal hedefli moleküller ADR kaynaklı hasarlarda terapötik bir strateji olarak önerilmiştir. Alfa-lipoik asit (1,2-ditiyolan-3-pentanoik asit, ALA), mitokondride lipoik asit sentaz tarafından üretilen mitokondriyal enzimler için kofaktör olan güçlü bir antioksidandır (15). ALA'nın ve indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asidin terapötik aktivitesi, metal şelatlama kabiliyeti, ROS süpürücü etkisi, oksidatif hasarı onarma yeteneği ve C vitamini, E vitamini ve glutatyon gibi endojen antioksidanların rejenerasyonunu içeren antioksidan özelliklerine dayanmaktadır (16).

ADR'ye bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikal aracılı toksisiteye karşı ALA'nın sitoprotektif etkisi ortaya koyulmuştur (17). Fakat ALA'nın ADR kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisinin böbrek dokusundaki DRP1 ile ilişkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, histolojik ve moleküler analizleri kullanarak ALA'nın ADR ile indüklenen böbrek hasarı üzerindeki muhtemel koruyucu etkisini değerlendirmektir. Ayrıca, DRP1'in terapötik bir hedef olarak önemini ele almak ve böylece çeşitli hastalıkların patogeneziindeki rolünü anlamak için araştırma yaparak, DRP1 gibi hayati araçların ve bunların çevresindeki mekanizmaların ortaya çıkmasına katkı sağlamaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2018/02 sayılı 23 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak yapılmıştır.

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nden temin edilen 200-250 gr ağırlığında 8-10 haftalık 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanları sıçan pelet yemi ve musluk suyu ile beslendikleri 12 saat (07:00-19:00) aydınlık 12 saat (19:00-07:00) karanlıkta, 21±1 °C ortam sıcaklığında tutuldu. Sıçanlar; kontrol, ADR, ADR+ ALA ve ALA olmak üzere rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı (n =7). Kontrol grubuna deney süresi olan yirmi sekiz gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. ADR ve ADR+ALA grubuna deneyin birinci günü 15 mg/kg dozunda adriamisin intraperitoneal (i.p.) olarak tek doz uygulandı. ADR+ALA ve ALA gruplarına ise serum fizyolojikte çözdürülmüş 50 mg/kg dozunda alfa lipoik asit (cat: 29,862 Lot: 002241-20,161,019, DL-a-Lipoic acid, Chem-Impex Int'l Inc, USA) deney süresi olan yirmi sekiz gün boyunca gün aşırı oral gavaj yoluyla verildi (18, 19). Deney süresi sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların böbrek dokuları hızla çıkarılıp bir kısmı histopatolojik değerlendirmeler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alınırken, diğer bir kısmı ise moleküler analizler için -80° C'de muhafaza edildi.

Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirmeler için 24 saat süre ile %10'luk formaldehit içerisinde fikse edilen böbrek dokuları çeşme suyu altında yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopu altında (Novel N-800M x20) incelendi ve fotoğraflandı. Değişiklikler histopatolojik durumlarına göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirilerek histoskor tablosu yapıldı. Tüm histolojik değerlendirmeler, iki araştırmacı tarafından körleme yöntemiyle yapıldı.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Böbrek dokusunda DRP1 immünreaktivitesinin belirlenmesi için, parafin bloklardan polilizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli alkol serilerinden geçirilerek sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksit bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) uygulandı. Zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) işleminden sonra primer antikor (YID5389 lot No: YL190228093, Polyclonal Anti-DRP1 Antibody) damlatılan dokular bir saat oda ısısında karanlık ve nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra dokular sekonder antikor (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) ile muamele edildi. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopu altında (Novel N-800M) incelen-

rek değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor tablosu oluşturuldu.

Kantitatif RT-PCR Yöntemi

Çalışmada DRP1, BCL-2 ilişkili protein X (BAX) ve Kaspase 3 (CASP3) genlerinin mRNA düzeylerindeki ifade farklılıklarının tespiti için qRT-PCR yöntemi kullanıldı.

Total RNA İzolasyonu

-80 °C'de muhafaza edilen sıçan böbrek dokusuna ait örneklerden total RNA izolasyonu için Trizol (MG-TRZ-01, Hibrigen, Türkiye) kullanıldı. Üretici firma tarafından önerilen protokole uyularak RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktarları, nanodrop cihazında (BioSpec-nano, Shimadzu) ölçüldü. Her gruba ait RNA örnekleri, eşit düzeyde total RNA içerecek şekilde, kendidlerine ait havuzlarda toplandı.

Komplementer DNA Sentezi

Çalışmaya konu olan genlerin mRNA düzeylerindeki ifade farklılıklarının tespitinde kullanılan komplementer DNA (cDNA)'lar için her bir grubu temsil eden havuz yapılmış RNA örneklerinden 10 µl kullanıldı. cDNA sentezi, OneScript Plus cDNA sentez kiti (abm, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Komplementer DNA Amplifikasyonu

Elde edilen cDNA'lar, dizi spesifik primerler varlığında qRT-PCR aracılığıyla amplifiye edildi. Sıçan böbrek örneklerindeki mRNA ifade düzeyleri incelenirken Glyceraldehide-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) referans gen olarak kullanıldı (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışmada kullanılan qRT-PCR primerleri.

Primer Adı		Primer Dizisi (5'-3')
GAPDH	FORWARD	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	REVERSE	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTC
DRP1	FORWARD	TGGAAAGAGCTCAGTGCTGG
	REVERSE	ACTCCATTTTCTTCTCCTGTTGT
BAX	FORWARD	GGCTGGACACTGGACTTC
	REVERSE	CAGATGGTGAGTGAGGCA
CASP3	FORWARD	TGCTTACTCTACCGCACCC
	REVERSE	CAACTACCTGATATCAAAGCTGAG

qRT-PCR analizi, 96 kuyucuklu platelerde, toplamda 10 µl hacimde (1 µl cDNA ve 9 µl karışım) üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Bu analiz, 2X Magic SYBR Mix (Procomcure, Avusturya) kullanılarak Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sisteminde üretici firmanın belirttiği protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. Analizler sonucunda mRNA ifadeleri arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

İstatistiksel Analiz

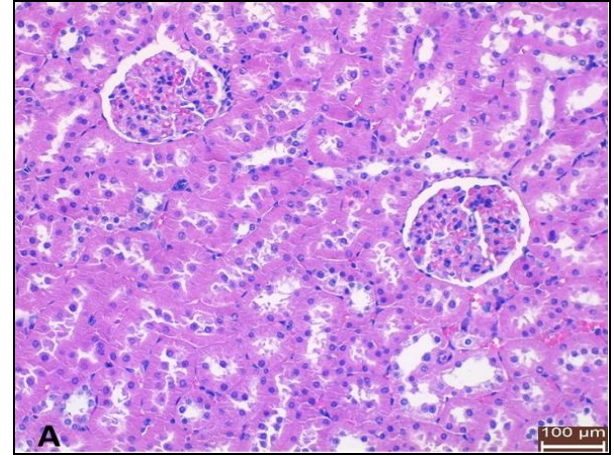
Çalışmada örneklem büyüklüğü hesaplanırken GPower 3.1 (<http://www.gpower.hhu.de/>) programı kullanıldı. Yapılan güç analizine göre, çalışmada kullanılan de-

ğişkenler için %95 güç ve 0.05 anlamlılık belirleyebilmek için her grup için en az 7 adet sıçan çalışmaya alındı. Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programında yapıldı. Elde edilen değerler ortalama \pm standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Normal dağılım gösteren çoklu grupların aralarındaki farklılıkları test etmek için Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), ikili karşılaştırmalar için ise Post-hoc Tukey testi kullanıldı.

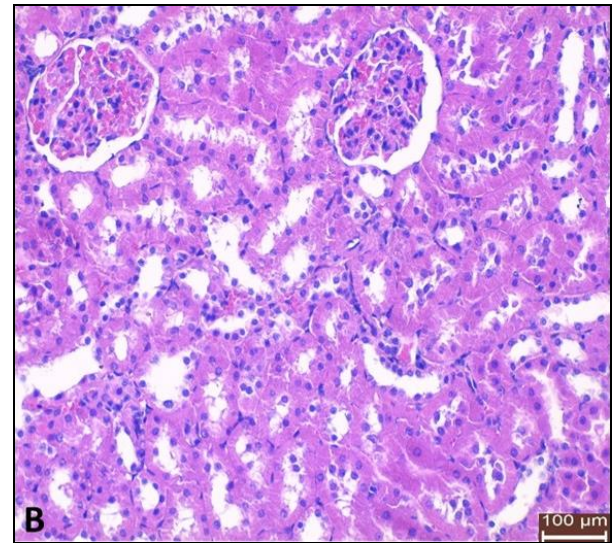
BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Işık mikroskopik incelemede hem kontrol hem de ALA gruplarının böbrek kesitleri için anormal bir histopatolojik bulguya rastlanılmadı. Glomerüller, bowman mesafesi ve tübüler yapılar normal histolojik yapı gösterdi (Şekil 1A ve B).

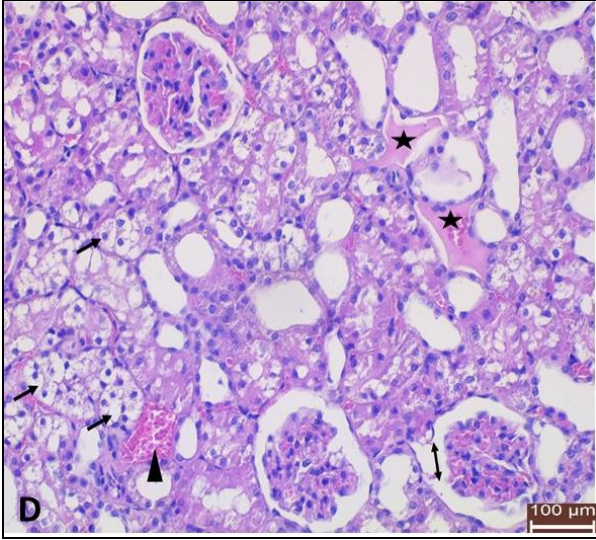


Şekil 1A. ADR ve/veya ALA uygulamalarının sıçan böbrek dokusu üzerindeki etkilerinin fotomikrografları: A; Kontrol grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde glomerül ve tübüler yapılar normal olarak ayırt edildi.

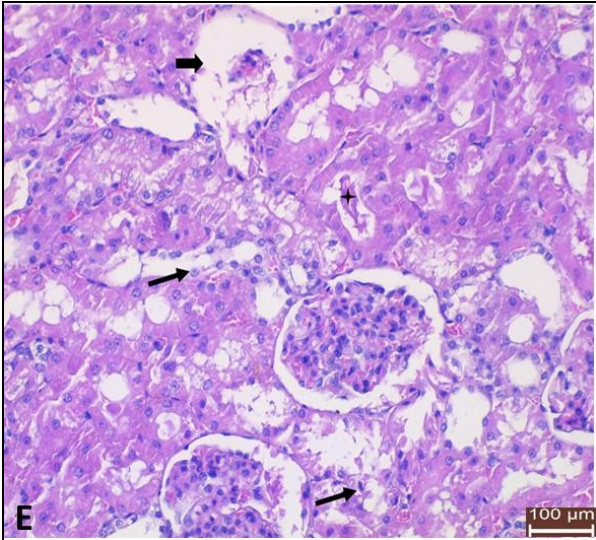


Şekil 1B. ALA grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde glomerüller ve tübüller normal bir histolojik yapı gösterdi.

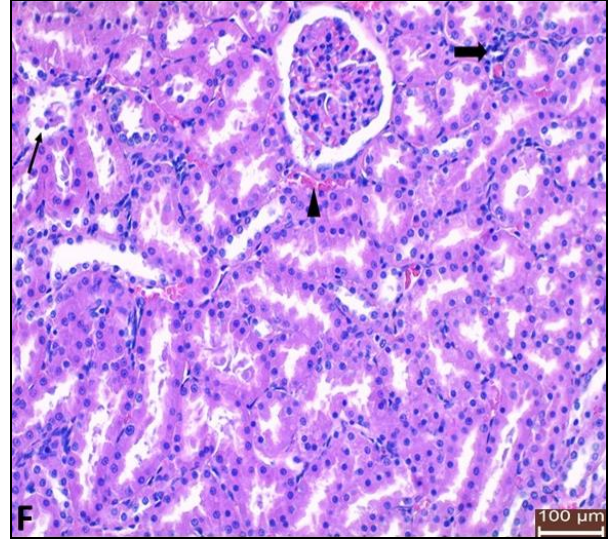
Sadece ADR verilen gruba ait preparatlarda yapılan incelemeler sonucunda renal glomerül ve tübüllerde dejeneratif değişiklikler görüldü. Kesitlerde atrofik glomerüller, renal tübül epitellerinde deskuamasyon ve dejenerasyon, Bowman boşluğunda genişleme, vasküler konjesyon, proksimal tübül epitellerine ait fırçamsı kenarlarında bozulma ve ayrılmalar, tübüllerde hiyalin birikimi, tübüler vakuolizasyon, peritübüler ödem ve intertisyel infiltrasyon bulguları izlendi (Şekil 1D, E, F).



Şekil 1D. ADR grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde peritübüler ödem (yıldız), vasküler konjesyon (ok başı) ve tübüller vakuolizasyon (ince ok) gözlemlendi.

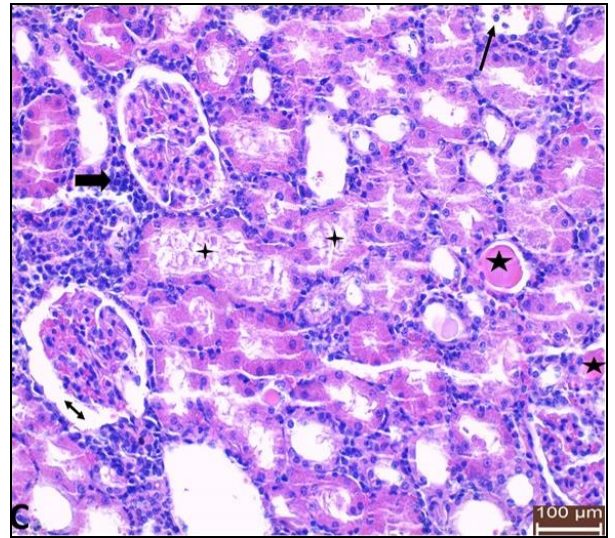


Şekil 1E. ADR grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde renal tübül epitellerinde deskuamasyon ve dejenerasyon (ince ok) ve atrofik glomerül yapıları (kalın ok) izlendi.



Şekil 1F. ADR+ALA grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde hafif derecede intertisyel infiltrasyon (kalın ok), ve vasküler konjesyon (ok başı) ve yer yer renal tübül epitellerinde deskuamasyon (ince ok) izlendi. Sıçanların ALA ile tedavisi ADR kaynaklı histopatolojik değişiklikleri açıkça hafifletti. Hematoksilen & Eozin, x20. ADR: Adriamisin; ALA: Alfa lipoik asit.

ADR+ALA grubuna ait böbreklerin histolojik incelenmesinde tek başına ADR uygulanan grupta gözlenen histopatolojik değişikliklerin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde azalma gösterdiği, sadece bazı alanlarda orta derecede infiltrasyon, vasküler konjesyon ve yer yer renal tübül epitellerinde deskuamasyon bulguları izlendi (sırasıyla; $p = 0.008$, $p = 0.038$, $p = 0.008$) (Şekil 1C).



Şekil 1C. ADR grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde tübüllerde hiyalin birikimi (yıldız), yoğun intertisyel infiltrasyon (kalın ok), proksimal tübül epitellerine ait fırçamsı kenarlarında bozulma ve ayrılmalar (ince yıldız) ve Bowman boşluğunda genişleme (iki başlı ok) gözlemlendi.

Histolojik değerlendirmelere ait histoskor sonuçları tablo 2'de gösterilmektedir.

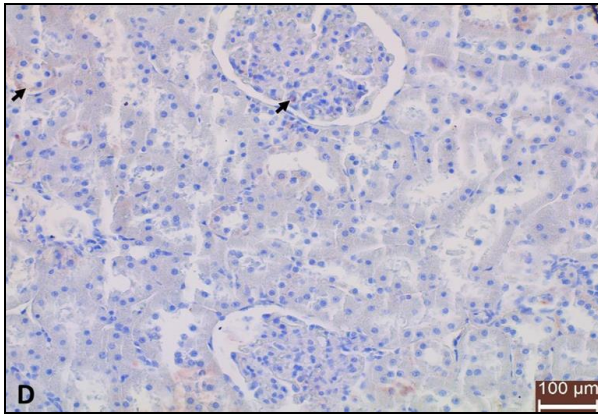
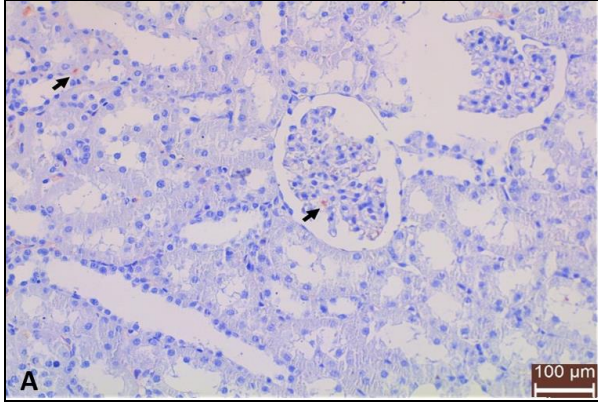
Tablo 2. Böbrek dokusundaki histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.

	Kontrol	ADR	ADR+ALA	ALA
Atrofik glomerüller	0.00±0.00	2.85±0.37 ^a	0.85±0.69 ^{a,b}	0.00±0.00 ^b
Tübül epitelinde deskuamasyon ve dejenerasyon	0.14±0.37	2.28±0.75 ^a	1.14±0.69 ^{a,b}	0.28±0.48 ^b
Bowman boşluğunda genişleme	0.00±0.00	2.14±0.37 ^a	0.57±0.53 ^{a,b}	0.14±0.37 ^b
Vasküler konjesyon	0.00±0.00	2.00±0.57 ^a	1.28±0.48 ^{a,b}	0.00±0.00 ^b
Hiyalin birikimi	0.00±0.00	2.42±0.78 ^a	0.71±0.48 ^{a,b}	0.00±0.00 ^b
Tübüler vakuolizasyon	0.00±0.00	2.00±0.81 ^a	0.42±0.78 ^b	0.00±0.00 ^b
Peritübüler ödem	0.00±0.00	2.00±0.57 ^a	0.57±0.53 ^b	0.00±0.00 ^b
İnteritelyel infiltrasyon	0.00±0.00	2.28±0.75 ^a	1.14±0.37 ^{a,b}	0.00±0.00 ^b

Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b ADR grubuna göre karşılaştırıldığında, * İstatistiksel anlamlılık ($p < 0.05$).

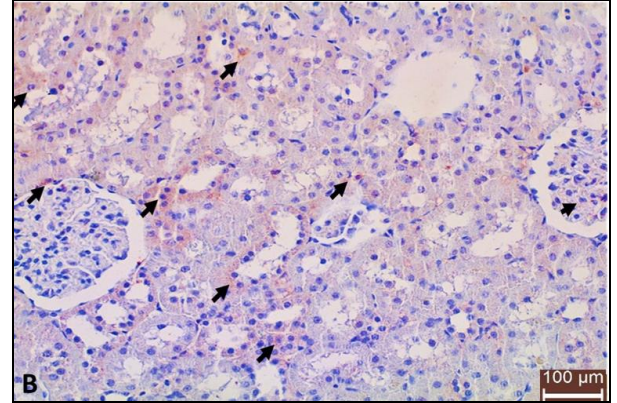
İmmünohistokimyasal Bulgular

DRP1 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; böbrek tübüllerinde ve glomerül yapılarında pozitiflik gözlemlendi (Şekil 2). Kontrol ve ALA grubuna ait DRP1 immünreaktiviteilerinin benzer olduğu gözlemlendi ($p = 0.991$) (Şekil 2A, D).



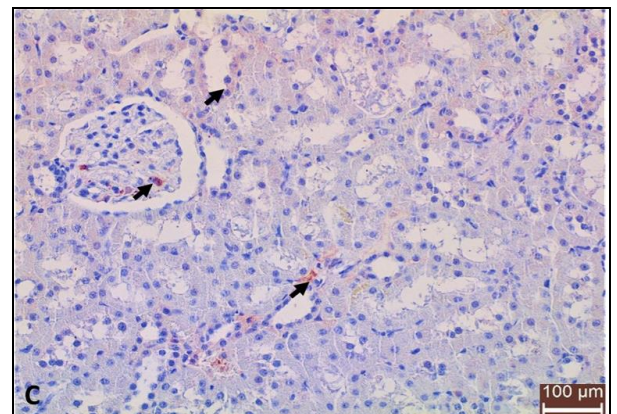
Şekil 2A, D. ADR ve / veya ALA uygulamalarının sıçan böbrek dokusu üzerindeki Drp1 immünreaktivitesine etkileri: Oklar gruplardaki DRP1 immünreaktivitesini göstermekte. Sırasıyla kontrol ve ALA gruplarına ait böbrek tübüllerinde ve glomerül yapılarındaki DRP1 immünreaktivitesinin benzer olduğu ($p > 0.05$) izlendi.

ADR grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış vardı ($p < 0.05$) (Şekil 2B).



Şekil 2B. ADR grubuna ait DRP1 immünreaktivitesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında böbrek tübüllerinde ve glomerül yapılarında istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p < 0.05$) artış olduğu gözlemlendi.

ADR+ALA grubunda ise, ADR grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p = 0.008$) (Şekil 2C) (sırasıyla; 0.48 ± 0.18 , 0.55 ± 0.19 , 2.18 ± 0.48 , 1.31 ± 0.72).



Şekil 2C. ADR+ALA grubuna ait böbrek tübüllerinde ve glomerül yapılarında ADR grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p < 0.05$) azalan DRP1 immünreaktivitesi tespit edildi.

DRP1 immünreaktivite histoskor sonuçları tablo 3'de gösterilmektedir.

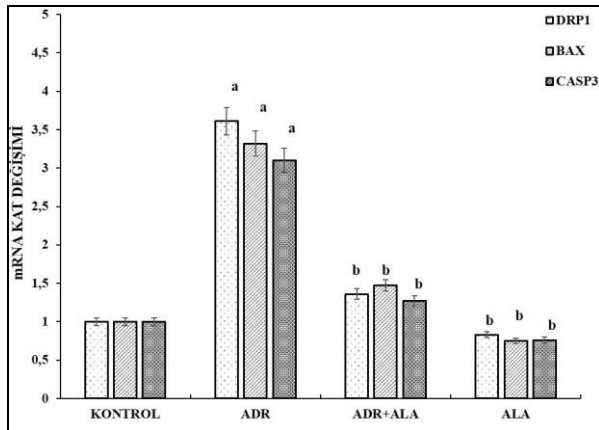
Tablo 3. Gruplardaki böbrek dokusuna ait DRP1 immünreaktivitesi histoskor sonuçları.

Gruplar	Histoskor (yaygınlık x şiddet)
Kontrol	0.48± 0.18
ADR	2.18±0.48 ^a
ADR+ALA	1.31±0.72 ^{a,b}
ALA	0.55± 0.19 ^b

Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b ADR grubuna göre karşılaştırıldığında, * İstatistiksel anlamlılık (p <0.05).

Kantitatif RT-PCR Bulguları

Kontrol grubuna kıyasla, yalnızca ADR grubunda; DRP1, BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış tespit edildi (sırasıyla; p =0.013, p =0.015 ve p =0.018). ADR+ALA grubunda ADR grubuna kıyasla DRP1, BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde (sırasıyla; p =0.024, p =0.038 ve p =0.031) anlamlı bir azalma tespit edildi. ALA grubunda da ADR grubuna kıyasla DRP1, BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde (sırasıyla; p =0.010, p =0.010 ve p =0.011) anlamlı bir azalma belirlendi. ADR+ALA grubuna kıyasla ALA grubunda mRNA düzeylerinin hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi (sırasıyla; p =0.109, p =0.083 ve p =0.121) (Şekil 3).



Şekil 3. ADR ve/veya ALA uygulamalarının sıçan böbrek dokusu üzerindeki ilgili genlerin mRNA ifadeleri üzerine etkileri.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ilk hedefimiz doku hasarında ADR ile ilişkili DRP1 aktivitesi arasındaki bağlantıyı ve azalmış DRP1 ekspresyonları ile ALA'nın koruyucu etkileri arasındaki ilişkiyi göstermekti. Ayrıca, böbrekte ADR'nin neden olduğu doku hasarı ile birlikte bu hasara karşı ALA'nın iyileştirici etkisi histopatolojik değerlendirmelerle ve moleküler analizlerle ortaya koyuldu. Kinin içeren antrasiklin grubu bir antibiyotik olan ADR, 1969'dan beri kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek antitümör etkinliğine rağmen, ADR'nin kemoterapide kullanımı kardiyak, renal, pulmoner, testiküler ve hematolojik toksisite nedeniyle büyük ölçüde sınırlandırılmıştır (1, 2, 19, 20) ADR ile indüklenen nefrotoksitenin kesin mekanizması bilinme-

mekle birlikte, toksisitenin serbest radikal oluşumu, biyolojik makromoleküllerin demire bağlı oksidatif hasarı, membran lipid peroksidasyonu (LPO) ve aşırı miktarlarda üretilen ROS aracılığıyla olabileceğine inanılmaktadır (21). Ayla ve arkadaşlarının (3) yaptıkları çalışmada sıçan böbreklerinde 20 mg / kg tek doz ADR enjeksiyonu ile meydana gelen değişikliklerin artmış bowman boşluğu ve glomerüler kapillerlerde genişleme, tübüllerde dejenerasyon ve vakuolizasyon ile birlikte mikrovillus kaybını içeren bulgular olduğu belirtilmiştir. Diğer çalışmalarda da yine ADR'nin böbrekte glomerüler kapiller permeabilitesinde artışa, tübüler atrofiye, intertisyel lenfositik infiltrasyona, glomerüllerde mezengial genişlemeye ve lümeninde hiyalin birikimine yol açtığı ifade edilmiştir (19, 22, 23). Biz de yaptığımız çalışmada 15 mg/kg i.p ADR uygulamasının böbrek dokusunda tübül epitellerinde dejenerasyon, intertisyel infiltrasyon, geniş intertübüler kanama alanları, glomerüler atrofi, tübüllerde dejenerasyon ve vakuolizasyon, bowman boşluğunda genişleme gibi histopatolojik bulgulara neden olduğunu saptadık. Çalışmamızın sonuçları, ADR grubunda önemli renal hasarlar olduğunu ortaya koydu.

ADR, serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar arasında bir dengesizliğe yol açarak endojen antioksidanların tükenmesine ve doku hasarlarının meydana gelmesine neden olur (24). Bu amaçla antioksidanların koruyucu ajanlar olarak kullanılması, ADR kaynaklı nefrotoksisite için potansiyel bir çözüm olabilir. Enerji üretiminde görev alan, pirüvat dehidrojenaz ve α -ketogluarat dehidrojenaz kompleksleri gibi çeşitli mitokondriyal enzimler için kofaktör olan ALA güçlü bir antioksidandır (15). ALA, serbest radikal hasarını başlatan molekülleri temizleme kabiliyetleri ve LPO'yu önlemesi nedenleriyle oldukça fazla araştırılmış ve yüksek singlet oksijen söndürme sabiti olması nedeniyle de evrensel antioksidan olarak kabul edilmiştir (25). Malarkodi ve arkadaşlarının (26) yaptıkları çalışmada 7.5 mg / kg tek doz ADR uygulaması ile LPO göstergesi olan malondialdehit seviyelerinin arttığı, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz antioksidan enzim aktivitelerinin ise azaldığı, ALA ile yapılan ön tedavinin ise lipid peroksidlerdeki artışı önleyerek ve antioksidan enzim seviyelerini arttırarak ADR'nin neden olduğu nefrotoksisitede etkili bir şekilde iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ALA ile 7 ve 14 günlük ön tedavinin ADR kaynaklı böbrek dokusunda gözlenen histopatolojik bulguları hafiflettiği bildirilmiştir (19). Çalışmamızda ise ADR uygulandıktan sonra tedavi amacıyla kullanılan ALA'nın diğer araştırma sonuçlarına benzer şekilde ADR ile artan histopatolojik bulgularda azalmaya yol açarak koruma sağladığını tespit ettik.

Mitokondri, dokudaki ADR'nin neden olduğu hücre hasarındaki hedeflerden biri olarak tanımlanmıştır (1, 2, 7). Mitokondrinin birçok işlevi, füzyon ve fisyon arasında hassas bir denge olan morfolojileriyle yakından bağlantılıdır (9). Hem mitokondriyal füzyon hem de fisyon, mitokondriyal fonksiyonun sürdürülmesine ve optimizasyonuna katkıda bulunur (27). DRP1, mito-

kondriyal fisyonun önemli bir düzenleyicisidir (13). Kültürlenmiş kas hücrelerinde, mitokondriyal fisyon inhibisyonunun palmitatla indüklenen mitokondriyal disfonksiyona karşı koruma sağladığı bildirilmiştir (28). Bununla birlikte mitokondriyal fisyonun podosit hasarına yol açan önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (29). Yapılan bir çalışmada, mitokondriyal fisyon proteini DRP1 inhibisyonunun aldosteron kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonu ve podosit hasarını baskıladığını bulmuştur (30). Bunun yanı sıra, ADR'nin çeşitli kanser hücrelerinde mitokondriyal fisyonu artırarak mitokondriyal parçalanmaya yol açtığı, bunun altında yatan mekanizmanın ise yüksek miktarda üretilen ROS, serbest radikaller ve peroksinitrit gibi diğer toksik maddelerin olduğu bildirilmiştir (13, 14, 31). Mitokondriyal fisyonun apoptotik süreçlerde de rol oynadığı bilinmektedir (32). DRP1'in hücre stresörlerine maruz kalması üzerine mitokondriyal membran fragmentasyonunu başlatmak için sitozolden mitokondriye yer değiştirdiği, DRP1'in mitokondride birikerek sitokrom c'nin sitozole salınmasını daha da teşvik ettiği ve sonuçta apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (13, 33). Disfonksiyonel mitokondri, fragmentasyon ve membran depolarizasyonu sergiler, büyük miktarlarda ROS üretir ve sonunda mitokondriyal hücre ölüm yolunu aktive eden ADR gibi stresörlere yanıt olarak apoptotik proteinleri (örneğin kaspaz-3) serbest bırakır (34). Mitokondriyal disfonksiyonun ve apoptozun mitokondriyal fisyonu baskılayarak bloke edilmesi böbrek hasarları için potansiyel tedavinin anahtarı olabilir. Bu nedenle biz de çalışmamızda ALA'nın mitokondriyal fisyon üzerindeki etkisini test ettik. ALA'nın ADR ile artan DRP1 ekspresyonlarını azaltarak mitokondriyal fisyon inhibisyonu yoluyla mitokondriyal dinamikleri düzenlemede iyileştirici rol oynayabileceği kanısındayız. Ayrıca ADR grubunda böbrek dokularında apoptozda rol oynayan proapoptotik belirteçlerden olan CASP3 ve BAX mRNA ekspresyonundaki artış, apoptotik hücrelerdeki artışı destekleyen bir bulguydu. Bununla birlikte, ADR grubunda artan DRP1 ekspresyon-

ları ile CASP3 ve BAX mRNA düzeylerindeki artışın paralellik göstermesi DRP1'in yukarıda bahsedilen apoptozu indükleyen ajan olduğu bilgilerini doğrular nitelikte olmuştur. Su ve arkadaşları (35) ADR uygulamasıyla böbrek dokusundaki hücre hasarlarını, bozulan böbrek fonksiyonunu ve histolojisini CASP3 artışına ve CASP3'ü aktive eden ve programlanmış hücre ölümünü başlatan oksidatif stresin indüksiyonuna atfetmişlerdir. Çalışmamızdaki bulgular ADR kaynaklı böbrek dokularında gözlenen histopatolojik bulgular ile artan CASP3 ve BAX ekspresyon düzeyleri arasındaki bağlantı açısından daha önceki araştırmaların verileri ile uyumludur. Ayrıca, ALA tedavisiyle apoptotik CASP3 ve BAX mRNA seviyelerindeki azalma gözlemlendi. ALA uygulamasıyla histopatolojik bulgularda gözlenen iyileşmenin azalan CASP3, BAX ve DRP1 ekspresyon seviyelerinden kaynaklanabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak, moleküler ve histopatolojik bulgularımıza göre ADR, DRP1, CASP3 ve BAX ekspresyonlarını arttırarak böbrek dokusunda ciddi doku harabiyetine neden olmuş ve ALA, mitokondriyal fisyon inhibisyonunda rol oynayarak ve anti-apoptotik özellikleri sayesinde güçlü bir serbest radikal süpürücü olarak ADR kaynaklı böbrek dokusu hasarını azaltmıştır. ALA'nın renal koruyucu etkisini, ADR grubundaki histopatolojik bulguların, DRP1 aktivitesinin ve apoptotik belirteçlerin restorasyonunu sağlayarak gerçekleştirdiği, bu sonuçlarımıza dayanarak da ALA uygulamasının terapötik etkinliği arttırmak ve klinik kemoterapide ADR'nin toksik yan etkilerini azaltmak için etkili bir rejim olabileceği kanısındayız. Bununla birlikte, sonuçlarımızı doğrulamak için daha fazla deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Finansman

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Elazığ, Türkiye [Proje numarası MAÜ. BAP. 18.SYO.010] tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Gharanei M, Hussain A, Janneh O, Maddock HL. Doxorubicin induced myocardial injury is exacerbated following ischaemic stress via opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 149-56.
2. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC et al. A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 48-61.
3. Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol* 2011; 1-9.
4. Miranda CJ, Makui H, Soares RJ et al. Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in ironmetabolism induced by doxorubicin. *Blood* 2003; 102: 2574-80.
5. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009; 16: 3267-85.
6. Xin YF, You ZQ, Gao HY et al. Protective effect of lycium barbarum polysaccharides against doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Phytother Res* 2012; 26: 716-21.

7. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 2001; 52: 159-64.
8. Perry HM, Huang L, Wilson WJ et al. Dynamin-Related Protein 1 Deficiency Promotes Recovery from AKI. *Am Soc Nephrol* 2018; 29: 194-206.
9. Wai T, Langer T. Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27: 105-17.
10. Hu C, Huang Y, Li L. Drp1-dependent mitochondrial fission plays critical roles in physiological and pathological progresses in mammals. *Int J Mol Sci* 2017; 18: 144.
11. Pernas L, Scorrano L. Mito-Morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annu Rev Physiol* 2016; 78: 505-31.
12. Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 341-51.
13. Wang JX, Li Q, Li PF. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain contributes to chemotherapy resistance by abolishing mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein-1. *Cancer Res* 2009; 69: 492-500.
14. Li Q, Wang JX, He YQ et al. MicroRNA-185 regulates chemotherapeutic sensitivity in gastric cancer by targeting apoptosis repressor with caspase recruitment domain. *Cell Death Dis* 2014; 5: 1197.
15. Reed LJ. From lipoic acid to multi-enzyme complexes. *Protein Sci* 1998; 7: 220-4.
16. Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kle-niewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep* 2011; 63: 849-58.
17. Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clinica Chimica Acta* 2005; 360: 160-6.
18. Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM. Possible Protective effect of diace-rein on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Toxicol* 2016; 2016: 9507563.
19. El-Sayed EM, Mansour AM, El-Sawy WS. Alpha lipoic acid prevents doxorubicin-induced nephrotoxicity by mitigation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2017; 31. doi: 10.1002/jbt.21940.
20. Onishi H, Kuriyama K, Yamaguchi M et al. Concurrent two-dimensional radiotherapy and weekly docetaxel in the treatment of stage III nonsmall cell lung cancer: a good local response but no good survival due to radiation pneumonitis. *Lung Cancer* 2003; 40: 79-84.
21. Liu LL, Li QX, Xia L, Li J, Shao L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin induced nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2007; 231: 81-90.
22. Lee VWS, Harris DCH. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 2011; 16: 30-8.
23. Yagmurca M, Yasar Z, Bas O. Effects of quercetin on kidney injury induced by doxorubicin. *Bra-tisl Med J* 2015; 116: 486-9.
24. Karaman A, Fadillioglu E, Turkmen E, Tas E, Yilmaz Z. Protective effects of leflunomide against ischemia reperfusion injury of the rat liver. *Pediatric Surgery International* 2006; 22: 428-34.
25. Kagan V, Shvedova A, Serbinova E et al. Dihydrolipoic acid-A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxyl, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1637-49.
26. Malarkodi KP, Balachandar AV, Sivaprasad R, Varalakshmi P. Prophylactic effect of lipoic acid against adriamycin-induced peroxidative damages in rat kidney. *Renal Failure* 2003; 25: 367-77.
27. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1817: 1833-8.
28. Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 309-19.
29. Ni Z, Tao L, Xiaohui X et al. Polydatin impairs mitochondria fitness and ameliorates podocyte injury by suppressing Drp1 expression. *J Cell Physiol* 2017; 232: 2776-87.
30. Yuan Y, Zhang A, Qi J et al. P53/Drp1-dependent mitochondrial fission mediates aldosterone-induced podocyte injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2018; 314: 798-808.
31. Wang J, Feng C, He Y et al. Phosphorylation of apoptosis repressor with caspase recruitment domain by protein kinase CK2 contributes to chemotherapy resistance by inhibiting doxorubicin induced apoptosis. *Oncotarget* 2015; 6: 27700-13.
32. Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 179-83.
33. Loson OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 2013; 24: 659-67.
34. Xiaoa L, Xua X, Zhanga F et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1. *Redox Biology* 2017; 11: 297-311.
35. Su Z, Ye J, Qin Z, Dingb X. Protective effects of madecassoside against doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific Reports* 2015; 5: 1-14.