

DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARINDA LERKANİDİPİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTIAPOPTOTİK ETKİLERİNİN BCL-2/BAX/SİT C/CAS-3 YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIAPOPTOTIC EFFECTS OF LERCANIDIPINE IN DOXORUBICIN-INDUCED KIDNEY DAMAGE VIA BCL-2/BAX/SIT C/CAS-3 SIGNALING PATHWAY

İlter İLHAN¹, Halil AŞCI², Mehmet Abdulkadir SEVÜK², Orhan Berk İMECİ², Adem MİLLETSEVER³, Okan SANCER⁴

¹ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

² Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

³ Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Patolojisi Ana Bilim Dalı, Burdur, TÜRKİYE

⁴ Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Isparta, TÜRKİYE

Cite this article as: İlhan İ, Aşçı H, Sevük MA, İmeci OB, Milletsever A, Sancer O. Dokсорubisin ile Oluşturulan Böbrek Hasarında Lercanidipinin Antioksidan ve Antiapoptotik Etkilerinin Bcl-2/Bax/Sit C/Cas-3 Yolağı Üzerinden Araştırılması. Med J SDU 2022; 29(4): 671-679.

Öz

Amaç

Dokсорubisin (Dox) kemoterapide kullanılan antineoplastik bir ilaçtır. Nefrotoksisite, Dox'un kullanımını kısıtlayan önemli yan etkilerden biridir. Bir kalsiyum kanal blokörü olan lercanidipinin (Ler) antioksidan ve antiapoptotik özellik gösterdiği bilinmektedir. Çalışmamızda, sıçanlarda oluşturulan Dox uygulaması ile tetiklenen böbrek hasarında Ler'in oksidatif stres ve apoptoz üzerine etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Yirmi dört adet erişkin erkek sıçan; kontrol, Dox (8. günde bir kez intraperitoneal 20 mg/kg) ve Dox+Ler (8. günde bir kez intraperitoneal 20 mg/kg Dox, her gün oral gavaj ile 2 mg/kg Ler 10 gün boyunca) şeklinde 3 eşit gruba ayrılmıştır. Çalışma sonunda sakrifiye edilen sıçanların kanlarından kan üre azotu (BUN) ve kreatinin ile alınan böbrek dokusundan total oksidan seviyesi (TOS), total antioksidan seviyesi (TAS) ve

süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ölçülmüştür. Ayrıca, böbrek dokusunda Bcl-2-ilişkili X proteini (Bax), B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2), sitokrom c (sit c) ve kaspaz-3 (Cas-3) mRNA ekspresyon düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle ölçülmüştür. Ek olarak hematoksilen-eozin boyama ile böbrekteki histopatolojik değişimler incelenmiştir.

Bulgular

Çalışmamızda, Dox uygulaması BUN, kreatinin, TOS ve oksidatif stres indeks seviyelerini yükseltirken, SOD aktivitesi ve TAS seviyelerini azaltmıştır. Ayrıca Dox grubunda proapoptotik belirteçlerin (Bax, sit c ve Cas-3) ekspresyonu artarken antiapoptotik bir faktör olan Bcl-2'nin ekspresyonu azalmıştır. Histolojik incelemelerde ise Dox'a bağlı böbrek hasarını gösteren bulgular gözlenmiştir. Ler uygulaması, böbrekte Dox'a bağlı tüm değişiklikleri sınırlayarak koruyucu etkiler göstermiştir.

Sorumlu yazar ve iletişim adresi /Corresponding author and contact address: İ.İ. / ilterilhan@sdu.edu.tr

Müracaat tarihi/Application Date: 02.11.2022 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 06.12.2022

ORCID IDs of the authors: İ.İ: 0000-0003-3739-9580; H.A: 0000-0002-1545-035X;

M.A.S: 0000-0003-3875-9365; O.B.İ: 0000-0002-3850-0137; A.M: 0000-0002-3614-7798;

O.S: 0000-0001-7935-5004

Sonuç

Çalışmamız Ler'in antioksidan ve antiapoptotik özellikler göstererek Dox'un neden olduğu böbrek hasarını önlemede potansiyel bir aday olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Doksorubisin, Lerkanidipin, Oksidatif stres.

Abstract

Objective

Doxorubicin (Dox) is an antineoplastic drug used in chemotherapy. Nephrotoxicity is one of the important side effects that limit the use of Dox. It is known that lercanidipine (Ler), a calcium channel blocker, has antioxidant and antiapoptotic properties. In our study, we aimed to evaluate the effects of Lercanidipine (Ler) on oxidative stress and apoptosis in Dox-induced kidney damage in rats.

Material and Method

Twenty-four adult male rats were divided into 3 equal groups: control, Dox (20 mg/kg Dox intraperitoneally once on day 8) and Dox+Ler (20 mg/kg Dox intraperitoneally once on day 8, 2 mg/kg Ler by oral gavage every day for 10 days). At the end of the study, blood urea nitrogen (BUN) and creatinine levels were measured from the serum of rats. Also, total oxidant sta-

tus (TOS), total antioxidant status (TAS) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity determined from kidney tissues. In addition, Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell-lymphoma-2 (Bcl-2) cytochrome c (sit c) and caspase-3 (Cas-3) mRNA expression levels in kidney tissue were analyzed by quantitative real time polymerase chain reaction method. Also, histopathological changes were examined by hematoxylin-eosin staining.

Results

In our study, Dox administration elevated BUN, creatinine, TOS and oxidative stress index, while decreasing SOD activity and TAS levels. In addition, while the expression of proapoptotic markers (Bax, sit c and Cas-3) increased in the Dox group, the expression of Bcl-2, an antiapoptotic factor, decreased. In histological examinations, findings indicating kidney damage due to Dox exposure were observed. But, the Ler administration showed protective effects by limiting all the changes related to Dox in the kidney.

Conclusion

Our study shows that Ler may be a potential candidate drug for preventing Dox-induced kidney damage by showing antioxidant and antiapoptotic properties.

Keywords: Apoptosis, Doxorubicin, Lercanidipine, Oxidative stress.

Giriş

Doksorubisin (Dox), antirasiklin grubunda yer alan ve uzun süredir çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antineoplastik bir ilaçtır (1). Dox, antitümör etkinliği güçlü bir ajan olmasına rağmen kullanıma bağlı akut, subakut ve kronik olarak kalp, akciğer, karaciğer ve böbrek toksisitesi gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (2). Dox kaynaklı dokularda görülen hasarın mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte, artan oksidatif stresin özellikle kalp ve böbrek toksisitesinde önemli olduğu düşünülmektedir (3, 4).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) zararlı etkilerinin hücrelerdeki antioksidan savunma mekanizmasının koruyucu etkisine kıyasla daha güçlü olduğu durumda meydana gelen dengesizliği ifade eder. Bozulan denge sonrası artış gösteren ROS hücredeki lipid, protein ve DNA gibi yapılara hasar verir (5). Çalışmalar, doksorubisine bağlı hücredeki tiyol gruplarının oksidasyonu ve membran lipidlerinin peroksidasyonu ile sonuçlanan oksidatif stres artışının böbrek hasarında önemli olabileceğini göstermektedir (6).

Ayrıca böbrekte artmış oksidatif stres özellikle renal tübüler epitel hücrelerinde apoptozu indükleyebilmektedir (7). Bunun haricinde Dox uygulaması böbrek tübül epitelinde bulunan mitokondrielerde direk olarak hasara ve fonksiyon bozukluğuna da yol açabilmektedir (8). Ek olarak, hasarlı mitokondri, daha fazla ROS üretimine ve hücrelerde mitokondriyal apoptoz yolunun (Bcl-2-ilişkili X proteini [Bax] aktivasyonu, B hücreli lenfoma-2'nin [Bcl-2] azalması ve sitokrom c'nin [sit c] mitokondri dışına çıkması) aktivasyonuna neden olmaktadır (9).

Mitokondriden dışarı çıkan sit c apoptozom oluşturarak kaspaz enzimlerini (kaspaz-9 [Cas-9] ve kaspaz-3 [Cas-3]) aktiflemekte ve DNA parçalanması ile hücre ölümüne yol açmaktadır (10). Bu nedenle antiapoptotik ve antioksidan etkiye sahip ilaçların kullanılması Dox'un böbrekte ortaya çıkarabileceği yan etkileri azaltabilir.

Lerkanidipin (Ler), L-tipi kalsiyum kanallarını inhibe eden ve antihipertansif amaçla kullanılan dihidropiridin türevi bir kalsiyum kanal blokörüdür (11). Ler

düşük yan etki, uzun etki süresi ve yüksek lipofilik özellikleri bakımından birçok dihidropiridin türevi antihipertansife göre üstünlük göstermektedir (12, 13). Ayrıca Ler lipofilik yapıda olduğu için membranlarda birikerek doğrudan bir antioksidan görevi görebilmektedir. Özellikle mitokondri membranında lipid peroksidasyonunu azaltarak mitokondriyal fonksiyonların devamlılığını sağlamaktadır (14). Ek olarak yapılan çalışmalar, Ler'in güçlü anti-inflamatuvar ve antiapoptotik etkileri olduğunu göstermektedir (15, 16).

Böbrek yetmezliği, önemli bir kemoterapötik olan Dox'un kanser tedavisinde kullanımını sınırlayan ciddi yan etkilerinden biridir ve böbrek toksisitesini azaltacak bir ajanın bulunması tedavide fayda sağlayabilir. Çalışmamızda Dox'un sıçanlarda neden olduğu böbrek hasarında, Ler'in olası koruyucu etkilerini oksidatif stres ve apoptoz yolları üzerinden değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Deney Protokolü

Çalışmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 15.09.2022 tarih ve 82 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Tüm deney, etik kurul tarafından belirlenmiş kurallara uygun bir şekilde yürütülmüştür. Hayvan deneyi uygulamaları Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda 24 adet erişkin Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanılmıştır. Deney süresince standart ışık (12 saat aydınlık / 12 saat karanlık) ve ısı (23°C) koşulları ile yeterli su ve yem sıçanlara sağlanmıştır.

Sıçanlar, her grupta eşit hayvan (n=8) olacak şekilde rastgele kontrol, Dox ve Dox+Ler gruplarına ayrılmıştır. Bunlardan;

Kontrol grubuna, 10 gün boyunca oral gavaj ile ve 8. gün de intraperitoneal (ip) olarak serum fizyolojik (SF) verilmiştir.

Dox grubuna, deney süresince her gün oral gavaj ile SF ve 8. gün 20 mg/kg Dox ip olarak verilmiştir (17).

Dox+Ler grubuna 10 gün boyunca her gün oral gavaj ile 2 mg/kg Ler ve 8. gün 20 mg/kg Dox ip olarak verilmiştir.

Ler insan için tedavi amacıyla en yüksek günlük 20 mg dozunda kullanılabilir. Bu değer sıçanlar için kullanılan hayvan eşdeğer dozu (animal equ-

ivalent dose) 2,05 mg/kg olarak hesaplanmıştır (18). Çalışmamızda Ler hesaplama kolaylığı açısından bu değere yakın olan 2 mg/kg dozunda kullanılmıştır.

Deney sonunda sıçanlar, ip olarak verilen % 2 ksilazin HCl (10 mg/kg) ve % 10 ketamin HCl (90 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edildi. Sıçanların vena kava inferiorundan alınan kanlar, rutin böbrek fonksiyon göstergeleri olan kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeylerinin ölçülmesi için jelli biyokimya tüplerine alındı. Ayrıca alınan böbrek dokuları, biyokimyasal oksidatif stres parametreleri olan total oksidan seviyesi (TOS), total antioksidan seviyesi (TAS), oksidatif stres indeksi (OSI) düzeylerini ve qRT-PCR yöntemiyle mitokondriyal hasar göstergeleri olan Bax, Bcl-2, sit c ve Cas-3 mRNA ekspresyon düzeylerini analiz etmek için -80°C sıcaklık koşullarında buzdolabında saklandı. Alınan diğer böbrek dokusu ise histopatolojik inceleme için ayrıldı.

Histopatolojik Analizler

Sıçanlardan alınan böbrek dokuları %10 formaldehit içeren sıvı içinde tespit edilip, histolojik takip yöntemleri uygulanmasının ardından parafinde bloklandı. Elde edilen bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi ile boyandı. Hazırlanan örnekler ZEISS AX10 fotomikroskop (Almanya) kullanılarak incelendi ve değerlendirme, hasar derecesi 0 ile 3+ arasında skorlanarak yapıldı.

Biyokimyasal Analizler

Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için sıçanlardan alınan kanlar 3000 RPM'de 15 dk santrifüj edildi ve serum BUN ve kreatinin düzeyleri Beckman Coulter AU5800 (Beckman Coulter, ABD) otoanalizöründe spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Sıçanların böbrek dokuları Ultra Turrax Janke & Kunkel T-25 homojenizatör (IKA® Werke, Almanya) ile PBS (10 mM Na2HP04, 1.8 mM KH2P04, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, pH: 7.4.) içinde homojenize edildi. Daha sonra homojenize edilen dokuların süpernatantları 10000 RPM'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıldı. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla böbrek dokusu süpernatantlarının TAS ve TOS düzeyleri ticari kitler kullanılarak (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) spektrofotometrik yöntem ile Beckman Coulter AU5800 (Beckman Coulter, ABD) otoanalizöründe ölçüldü (19, 20). Ölçülen TOS ve TAS sonuçları ile OSI aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

OSI (arbitrary unit) = TOS (µmol H2O2 Eq/L) / TAS (mmol Trolox Eq/L) x 100.

Ayrıca ayrılan süpernatantların süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Ransod ticari kiti (Randox Laboratories, Birleşik Krallık) kullanılarak ksantin oksidaz yöntemiyle analiz edildi (21). Protein konsantrasyonları ise Beckman Coulter AU5800 (Beckman Coulter, ABD) otoanalizöründe ölçüldü.

Genetik Analizler

Genetik analiz için doku örneklerinin RNA izolasyonu GeneAll Ribospin RNA izolasyon kiti (Kore) ile yapıldı. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanodrop (Thermo-Fisher, ABD) cihazı ile ölçüldü. Her izole edilmiş RNA örneğinin konsantrasyonu 500 ng/ μ l'de standardize edildi.

cDNA sentezi, A.B.T.™ cDNA Sentez Kiti (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre thermal cycler (Thermo-Fisher, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Tüm aşamalar bir döngüde gerçekleştirildi ve elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

Primer tasarımları, spesifik mRNA sekansları tespit edilerek ve NCBI web sitesi kullanılarak yapıldı. Ekspresyon adımında kullanılan genler ve spesifik primer sekansları Tablo 1'de verilmiştir. Genlerin ekspresyon seviyeleri Biorad CFX96 RT-PCR (Biorad, ABD) cihazında A.B.T.™ 2xqPCR CYBR-Green MasterMix (Atlas Biyoteknoloji, Türkiye) kiti kullanılarak üreticinin protokolüne göre ölçüldü. Çalışmada housekeeping gen olarak Beta-aktin geni ve normalizasyon için bu genin ct değerleri kullanıldı. q-PCR için uygulanan

basamaklar ise 95 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, ardından 95 °C'de 20 sn ve 60 °C'de 30 sn'lik 40 döngüdür. Gen ekspresyonunun nispi nicelenmesi, $\Delta\Delta Ct$ karşılaştırma yöntemi kullanılarak yapıldı.

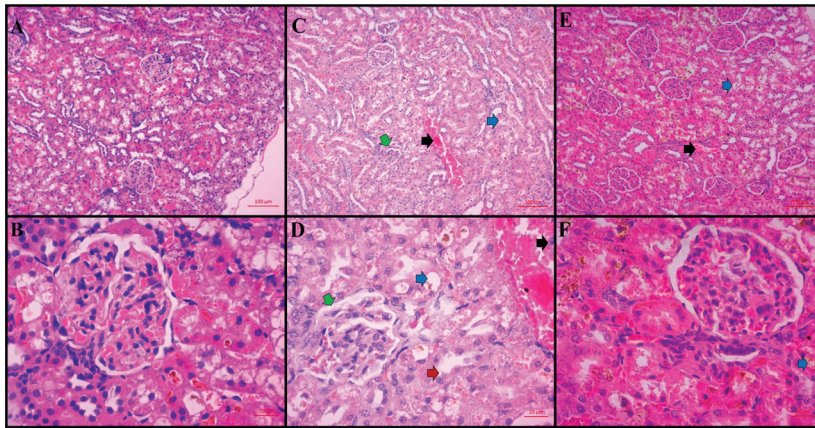
İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler ise veriler normal dağılım gösterdiği için One-way ANOVA, post-hoc Tukey's HSD testi kullanılarak IBM SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile yapıldı ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Değişkenler ortalama \pm standart sapmalar olarak sunuldu.

Bulgular

Histopatolojik Analizler

Histolojik değerlendirme sonucunda kontrol grubunda bulunan sıçanların böbrek dokularında herhangi bir patolojik bulguya rastlanmamıştır (Şekil 1A-10X büyütme ve Şekil 1B-40X büyütme). Dox verilen sıçanların böbrek dokuları incelendiğinde ise böbrek hasarı ile uyumlu bulgular saptanmıştır. Mikroskopik incelememizde yeşil ok ile gösterilen alanda glomerüler dejenerasyon, kırmızı ok ile tübüler dilatasyon, siyah ok ile damardaki hemoraji ve konjesyon ile mononükleer hücre infiltrasyon alanları, mavi ok ile de nekroz alanları gösterilmiştir (Şekil 1C-10X büyütme ve Şekil 1D-40X büyütme). Dox+Ler uygulanan grubun böbrek dokuları değerlendirildiğinde ise sadece Dox uygulanan gruba göre böbrek hasarının azaldığı görülmüştür ($p < 0.05$) (Şekil 1E-10X büyütme ve Şekil 1F-40X büyütme) (Tablo 2).



Şekil 1

Sıçan böbrek dokularının histolojik değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait böbrek dokusu görüntülerinde herhangi bir patolojik yapı görülmemiştir (A,B). Dox grubunda siyah okla damardaki hemoraji ile mononükleer hücre infiltrasyonu, kırmızı ok ile tübüllerde dilatasyon, mavi okla hücrelerdeki nekroz ve yeşil okla da glomerüler dejenerasyon gösterilmiştir (C, D). Dox+Ler grubunda siyah okla damardaki hemoraji ile mononükleer hücre infiltrasyonu ve mavi okla da hücrelerdeki nekroz bulguları gösterilmektedir (E, F). Hematoksilen-Eozin boyama. Üst sıradaki görüntüler X10 büyütme (ölçek çubuğu: 100 μ m) ile alt sıradaki görüntüler ise X40 büyütme (ölçek çubuğu: 20 μ m) ile gösterilmiştir.

Tablo 1 PCR analizinde kullanılan primer sekansları

Gen	Primer Sekansı	Ürün boyutu	Ort. Tm değerleri
Beta-aktin (HouseKeeping)	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250 bp	60.6 °C
	R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT		
Caspase-3	F: GGCCGACTTCCTGTATGCTT	110 bp	62.3 °C
	R: CGTACAGTTTCAGCATGGCG		
Sitokrom C	F: TAAATATGAGGGTGTGCG	192 bp	50.4 °C
	R: AAGAATAGTCCGTCCTG		
Bcl-2	F: ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC	134 bp	62.2 °C
	R: AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAA		
Bax	F: AGGGTGGCTGGGAAGGC	93 bp	64.4 °C
	R: TGAGCGAGGCGGTGAGG		

F: İleri (Forward), R: Geri (Reverse), Bp: Baz çifti, Tm: Erime noktası, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, Bax: Bcl-2-associated X protein

Tablo 2 Böbrek dokusunda histokimyasal skorlamaların gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol (Ort±SD)	DOX (Ort±SD)	DOX+LER (Ort±SD)
Tübüler Dilatasyon	0,13±0,13	2,25±0,25**	1,25±0,25*.#
Nekroz	0,25±0,16	2,13±0,23**	1,25±0,16*.#
Glomerüler Dejenerasyon	0,13±0,13	2,38±0,18**	1,63±0,18**.#
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	0,13±0,13	1,63±0,18**	0,88±0,13*.#
Hemoraji ve Konjesyon	0,13±0,13	2,50±0,19**	1,75±0,16**.#.#

Dox: Doksorubisin; Ler: Lerkandipin **=p<0.001, *=p<0.05 '* kontrol grubu ile karşılaştırmayı, ###=p<0.001, #=#=p<0.05, '# Dox grubu ile karşılaştırmayı temsil etmektedir.

Biyokimyasal Analizler

Böbrek fonksiyon göstergeleri olarak kullanılan serum BUN ve kreatinin düzeyleri, Dox grubunda kontrol grubuna göre sırasıyla %214 ve %72 oranlarında anlamlı olarak artmıştır (p<0.05). Bununla birlikte Dox+Ler grubunda ölçülen kreatinin ve BUN seviyeleri sadece Dox uygulanan gruba göre sırasıyla %30 ve %41 oranlarında anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05) (Tablo 3).

Böbrek dokusunda oksidatif stres parametreleri incelendiğinde ise TOS ve OSİ seviyelerinde Dox için sırasıyla %167 ve %223 oranlarında ve Dox+Ler grubunda ise iki parametre için de %82 oranında kontrole göre anlamlı artış bulunmuştur (p<0.05). Dox grubu-

nun SOD aktivitesinde ve TAS seviyesinde ise kontrole göre sırasıyla %40 ve %17 oranlarında Dox+Ler grubuna göre ise sırasıyla %39 ve %16 oranlarında anlamlı azalma saptanmıştır (p<0.05). Ayrıca Dox grubu ile Dox+Ler grubu karşılaştırıldığında TOS ve OSİ seviyeleri Dox+Ler grubunda Dox gruba göre sırasıyla %32 ve %44 oranlarında daha düşük bulunmuştur (p<0.05) (Tablo 3).

Genetik Analizler

Böbrek dokusunun genetik analizinde ise apoptoz göstergelerinden olan Bax, sit c ve Cas-3 mRNA ekspresyon seviyeleri Dox grubunda kontrole göre sırasıyla %147, %136 ve %159 oranlarında artarken Bcl-2 ekspresyonu kontrole göre %55 oranında an-

Tablo 3 Böbrek fonksiyon testlerinin ve oksidatif stres parametrelerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol (Ort±SD)	DOX (Ort±SD)	DOX+LER (Ort±SD)
Kreatinin (mg/dl)	0,29±0,08	0,79±0,24**	0,55±0,2*.#
BUN (mg/dl)	21,71±4,45	68,16±28,63**	40,2±17,37#
TOS (µmol H2O2 Eq/L)	15,56±4,70	41,56±6,01**	28,29±7,5*.#
TAS (mmol Trolox Eq/L)	1,90±0,15	1,57±0,14**	1,88±0,13#
OSİ	0,83±0,27	2,68±0,48**	1,51±0,39*.#
SOD enzim aktivitesi (U/mgr protein)	2,28±0,73	1,36±0,21*	2,24±0,19#

Dox: Doksorubisin; Ler: Lerkanidipin; TOS: Total oksidan seviyesi; TAS: Total antioksidan seviyesi; OSİ, Oksidatif stres indeksi; SOD: Süperoksit dismutaz. **=p<0.001, *=p<0.05 * kontrol grubu ile karşılaştırmayı, ###=p<0.001, #=p<0.05, '# Dox grubu ile karşılaştırmayı temsil etmektedir.

Tablo 4 Böbrek dokusunda rölatif mRNA ekspresyon seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılması

	Kontrol (Ort±SD)	DOX (Ort±SD)	DOX+LER (Ort±SD)
Bax	1.02±0.24	2.52±0.34**	1.61±0.17*.#
Bcl-2	1.03±0.28	0.46±0.18**	0.74±0.12*.#
Sit c	1.07±0.40	2.53±0.41**	1.67±0.33*.#
Cas-3	1.02±0.20	2.64±0.41**	1.40±0.20*.#

Dox: Doksorubisin; Ler: Lerkanidipin; Bax: Bcl-2 ilişkili X proteini, Bcl-2: B hücreli lenfoma-2, Sit c: Sitokrom c; Cas-3: kaspaz-3. **=p<0.001, *=p<0.05 * kontrol grubu ile karşılaştırmayı, ###=p<0.001, #=p<0.05, '# Dox grubu ile karşılaştırmayı temsil etmektedir.

lamli olarak azalmıştır (p<0.05). Dox+Ler grubunda ise Bax, sit c ve Cas-3 ekspresyon seviyeleri kontrole göre sırasıyla %58, %56 ve %37 oranlarında artarken Bcl-2 ekspresyonu %28 oranında anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05). Ek olarak, Dox grubu ile Dox+Ler grubu karşılaştırıldığında Bax, sit c ve Cas-3 mRNA ekspresyon seviyeleri Dox+Ler grubunda Dox grubuna göre sırasıyla %36, %34 ve %47 oranlarında azalırken Bcl-2 ekspresyonu %61 oranında anlamlı olarak artmıştır (p<0.05) (Tablo 4).

Tartışma

Dox çeşitli kanserlerde tek başına veya diğer kemo-terapötiklerle kombinasyon halinde kullanılan etkili bir antineoplastik ilaçtır (22). Ancak böbrek dokusu gibi bazı dokularda birikerek doğrudan toksik etkiler gösterebilmektedir (23). Dox'un dokularda hangi meka-

nizmalarla hasar oluşturduğu kesin olarak bilinmese de literatürde Dox toksisitesinde oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve hücre apoptozunun rol oynadığını ileri süren çalışmalar bulunmaktadır (24, 25). Çalışmamızda Dox ve Ler'in böbrek üzerinde oluşturduğu etkiler histolojik, biyokimyasal ve genetik analizler ile değerlendirilmiştir.

Klinikte böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla en sık serum BUN ve kreatinin parametreleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda BUN ve kreatinin seviyelerinin Dox grubunda kontrole göre artması ilaca bağlı olarak böbrek fonksiyon bozukluğunun geliştiğini göstermektedir. Al Asmari ve ark. yaptığı çalışmada tek doz 20 mg/kg Dox uygulanması çalışmamıza benzer olarak sıçanlarda böbrek fonksiyonlarını bozmuş ve BUN ile kreatinin seviyelerini artırmıştır. Ayrıca bu çalışmada Dox uygulamasının, böbrek

fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir (26). Ek olarak çalışmamızda Ler uygulamasının Dox'a bağlı gelişen BUN ve kreatinin artışını sınırladığı gösterilmiştir. Yapılan kapsamlı klinik çalışmalarda Ler'in hastalarda kreatinin klirensini artırdığı ve proteinüri gelişimini azalttığı bulunmuştur (27, 28). Literatürde Ler ile ilgili hayvan çalışmaları kısıtlı olmakla birlikte diğer dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokörlerinin (amilodipin, nifedipin) ilaçlara bağlı gelişen böbrek toksisitesine karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (29).

Birçok araştırmacı tarafından Dox kaynaklı nefrotoksitenin patogenezinde asıl olarak serbest radikallerin artışı ve oksidatif stresin olduğu öne sürülmektedir (30, 31). Dox'un halkasal yapısının hücrede bazı enzimler ile radikal hale dönüştüğü ve bu radikalin moleküler oksijeni, süperoksit anyon radikali ile hidrojen peroksit indirgediği bilinmektedir (32). Çalışmamızda TOS ve OSİ parametrelerinin Dox grubunda artışı Dox'a bağlı böbrekte oksidanların arttığını göstermektedir. Ayrıca TAS düzeyinin ve SOD enzim aktivitesinin azalması da hücresel antioksidan savunma mekanizmasında bozulmanın gerçekleştiğini göstermiştir. Bu verilerin ışığında çalışmamızda literatürle uyumlu olarak Dox uygulamasının böbrek dokusunda oksidatif stresi arttırdığı söylenebilir. Altinoz ve ark. yaptığı sıçan çalışmasında 20 mg/kg Dox uygulamasının böbrekte lipid peroksidasyonun göstergesi olan malondialdehid (MDA) artışına ve SOD, katalaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesinin azalmasına yol açtığını bulmuşlardır. Ek olarak verdikleri antioksidan bir bileşik olan linalool maddesinin oksidatif stresi azaltarak Dox'a bağlı böbrek hasarını azalttığını öne sürmüşlerdir (33). Deneyimizde benzer şekilde antioksidan özellikler taşıyan Ler'in Dox'a bağlı böbrekte gelişen oksidatif stresi azalttığı bulunmuştur. Ler'in antioksidan özellikleri ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Rachmani ve ark. yaptıkları klinik çalışmada Ler kullanan hipertansif ve diyabetik hastalarda okside LDL miktarının düştüğünü göstermişlerdir (34). Ayrıca Ler, okside LDL tarafından uyarılan hücre içi ROS artışını da engellemektedir (35). Oksidatif stres, hipertansif hastalarda matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerini uyarmaktadır. Bu hastalarda yapılan bir çalışmada Ler oksidatif stres tarafından indüklenen MMP-9 miktarını antioksidan etkilerle azaltmıştır. Ayrıca Ler kullanan hipertansif hastalarda plazma MDA düzeyi daha düşük bulunmuştur (36). Bir başka çalışmada Taddei ve ark. Ler kullanan hastalarda plazma lipoperoksit, izoprositan ve MDA seviyelerinin azaldığını ve plazma antioksidan kapasitesinin arttığını bulmuşlardır (37). Ayrıca Ler'in antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonu ve mitokondriyal hasarı da azalttığı öne sürülmektedir (14).

Mitokondri, hücre için enerji kaynağıdır ve apoptozun anahtar düzenleyicisidir. Bu sebeple, mitokondrinin hasar görmesi ve/veya fonksiyonlarının bozulması böbrek hastalıklarının gelişimi için kritik bir öneme sahiptir (38). Dox hücre içinde mitokondrielerde birikerek hasara ve fonksiyon bozukluğuna yol açabilmektedir. Bunun yanında Dox'un hücre içi kalsiyum artışına sebep olarak mitokondriye bağımlı apoptotik yolun aktivasyonunu uyardığı bildirilmiştir (39). Sıçanlarda yapılan çalışmalara göre 20 mg/kg dozunda (i.p) verilen Dox, böbrekte proapoptotik faktörlerden Bax ve cas-3'ekspresyonunda artmaya, antiapoptotik protein Bcl-2 ekspresyonunda azalmaya yol açmıştır (40, 41). Literatürdeki verilere benzer olarak çalışmamızda Dox uygulanan sıçanların böbreklerinde proapoptotik faktörlerin (Bax, sit-c ve cas-3) ekspresyonunda artma, antiapoptotik bir faktör olan Bcl-2 ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Ler uygulaması ise bu faktörler üzerine ters yönde etki göstererek böbrek dokusunda Dox'a bağlı apoptozu azaltmıştır. Literatürde Ler'in apoptoz üzerine etkilerini araştıran çalışmalar daha çok sinir sistemiyle ilgilidir. Gupta ve ark.'nın inme modeli oluşturduğu sıçanlarda 0,5 mg/kg dozunda Ler'in beyin dokusunda hücre içi kalsiyum düzeyi ve cas-3 seviyelerini azaltarak hücreleri koruduğu gösterilmiştir (16). Elbaz ve ark. ise Huntington hastalığı modeli oluşturduğu sıçanlarda 0,5 mg/kg dozunda verilen Ler'in, Bax ekspresyon artışını ve Bcl-2 ekspresyon azalışını sınırladığını raporlamışlardır (42).

Histopatolojik değerlendirmelerimizde ise Dox grubunun böbreklerinde mononükleer hücre infiltrasyonunda artış, tübüler dilatasyon, glomerüler lezyonlar ve nekroz alanları gibi böbrek hasarı ile ilişkili bulgular tespit edilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarında bizim bulgularımızla uyumlu olarak Dox uygulamasının tübüler değişiklikler ve glomerüler hasara yol açtığı bildirilmiştir (33, 43). Ayrıca bulgularımız Ler'in Dox'a bağlı gelişen böbrek hasarını histolojik olarak da azalttığını göstermektedir. Rosenthal ve ark.'nın diyabetik ve hipertansif sıçan kullanarak yaptıkları çalışmada Ler'in böbrekte glomerülleri koruyarak yapısal hasar oluşumunu azalttığı bulunmuştur (44). Parasetamol ve alkol ile oluşturulan karaciğer hasarında da ise Ler 1,8 mg/kg dozunda histolojik yapıyı koruyucu etkiler göstermiştir (45).

Dox ve Ler uygulamasına bağlı olarak sıçanların böbrek dokusundaki apoptotik ve antiapoptotik faktörlerin genetik ekspresyonlarında gözlenen değişimlerin bu faktörlerin kendisinin veya aktivitelerinden sorumlu formlarının konsantrasyonlarına nasıl yansıdığını göstermeye yönelik Western Blot veya immunohistokimya testlerinin yapılamaması çalışmamızdaki kısıtlamalar arasında yer almaktadır.

Sonuç

Çalışmamızda elde edilen veriler, Dox'un neden olduğu böbrek hasarına karşı Ler' in faydalı olabileceğini göstermektedir. Ler'in böbrekteki koruyucu etkisi antioksidan ve antiapoptotik özellikler ile birlikte, kalsiyum kanallarını bloke etme aktivitesine bağlı olabilir. Ancak Ler'in klinikte kullanımını için daha detaylı ileri çalışmalar gerekmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 15.09.2022 tarih ve 82 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

Finansman

Bu araştırma, kamu, ticari veya kar amacı gütmeyen sektörlerdeki finansman kuruluşlarından herhangi bir finansal destek almamıştır.

Verilerin Ulaşılabilirliği

Veriler yazarlardan talep edilebilir.

Yazar Katkıları

İ.İ: Çalışmanın planlanması, Formal Analizler, Araştırma, Metodoloji, Makalenin Yazımı.

H.A: Çalışmanın planlanması, Makalenin düzenlenmesi.

M.A.S: Araştırma, Metodoloji, Makalenin Yazımı.

O.B.İ: Araştırma, Verilerin İşlenmesi.

A.M: Formal Analizler, Görselleştirme.

O.S: Formal Analizler, Verilerin İşlenmesi.

Kaynaklar

1. Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy NF, Abdelrahman AM. Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Journal of toxicology*. 2016;2016:9507563.
2. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2013;65(2):157-70.
3. Wu Q, Li W, Zhao J, Sun W, Yang Q, Chen C, et al. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;137:111308.
4. Songbo M, Lang H, Xinyong C, Bin X, Ping Z, Liang S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicology letters*. 2019;307:41-8.
5. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*. 2015;6(3):331-6.
6. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varalakshmi P. The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. *Mol Cell Biochem*. 2003;247(1-2):15-22.
7. Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2016;25(12):657-84.
8. Taskin E, Ozdogan K, Kunduz Kindap E, Dursun N. The restoration of kidney mitochondria function by inhibition of angiotensin-II production in rats with acute adriamycin-induced nephrotoxicity. *Renal Failure*. 2014;36(4):606-12.
9. Atagün G, Zafer E, Gürkanlı İ. Apoptoziste mitokondrinin rolü. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*. 2011(2):9-53.
10. Su Z, Ye J, Qin Z, Ding X. Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-14.
11. Grassi G, Robles NR, Seravalle G, Fici F. Lercanidipine in the management of hypertension: an update. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2017;8(4):155-65.
12. Testa R, Leonardi A, Tajana A, Riscassi E, Magliocca R, Sartani A. Lercanidipine (Rec 15/2375): A Novel 1, 4-Dihydropyridine Calcium Antagonist for Hypertension. *Cardiovascular Drug Reviews*. 1997;15(3):187-219.
13. Epstein M. Lercanidipine: a novel dihydropyridine calcium-channel blocker. *Heart Dis*. 2001;3(6):398-407.
14. Bernocchi P, Ceconi C, Cargnoni A, Pedersini P, Boraso A, Curello S, et al. Effects of lercanidipine on Fe²⁺-induced mitochondrial lipid peroxidation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 1997;29:S63-S72.
15. Vasigar P, Batmanabane M. Anti-inflammatory activity of calcium channel blocker lercanidipine hydrochloride. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 2013;4(4):238-42.
16. Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Experimental neurology*. 2017;288:25-37.
17. Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, Cengiz M, Eser M, Soner BC, et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol*. 2011;2011:390238.
18. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*. 2016;7(2):27.
19. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*. 2005;38(12):1103-11.
20. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*. 2004;37(4):277-85.
21. Ukedo H, Kawana D, Maeda S, Sawamura M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on the reduction of highly water-soluble tetrazolium salts by xanthine-xanthine oxidase. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1999;63(3):485-8.
22. Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in oncology*. 1992;19(6):670-86.
23. Injac R, Boskovic M, Perse M, Koprivec-Furlan E, Cerar A, Djordjevic A, et al. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullerol C60 (OH) 24 via suppression of oxidative stress. *Pharmacological Reports*. 2008;60(5):742.
24. Abdelmeguid NE, Chmaisse HN, Zeinab N. Protective effect of silymarin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pak J Nutr*. 2010;9(7):624-36.
25. Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, Suzuki K, Ko KM, Krishnamurthy P, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119214.

26. AlAsmari AF, Ali N, Alharbi M, Alqahtani F, Alasmari F, Almoqbel D, et al. Geraniol Ameliorates Doxorubicin-Mediated Kidney Injury through Alteration of Antioxidant Status, Inflammation, and Apoptosis: Potential Roles of NF- κ B and Nrf2/Ho-1. *Nutrients*. 2022;14(8):1620.
27. Robles NR, Ocon J, Gomez CF, Manjon M, Pastor L, Herrera J, et al. Lercanidipine in patients with chronic renal failure: the ZAFRA study. *Renal failure*. 2005;27(1):73-80.
28. Robles NR, Calvo C, Sobrino J, Espinel E, Esteban R, Mateos L, et al. Lercanidipine valuable effect on urine protein losses: the RED LEVEL study. *Current medical research and opinion*. 2016;32(sup2):29-34.
29. Li J, Li Q-x, Xie X-f, Ao Y, Tie C-r, Song R-j. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. *European journal of pharmacology*. 2009;620(1-3):97-104.
30. Khan TH, Ganaie MA, Alharthy KM, Madkhali H, Jan BL, Sheikh IA. Naringenin prevents doxorubicin-induced toxicity in kidney tissues by regulating the oxidative and inflammatory insult in Wistar rats. *Archives of physiology and biochemistry*. 2020;126(4):300-7.
31. Kocahan S, Dogan Z, Erdemli E, Taskin E. Protective effect of quercetin against oxidative stress-induced toxicity associated with doxorubicin and cyclophosphamide in rat kidney and liver tissue. *Iranian journal of kidney diseases*. 2017;11(2):124.
32. Özgen ZE. Doksorubisin Kardiyotoksitesinin Oluşumu ve Önlenmesi. *Izmir Democracy University Health Sciences Journal*. 4(1):1-15.
33. Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Uremis N, Uremis M. Linalool exhibits therapeutic and protective effects in a rat model of doxorubicin-induced kidney injury by modulating oxidative stress. *Drug and Chemical Toxicology*. 2021:1-7.
34. Rachmani R, Levi Z, Zadok BS, Ravid M. Losartan and lercanidipine attenuate low-density lipoprotein oxidation in patients with hypertension and type 2 diabetes mellitus: A randomized, prospective crossover study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002;72(3):302-7.
35. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Pastorino AM, Davoli A, Nava C, et al. Antioxidant activity of different dihydropyridines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2003;302(4):679-84.
36. Martinez ML, Lopes LF, Coelho EB, Nobre F, Rocha JB, Gerlach RF, et al. Lercanidipine reduces matrix metalloproteinase-9 activity in patients with hypertension. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006;47(1):117-22.
37. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Versari D, Salvetti G, Magagna A, et al. Calcium antagonist treatment by lercanidipine prevents hyperpolarization in essential hypertension. *Hypertension*. 2003;41(4):950-5.
38. Gazdikova K, Fojtova A, Ticha L. Kidney manifestations of mitochondrial disorders. *Bratislavské Lekárske Listy*. 2022;123(9):659-71.
39. Wallace KB, Sardão VA, Oliveira PJ. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Circulation research*. 2020;126(7):926-41.
40. Ali N, AlAsmari AF, Imam F, Ahmed MZ, Alqahtani F, Alharbi M, et al. Protective effect of diosmin against doxorubicin-induced nephrotoxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(8):4375-83.
41. Al Seyedan A, Dezfoulian O, Alirezaei M. Satureja khuzistanica Jamzud essential oil prevents doxorubicin-induced apoptosis via extrinsic and intrinsic mitochondrial pathways. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2020;15(5):481.
42. Elbaz EM, Helmy HS, El-Sahar AE, Saad MA, Sayed RH. Lercanidipine boosts the efficacy of mesenchymal stem cell therapy in 3-NP-induced Huntington's disease model rats via modulation of the calcium/calcineurin/NFATc4 and Wnt/ β -catenin signalling pathways. *Neurochemistry International*. 2019;131:104548.
43. Afsar T, Razak S, Almajwal A, Al-Disi D. Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *Acacia hydasypica* tannin-rich ethyl acetate fraction. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2020;27(9):2251-60.
44. Rosenthal T, Rosenmann E, Tomassoni D, Amenta F. Effect of lercanidipine on kidney microanatomy in Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rats. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2007;12(2):145-52.
45. Venu K, Sujitha E, Samreen N, Rao CS, Fathima M, Syed AH, et al. Hepatoprotective agents as calcium channel blockers in paracetamol-induced and alcohol-induced hepatotoxicity models (curative method) in rats. *Egyptian Pharmaceutical Journal*. 2020;19(4):371.