

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI;

**ADRIYAMİSİNİN RENAL TOKSİSİTE OLUŞTURMA MEKANİZMASI VE
SELENYUM KORUYUCULUĞU**

Proje No:TSA-11-3644

Proje Türü

N. Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

PROF.DR. MERAL AŞÇIOĞLU

TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

Araştırmacının

PROF:DR: NURCAN DURSUN

TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

30/11/ 2012

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

“Adriyaminin renal toksisite oluşturma mekanizması ve selenyum koruyuculuğu” isimli ve TSA-11-3644 numaralı bu alışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	1
ABSTRACT	2
GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	3
GENEL BİLGİLER	4-5
GEREÇ VE YÖNTEM	6-8
BULGULAR	9-12
TARTIŞMA VE SONUÇ	13-14
KAYNAKLAR	15-16
EKLER	17

ÖZET

Adriyaminin (ADR) in vitro olarak yüksek antitümör etkililik göstermesine rağmen, kanserin kemoterapisi amaçlı klinik kullanımı yüksek renal toksik etkisi ile sınırlı kalmaktadır. Bu çalışma ADR'nin nefropati yapma mekanizması ve ADR'nin neden olduğu böbrek hasarında selenyumun protektif etkisini selenyum ve mitokondri ilişkisini göstererek ortaya koymaktır.

21 gün boyunca serum fizyolojik verilen grup (4 mg/kg i.p.) kontrol, heriki güne bir ADR verdiğimiz grup (ADR), 50 µg/kg i.p. olarak 21 gün selenyum verilen üçüncü grup (Se), ADR ile selenyum alan dördüncü grup oluşturulmuştur (ADR+Se). Grupların kan basıncı, mitokondrial membran potansiyeli (MMP), adenosin trifosfat (ATP) seviyeleri ölçülmüştür. Plazma ile ($p<0.01$) böbrek hücrelerinin sitozolik ve mitokondrial Total antioksidant (TAS) ve oksidant (TOS) durumları ölçüldü.

Se verilen gruba kıyasla ADR verilen grubun TAS değerleri azaldı, TOS değerleri arttı. ADR verilen sıçanlarda kontrol ve selenyum gruplarına göre MMP'de önemli azalma görüldü. MMP, Se+ADR grubunda ADR verilen gruba göre önemli derecede normale yakın bulundu ($p<0.01$). ATP seviyesinde, Se+ADR grubunda ADR verilen gruba göre önemli derecede normale yakın bulundu ($p<0.01$).

Sonuç olarak in vivo şartlarda selenyum, ADR'nin oluşturduğu hasarı total oksidan ve antioksidan restorasyonu yaparak böbrek hücre mitokondrilerini korumuş, böylece böbrek koruyucu özellik göstermiştir.

Anahtar kelimeler; Adriyaminin, Selenyum, mitokondrial membran potansiyeli(MMP), ATP, total antioksidan durum, total oksidan durum

ABSTRACT

Although adriamycin (ADR) exhibits high antitumor efficacy in vitro, its clinical use in cancer chemotherapy is limited due to its high renal toxicity. This study investigated the mechanism of ADR nephropathy and the protective effect of selenium on ADR-induced kidney damage by analyzing of the relationship between selenium and mitochondria. Rats were divided into four groups. The first group was injected with saline i.p. for 21 days, the second group received the 4 mg/kg i.p. ADR every alternate day for 8 days, the third group received the 50 µg/kg i.p. Se for 21 days, and the fourth group received the Se. ADR coadministration i.p. blood pressures were assessed, the mitochondrial membrane potential (MMP) was assessed, and the adenosine triphosphate (ATP) levels were determined. The total antioxidant (TAS) and oxidant status (TOS) in cytosol, the mitochondria of kidney cells, and plasma were measured. Mitochondrial TAS decreased and TOS increased in the ADR group compared to the Se group. ADR-treated rats showed significantly lower MMP than did the control and Se groups. MMP was significantly restored in the Se+ADR group through selenium treatment compared to the ADR group ($p<0.01$). In the ADR group, a reduction in ATP content was seen compared to the control and Se groups ($p<0.01$). ATP level was significantly restored through treatment with selenium in the Se+ADR group compared to the ADR group ($p<0.01$). We concluded that selenium is effective in vivo against ADR-induced kidney damage via the restoration of TAS and TOS, which prevented mitochondrial damage.

Keywords: Adriamycin, Selenium, Mitochondrial membrane potential , ATP, Total antioxidant status, Total oxidant status

AMAÇ VE KAPSAM

Kemoterapatik ilaç olarak hala etkin kullanımı olan adriyamisin (ADR) kardiyotoksik etkisi ile ilgili pek çok araştırma bulunmaktadır. ADR'nin kardiyotoksik etki mekanizmasını açıklama amaçlı yaptığımız çalışmada, ADR'nin myosit mitokondri yapısı ve fonksiyonunda önemli toksik etki yaptığı ve selenyumun bunu azaltıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, ADR'nin etkilediği diğer önemli bir doku olan böbrekte de benzer mekanizma ile hasar oluşturabileceği düşüncesini geliştirmiştir. Bu proje ile, ADR'nin böbrek dokusunda oluşturduğu hasar mekanizmasının açıklanması ve selenyum elementinin bu hasardaki koruyucu rolünün gösterilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Böbrek filtrasyon bariyerinin devamlılığını glomerular podositler sağlamaktadır. Bunların ADR gibi toksik madde ya da ilaçlarla hasarlanması klasik nefropatiye neden olur ve bu nedenle bu tür ilaçlar ile model nefropati oluşturulmaktadır [1, 2]. Genetik bozukluklar veya podosit hücre kitlesinin %10-%20 kadarının azalması ile meydana gelen hasarlar glomerulosklerozi ve nefropatiyi başlatmak için yeterlidir [3, 4]. ADR nefropati modelinde, ADR'nin tek bir dozu, podosit yapım sürecini bozarak podosit sayısının azalmasına sebep olur. Podosit sayısının azalması ile birlikte proteinüri gelişir, bunu fokal segmental glomerulosklerozi daha sonrada global sklerozi takip eder [5]. Bu model, genetik olarak glomeruloskleroze duyarlılığı ortadan kaldırmak, yada nefropati gelişiminin altında yatan mekanizmaları saptamak amacıyla kullanılmıştır [1, 2, 5, 6]. Bununla birlikte ADR'nin nefropati modelini kullanan çalışmalar, hasar mekanizmasının açıklanmasında hala yetersizdir. Yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

ADR yaygın olarak kullanılan kemoterapik bir ilaçtır. Pleyiotropik sitotoksik etkisi ve antrasiklin bir antibiyotik olmasından dolayı katı ve hematogenous tümörlerin tedavisinde halen kullanılmaktadır. ADR'nin oluşturduğu doku hasar mekanizmaları olarak açıklananlar; çift sarmal DNA kırılmalarının başlangıcını (DSBs), lipit peroksidasyonunu, proteaz aktivitesini inhibe etmesi, hücre iskeleti ve ekstrasellüler matrix'in bozulması, kırılmış DNA sarmallarının bağlanmasına aracılık eden topoizomera II'nin inhibisyonu gösterilmektedir [7-9]. Kısa süreli ADR tedavisi sonrası, kalp ve böbrek dokusundaki mitokondride DNA hasarı ya da indirekt yolla sitozolde artan ROS aracılı mitokondriyal DNA hasarı oluşturmaktadır [10-12]. Yapılan çalışmalar; ADR'nin miyositler üzerinde oluşturduğu toksik etkisinin yanı sıra endotel hasarına da sebep olduğunu göstermiştir. ROS üretimine ek olarak Nitrik Oksit sentezindeki düzensizlik, ADR'nin endotelial fonksiyon bozukluğu nedenlerinden birisi olarak kabul görmektedir. ADR, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS)'ın redüktaz domainine bağlanarak enzimin oksijenaz domaininden elektron akışının yönünü değiştirerek NO yapımında bir azalmaya ve ROS üretiminde de bir artmaya sebep olmaktadır. Bu süreçte ADR toksisitesini minimize etmek için ortaya konulan yaklaşımlardan bir tanesi serbest radikal temizleyiciler ve diğer antioksidanların kullanımına dayanmaktadır [13].

Selenyum, günlük diyet ile alınması gerekli eser bir elementtir. Selenyum; hücre içerisinde ROS oluşumunu azaltıp, DNA fragmentasyonunu önler. Ayrıca kaspaz ve sinyal düzenleyici kinaz-1 aktivitesini baskılayarak apoptozisi engeller [14]. Selenyumun başlıca rolü, temel

intracellüler antioksidan olan Glutasyon peroksidaz (GPx) enziminin bir antioksidanı olmasıdır. Selenyum eksikliği GPx aktivitesinde ve protein düzeylerinde azalmaya sebep olmaktadır. May JM ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, selenyum bağımlı thiodoksin redüktaz sisteminin vitamin C rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir [15]. Bu sebeple, selenyum bağımlı sistemler insanlarda ciddi antioksidan savunma mekanizmalarıdır. Daha önce yaptığımız çalışmalarda ADR verilmesinin mitokondriyal membran potansiyelini (MMP), ATP düzeyini ve sıçan miyosit mitokondrilerinde thiodoksin redüktaz aktivitesini (TrxR) azalttığı gösterilmiştir. ADR verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sitozolik ve mitokondriyal total antioksidan(TAS) oranında azalma ve plazma oksidant seviyesinde(TOS) artma meydana geldi. ADR ile birlikte selenyum uygulaması MMP’de ve ATP seviyesinde iyileşme meydana getirmiş, azalan okidan ve artan antioksidanlar tarafından oksidatif stres engellenmiştir. İlk defa, bu çalışmada selenyum ve mitokondri arasındaki ilişki analiz edilerek ADR ile indüklenmiş renal hasarlar üzerinde selenyumun koruyucu etkisi incelenecektir.

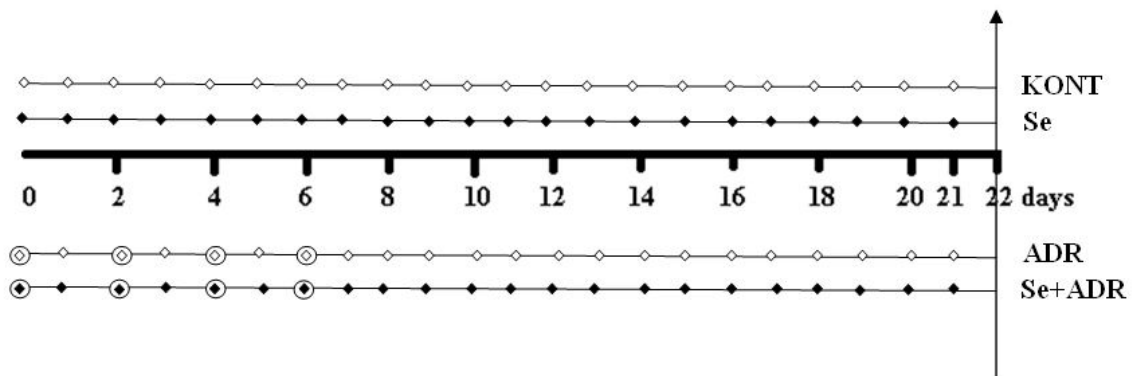
GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar ve ajanlar

Deneylerde kullanılacak kimyasal maddeler şunlardır: Sodium selenit, Tris HCl, EGTA, sukroz (Sigma Chemical) (St. Louis, MO); adriamycin HCl Pharmacia (Milan, Italy); JC-1 Mitochondrial Membrane Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir Potential Assay (MMP) Kit (Cayman Chemical Company, USA); TAS, TOS kitleri (Rel Assay Diagnostics, TURKEY); ve Adenosine Triphosphate (ATP) kiti (Cambrex Bio Science, Rockland, USA).

Hayvanlar

Çalışma; Etik Kurul onayı alınarak Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden (DEKAM) sağlanan ve vücut ağırlığı 330 ± 30 gr olan 30 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar ile gerçekleştirilecek. Sıçanlar deney süresince polipropilen kafeslerde hijyenik ve standart koşullar altında barındırılacak. Oda sıcaklığı $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de, %60-70 oranında nem oranında ve gece-gündüz döngüsü otomatik aygıtla 12 saat gece (6.00-20.00), 12 saat gündüz (20.00-6.00) olacak şekilde ayarlanacak. Çalışma süresince hayvanlara pelet şeklinde standart sıçan yemi verilecek. Hayvanlar rastgele bir şekilde 4 gruba ayrılacak. Bunlar, Kontrol grubu (n=7), ADR verilen grup (n=7), Se verilen grup (n=7) ve Se+ADR verilen grup (n=7). Deneyin başında ADR, her sıçana 4mg/kg olacak şekilde bir hafta boyunca 2 şer gün arayla 4 defa intraperitoneyal (i.p) olarak verilecek, toplam kümülatif doz 16 mg/kg olacak. Kontrol grubuna 21 gün boyunca i.p olarak serum fizyolojik verilecek. Selenyum, her sıçana 50 mg/kg olacak şekilde 21 gün boyunca her gün verilecek. ADR+Selenyum verilmesi, ADR ve Selenyum verilen gruplarla birlikte başlatılacak ve sonlandırılacak (Şekil 1).



Şekil 1. Deney protokolü

Sıçanların, enjeksiyon sonrası 3 hafta boyunca genel görünüşleri, davranışları ve ölüm durumları gözlemlenecek. Arteryal kan basıncı ölçümlerinden sonra, kan örnekleri toplanacak ve plazma santrifüj ile ayrılıp biyokimyasal tahlillerde kullanılacak. Hayvanların torakal

aortaları alınıp, izole organ banyosunda damarın kastırıcı ve gevşeticilere olan cevapları değerlendirilecektir. Daha sonra ise sıçanlardan böbrekleri çıkartılıp, ağırlıkları ölçülüp -80°C’de kullanılıncaya kadar saklanacak. İstenen 50 hayvanın geriye kalan 20’sine herhangi bir kimyasal verilmeden anestezi yapılacak ve torakal aortaları alınıp izole organ banyosunda ADR ve Se ile muamele edilecek, kasılma ve gevşeme cevapları değerlendirilecek.

Hemodinamik Parametrelerin Ölçümü

Hayvanlar ketamin (39.35 mg/kg, im) ve xylazine (4.96 mg/kg, im) karışımı ile anestezi edilecek. Sistolik,diyastolik ve ortalama kan basınçları ve kalp hızları femoral arter vasıtasıyla direk olarak ölçülecek.Polietilen bir katater (PE-50, Intramedic, Clay Adams, MD) femoral arter içerisine yerleştirilecek. Transdüserin verimi güçlendirilecek ve arteryal basınç bir analog-dijital sistem yardımı ve bir basınç çevireci ile bilgisayara kaydedilecek (MP30, Biopac System, Inc., CA).

Mitokondrilerin Hazırlanması

Mitokondriler tanımlandığı gibi saklanan böbreklerden izole edilecek (Martin et al. 2002; Simon et al. 2003).Böbrekler içerisinde 250 mM sucrose, 2 mM EGTA, 5 mM Tris HCl içeren soğuk bir tampon içerisinde homojenizatör ile homojenize edilecek ve 2000 gr’da 4°C’de 8 dk boyunca santrifüj edilecek. Santrifüj edildikten sonra oluşan süpernatant’tan 1ml alınarak yeni bir tüpte 12,000 gr’da 4°C’de 10 dk daha santrifüj edilecek.Geriye kalan pelletteki mitokondriler, 140 mM potassium, 20 mM Tris HCl içeren soğuk bir tamponda solüsyonla sulandırılacak ve kullanılıncaya kadar -80°C’de saklanacak.

Mitokondriyal Membran Potansiyeli Ölçümü

Mitokondriyal spesifik katyonik boya ,5’,6,6’-tetrachloro-1,1’,3,3’- tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1) mitokondri membran potansiyeli (MMP) ölçümünde kullanılacak. JC-1 1/10 oranında serum fizyolojik ile sulandırılacak. Her bir plate kuyucuğuna 50 µL mitokondri solüsyonlarından konulacak üzerine 10 µL sulandırılmış JC-1 eklenecek ve karanlıkta 37°C’de 20 dakika ‘‘plate shaker’’ında 250 rpm de inkübe edilecek.İnkübasyondan sonra mitokondriler ‘‘floresan plate’’ okuyucuda (Biotek, Synergy HT) analiz edilecek.Sağlıklı hücrelerde JC-1,560 ve 595 nm’de sırasıyla uyarma ve emisyon ile güçlü floresan yoğunluğu görüntülenebilen J-agregatlar oluşturur.Apoptotik ya da sağlıklı hücrelerde JC- 1,485 ve 535 nm’de sırasıyla uyarma ve emisyon ile güçlü floresan yoğunluğu görüntülenebilen JC-1 monomerleri oluşturur.J-agregatlar floresans (kırmızı)yoğunluğunun monomerlerin floresan (yeşil) yoğunluğuna oranı mitokondri membran potansiyelinin bir göstergesi olarak kullanılır.

ATP İçeriğinin Belirlenmesi

Hücrelerin hayatta kalması ve kendi özel işlevlerini yerine getirmek için kullanılan ATP, canlı hücrelerin fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirme amaçlı kullanılmaktadır. ATP lmnde kullanılan kit, metabolik olarak aktif hücrelerin tamamında mevcut bulunan ATP'nin biyoluminesansı esasına dayanmaktadır. Bioluminesans yönteminde ATP'den ışık oluşumunu katalizleyen bir enzim olan, "lusuferaz" kullanılmaktadır. 100 μL 'lik mitokondri örneklerine 10 μL "Cell Lysis Reagent" eklenecek ve oda ısısında 10 dakika ATP ekstratını ortaya çıkarmak için inkübe edilecek. 100 μL 'lik ATP monitoring ajanların ardından, luminesens luminometre kullanarak ölçülecek (Biotek, Synergy HT). ATP konsantrasyonu bilinen standart örneklerin değerleri kullanılarak standart eğri elde edilecek. Bu eğri her bir rneğin ATP konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılacak. Luminesensin, belirli bir aralığın üzerindeki örneklerde ATP konsantrasyonunun negatif logaritması ile doğrusal olarak artacağı düşünülmektedir. Her probe'dan mitokondriyal ATP içeriği çoğaltılan örneklerde incelenecek.

Biyokimyasal Analiz

Total Oksidan Seviyesi lm (TOS)

Renal hücrelerde mitokondri ve sitozoln total oksidan seviyesi "Rel Assay" kiti kullanarak ölçülecek. Örneklerde bulunan ferröz iyonu ferrik iyona oksitlenmektedir. Ferrik iyonlar asidik ortamda "xylenol orange" ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örneklerde bulunan oksidanların miktarlarıyla ilişkili olan şiddet, spektrofotometrik olarak ölçülecektir. Bulgular, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{L}$ şeklinde ifade edilecek.

Total Antioksidan Seviyesi lm (TAS)

Renal hücrelerde mitokondri ve sitozoln total antioksidan seviyesi "Rel Assay" kiti kullanarak ölçülecek. Bu kit, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)'nin peroksidaz (metmiyogloblin) ve H_2O_2 ile inkübe edilip 530 nm'de absorbans veren stabil mavi-yeşil renkli ABTS radikali oluşumu prensibiyle çalışmaktadır. Bulgular, $\mu\text{mol Trolox equivalent/L}$. Olarak ifade edilecek.

Oksidatif Stres İndeksinin lm (OSI)

TOS/TAS oranı sitozolde ve renal hücrelerin mitokondrilerinde oksidatif stres indeksi (OSI) olarak kabul edilmektedir. OSI'nın formülizasyonu aşağıdadır. $\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox equivalent/L}) / 100]$.

BULGULAR

Adriyaminin ve selenyumun hemodinami ve EKG parametrelerine etkisi

Adriyaminin verilen gruplarda Sistolik kan basıncı kontrol ve selenyum verilen gruplardan önemli derecede düşük bulundu groups ($p<0.05$ ve $p<0.01$, sırasıyla, Tablo 1).ADR grubunda sistolik kan basıncındaki azalma ADR ile birlikte selenyum verilen gruplarda normal değerine yakın bulundu fakat bu düzelme istatistiksel anlamda değildi. Ortalama sistolik basınç, diyastolik basınç, ve kalp hızları gruplar arası fark göstermedi.

Tablo 1. Kan basıncı ve kalp atım hızları üzerine adriyaminin indüklediği değişiklikler üzerine selenyumun etkisi

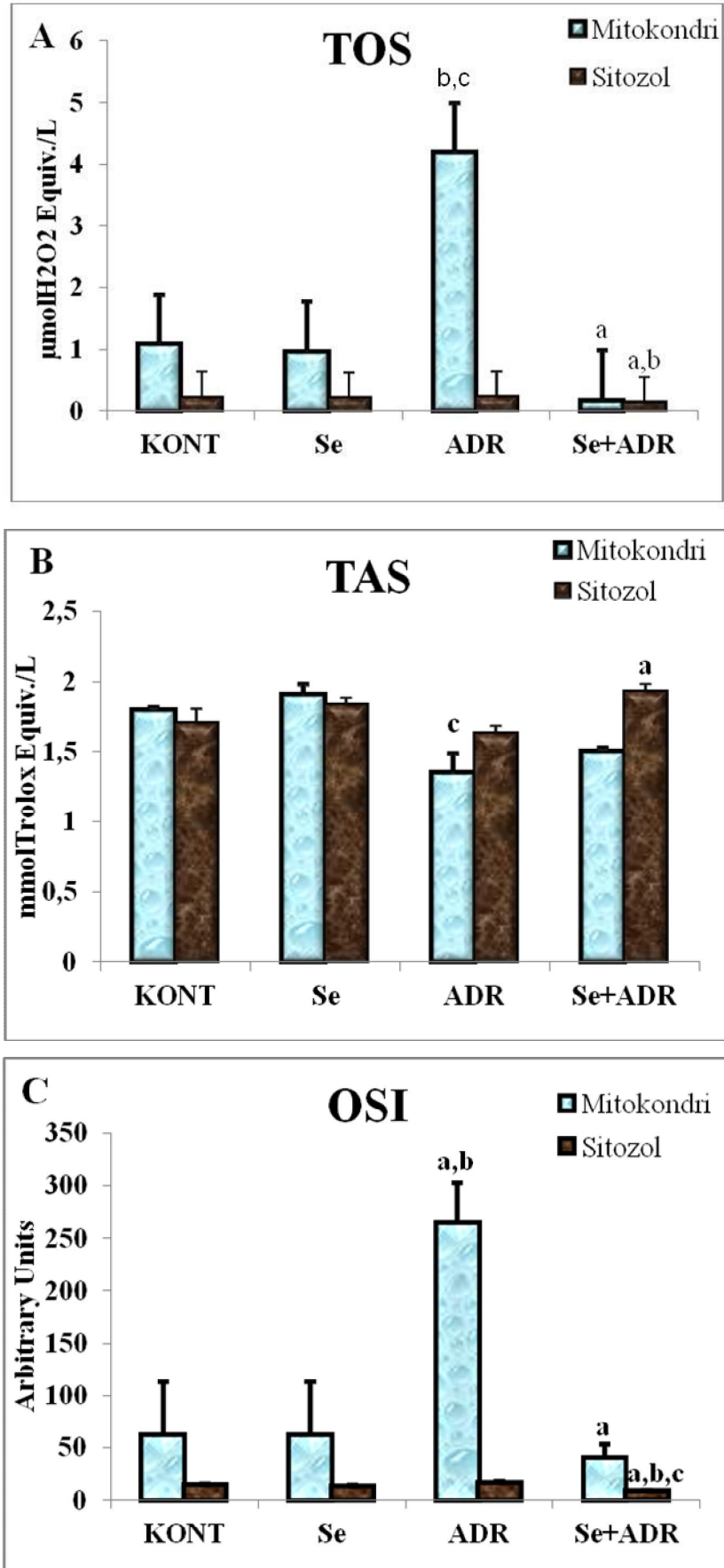
	KONT	Se	ADR	Se+ADR
OKB (mmHg)	84 ± 11	78 ± 7	66 ± 10	80 ± 13
SKB (mmHg)	106 ± 14	111 ± 9	$75 \pm 13^{a,b}$	92 ± 10
DKB (mmHg)	69 ± 8	60 ± 9	57 ± 8	69 ± 16
KAH (Atım sayısı/dk)	318 ± 39	251 ± 37	304 ± 42	239 ± 47

OKB: Ortalama kan basıncı, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı ve KAH: Kalp atım hızı.

a: $p<0.05$ KONT a göre , b: $p<0.01$ Se' ye göre

Selenyumun total oksidant ve antioksidant ile oksidatif stress indeksine etkisi

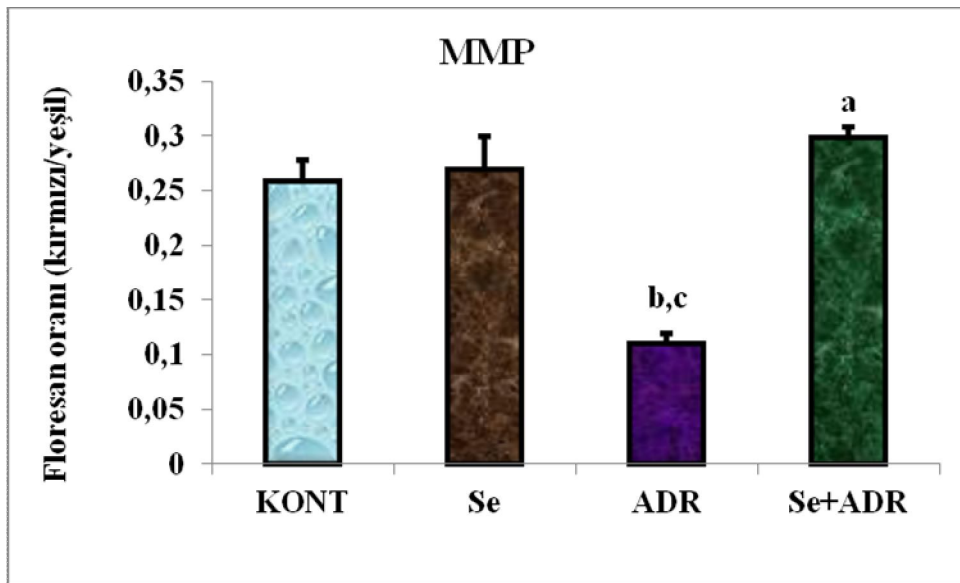
ADR verilmesi mitokondriyal total oksidan (TOS) seviyesinde artışa neden oldu ($p<0.05$, Şekil. 2A), sitozolik total oksidan seviyesinde ise değişim görülmedi. ADR verilen grubun mitokondriyal total antioksidan enzimleri (TAS) selenyum verilen grubun değerlerinden daha düşük bulundu ($p<0.05$, Şekil. 2B), sitozoldeki total antioksidan enzimleri ise ADR verilen gruba kıyasla ADR ile birlikte selenyum verilenlerde daha yüksekti. Normal kontrol ratlarda oksijen stres indeksi (OSİ) değeri mitokondride 61 ± 5 sitozolde ise 13.7 ± 0.4 olarak tesbit edildi. ADR verilen gruplarda OSİ indeks değeri 264 ± 38 gibi yüksek bir değer olarak hesaplandı, bu farklılık ADR'nin verilmediği kontrol ile selenyum verilen grup değerlerinden istatistiksel anlamda farklıdır. ADR ile selenyumun birlikte verildiği grupta OSİ değeri anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$ KONT'a göre, ADR, ve Se grupları, Şekil. 2C).



Şekil 2. Total oksidan (2A), total antioksidan (2B) ve oksidatif stress (2C) indeksi üzerine adriyaminin indüklediği değişikliklerde selenyumun etkisi. . a ADR'ye göre $p<0.05$, b KONTROL'e göre $p<0.05$; c Se'a göre $p<0.05$

Myositlerin Mitokondrial Membrane Potansiyeline (MMP) selenyum etkisi

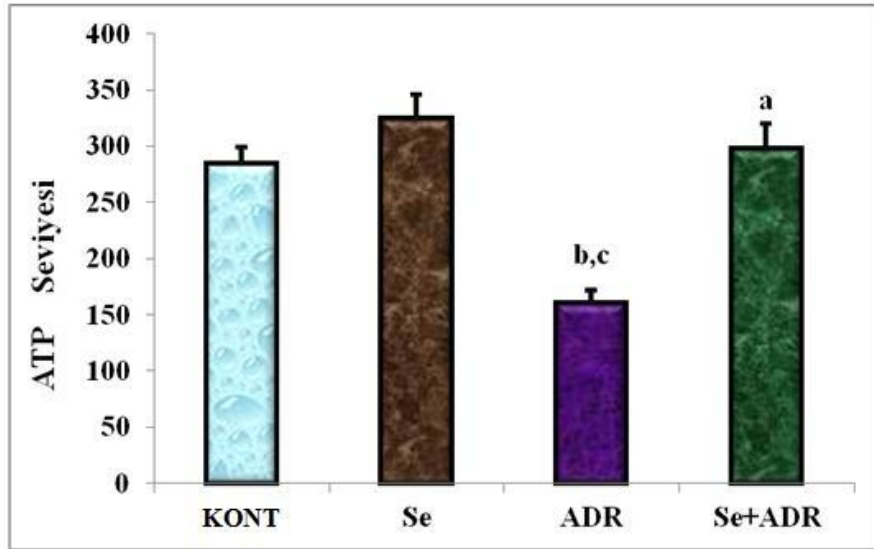
JC-1 normal mitokondride agreste olur, kırmızı floresan ışık verir. Kırmızı ve yeşil floresan ışık oranı ADR'nin mitokondride yaptığı toksisiteyi ve selenyumun bunu iyileştirmedeki rolünü çok iyi gösterir. Normal ratlarda bu oran 0.257 ± 0.02 iken ADR verilenlerde önemli miktarda düşme gösterdi (0.108 ± 0.012 , $p < 0.01$) ve bu değişim kontrol ve selenyum verilen gruplardan da önemli derecede farklı bulundu. ADR ile selenyumun birlikte verilmesi MMP değerini kontrol değerlerine yaklaştırdı (0.279 ± 0.01 , $p < 0.01$ KONT' a göre, Şekil 3)



Şekil 3. Mitokondriyal membran potansiyeli üzerine adriyamisinindüklediği değişikliklerde selenyumun etkisi. a ADR'ye göre $p < 0.01$, b KONTROL'e göre $p < 0.01$, c Se'a'ye göre $p < 0.01$

Myosit mitokondrilerinde ATP üretimine selenyum etkisi

Kontrol ve selenyum verilenlerin ATP değerleri arasında önemli farklılık bulunmamıştır. ADR verilen grubun ATP miktarında azalma olmuş bu azalma kontrol ve selenyum gruplarından istatistiksel olarak da anlamlıdır. ADR ile birlikte selenyum verilmesi ATP üretimini normale yaklaştırmıştır, selenyum ile ADR'nin birlikte verildiği grubun ATP değeri ilse sadece ADR verilenlerin ATP değerleri istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p < 0.01$; Şekil 6).



Şekil 4. ATP üretimi üzerine adriyaminin indüklediği değişikliklerde selenyumun etkisi. a ADR'ye göre $p<0.01$, b KONTROL'e göre $p<0.01$, c Se'a'ye göre $p<0.01$

TARTIŞMA VE SONUÇ

ADR kanser tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılan bir ilaçtır. Adriyaminin en önemli yan etkileri kalp fonksiyon bozukluğu, kalp yetmezliği aritmiler ve kardiyomyopati'dir (16). ADR ile tedavi gören hastalarda kanser tedavisi tamamlandığında da kalp bozuklukları devam etmektedir[17].ADR'nin neden olduğu kardiyotoksikite nedeni hala tam olarak bilinmemektedir, oksidatif stress, mitokondriyal DNA hasarı, intrasellüler kalsiyum artışı, artmış sitokin salınımı ve miyokardiyal adrenerjik fonksiyon değişiklikleri nedenler arasında gösterilmektedir [18]. ADR'nin böbrek fonksiyon bozucu etkisi de bilinmemektedir. ADR diğer dokulara kıyasla böbrekte çok fazla birikir [19].

Böbrek nükleusu ve mitokondrisindeki miktarı kalp dokusundakinden oldukça fazla bulunmuştur. Normalde de ADR mitokondride en fazla biriken bir ilaçtır. ADR'nin intravenöz verilmesi glikolitik enzimlerin, hekzokinazın, fosfoglucoizomerın, aldolazın ve laktat dehidrogenaz aktivitelerini azalttığı bildirilmektedir [20]

Bu çalışma ile böbrek mitokondrisinde ilaç birikimlerinin böbrek hücre enerji metabolizmasını etkileyeceği ileri sürülmektedir. ADR'nin böbrekte mitokondriyal elektron transport zincirini dolayısı ile oksidatif fosforilasyonu etkileyeceği tahmin edilmekte ama bu tam olarak ortaya konulmamıştır. Bununla ilgili hipotezlerden birisi; serbest radikallerin mitokondrial biyoenerjetikler ile bağlantı kurması, kalsiyum regülasyonunu bozması olarak bildirilir [21]

Bu çalışmada 16 mg/kg ADR verilmesi böbrek mitokondrisinde antioksidant ve oksidant özellikleri, dengesini etkilemiş, buna bağlı MMP ve ATP üretimi değişmiştir. Oksidatif hasar belirleyici total oksidan seviyesi (TOS) ADR verilmesi ile artmış, total antioksidan seviye (TAS) azalmıştır. Plazma OSI değeri ise diğer gruplara göre ADR verilen grupta oldukça yüksektir. Oksidatif hasarın böbrek mitokondrisinde göstergelerinden olan mitokondrial membran potansiyel değeri (MMP) ve ATP miktarıda ADR verilmesi ile etkilenmiştir. MMP değeri ADR verilenlerde artmış, ATP üretimi ise azalmıştır. ADR'nin selenyum ile birlikte verildiği gruplarda tüm bu parametreler kontrol ve sadece selenyum verilen grup değerlerine yakın bulunmuştur. Bu çalışmada spesifik antioksidan enzim aktiviteleri (TrxR, GPx aktiviteleri) ölçülmesinde muhtemelen selenyum bu tür antioksidan enzim aktivitelerini artırarak ADR'in oksidan stres hasarını azaltmada etkili olmuştur. Selenyum antioksidan savunma durumunda radikal süpürücü gibi davranıp böbrek hasarını azaltmıştır.

Domuz böbrek epitelyal hücrelerinde yapılan (LLC-PK1 cell) bir çalışmada selenyumun kadmiyumun indüklediği apoptozisi engellediğini bildirilmektedir. Selenyumun ROS oluşumunu blokladığı, mitokondrial potansiyelin normal kalmasını sağladığı, böylelikle mitokondriyal şişmeyi, mitokondriden sitokrom c salımını kaspas aktivasyonunu engellediği yorumunu yapmaktadırlar (22)

Yaptığımız bu çalışma sonucu bize ADR ile tedavi edilen kanser ilaçlarına ilaveten selenyum verilmesinin ADR'nin kardiyak ve renal hasar yapıcı etkilerini azaltabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Rossmann P, Matousovic K, Bohdanecka M (1993) Experimental adriamycin nephropathy. Fine structure, morphometry, glomerular polyanion, and cell membrane antigens. *J Pathol* 169:99–108
2. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC (2000) Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 58:1797–1804
3. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE et al (2005) Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol* 16:2941–2952
4. Wiggins JE, Goyal M, Sanden SK et al (2005) Podocyte hypertrophy, “adaptation,” and “decompensation” associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. *J Am Soc Nephrol* 16:2953–2966
5. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R et al (1982) Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 46:16–23
6. Cao Q, Wang Y, Zheng D et al (2010) IL-10/TGF- β -modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 21:933–942
7. Paczek L, Teschner M, Schaefer RM et al (1992) Intraglomerular proteinase activity in adriamycin-induced nephropathy. *Nephron* 60:81–86
8. Coers W, Huitema S, van der Horst ML, Weening JJ (1994) Puromycin aminonucleoside and adriamycin disturb cytoskeletal and extracellular matrix protein organization, but not protein synthesis of cultured glomerular epithelial cells. *Exp Nephrol* 2:40–50
9. Akman SA, Doroshow JH, Burke TG, Dizdaroglu M (1992) DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalyzed reduction of doxorubicin. *Biochemistry* 31:3500–3506
10. Adachi K, Fujiura Y, Mayumi F et al (1993) A deletion of mitochondrial DNA in murine doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 195:945–951
11. Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA (2005) Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol* 207:436–444
12. Suliman HB, Carraway MS, Ali AS et al (2007) The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J Clin Invest* 117:3730–3741
13. Va'squez-Vivar, J., Martasek, P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard, K. A., Jr., and Kalyanaraman, B. (1997) *Biochemistry* 36, 11293–11297
14. Rayman MP (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:233–241
15. May JM, Mendiratta S, Hill KE and Burk RF (1997) Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by the eelenzyme thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 272:22607–22610.
16. Dursun N, Taskin E, Yerer Aycan MB, Sahin L (2011) Seleniummediated cardioprotection against adriamycin-induced mitochondrial damage. *Drug Chem Toxicol* 34:199–207
17. Chandran K, Aggarwal D, Migrino RQ, Joseph J, McAllister D, Konorev EA, Antholine WE, Zielonka J, Srinivasan S, Avadhani NG and Kalyanaraman B (2009) Doxorubicin inactivates myocardial cytochrome c oxidase in rats: cardioprotection by Mito-Q. *Biophys J* 96:1388–1398.

18. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S and Gottlieb JA (1973) A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32:302-314.
19. Muhammed H, Kurup CK (1983) Distribution of adriamycin in tissues & subcellular fractions. *Indian J Biochem Biophys* 20:349– 352
20. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varlakshmi P (2003) The influence of lipoic acid on adriamycin-induced hyperlipidemic nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem* 247:139– 145
21. Wallace KB and Starkov AA (2000) Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:353-388.
22. Zhou YJ, Zhang SP, Liu CW, Cai YQ (2009) The protection of selenium on ROS mediated apoptosis by mitochondria dysfunction in cadmium-induced LLC-PK(1) cells. *Toxicol In Vitro* 23:288–294

EKLER

1. Selenium-mediated cardioprotection against adriamycin-induced mitochondrial damage.

Dursun N, Taşkın E, Yerer Aycan MB, Sahin L.

Drug Chem Toxicol. 2011 Apr;34(2):199-207. doi: 10.3109/01480545.2010.538693.

2.Protective effect of carnosine on adriamycin-induced oxidative heart damage in rats.

Ozdoğan K, Taşkın E, **Dursun N**.

Anadolu Kardiyol Derg. 2011 Feb;11(1):3-10. doi: 10.5152/akd.2011.003. Epub 2010 Dec 24.

3.Protection against adriamycin-induced cardiomyopathy by carnosine in rats: role of endogenous antioxidants.

Dursun N, Taşkın E, Oztürk F.

Biol Trace Elem Res. 2011 Oct;143(1):412-24. doi: 10.1007/s12011-010-8875-y. Epub 2010 Oct 13.