



Pleurotus Eryngii Ekstraktının Sprague-Dawley Sıçanlarında Adriamisin Kaynaklı Kardiyotoksisite Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Elif Erdem Güzel¹, Nalan Kaya Tektemur², Ahmet Tektemur³, Hilal Acay⁴, Ayfer Yıldırım⁵

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

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

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

4 Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Mardin, Türkiye

5 Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Mardin, Türkiye

Geliş: 29.03.2021; Revizyon: 30.04.2021; Kabul Tarihi: 03.05.2021

Öz

Amaç: Adriamisin (ADR), kanser tedavilerinde kullanılan güçlü ve geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Fakat ADR'nin klinik etkinliği, doza bağlı kardiyotoksisitesi nedeniyle engellenmektedir. Bu nedenle çalışmada ADR uygulanan sıçanların kalp dokularında meydana gelen değişiklikler üzerine *Pleurotus eryngii* ekstraktının (PEE)'nin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar 4 eşit gruba ayrıldı (n=6). Kontrol grubuna DMSO/etanol çözeltisi oral gavaj yolu ile gün aşırı verildi. ADR grubuna 10 mg/kg ADR intraperitoneal (i.p) olarak tek doz uygulandı. ADR+PEE grubuna 10 mg/kg i.p tek doz ADR verildikten sonra DMSO/etanol içinde çözdürülen 200 mg/kg PEE oral gavaj yoluyla gün aşırı verildi. PEE grubuna oral gavaj ile DMSO/etanolde çözdürülen 200 mg/kg PEE gün aşırı verildi. 21.günün sonunda sıçanlar dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından kalp dokuları çıkarılarak histolojik ve kantitatif RT-PCR analizleri yapıldı.

Bulgular: ADR grubuna ait kalp dokularında inflamatuvar hücre artışı, miyofibril kaybı, sitoplazmik vakuolizasyon ve vasküler konjesyon bulgularına rastlanıldı. PEE tedavisinin bu histopatolojik bulgularda iyileşmeye neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca ADR grubunda kontrol grubuna kıyasla IL1- β immunoreaktivitesinde ve IL1- β , BAX, Kaspaz-3 mRNA seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu izlendi. ADR+PEE grubunda ise ADR grubuna kıyasla IL-1 β immunoreaktivitesinde ve IL1- β , BAX, Kaspaz-3 mRNA seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu belirlendi.

Sonuç: ADR'ye bağlı kardiyotoksisitede PEE tedavisinin anti-apoptotik ve anti-inflamatuvar özellikleri ile kardiyoprotektif etki gösterdiği ortaya koyuldu.

Anahtar kelimeler: Adriamisin, Kardiyotoksisite, *Pleurotus eryngii*, Apoptozis, İnterlökin-1 beta

DOI: 10.5798/dicletip.944395

Yazışma Adresi / Correspondence: Elif Erdem Güzel, Mardin Artuklu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Mardin, Türkiye 47000 e-mail: eliferdem@artuklu.edu.tr

Investigation of The Effects of Pleurotus Eryngii Extract on Adriamycin-Induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats

Abstract

Objective: Adriamycin (ADR) is a potent and broad-spectrum antibiotic used in cancer treatments. However, the clinical efficacy of ADR is hampered by its dose-dependent cardiotoxicity. For this reason, in this study, it was aimed to examine the protective effect of Pleurotus eryngii extract (PEE) on the changes occurring in the heart tissues of rats treated with ADR.

Methods: Sprague-Dawley male rats were divided into 4 equal groups (n = 6). DMSO/ethanol was given to control group by oral gavage. A single dose of 10 mg/kg ADR was administered to ADR group. After administration of 10 mg/kg single dose ADR, 200 mg/kg dose of PEE (dissolved in DMSO/ethanol) was given orally to ADR+PEE group. 200 mg/kg PEE was administered by oral gavage to PEE group. At the end of the 21st day, the rats were decapitated. After decapitation, the heart tissues were removed and histological and quantitative RT-PCR analyzes were performed.

Results: Inflammatory cell increase, loss of myofibril, cytoplasmic vacuolization, and vascular congestion were found in the heart tissues belonging to ADR group. PEE treatment caused improvement in these histopathological findings. Also, a significant increase in IL1- β immunoreactivity and IL1- β , BAX, Caspase-3 mRNA levels were observed in the ADR group compared to the control group. However, it was determined that significant decrease in IL-1 β immunoreactivity and IL1- β , BAX, Caspase-3 mRNA levels in ADR + PEE group compared to ADR group.

Conclusion: PEE treatment has been shown to have a cardioprotective effect with anti-apoptotic and anti-inflammatory properties against ADR-induced cardiotoxicity.

Keywords: Adriamycin, Cardiotoxicity, Pleurotus eryngii, Apoptosis, Interleukin-1 beta.

GİRİŞ

Adriamisin (ADR), 1960'larda Streptomyces peucetius adlı aktinomiset türünden izole edilen antrasiklin grubu bir antibiyotiktir. Güçlü bir anti-neoplastik ajan olması nedeniyle lösemi, lenfoma ve solid tümörler gibi çeşitli malign tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ADR'nin klinik etkinliği doza bağlı kardiyotoksitesini nedeniyle engellenmektedir. ADR tarafından indüklenen kardiyotoksitesite mekanizmasında oksidatif stres ve oksidatif strese yanıt olarak artan inflamasyon ile apoptozisin rol oynadığına dair kanıtlar vardır fakat miyokardiyal hasarın nedeni hala kesin olarak tespit edilememiştir¹. İnterlökin-1 ailesinden olan İnterlökin-1 beta (IL-1 β), immün ve inflamatuvar yanıtların aktivasyonunda görev alan pro-inflamatuvar sitokin proteindir. IL-1 β 'nin yer aldığı olumsuz inflamatuvar sonuçların, ADR kaynaklı kardiyak toksite ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir².

ADR kaynaklı kardiyotoksitesiteyi azaltmayı amaçlayan deneysel çalışmalarda farmakolojik ve farmakolojik olmayan birçok uygulamanın

olumlu sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir^{1,3}. Ancak, klinik uygulamalarda ADR kaynaklı kardiyotoksitesitenin önlenmesinde kullanılan hala düzenli bir tedavi yöntemi yoktur. Bu nedenle iyileştirici etkinliği olan ve toksik etki göstermeyen terapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Binlerce yıldır insan diyetinin bir parçası olan mantarlar, antioksidan özellikleri nedeniyle son yıllarda farmakolojik çalışmalarda büyük ilgi görmektedir. Kral istiridye mantarı olarak da adlandırılan Pleurotus eryngii, (P. eryngii) olağanüstü lezzeti ve besin değeri nedeniyle Kuzey Afrika, Avrupa ve Asya'daki tüketiciler arasında hızla çok değerli bir tür haline gelmiştir⁴. P. eryngii'nin antitümör, anti-mikrobiyal, antioksidan ve immunsupresif özellikleri bilinmektedir⁴⁻⁷. Bununla birlikte, sıçanlarda ADR kaynaklı kardiyotoksitesiteye karşı P. eryngii ekstraktının (PEE) anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik aktivitelerine ilişkin deneysel bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, ADR kaynaklı kardiyotoksitesiteye karşı PEE'nin anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etkilerini ortaya

koymayı amaçladık. Sonuçlar, ADR kaynaklı kardiyotoksititeye karşı yeni ilaçlar ve fonksiyonel gıdalar geliştirmeye yardımcı olacaktır.

YÖNTEMLER

Araştırmada Kullanılan Makrofungus Örneği ve Kimyasallar P. eryngii mantarı, Mayıs 2018 tarihinde Hakkâri / Türkiye'den toplandı ve makroskopik, ekolojik yapısal özelliklere göre teşhis edildi⁷. Mantarlar Mardin Artuklu Üniversitesi Mikrobiyoloji Biyokimya Araştırma Laboratuvarında 500 gr'lık numuneler hazırlanarak muhafaza edildi. Sodyum tripolifosfat (STPP) Acros Organics'den (New Jersey, ABD) sağlandı. ADR (Adriamycin®) Deva Farma'dan (İstanbul, Türkiye) satın alındı.

PEE'nin hazırlanması

Toplanan P. eryngii mantarları, oda sıcaklığında yaklaşık 5-7 gün kurutuldu ve öğütüldü. Daha sonra 20 gr P. eryngii ve 200 ml metanol gece boyunca karıştırılarak 500 ml erlenmeyer içine kondu. Karışım süzülme ve süzümü metanol ile 25 °C'de 150 rpm'de 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılarak tekrar özümledi. Nihai karışım süzülme ve metanolün 40 °C'de kuruyana kadar buharlaştırılması nedeniyle tüm metanol karışımları bir buharlaştırma balonunda toplandı. Metanol evaporatörde uçurulduktan sonra elde edilen ekstrakt, daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'de saklandı⁸.

Deney Hayvanları ve Deney Düzenine Oluşturulması

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2019/15 sayılı 146 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak yapılmıştır. Deney hayvanlarının barındırılması için gerekli olan tüm optimal laboratuvar koşulları (12 saat aydınlık 12 saat karanlık, 22-25 °C ortam sıcaklığı, %50 ± 10 nem, sıçan pelet yemi, temiz su) ve prosedürler Helsinki Deklarasyonuna uygun olarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (FÜDAM) tarafından sağlanmaktadır. FÜDAM'dan temin edilen 24

adet Sprague-Dawley erkek sıçan (200-250 g ağırlık, 8-10 haftalık) rastgele dört gruba (n = 6) ayrıldı; (I) Kontrol (DMSO/etanol), (II) ADR (10 mg / kg ADR), (III) ADR+PEE (10 mg / kg ADR + 200 mg / kg PEE), (IV) PEE (200 mg / kg PEE). I. gruptaki sıçanlara 7 mg ml⁻¹ DMSO/etanol (2:8) çözeltisi oral gavaj yolu ile gün aşırı verildi. II. ve III. gruplardaki sıçanlara 10 mg/kg'lık ADR tek bir doz intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. III. ve IV. gruplardaki sıçanlara 7 mg ml⁻¹ DMSO/etanol (2:8) stok solüsyonu içinde çözündürülen 200 mg/kg dozda PEE oral gavaj yoluyla gün aşırı uygulandı. ADR ve PEE uygulamalarının dozajları ve çözücüleri önceki çalışmalara göre belirlendi^{1,9}. Deney süresi olan 21. günden sonra bütün uygulamalar durduruldu ve deney sonlandırıldı. Tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulaması ile anestezi altında dekapite edildi. Kalp dokuları hızla çıkarıldıktan sonra bir kısmı histopatolojik değerlendirmeler için %10'luk formalin solüsyonuna alınırken, diğer bir kısmı ise moleküler analizler için -80 °C'de muhafaza edildi.

Histopatolojik Değerlendirme

%10'luk formalin solüsyonu içinde fiksasyonu sağlanan kalp dokuları rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler elde edildi. Elde edilen kesitlerin parafini ksilen ile giderildi. Ardından azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra Hematoksilin-Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskobu altında (Novel N-800M, Ningbo, Çin) incelendi ve fotoğraflandı. Değişiklikler histopatolojik şiddetine göre yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak iki histolog tarafından körleme yöntemiyle değerlendirildi ve histoskor tablosu yapıldı.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Kalp dokularında IL-1β immünreaktivitesinin belirlenmesi için, parafin bloklardan polilizinli lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

Deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 10 dakika kaynatıldı. Oda ısısında bekletilerek soğuması sağlanan dokular PBS'e (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) alınarak yıkandı. Ardından endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksit bloker (TA-125-HP Lot No: HP18180, Hydrogen Peroxide Block, Thermo Scientific) uygulandı. Zemin boyasını engellemek için dokular Ultra V Block'ta (TA-125-UB, Ultra V Block, Thermo Scientific) 5 dakika bekletildi. Daha sonra primer antikör (SC-1251 lot no: K0915, Polyclonal Anti-IL-1 β Antibody, Santa Cruz Biotechnology) damlatıldı ve dokular bir saat oda ısısında karanlık ve nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından sekonder antikör (TP-060-BN, Biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), Thermo Scientific) uygulandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopu altında (Novel N-800M) incelenerek 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

Kalp dokularına ait örneklerden total RNA izolasyonu için Trizol (MG-TRZ-01, Hibrigen, Türkiye) kullanıldı. Üretici firma tarafından önerilen protokol takip edilerek RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktarları, nanodrop cihazında (BioSpec-nano, Shimadzu) ölçüldü. Her gruba ait RNA örnekleri, eşit düzeyde total RNA içerecek şekilde, kendilerine ait havuzlarda toplandı. IL-1 β , BCL-2 ilişkili protein X (BAX), Kaspaz-3 (CASP3) genlerinin mRNA düzeylerindeki ifade farklılıklarının tespitinde kullanılan komplementer DNA (cDNA)'lar için her bir grubu temsil eden havuz yapılmış RNA

örneklerinden 10 μ l kullanıldı. cDNA sentezi, OneScript Plus cDNA sentez kiti (abm, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uyularak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar, dizi spesifik primerler varlığında qRT-PCR aracılığıyla amplifiye edildi. Sıçan kalp örneklerindeki mRNA ifade düzeyleri incelenirken Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) referans gen olarak kullanıldı (Tablo I). qRT-PCR analizi, 96 kuyucuklu platelerde, toplamda 10 μ l hacimde (1 μ l cDNA ve 9 μ l karışım) üç tekrarlı olarak yapıldı. Bu analiz, 2X Magic SYBR Mix (Procomcure, Avusturya) kullanılarak Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sisteminde üretici firmanın belirttiği protokole uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Analizler sonucunda mRNA ifadeleri arasındaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Tablo I: Çalışmada kullanılan qRT-PCR primerleri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİSİ (5'-3')	
GAPDH	FORWARD	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	REVERSE	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
IL1- β	FORWARD	CCTATGTCTTGCCCGTGGAG
	REVERSE	CACACACTAGCAGGTCGTCA
BAX	FORWARD	GGCTGGACACTGGACTTC
	REVERSE	CAGATGGTGAGTGAGGCA
CASP3	FORWARD	TGCTTACTCTACCGCACCC
	REVERSE	CAACTACCTGATATCAAAGCTGAG

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler 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

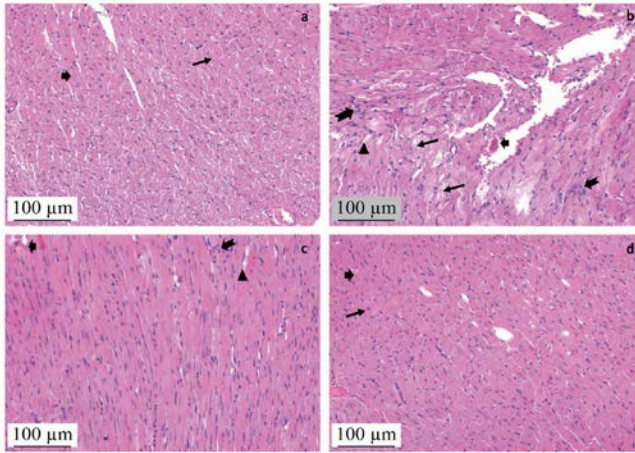
Işık mikroskobu altında yapılan incelemede, kontrol ve PEE gruplarına ait miyokard tabakasında kardiyomiyosit ve miyofibril organizasyonu normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 1;a,d). ADR gruba ait miyokard tabakasında sitoplazmik vakuolizasyon,

vasküler konjesyon, miyofibril kaybı ve inflamatuvar hücre artışı izlendi (Şekil 1;b). PEE tedavisinin ise ADR kaynaklı histopatolojik değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte ADR+PEE grubuna ait miyokard tabakasında bazı alanlarda hafif derecede infiltrasyon, vasküler konjesyon ve sitoplazmik vakuolizasyon bulguları gözlemlendi (Şekil 1;c). Histolojik değerlendirmelere ait histoskor sonuçları Tablo II'de gösterilmektedir.

Tablo II: Kalp dokusundaki histolojik değerlendirmelere ait histoskor tablosu.

	Kontrol	ADR	ADR+PEE	PEE	*p
Sitoplazmik vakuolizasyon	0.14±0.37	2.85±0.37 ^a	1.28±0.48 ^{a,b}	0.28±0.48 ^{b,c}	<0.05
Vasküler konjesyon	0.33±0.51	2.42±0.78 ^a	0.85±0.37 ^b	0.14±0.37 ^b	<0.05
Miyofibril kaybı	0.00±0.0	2.57±0.78 ^a	1.0±0.57 ^{a,b}	0.14±0.37 ^{b,c}	<0.05
İnflamatuvar hücre artışı	0.00±0.0	2.00±0.81 ^a	0.85±0.37 ^{a,b}	0.00±0.0 ^{b,c}	<0.05

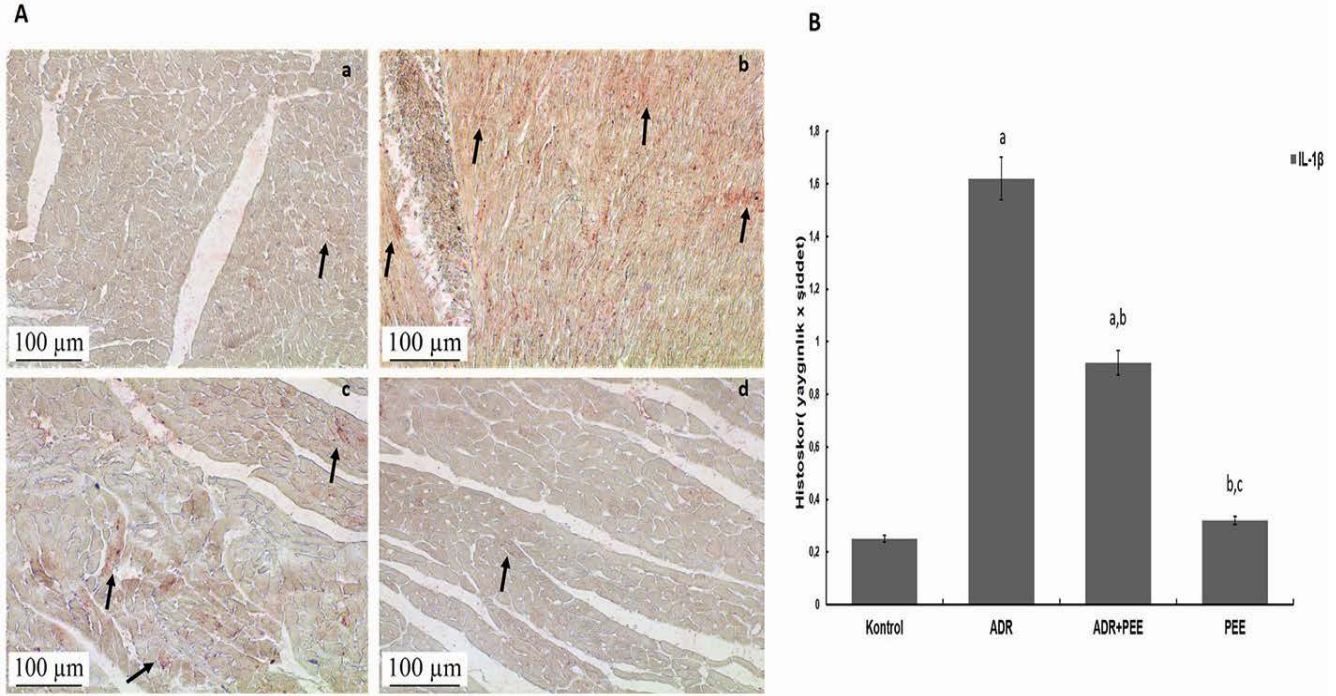
Değerler ortalama± standart sapma olarak verilmiştir. ^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^bADR grubuna göre karşılaştırıldığında, ^cADR+PEE grubuna göre karşılaştırıldığında, *İstatistiksel anlamlılık ($p<0.05$). ADR: Adriamisin; PEE: Pleurotus eryngii Ekstraktı.



Şekil 1. ADR ve / veya PEE uygulamalarının sıçan kalp dokusu üzerindeki etkilerinin fotomikrografları: Kontrol ve PEE gruplarına ait miyokard tabakasında kardiyomiyosit (ince ok) ve miyofibril (ok başı) yapıları normal olarak ayırt edildi (a,d). ADR grubuna ait miyokard tabakasında sitoplazmik vakuolizasyon (üçgen), vasküler konjesyon (ok başı), miyofibril kaybı (ince ok) ve inflamatuvar hücre artışı (çentikli ok) gözlemlendi (b). ADR+PEE grubuna ait miyokard tabakasında hafif derecede infiltrasyon (çentikli ok), vasküler konjesyon (ok başı) ve sitoplazmik vakuolizasyon (üçgen) izlendi (c). Hematoksilen & Eozin, skala bar: 100µm, x200. ADR: Adriamisin; PEE: Pleurotus eryngii Ekstraktı.

İmmünohistokimyasal Bulgular

IL-1 β immünreaktivitesi kalp dokusunda miyosit ve endotel hücrelerinde pozitiflik gösterdi (Şekil 2A). Kontrol ve PEE gruplarına ait IL-1 β immünreaktivitelerinin benzer olduğu gözlemlendi ($p>0.05$) (Şekil 2A;a,d). ADR grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IL-1 β immünreaktivitesinde anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$) (Şekil 2A;b). ADR+PEE grubunda ise ADR grubu ile kıyaslandığında IL-1 β immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 2A;c) (grup sıralamasına göre sırasıyla değerler; 0.25±0.09, 1.62± 0.59, 0.92±1.25, 0.32±1.16). IL-1 β immünreaktivite histoskor sonuçları Şekil 2B'de gösterilmektedir.

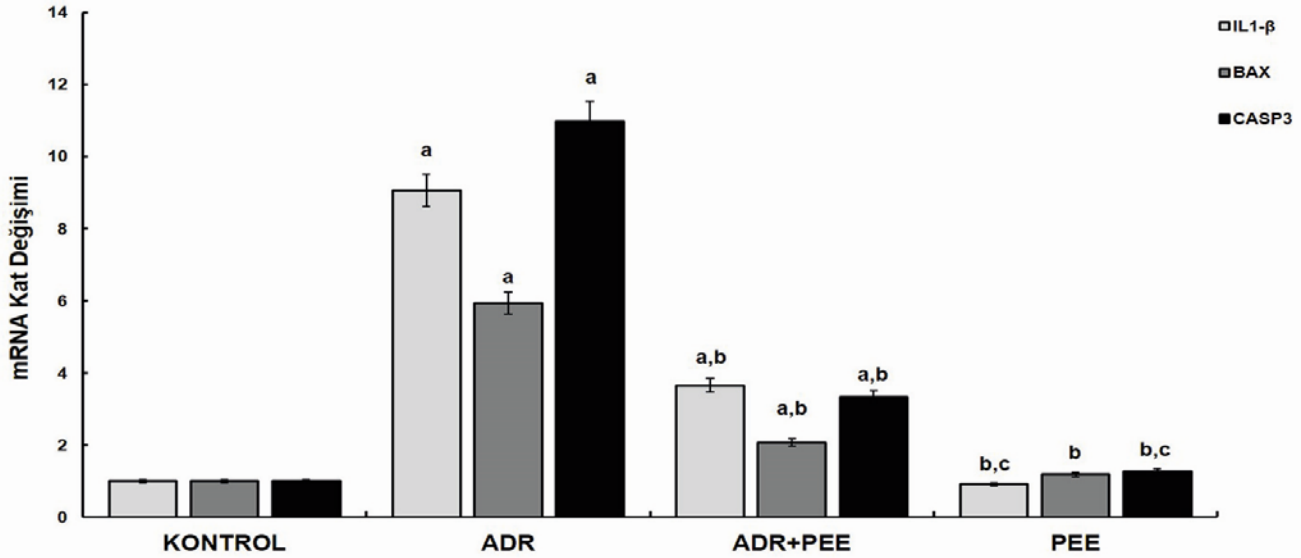


Şekil 2. ADR ve / veya PEE uygulamalarının sıçan kalp dokusu üzerindeki IL-1 β immünreaktivitesine etkileri: A: Kalp dokusuna ait IL-1 β immünohistokimyasal görüntüleri. Oklar gruplardaki IL-1 β immünreaktivitesini göstermekte. Kontrol ve PEE gruplarına ait kalp dokularında IL-1 β immünreaktivitesinin benzer olduğu ($p>0.05$) belirlendi (**a,d**). ADR grubuna ait IL-1 β immünreaktivitesinin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0.05$) artış olduğu gözlemlendi (**b**). ADR+PEE grubuna ait IL-1 β immünreaktivitesinin ADR grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı oranda ($p<0.05$) azaldığı tespit edildi (**c**). Tüm kesitler hematoksisilen ile zıt boyandı, skala bar: 100 μ m, $\times 200$. B: Gruplara ait IL-1 β histoskor sonuçları. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir ($n=6$). ^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^bADR grubuna göre karşılaştırıldığında, ^cADR+PEE grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı, istatistiksel anlamlılık ($p<0.05$). ADR: Adriamisin; PEE: Pleurotus eryngii Ekstraktı. IL-1 β : İnterlökin-1 beta.

Kantitatif RT-PCR Bulguları

Kontrol grubuna kıyasla PEE grubunda IL1- β , BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0.05$) (sırasıyla; $p=0.726509$, $p=0.502412$ ve $p=0.350470$). ADR grubunda IL1- β , BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde kontrol grubuna

kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$) (sırasıyla; $p=0.005083$, $p=0.006687$ ve $p=0.004666$). ADR+PEE grubunda ise IL1- β , BAX ve CASP3 mRNA düzeylerinde ADR grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$) (sırasıyla; $p=0.025168$, $p=0.018099$ ve $p=0.013731$) (Şekil 3).



Şekil 3. ADR ve / veya PEE uygulamalarının sıçan kalp dokusu üzerindeki IL-1 β , BAX ve CASP3 mRNA düzeylerine etkileri. Kontrol grubuna kıyasla; ADR grubunda IL-1 β , BAX ve CASP3 gen ekspresyonları anlamlı olarak arttı ($p < 0.05$). ADR+PEE grubunda ise ADR grubuna göre IL-1 β , BAX ve CASP3 gen ekspresyonları anlamlı olarak azaldı ($p < 0.05$). Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir (n=6). ^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^bADR grubuna göre karşılaştırıldığında, ^cADR+PEE grubuna göre karşılaştırıldığında anlamlı, istatistiksel anlamlılık ($p < 0.05$). ADR: Adriamisin; PEE: Pleurotus eryngii Ekstraktı. IL-1 β : İnterlökin-1 beta. BAX: BCL-2 ilişkili protein X, CASP3: Kaspaz-3.

TARTIŞMA

ADR, antirasiklin sınıfına ait en etkili antitümör antibiyotiklerden biridir. Bununla birlikte, ADR'nin klinik kullanımı, kardiyomiyopatiye ve kalp yetmezliğine yol açan kardiyotoksitite nedeniyle sınırlıdır¹⁰. ADR ile indüklenen kardiyotoksititenin mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır, ancak kanıtlar kardiyak inflamasyonun önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır¹. IL-1 β , kardiyak yeniden şekillenmede rol oynayan ve diğer inflamatuvar sitokin / kemokinlerin üretimine yol açarak doku hasarlarını destekleyen inflamatuvar bir sitokindir². ADR'nin damar ve miyokard'da inflamatuvar etkiyi uyararak IL-1 β sitokin seviyelerini arttırdığı ve bu artış ile birlikte kardiyak hasarın geliştiği gösterilmiştir¹¹. Ayrıca kemiricilerle yapılan çalışmalarda ADR uygulamasının kalp dokusunda inflamatuvar hücre artışına, vasküler hasara, sitoplazmik vakuolizasyona, miyofibriler dejenerasyona ve interstisyel ödeme yol açarak kardiyotoksititeye neden olduğu rapor edilmiştir¹²⁻¹⁴. Bu

raporlarla tutarlı olarak, çalışmamızda ADR uygulamasının kalp dokusunda sitoplazmik vakuolizasyon, miyofibril kaybı, inflamatuvar hücre atışı ve konjesyon ile karakterize edilen şiddetli histopatolojik lezyonlara ve kardiyak IL-1 β 'de önemli artışlara yol açtığı gözlemlendi. Bu sonuçlar kardiyak dokuda meydana gelen histopatolojik bulgular ile artan IL-1 β ekspresyon düzeylerinin ilişkili olduğuna dair daha önce yapılan çalışmaları desteklemiştir^{2,11}.

ADR ile indüklenen kardiyotoksitide yer alan mekanizmalardan biri de apoptozistir¹³. Apoptozis, sinyal iletimi sırasında bir dizi protein tarafından düzenlenir. Bunlardan biri olan BAX, pro-apoptotik sinyallerde görev alırken, proteolitik enzim olan CASP3, oksidatif stres yoluyla mitokondride apoptotik mekanizmaları başlatır¹⁵. Fareler ile yapılan bir deneyde, 5 mg/kg ADR maruziyetinin kardiyak dokuda BAX ve CASP3 ekspresyon seviyelerini arttırdığı ve bu artışın kardiyotoksititeye neden olduğu bildirilmiştir¹⁶. Ayrıca artan IL-1 β

ekspresyon seviyelerinin kardiyomiyosit apoptozunu uyardığına dair kanıtlar vardır¹⁷. Hafez ve ark. yaptıkları çalışmada, ADR tedavisi ile artış gösteren kardiyak IL-1 β 'nin CASP3 ekspresyon düzeylerinde yükselmeye neden olduğu ve böylece artan apoptozisin IL-1 β seviyeleri ile bağlantısının olabileceği ifade edilmiştir¹³. Çalışmamızda, ADR grubunda kontrol grubuna göre IL-1 β , BAX ve CASP3 düzeylerinde artışın tespit edilmesi bu raporları destekleyen sonuçlardandır. Bununla birlikte, ADR grubunda kontrol grubuna göre yükselen BAX, CASP3 seviyeleri ile birlikte histopatolojik bulguların gözlenmesi apoptozisin ADR ile indüklenen kardiyotoksisitenin patogenezinde rol oynadığını ortaya koyan diğer çalışmalarla uyumludur^{1,13}.

ADR ile indüklenen oksidatif stresin, bozulan antioksidan savunma sistemine eşlik ederek kardiyak hasara yol açtığı bilinmektedir. Farmakolojik çalışmalar, antioksidan tedavilerinin ADR ile ilişkili kardiyak hasarı azaltmada olumlu sonuçlar gösterdiğini kanıtlamıştır^{1,3,16}. Ayrıca anti-inflamatuar tedavilerin de hem ADR kaynaklı miyokardiyal inflamasyonu bastırdığı hem de kardiyomiyopatiyi engellediği rapor edilmiştir¹⁷. Bu bağlamda, antioksidan ve anti-inflamatuar etkilere sahip terapötik müdahalelerin kardiyotoksititeye karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir¹⁶. *P. eryngii*, uzun süredir hem besin kaynağı hem de farmakolojik ajan olarak kullanılan antioksidan aktivitelere sahip yenilebilir mantarlardandır. Kültürü yapılan diğer *Pleurotus* türlerine göre daha uzun raf ömrüne sahip olması, geniş meyve şekli, etli dokusu, sap ve şapkasının daha yoğun, sert ve dolgun olması, farklı aromatik yapısı ve yüksek besin içeriğinden dolayı farmakoloji ve biyoteknoloji çalışmalarında popülaritesi son yıllarda artmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* deneylerde, *P. eryngii*'nin antioksidan özelliğinin yanı sıra anti-inflamatuar, hepatoprotektif ve hipolipidemik etkileri

olduğu da gösterilmiştir, fakat kardiyoprotektif etkileri üzerine literatür bilgisi mevcut değildir^{19,20}. Bununla birlikte, Huang ve ark. sıçanlar üzerinde deneysel yağlı karaciğer modeli oluşturdukları bir çalışmada *P. eryngii*'nin karaciğer dokusunda malondialdehit düzeylerini azaltarak, süperoksit dismutaz düzeylerini ise yükselterek histopatolojik bulguları hafiflettiği bildirilmiştir²¹. ADR ile indüklenen kalp dokusundaki inflamasyona karşı PEE'nin etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Fakat PEE'nin alerjik reaksiyonlar üzerindeki inhibitör etkisini araştıran bir çalışmada, PEE'nin mast hücrelerinden inflamatuvar sitokin ekspresyon düzeylerini baskıladığı rapor edilmiştir²². Çalışmamızda da bu literatür bilgilerini destekler nitelikte ADR kaynaklı artan IL-1 β ekspresyon düzeylerinde PEE tedavisi ile anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca PEE tedavisi ile ADR kaynaklı artan BAX ve CASP3 aktivitelere de azalma olduğu belirlendi. Bulgularımız PEE'nin, anti-inflamatuar özelliği ile pro-inflamatuar yanıtları inhibe ederek ve anti-apoptotik özelliği ile apoptozisi azaltarak histopatolojik iyileşmeye yol açabileceğini ve böylece ADR'nin neden olduğu kardiyak hasarın önlenmesine katkı sağlayabileceğini göstermiştir.

Sonuç olarak mevcut çalışmadan elde edilen verilerimiz, ADR tarafından uyarılan kardiyak hasarın patogenezinde inflamasyon ve apoptozun muhtemel bir rolü olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, PEE tedavisinin ADR ile indüklenen kardiyotoksititeye karşı koruma sağladığı ve bu nedenle ADR uygulamaları sonrası oluşabilecek kardiyotoksititenin hafifletilmesinde potansiyel bir aday olabileceği kanaatindeyiz.

Etik Kurul Kararı: Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2019/15 sayılı 146 no'lu kararı gereğince etik yönden uygun bulunarak yapılmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Mardin Artuklu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Mardin, TÜRKİYE, (Proje numarası: MAÜ.BAP.18.SHMYO.041) tarafından desteklenmiştir.

Declaration of Conflicting Interests: The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial Disclosure: This study Mardin Artuklu University Scientific Research Projects Coordination, Mardin, supported by TURKEY (Project number: MAÜ.BAP.18.SHMYO.04).

KAYNAKLAR

1. Zhang J, Cui L, Han X, et al. Protective effects of tannic acid on acute doxorubicin-induced cardiotoxicity: involvement of suppression in oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 1253-60.
2. Sauter KA, Wood LJ, Wong J, Iordanov M, Magun BE. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome: Progress at a snail's pace. *Cancer Biol Ther* 2011; 11: 1008-16.
3. Yarmohammadi F, Rahimi N, Faghir-Ghanesefat H, et al. Protective effects of agmatine on doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity in rat. *Eur J Pharmacol* 2017; 796: 39-44.
4. Yang Z, Xu J, Fu Q, et al. Antitumor activity of a polysaccharide from *Pleurotus eryngii* on mice bearing renal cancer. *Carbohydr Polym* 2013; 95: 615-20.
5. Kim JY, Kang HI, Park KU, et al. Antioxidative and antitumor activities of crude polysaccharide fraction from *Pleurotus eryngii*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33: 1589-93.
6. Kang HI, Kim JY, Moon KD, et al. Effect of the crude polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004; 33: 1092-97.
7. Acay H, Yildirim A, Erdem Güzel E, Kaya N, Baran MF. Evaluation and characterization of *Pleurotus*

eryngii extract-loaded chitosan nanoparticles as antimicrobial agents against some human pathogens. *Prep Biochem Biotech* 2020; 50: 897-906.

8. Acay, H. Yenilebilen Yabani Mantar *Morchella esculenta* (L.) Pers.'nın Besinsel Kalitesi ve Biyoaktif Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *Mantar dergisi* 2018; 9: 95-105.

9. Dhamodharan G, Mirunalini S. A detail study of phytochemical screening, antioxidant potential and acute toxicity of *Agaricus bisporus* extract and its chitosan loaded nanoparticles. *J Pharm Res* 2013; 6: 818-22.

10. Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010; 115: 155-62.

11. Zhu J, Zhang J, Zhang L, et al. Interleukin-1 signaling mediates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 481-5.

12. Nazaire AK, Konan K, Severin KK, Felix YH, Joseph DA. Cardioprotective effect of tanopati against doxorubicin-induced myocardial toxicity in wistar rats. *J Pharm Res Int* 2015; 7: 282-90.

13. Hafez HM, Hassanein H. Montelukast ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity via modulation of p-glycoprotein and inhibition of ROS-mediated TNF- α /NF- κ B pathways. *Drug Chem Toxicol* 2020; 1-12.

14. Chen RC, Sun GB, Ye JX, Wang J, Sun XB. Salvianolic acid B attenuates doxorubicin-induced ER stress by inhibiting TRPC3 and TRPC6 mediated Ca²⁺ overload in rat cardiomyocytes. *Toxicol Lett* 2017; 276: 21-30.

15. Gedikli S, Şengül E. Ratlarda siklofosamid ile indüklenen hepatotoksisite üzerine kuersetinin etkileri. *Dicle Med J* 2019; 46: 41-50.

16. Qi W, Boliang W, Xiaoxi T, et al. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling. *Biomed Pharmacother* 2020; 122: 109547.

17. Zhu J, Zhang J, Xiang D, et al. Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist protects mice

against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Eur J Pharmacol* 2010; 643: 247-53.

18. Mishra KK, Pal RS, Arunkumar R, et al. Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials. *Food Chem* 2013; 138: 1557-63.

19. Chen J, Mao D, Yong Y, et al. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii*. *Food Chem* 2012; 130: 687-94.

20. Yuan B, Zhao L, Rakariyatham K, et al. Isolation of a novel bioactive protein from an edible mushroom *Pleurotus eryngii* and its anti-inflammatory potential. *Food Funct* 2017; 8: 2175-83.

21. Huang JF, Zhan T, Yu XL, et al. Therapeutic effect of *Pleurotus eryngii* cellulose on experimental fatty liver in rats. *Genet Mol Res* 2016; 15: 1-8.

22. Han EH, Hwang YP, Kim HG, et al. Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1416-25.