

RATLARDA CİSPLATİN VE GENTAMİSİNİN KAN İLE KARACİĞERDE OLUŞTURDUKLARI OKSİDATİF STRES ÜZERİNE LİKOPENİN ETKİLERİ*

İzzet KARAHAN¹ Seval YILMAZ² Ahmet ATEŞŞAHİN¹

¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 05.10.2005 Kabul Tarihi: 07.11.2005

ÖZET

Bu çalışma, cisplatin ve gentamisin kan ile karaciğerde oluşturabilecekleri oksidatif stresi belirlemek ve likopenin iyileştirici bir etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla yapıldı.

Araştırmada kullanılan ratlar her grupta 6 hayvan olacak şekilde 5 gruba bölündü ve birinci grup kontrol olarak ayrıldı. Grup 2, 3, 4 ve 5'teki hayvanlara sırasıyla tek doz cisplatin (7 mg/kg); cisplatin uygulamasını takiben 5 gün süreyle likopen (4 mg/kg); 6 gün süre ile gentamisin (100 mg/kg) ve gentamisin ile birlikte likopen uygulamaları yapıldı. Tek doz cisplatin uygulamasını takiben 5. günde, diğer gruplarda ise son uygulamadan 24 saat sonra kan ve karaciğer örnekleri alındı. Bu örneklerde malondialdehid (MDA) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi.

Tek doz cisplatin uygulanan ratlarda plazma MDA ve kan GSH ile karaciğer MDA düzeylerinde önemli artışların olduğu, buna karşın cisplatin uygulamasını takiben likopen verilen grupta bu değerlerin kontrol değerlerine yaklaştığı belirlendi. Karaciğer GSH düzeylerinde ise kontrol grubuna göre bir farklılık olmadığı görüldü. Gentamisin uygulaması yapılan ratlarda ise yalnızca plazma MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre bir artış belirlenirken, karaciğer MDA ve GSH ile kan GSH düzeylerinin değişmediği tespit edildi. Diğer yandan, likopenle birlikte gentamisin uygulanan grupta ise plazma MDA düzeylerinin kontrol değerlerine yaklaştığı belirlendi.

Sonuç olarak, ratlarda gentamisin uygulamasının kan ve karaciğerde oksidatif stres oluşumunu önemli ölçüde etkilemediği, buna karşın cisplatin uygulamasının ise oksidatif stresi artırdığı ve likopen uygulamasının ise artan oksidatif stresi engelleyebileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Cisplatin, Gentamisin, Likopen, Malondialdehit, Glutatyon.

ABSTRACT

Effects of Lycopene on Cisplatin and Gentamicin Induced Oxidative Stres in Blood and Liver in Rats

This study was carried out to establish the effects of lycopene on administrations of high dose cisplatin and gentamicin induced oxidative stres in blood and liver and to investigate whether lycopene have any ameliorate effects.

Rats were divided into 5 groups, each consisting of 6 rats. Group 1 used as control. Animals of group 2, 3, 4 and 5 were administrated single dose cisplatin (7 mg/kg); cisplatin following 5 days lycopene (4 mg/kg); gentamicin for 6 days (100 mg/kg) and gentamicin together with lycopene respectively. Blood and liver tissue samples were collected 5 days after single dose cisplatin and 24 hours after the last treatment in other groups. The levels of malondialdehyde and reduced glutathione levels were determined spectrophotometrically.

Significant increases in plasma MDA, blood GSH and liver MDA, levels were observed in single dose cisplatin treated rats. Administration of lycopene after cisplatin produced decreases in these parameters. No change was observed liver GSH levels in these groups compared to the control group. While significantly increase was determined alone the levels of plasma MDA 6 days treatment of gentamicin in group 4 when compared control group; liver MDA, GSH and blood GSH levels were not changed. Normalization of plasma MDA levels was determined in treated lycopene together with gentamicin group.

In conclusion, treatment with gentamicine were not affected on oxidative stres in blood and liver, but cisplatin increased in rats, and it was concluded that lycopene may prevent increasing oxidative stres in blood and liver.

Key Words: Cisplatin, Gentamicin, Lycopene, Malondialdehyde, Glutathione.

GİRİŞ

Çoğu ksenobiotiklerin toksisitesinde olduğu gibi, anormal düzeyde etkin oksijen radikalleri oluşumu, bazı makromoleküller ve hücrede hasar, membran

lipidlerinin peroksidasyonunu içeren çeşitli mekanizmalarla nekroz, protein denatürasyonu ve DNA hasarı meydana getirebilir (1, 2).

* Bu araştırma I. Ulusal Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Kongresi (22-24 Eylül 2005, ANKARA)'nde poster olarak sunulmuştur.

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) halen yaygın olarak antikarsinogenik olarak kullanılan önemli bir sitotoksik maddedir (3, 4). Aminoglikozid antibiyotikler, özellikle gentamisin, ise veteriner ve insan hekimliğinde bilhassa gram negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılmaktadır (5, 6). Bu maddelerin terapotik anlamda ve doza bağlı neden olduğu toksisite oranı oldukça yüksektir. Bu yüzden klinik olarak kullanımları oldukça sınırlı bir hale gelmiştir (7-9). Hem cisplatin hem de gentamisin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, etkin oksijen radikallerinin düzeyini artırdığı gözlenmiştir. Cisplatin ve gentamisin uygulamaları sonucu oluşan lipid peroksidasyona bağlı olarak dokularda MDA ve GSH düzeylerinde ve bazı koruyucu enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan maddelerin düzeylerinde değişikliklere neden oldukları gösterilmiştir (2, 4, 10, 11).

Vitamin E, selenyum, vitamin C ve karotenoidler gibi antioksidan maddeler ilaç ve ksenobiotiklerin oluşturdukları oksidatif hasarlara karşı koruyucu etkilere sahiptirler (3, 10-12). Karotenoidlerin oksidatif stres üzerine etkisine dair pek çok araştırmalar yapılmıştır. Domates ve domatesten elde edilen ürünler likopen ve diğer benzeri karotenoidleri içerir. Likopen, bir alifatik hidrokarbondur ve doğal olarak bulunan yaklaşık 600 karotenoidden bir tanesidir (13-15). Likopen, singlet oksijen ile serbest radikallerin etkilerini önleme kapasitesi ve yüksek derecede antioksidan etkisi yönünden son zamanlarda yapılan çalışmalarda dikkatleri üzerine çekmektedir. Likopen tarafından güçlü bir şekilde oluşturulan antioksidan aktivite, çeşitli oksidatif hasarlar, toksisite ve diğer hastalıkların önlenmesine katkıda bulunmaktadır. Bundan dolayı, karotenoidler arasında likopen biyolojik etkin oksijen gruplarına karşı daha etkili, bir antioksidandır ve hem *in vivo* hem de *in vitro* doku ve hücrelerin iyileşme yada korunmasına katkıda bulunmaktadır (12, 14, 16, 17).

Bu nedenle, bu çalışmada ratlarda cisplatin ve gentamisin kan ve karaciğerde neden olabilecekleri oksidatif hasar üzerine likopenin muhtemel koruyucu veya iyileştirici etkilerini ortaya koymak amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hayvan Materyali : Bu çalışmada, 190-250 g ağırlıklarında 30 adet, erkek, sağlıklı, Sprague-Dawley ırkı ratlar (Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel Araştırma Merkezi, Elazığ) kullanıldı. Araştırmada deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına uygun olarak yürütüldü. Deneysel uygulamalar süresince

ratlara standart ticari rat yemi ve musluk suyu *ad libitum* sağlandı.

Deneysel İlaç Uygulamaları : Hayvanlar, bir grupta 6 rat olacak şekilde rastgele 5 gruba bölündü. Ratlara, böbrek hasarı yapıcı etkiye sebep olduğu iyi bilinen dozlarda; tek doz cisplatin (7 mg/kg) ve 6 gün süreyle gentamisin (100 mg/kg/gün) intraperitonel olarak enjekte edildi (6, 7, 9). Likopen ise mısır yağı içinde 4 mg/kg/gün dozunda mide gavajı şeklinde uygulandı. Çalışmada kullanılan likopenin dozu önceki çalışmalara dayanarak seçildi (8, 17).

Deneysel uygulamalar aşağıdaki gibi yapıldı.

Grup 1 (Kontrol, n = 6): Ratlara, 10 gün 0.5 ml mısır yağı verilmesini takiben 6 gün süreyle günde 0.5 ml intraperitonel (i.p) yolla izotonik sodyum klorür;

Grup 2 (n = 6): Ratlara tek doz cisplatin;

Grup 3 (n = 6): Ratlara tek doz cisplatin uygulanmasını takiben 5 gün süreyle likopen;

Grup 4 (n = 6): Ratlara 6 gün süreyle gentamisin;

Grup 5 (n = 6): Ratlara gentamisin ile birlikte eş zamanlı olarak 6 gün süreyle likopen uygulamaları yapıldı.

Örnek Alınması ve Biyokimyasal Analizler:

Bütün gruplardaki hayvanlar, son uygulamadan 24 saat sonra sakrifiye edilerek, kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Kan örnekleri antikoagülan (%2 sodyum okzalot) içeren tüplere toplandı ve plazmalarını ayırmak için +4 °C'de 200 g'de 5 dak santrifüje edildi. Plazma örnekleri ve karaciğer örnekleri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C'de saklandı. Analizler öncesinde karaciğer dokuları tüm homojenatta 1:10 (a/h) bulunacak şekilde % 1.15 KCl içeren bir tampon ile Teflon-glass homojenizatörde homojenize edildi. Bu homojenatlar MDA ve GSH düzeylerini belirlemek için 18.000 g'de, +4°C'de 15 dk. santrifüje edildi.

MDA düzeyleri tiyobarbitürik asit ile reaksiyonuna dayanan Ohkawa ve ark. (18)'nın modifiye yöntemine göre; GSH düzeyleri (nmol/g doku) Ellman (19)'ın bildirdiği spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.

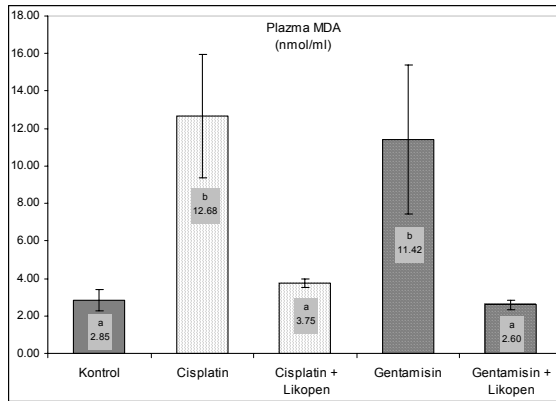
İlaç ve Kimyasal Maddeler: Gentamisin sülfat Eczacıbaşı (İstanbul, Turkey), Cisplatin (10mg/10ml, Code 1876A) Faulding Pharmaceuticals Pic (Warwickshire, UK), likopen (%10 FS DSM, Redivivo TM, Code 7803) Nutritional Products firmalarından, indirgenmiş glutatyon, glutatyon redüktaz, tiyobarbitürik asit, fosfotungustik asit, hidrojen peroksit, NADPH ve diğer kimyasallar

Sigma'dan (St Louis, MO, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany)'ten temin edildi.

İstatistiksel Analizler: Veriler ortalama değerler ($X \pm SD$) olarak verildi. Grup arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizini takiben Dunnet testiyle değerlendirildi. Sonuçların önem dereceleri $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ olarak vurgulandı.

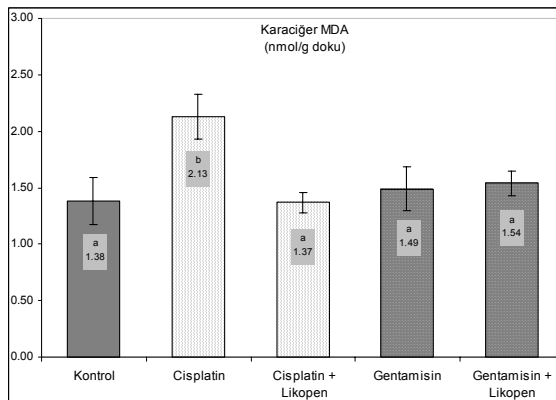
BULGULAR

Plazma ve Karaciğer MDA Düzeyleri: Tüm uygulamalardaki plazma ve karaciğerde oluşan MDA düzeylerindeki değişimler sırasıyla Şekil 1 ve 2'de sunuldu. Tek doz cisplatin uygulanan ratlarda (Grup 2) plazma MDA ($p < 0.05$) ile karaciğer MDA ($p < 0.05$) düzeylerinde kontrol grubuna göre önemli artışların olduğu, diğer yandan cisplatin uygulamasını takiben likopen verilen grupta (Grup 3) hem plazma hem de karaciğer MDA düzeylerinin normale indiği ve kontrol grubuna göre farklılık göstermediği görüldü.



^{a, b}: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

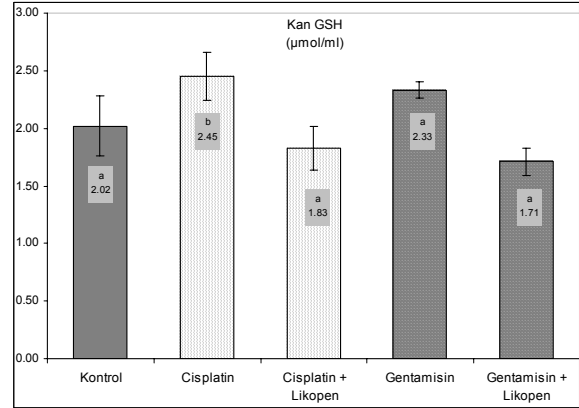
Şekil 1. Tüm Uygulamalardaki Plazma MDA (nmol/ml) Düzeyleri.



^{a, b}: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.05$)

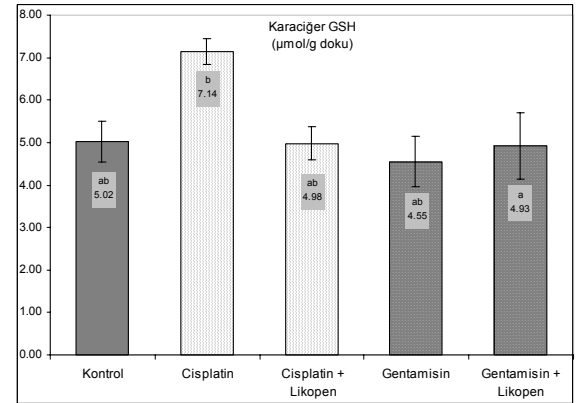
Şekil 2. Tüm Uygulamalardaki Karaciğer MDA (nmol/g doku) Düzeyleri.

Kan ve Karaciğer GSH Düzeyleri: Tüm uygulamalardaki kan ve karaciğerde oluşan GSH düzeylerindeki değişimler sırasıyla Şekil 3 ve 4'te sunuldu. Kan GSH ($p < 0.01$) düzeylerinin yalnızca tek doz cisplatin uygulanan grupta arttığı; cisplatinle birlikte likopen, yalnız başına gentamisin ve gentamisinle eş zamanlı likopen uygulamalarında ise kan GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre farklılık göstermediği belirlendi.



^{a, b}: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$)

Şekil 3. Tüm Uygulamalardaki Kan GSH (µmol/ml) Düzeyleri.



^{a, b}: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$)

Şekil 4. Tüm Uygulamalardaki Karaciğer GSH (µmol/g doku) Düzeyleri.

Buna karşın karaciğer GSH düzeylerinin cisplatin uygulamasını takiben likopen ve gentamisinle eş zamanlı likopen uygulamaları yapılan gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görülse de, tüm gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edildi.

TARTIŞMA

Cisplatin ve gentamisin gibi bazı ilaçların etkin oksijen radikallerinin oluşturma yeteneğinde olduğu ve etkin oksijen radikallerinin bu maddeler tarafından oluşturulan hasarlarda arttığı bildirilmektedir (3, 5, 10). Serbest radikaller için bir substrat görevi gören MDA, doymamış yağ asitlerinin yıkımlanması sonucu oluşan dokulardaki lipid peroksidasyonun son ürünüdür. GSH, hücre metabolizmasına katılan, hücre bütünlüğünün muhafazası için esansiyel bir bileşiktir (1, 2). Yapılan deneysel çalışmalarda cisplatin ve gentamisin tarafından oluşturulan hasarların artmış olan MDA düzeyleriyle doğrudan ilişkili olduğunu belirlenmiştir (4-9, 11). Diğer yandan ksenobiyotikler ve diğer toksik maddelerin oluşturdukları oksidatif hasarlarda oluşan doku GSH seviyeleri ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişiklikler halen tartışmalı bir problemdir. Bazı araştırmacılar (7, 11) ratlara cisplatin uygulamasıyla oluşturulan oksidatif strese bağlı olarak böbrek GSH düzeylerinde azalma gözlemlerken, bazı araştırmacılar (3, 4, 10) ise oluşan hasarın GSH düzeylerini değiştirmedini ve hatta arttırabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca, gentamisin de özellikle böbrek dokularında GSH düzeylerini etkilemediği veya azalttığı bildirilmektedir (2, 6, 8). Bu çalışmada cisplatin ve gentamisin plazma MDA düzeylerini arttırdığı belirlenirken, karaciğer MDA düzeylerinin ise, yalnızca cisplatin uygulamalarında arttığı görüldü. Diğer yandan, GSH düzeylerinin yalnızca cisplatin uygulamaları sonucunda kanda arttığı tespit edildi. Bu bulgular kan ve karaciğerde cisplatinin oksidatif hasar oluşumunu arttırdığını, gentamisin ise etkilemediğini ortaya koymaktadır.

Karotenoidlerin lipid peroksidasyon ve etkin oksijen gruplarının oluşmasına karşı güçlü etkilerinin olduğu iyi bilinmektedir. Likopen, domates ve domates ürünlerinden elde edilen en önemli karotenoiddir (13-15). Tüm karotenoidler gibi likopenin etkin oksijen gruplarıyla ilişkili yüksek düzeydeki oksidatif strese karşı etkisi gösterilmiştir. Enerji etkin oksijen radikallerinden likopen

molekülüne aktarılır ve molekül enerji bakımından zengin bir yapıya dönüştürülür. Bu şekilde etkin oksijen gruplarının da tutulması ise likopen moleküllerinin oksidatif yıkımlanmasına sebep olur. Böylece likopen, etkin oksijen radikallerinin aracılık ettiği hasar ve oksitlenme ürünleri oluşumu sonucu görülen hücrel yapıların, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın *in vivo* olarak oksidasyonuna karşı koruyucu etki yapar (12, 14-16)

Yapılan araştırmalarda (12, 13, 16, 17) likopenin çeşitli sebeplere bağlı olarak oluşturulan oksidatif stresler ile katarakt, yangı, çeşitli kanser vakaları ve kardiyovasküler hastalıklarda antioksidanlar gibi etkiyerek MDA düzeylerini azalttığı, GSH ve vitamin E başta olmak üzere diğer antioksidanların etkinliklerini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca daha önceki çalışmalarımızda (7, 8) uygulama öncesi ve sonrası likopen verilmesinin cisplatin ve gentamisin tarafından oluşturulan böbrek hasarına karşı koruyucu etki sağladığını gösterdik. Bu çalışmada cisplatin tarafından plazma ve karaciğerde, gentamisin tarafından plazmada arttırılan MDA düzeylerinin, likopen verildiğinde normal düzeylere düştüğü; GSH düzeylerinde ise değişmelerin olmadığı belirlendi. Açıkça görülmektedir ki, likopenin karaciğer ve kanda oluşturulan oksidatif hasara karşı faydalı etkilerine katkıda bulunan mekanizmalardan biri onun antioksidan aktiviteye sahip olmasıdır.

Sonuç olarak, cisplatinin kan ve karaciğerde oksidatif stresi arttırdığı, gentamisin ise etkisinin önemli olmadığı; likopen uygulanmasının oluşan bu oksidatif strese karşı koruyucu etki sağladığı ortaya konuldu. Klinik olarak bu gibi ilaç veya ksenobiyotik toksitelerine karşı likopenin muhtemel koruyucu ve tedavi edici etkilerinin açıklanması için daha başka çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kehrer, JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23 (1): 21-48.
2. Priuska, E.M, Schacht, J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (11): 1749- 1752.
3. Antunes, LM, Darin, JD, Bianchi, MP. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats. *Pharmacol Res* 2000; 41 (4): 405-11.
4. Mora, LO, Antunes, L.M, Francescato, HD, Bianchi, ML. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003; 47: 517-522.
5. Cuzzocrea, S, Mazzon, E, Dugo, L, Serraino, I, Di Paola, R et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 16, 450 (1): 67-76.
6. Nakajima, T, Hishida, A, Kato, A. Mechanisms for protective effects of free radical scavengers on

- gentamicin-mediated nephropathy in rats. *Am J Physiol* 1994; 266: F425-431.
7. Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan İ, Çeribaşı AO, Karaoğlu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212 (2-3): 116-123.
 8. Karahan İ, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 2005; 215 (3): 198-204.
 9. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicol Lett* 1992; 62, (2-3): 293-300.
 10. Naziroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195 (2-3): 221-230.
 11. Silva CR, Greggi Antunes, LM, Bianchi ML. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43, 6: 561-566.
 12. Reifen R, Nissenkorn A, Matas Z, Bujanover Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. *J Gastroenterol* 2004; 396: 514-19.
 13. Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Verma, SD. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutr* 2003; 19: 794-799.
 14. Heber D and Lu QY. Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp Biol Med* 2002; 227: 920-923.
 15. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharma* 2004; 58: 100-110.
 16. Matos HR, Di Mascio P, Medeiros MH. Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture. *Arch Biochem Biophys* 2000; 383 (1): 56-59.
 17. Velmurugan B, Bhuvanewari V, Nagini S. Antiperoxidative effects of lycopene during N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis. *Fitoterapia* 2002; 73, 7-8: 604-611.
 18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
 19. Ellman G. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.