

Sisplatin Nefrotoksitesisi Oluşturulan Sıçanların Plazma Glutasyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Adenozin Deaminaz Aktiviteleri ve Nitrik Oksit Seviyelerine Ginkgo Biloba Ekstraktının Etkileri

THE EFFECTS OF GINKGO BILOBA EXTRACT ON PLASMA GLUTATHION PEROXIDASE, SUPEROXIDE DISMUTASE, ADENOSINE DEAMINASE AND NITRIC OXIDE LEVELS IN CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY

Dr. Mukaddes GÜLEÇ,^a Dr. H. Ramazan YILMAZ,^b Dr. Mustafa IRAZ,^c Dr. Seda AĞLAMİŞ,^c Dr. Sadık SÖĞÜT^d

^aBiyokimya, ^cFarmakoloji AD, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, MALATYA

^bTıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, ISPARTA

^dBiyokimya AD, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, HATAY

Özet

Amaç: Sisplatin (CDDP) geniş spektrumlu platin türevi bir antineoplastik ajandır. Kuvvetli nefrotoksitesite riskinden dolayı tedavide kullanımı oldukça kısıtlıdır. CDDP'nin böbrek dokusunda yaptığı hasarın altında yatan mekanizma büyük oranda reaktif oksijen ürünleri (ROS)'ne bağlıdır. Ginkgo biloba ekstraktı (GBE)= Egb 761, birçok organ ve dokunun birbirinden farklı ama ortak olarak serbest radikallerin öncelikli rol oynadığı patolojilerinde kullanılmakta olup tedavide faydalı etkisi olduğu görülmüştür. Bu çalışma GBE'nin sisplatin nefrotoksitesisine karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını tespit etmek amacıyla planlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada erkek Sprague Dawley sıçanlar (60 günlük) kullanıldı. Hayvanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı: Kontrol grubu (n=7), IP 7 mg/kg' dan tek doz CDDP (Cisplatin, Ebewe) uygulanan grup (n=8), CDDP ile birlikte IP 10 mg/kg E-vit (Evigen-Aksu) verilen grup (n=9), CDDP ile birlikte oral 100 mg/kg GBE uygulanan grup (n=7). Deneysel işlemlerden 10 gün sonra hayvanların kanları alınarak uygulanan ajanların plazma oksidan/antioksidan sisteme olan etkileri araştırıldı.

Bulgular: Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde; CDDP alan sıçanların plazma glutasyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesinde azalma söz konusu iken, adenozin deaminaz (ADA) aktivitesinde ve nitrik oksit (NO) değerlerinde artışa rastlanmıştır. Plazma süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde, gruplar arasında herhangi bir değişiklik olmamıştır. CDDP + E-vit verilmesi ile GSH-Px ve ADA aktivitelerinde kontrole yakın olmak üzere NO değerlerinde de bir düzelmeye gözlenmiştir. CDDP + GBE alan grubun GSH-Px aktiviteleri sadece CDDP alan gruba göre anlamlı derecede artmıştır (p<0.014). GBE aynı zamanda CDDP ile artmış olan ADA ve NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan belirgin bir azalma sağlamıştır.

Sonuç: Bu sonuçlara göre CDDP ile oluşturulan nefrotoksitesinin temelinde hücre savunma sisteminin bozulması söz konudur. Antioksidan özelliği olan GBE, burada kısmen koruyucu bir etkinlik göstermiştir. CDDP nefrotoksitesisinde GBE'nin kesin tedavi edici bir ilaç olarak değerlendirilebilmesi için henüz çok erkendir. Bu nedenle farklı doz, farklı süre ve farklı denek sayılarıyla yeni çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin nefrotoksitesisi, ginkgo biloba, glutasyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, adenozin deaminaz, nitrik oksit

Abstract

Objective: Cisplatin (CDDP), derived from platinum, is a broad-spectrum antineoplastic agent. It has not commonly been used as a therapeutic agent because of its nephrotoxicity risk. The underlying mechanism in nephrotoxicity has been attributed to reactive oxygen species (ROS). Ginkgo biloba extract (GBE, Egb 761) has been shown to be effective on some organ and tissue pathologies induced by ROS. The aim of this experimental study was to determine whether antioxidant GBE has a preventive effect on nephrotoxicity induced by CDDP through oxidative damage.

Material and Methods: Male Sprague Dawley rats (60 days old) were used in the experiments. Rats were randomly assigned to one of four groups: control or untreated rats (n=7); rats treated with i.p. injection in a single dose of 7 mg/kg body wt CDDP (Cisplatin, Ebewe) (n=8); rats treated with CDDP plus i.p. injection of 10 mg/kg body wt vitamin E (Evigen-Aksu, Turkey) (n=9); and rats treated with CDDP plus oral administration of GBE in a dosage of 100 mg/kg body wt (n=7). After 10 days of experimental procedure, animals were euthanized by bleeding, kidneys were removed and oxidant and antioxidant parameters were examined to determine the effects of agents as applied to the rats.

Results: In treated rats, the activity of plasma glutathion peroxidase (GSH-Px) was decreased, but adenosine deaminase (ADA) and nitric oxide (NO) levels were increased with CDDP. The activity of superoxide dismutase (SOD) remained unchanged in all study groups. Upon treating the rats with CDDP + vit E, the activities of GSH-Px and ADA, and the level of NO were improved. In the case of CDDP + GBE application, we determined an increased activity of GSH-Px in comparison with the rats treated with CDDP (p<0.014). GBE also decreased the levels of ADA and NO, which were increased in the CDDP-treated group.

Conclusion: In keeping with the results, the main underlying mechanism in CDDP-induced nephrotoxicity appears to be due to renal tubular cell damage. GBE appeared to induce a beneficial therapeutic effect in this study. However, we can not yet consider GBE to be a new therapeutic agent in CDDP nephrotoxicity until further studies with various doses, different time intervals, and more animal numbers have been provided.

Key Words: Cisplatin nephrotoxicity, ginkgo biloba, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, adenosine deaminase, nitric oxide

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:585-591

Geliş Tarihi/Received: 10.02.2004 Kabul Tarihi/Accepted: 30.04.2004

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Mukaddes GÜLEÇ

Akyurt Devlet Hastanesi
06750 Akyurt, ANKARA
drmmukaddes@yahoo.com

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24

CDDP (sisplatin) testis, over, mesane, serviks, baş ve boyun, akciğer küçük hücreli tümörleri gibi birçok solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir

kemoterapötiktir.¹ Terapötik etkisini DNA çift zincirinde zincirler arası ve zincir içi çapraz bağlanma yaparak gösterir. Böbrek, karaciğer ve barsakların üst bölümlerinde yaygın dağılım gösterir. Verilişinden sonra 4 ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir.² Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır. Miyelosüpresif etkinliği orta derecede olduğu için kombinasyonlara elverişlidir ve daha çok o şekilde kullanılır. Kullanımını kısıtlayan en önemli yan tesiri doza bağımlı olarak ortaya çıkan akut tübüler nekrozdur.³ CDDP tedavisinin yaklaşık %30'unda rastlanmaktadır.

Nefrotoksisitenin temelinde yatan mekanizma hakkında tam bir fikir birliğinin henüz oluşmamasına rağmen son zamanlarda yapılan araştırmalarda, oksidatif stresin önemli rolü olduğunu kanıtlayan deliller bulunmaktadır. CDDP tedavisi alan hastaların böbrek dokularında lipid peroksidasyonu artmaktadır.⁴ Clerici ve ark.'nın yaptığı çalışmada CDDP, OH ve diğer serbest radikallerin artışına; Sasada ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da peroksit radikallerinin artışına neden olmuştur.^{5,6} Ratlarda yapılan in vivo çalışmalarda CDDP'in süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürdüğü ve reaktif oksijen türlerini yakalama görevi olan redükte glutatyon (GSH)'un seviyesini de azalttığı gösterilmiştir.⁷⁻¹⁰ Artan reaktif oksijen türleri de DNA hasarına ve membranlarda lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedir.¹¹ CDDP saatler içinde böbrek proksimal tübüllerinde özellikle de S₃ segmentinde akut fonksiyonel hasara yol açar. İntratübüler basınç artar ve glomerüllere yansıyan bu basınç glomeruler filtrasyon hızında azalmaya neden olur.¹² Serum kreatinin seviyesi tedavinin 6-7. günlerinde yükselir ve yaklaşık 3 haftada normale döner.¹³

CDDP'nin indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) sentezini artırarak da nefrotoksik etki gösterdiği rapor edilen bilgiler arasındadır.^{14,15}

Basitçe ginkgo da denilen ginkgo biloba, ginkgo bitki ailesinin tek yaşayan üyesidir. Ginkgo ağacı; kuvvetliliği, hastalıklara karşı dirençliliği ve uzun yaşama özelliği ile karakterizedir.

Ginkgo'nun tıbbi kullanımı eski Çin Materia Medica Pen Tsao Ching (M.Ö. 2800)'e dayanmaktadır. Tarih boyunca ginkgo biloba; kalp ve böbrek bozukluklarında, Alzheimer hastalığı ve astımda tedavi amacıyla ayrıca dolaşımı düzenleyici ve enerjiyi artırıcı olarak kullanılmıştır. Batıda ginkgo yapraklarının ekstraktı veya eriği tıbbi müstahzar olarak kullanılmaktadır. Modern farmakolojik araştırmalar ginkgo biloba ekstraktı (GBE)'nin elde edilmesini sağlamıştır. Günümüzde kullanılan standart GBE (Egb 761) içinde %24 oranında flavon glikozidler, %6 oranında terpenoidler ve çeşitli organik asitler bulunur.¹⁶ Flavon glikozidler; quersetin, kempferol ve izorhamnetin bileşiklerinden oluşur. Bunların güçlü antioksidan özellikleri vardır. Ortamda bulunan süperoksit, hidroksil ve peroksil radikalleri gibi serbest radikalleri yakalayarak hücreleri lipid ve protein oksidasyonuna karşı korurlar.¹⁷ Terpenoidler; bilobalid ve ginkgolidler (ginkgolid A, B, C, M ve J)'den oluşur. Ginkgolid-B, platelet aktive edici faktörün (PAF) kuvvetli inhibitörüdür.^{18,19} Kan pıhtılaşması ve enflamasyon sürecinde önemli rol oynar. GBE, dokularda kan dolaşımını artırarak hücrelerin oksijen alımını artırır ve ortamda bulunan toksinlerin temizlenmesini sağlar.

Bugün orijinali Almanya'da üretilmiş olan GBE'nin hazır preparatları özellikle sinir sistemini ilgilendiren bunama, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi beyin fonksiyonlarının bozulduğu durumlarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır.^{20,21} Bunun yanında güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve nöron koruyucu özelliğinden dolayı birçok hastalığın tedavisinde de yararlı olabileceğini vurgulayan çalışmalar sürdürülmektedir.^{22,23}

Biz bu çalışmada CDDP ile ratlarda akut böbrek yetmezliği tablosu oluşturarak GBE'nin oluşan nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir rolünün olup olmadığını araştırdık. Burada asıl amaç CDDP kullanan kanserli hastalarda gelişmesi muhtemel olan akut böbrek yetmezliğinin tedavisinde kullanılabilecek bir ajanın etkinlik derecesini saptamaktır.

Gereç ve Yöntemler

1. Sıçanların temini ve deney gruplarının oluşturulması

Bu çalışmada kullanılan Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deneysel ve Klinik Araştırma Laboratuvar'ından temin edildi. Deney "Guide for the use of Laboratory Animals, DHEW Publication No. (NIH) 85-123, 1985" kriterlerine uygun olarak yürütüldü. Deney gününe kadar havalandırması olan ve gün ışığı alan odalarda, özel kafeslerde tutulan sıçanlara *ad libitum* standart pellet yem ve çeşme suyu verildi. Deneyden bir gün önce, yemleri kesilen sıçanların ağırlıkları tartıldı ve ağırlıkları 250 g'ı geçen sıçanlar rastgele alınarak, kontrol ve deney grupları oluşturuldu.

Grup-1: Kontrol grubu (n= 7): Birinci gün %0.9'luk SF, 1 mL/kg'dan disposibl enjektör ucuna takılan kanül yardımıyla mideye her gün 1 x 1 (günde bir kez) olarak deney süresince (10 gün) uygulandı. SF verilmesinin sebebi, deney gruplarında kullanılacak olan GBE'nin SF içinde çözünmüş olmasından dolayıdır.

Grup-2: CDDP grubu (n= 8): Dördüncü gün tek doz CDDP 7 mg/kg (Cisplatin, 0.5 mg/mL, 20 mL flakon, EBEWE-Liba) IP olarak enjekte edildi.

Grup-3: CDDP + E-vitamini (E-vit) grubu (n= 9): Deney süresince her gün IP olarak E-vit (Evigen, 300 mg/2 mL ampul, Aksu) 10 mg/kg dozda 1 x 1 olarak verildi. Dördüncü gün 7 mg/kg CDDP tek doz halinde IP olarak uygulandı.

Grup-4: CDDP + GBE (n= 7): Deney süresince her gün disposibl enjektör ucuna takılan kanül yardımıyla doğrudan mideye 100 mg/mL/kg GBE 1 x 1 verildi. CDDP ise 4. gün 7 mg/kg tek doz olarak IP verildi.

2. Kan ve idrar örneklerinin elde edilmesi ve analizlere hazırlanması

CDDP verilişinden 7 gün sonra deneyin 11. gününde sıçanların kanları ve idrar kesesinden ponksiyonla sıçanların idrar örnekleri alındı. Alınan örnekleri 1500 x g'de 10-15 dk. santrifüj edildikten sonra elde edilen plazma ve idrar örnekleri ependorf tüplere aktarılarak porsiyonlara ayrıldı. Biyokimyasal testlerin yapılacağı zamana

kadar

-20°C derin dondurucuda (Bosch, GSU 1701 NE) saklandı.

3. Biyokimyasal analizlerin yapılması

Plazmada GSH-Px aktivite tayini: GSH-Px aktivitesi Paglia ve ark.'nın metoduna göre çalışıldı.²⁴ GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte GSH, okside GSH (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksitin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, GSH redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'in NADP⁺ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

Plazmada SOD aktivite tayini: SOD aktivitesi Sun ve ark. tarafından tanımlanan, Durak ve ark. tarafından modifiye edilen NBT indirgeme yöntemiyle çalışıldı.^{25,26} Bu metotta, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbans verir. Enzimin olmadığı ortamda meydana gelen indirgenme mavi-mor renk oluşturur. Ortamda SOD olduğunda ise NBT indirgenmesi tam olmayıp enzim miktar ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşur, buradan aktivite hesabı yapılır.

Plazmada adenzin deaminaz (ADA) aktivite tayini: ADA aktivitesi Guisti'nin metoduna göre çalışıldı.²⁷ Bu metotta ADA ile adenzinin reaksiyona girmesiyle amonyak açığa çıkar. Bunun absorbansı 628 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülebilir.

Plazmada nitrik oksit (NO) tayini: Bu metotta total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilir.²⁸ pH= 9.7 glisin tamponunda bakır (Cu) kaplı kadmiyum granülleri, deproteinize numune süpernatantı ile 90 dk., aralıklı karıştırarak inkübe edilir. İnkübasyon sonunda nitratın tamamı nitrite redüklenir. Üretilen total nitrit; sülfanilamid ve N-naftiletilediamin (NNDA) diazotizasyon reaksiyonu ile oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile belirlenir.

Plazma BUN, kreatinin ile idrarda MTP tayini: Olympus marka BUN, kreatinin ve mikrototal protein kitleri kullanılarak yine aynı marka (Olympus AU-600) rutin otoanalizöründe çalışıldı. BUN, kinetik uv GLDH yöntemi ile; kreatinin kinetik Jaffe yöntemi ile ve MTP klorometrik progallol red yöntemi ile çalışıldı.

4. İstatistiksel analizler

İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS® 7.5 ile yapıldı. Dağılım testine tabi tutulduğunda, 4 grupta da yer alan tüm sonuçlar normal dağılım gösterdiğinden parametrik testlerden one-way ANOVA testi uygulandı, Post Hoc testlerden “Least significant difference (LSD)” ile gruplar arası anlamlılık incelendi. Korelasyon analizi için bivariate korelasyon testlerinden Pearson korelasyon testi kullanıldı ve iki yönlü anlamlılık (two-tailed significance) testine bakıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verildi.

Bulgular

CDDP alan sıçanların plazma GSH-Px aktivitesinde azalma söz konusu iken, ADA aktivitesinde ve NO değerlerinde artışa rastlanmıştır. Plazma SOD aktivitesinde gruplar arasında herhangi bir değişiklik olmamıştır. CDDP + E-vit verilmesi ile GSH-Px ve ADA aktivitesinde kontrole yakın olmak üzere NO değerlerinde de bir düzelme gözlenmiştir. CDDP +

GBE alan grubun GSH-Px aktiviteleri sadece CDDP alan gruba göre anlamlı derecede artmıştır ($p < 0.014$). GBE aynı zamanda CDDP ile artmış olan ADA ve NO değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan belirgin bir azalma sağlamıştır (Tablo 1).

Korelasyon analizinde sisplatin verilen grubun ADA ve SOD aktiviteleri ile sis + GBE verilen grubun SOD ve GSH-Px aktiviteleri arasında pozitif bir korelasyon bulunurken; sis + GBE grubunun SOD ve NO değerleri arasında negatif bir korelasyon tespit edilmiştir.

İdrar MTP değerleri, CDDP grubunda kontrole ve CDDP + E-vit grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.017$, $p < 0.015$). GBE + CDDP grubunun MTP değerlerinde anlamlı bir fark bulunamadı. Plazma BUN değerleri deney gruplarında kontrole karşılaştırıldığında yüksek bulundu. Plazma kreatinin değerleri CDDP verilen sıçanlarda kontrole göre anlamlı olarak yüksek ölçüldü ($p < 0.005$). Bu bulgulara göre CDDP böbrekte nefrotoksisite oluşturmuştur. CDDP + E-vit verilen sıçanların plazma BUN ve kreatinin değerleri CDDP verilenlere göre anlamlı olarak düşük iken ($p < 0.032$), CDDP + ginkgo biloba verilenlerin BUN ve kreatinin değerlerinde anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 2).

Tartışma

Yapılan çalışmalarda çoğunlukla CDDP'in oksidatif hasara bağlı bir mekanizma ile toksik etki

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarında plazma SOD, GSH-Px, ADA aktivitesi ve NO seviyeleri. [Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) olarak verilmiştir].

Gruplar	SOD (U/mL)	GSH-Px (U/L)	ADA (U/L)	NO (μ mol/L)
I. Kontrol (n= 7)	13.47 \pm 0.6	447.57 \pm 138.43	34.28 \pm 5.18	117.65 \pm 84.45
II. Sisplatin (n= 8)	12.97 \pm 0.12	295.22 \pm 113.29	56.12 \pm 10.63	316.4 \pm 105.86
III. Sis + E-vit (n= 8)	12.5 \pm 0.16	442.84 \pm 116.20	36.87 \pm 6.97	226.68 \pm 61.05
IV. Sis + GBE (n= 7)	11.56 \pm 1.81	719.56 \pm 78.43	36.67 \pm 10.16	236.85 \pm 43.50
p değerleri				
I-II	0.695	0.355	0.079	0.052
I-III	0.450	0.977	0.830	0.274
I-IV	0.155	0.115	0.854	0.247
II-III	0.704	0.353	0.107	0.350
II-IV	0.276	0.014	0.130	0.422
III-IV	0.464	0.099	0.987	0.918

Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarında MTP ve plazma BUN, kreatinin değerleri. [Sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) olarak verilmiştir].

Gruplar	MTP (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)
I. Kontrol	85.86 \pm 16.72 (n= 7)	32.86 \pm 10.89 (n= 7)	0.629 \pm 0.07 (n= 7)
II. CDDP	180.5 \pm 40.17 (n= 8)	117.88 \pm 17.08 (n= 8)	1.950 \pm 0.35 (n= 8)
III. CDDP + E-vit	89.11 \pm 17.84 (n= 9)	89.11 \pm 12.25 (n= 9)	1.03 \pm 0.14 (n= 9)
IV. GBE + CDDP	113.60 \pm 13.64 (n= 5)	174.43 \pm 49.35 (n= 7)	1.37 \pm 0.49 (n= 7)
p değerleri			
I-II	0.017	0.028	0.005
I-III	0.929	0.125	0.344
I-IV	0.515	0.001	0.107
II-III	0.015	0.409	0.032

gösterdiği fikri ortaya çıkmıştır. Bu amaçla antioksidan etkisi birçok alanda denenmiş ancak CDDP nefrotoksitesinde henüz yeterli düzeyde çalışılmamış GBE'ni CDDP ile nefropati oluşturulan ratlara uyguladık ve plazma oksidan/antioksidan sistem üzerine olan etkisini araştırdık. Burada dikkati çeken noktalardan biri CDDP verilen ratlarda antioksidan enzimlerden biri olan GSH-Px aktivitesinin azalmış olmasıdır. SOD aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Normalde CDDP verildikten sonraki erken dönemde antioksidan enzim aktivitelerinin artması beklenir. Ancak daha sonraki dönemlerde, reaktif oksijen türleri ile sürekli olarak mücadele halinde olan enzimler zamanla fonksiyonlarını kaybederek aktivitelerinde azalma görülmektedir. GSH-Px'de buna uygun olarak azalmıştır. Bu durum oksidatif stresle yeterli mücadele yapıldığını gösterebilir. Diğer yandan ADA aktivitesi ile NO değerleri CDDP verilen grupta artmıştır.

Antioksidan karakterli maddeler olan E-vit ve GBE verilen ratlarda, plazma GSH-Px aktivitesinde artma gözlenmiştir. GBE grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. Plazma ADA ve NO değerleri ise azalmıştır. Bu durumda GBE hepsinde anlamlı olmasa da sisplatinin neden olduğu oksidatif strese karşı güçlü antioksidan savunma göstermiştir.

CDDP dokuda SOD, GSH, GSH-Px gibi serbest radikal yakalayıcı enzimlerin aktivitelerini azaltırken $O_2^{\cdot-}$ başta olmak üzere oksijen

radikallerinin artışına yol açar.²⁹ Mitokondri hasarı CDDP nefrotoksitesinde majör rolü oynamaktadır. CDDP'in direkt olarak hücre DNA'sı ile etkileşime girmesi sonucunda mitokondrial fonksiyon bozukluğuna yol açan $O_2^{\cdot-}$ ve $\cdot OH$ açığa çıkar.³⁰ Bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre CDDP'e bağlı mitokondri disfonksiyonunun nedeninin solunum zincirindeki kompleks 1 ve 2'nin inhibisyonu ile ortaya çıkan ATP azalması olduğu iddia edilmektedir.³¹ GBE yaşlılıkta artan oksidatif stresin yol açtığı mitokondrial DNA hasarını engellemiştir.³²

Satranayan ve ark.'nın yaptıkları araştırmalarda CDDP'in serbest oksijen radikali (SOR) üretimine ve NF- κ B aktivasyonuna yol açarak adenozin A_1 reseptör sentezinin artışına neden olduğu belirtilmektedir.³³ CDDP'in DNA transkripsiyonunu zincirde çapraz bağlar yaparak inhibe ettiği bilinmektedir. Adenozin A_1 reseptör düzeyini de genetik olarak etkiliyor olabilir.³⁴ Adenozin metaboliti olan inozinin ksantin oksidaz tarafından metabolize edilmesi sırasında SOR üretimine yol açarak oksidatif hasar oluşturması CDDP nefrotoksitesinde önemli rol oynayabilir.³³

CDDP'in ototoksik ve nefrotoksik etkisinin ortaya çıkmasında indüklenebilir NOS sentezinin artması önemli bir bulgudur.^{35,36} CDDP'in üretimini arttırdığı toksik radikaller NF- κ B'yi uyarırlar. NF- κ B de iNOS sentezini artırır. Sonuçta yüksek miktarda NO sentezi olur. Normalden fazla miktarda sentezlenen NO birtakım toksik bileşikler oluşturarak böbrek tübül

hücrelerinde toksik hasara yol açar. E-vit ve GBE muhtemelen serbest radikal tutucu etkilerinden dolayı NO'daki artışı inhibe etmişlerdir ($p < 0.042$ ve $p < 0.059$). Ginkgo bilobanın iNOS mRNA sentezini inhibe ettiğine dair iddialar da vardır.³⁷

GBE'nin potent süperoksit, hidroksil, peroksil ve NO radikal yakalayıcı olduğunu bildiren raporlar mevcuttur.³⁸⁻⁴¹ 1 mg/kg CDDP ve 100 mg/kg GBE (CDDP'den 90 dk. önce) ile yapılan bir çalışmada GBE'nin nefrotoksisite bulgularını düzelttiği görülmüştür.⁴² Literatürde GBE'nin başka ilaçların oksidatif yolla oluşturduğu toksik yan etkilerine karşı koruyuculuğunu gösteren çalışmalar da vardır. Bunlardan biri de gentamisin nefrotoksisitesidir.⁴³ Barth ve ark. siklosporinin uyardığı SOR oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu GBE'nin engellediğini rapor etmişlerdir.⁴⁴

Antioksidan etkinliği birçok çalışmada vurgulanmış olan aynı zamanda periferik dolaşımla beyin kan akımını arttırabilen GBE (Egb 761) günümüzde daha ziyade serebrovasküler disfonksiyon ve periferik vasküler hastalıklarda kullanılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre CDDP nefrotoksisitesinde GBE'nin kısmen koruyucu olduğunu söyleyebiliriz. Bu çalışma, bu alanda yapılmış ilk çalışmalardan biridir. GBE'nin CDDP nefrotoksisitesindeki koruyucu etkinliğini ortaya çıkarabilmek amacıyla daha farklı dozlarda, farklı deney sürelerinde ve daha fazla hayvan sayısı ile çalışmaların yapılması gerekir.

KAYNAKLAR

- Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in cisplatin. In: Lippert B, ed. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Switzerland: Wiley-VCH, Basel; 1999. p.3-27.
- Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji 1. Cilt, 9. Baskı 2000. p.396-7.
- Choei DD, Longnecker DS, del Campo AA. Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. Lab Invest 1981;44:397-402.
- Hanneman J, Baumann K. Nephrotoxicity of cisplatin, carboplatin and transplatin. A comparative in vitro study. Arch Toxicol 1991;64:393-400.
- Clerici WJ, Hensley K, DiMartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. Hear Res 1996;98(1-2):116-24.
- Sasada T, Iwata S, Sato N, et al. Redox control of resistance to cis-diamminedichloro platinum (II) (CDDP): Protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. J Clin Invest 1996;97:2268-78.
- Kruidering M, Van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Cisplatin-nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. J Pharmacol Exp Ther 1997;280:638-49.
- Sadzuka Y, Shimizu Y, Takino Y. Role of glutathione S-transferase isoenzymes in cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat. Toxicol Lett 1994;70:211-22.
- Mistry P, Merazga Y, Spargo DJ, Riley PA, McBrien DC. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. Cancer Chemother Pharmacol 1991;28:277-82.
- Kuhlman MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. Nephrol Dial Transplant 1997;12:2478-80.
- Salahudeen A, Badr K, Morrow J, Roberts II J. Hydrogen peroxide induced 21-aminosteroid-inhibitable F2-isoprostane production and cytolysis in renal tubular epithelial cells. J Am Soc Nephrol 1995;6:1300-5.
- Groth S, Nielsen H, Sorensen JB, Christensen AB, Pedersen AG, Rorth M. Acute and long-term nephrotoxicity of cisplatin in man. Cancer Chemother Pharmacol 1986;17:191-6.
- Chopra, S, Kaufman JS, Jones TW, et al. Cis diamminedichloro-platinum-induced acute renal failure in the rat. Kidney Int 1982;21:54-64.
- Watanabe KI, Hess A, Bloch W, Michel O. Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. Anticancer Drugs 2000;11:401-6.
- Srivastava RC, Farookh A, Ahmad N, Misra M, Hasan SK, Husain MM. Evidence for the involvement of nitric oxide in cisplatin-induced toxicity in rats. Biometals 1996;9(2):139-42.
- De Feudis FV. Ginkgo biloba extract (Egb 761): Pharmacological activities and clinical applications. Paris: Elsevier; 1991. p.7-146.
- Maitra I, Marcocci L, Droy-Lefaix MT, Packer L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract Egb 761. Biochem Pharmacol 1995;49:1649-55.
- Braquet P. The ginkgolides: Potent platelet-activating factor antagonists isolated from Ginkgo biloba L: Chemistry, Pharmacology and clinical applications. Drugs of the future 1987;12(7):643-99.
- Smith PF, MacLenman K. The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: A review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). Ethnopharmacol 1996;50(3):131-9.
- Bowling AC, Beal MF. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Life Sci 1995;56:1151-71.
- Jenner P, Dexter DT, Sian J, Shapira AHV, Marsden CD. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. Ann Neurol 1992;32:S82-7.

22. Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, Drieu K, Culcasi M, Pietri S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (Egb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2000;95:368-77.
23. Leubuisson DA, Lorey L, Rigal G. Treatment of senile macular degeneration with ginkgo biloba extract. A preliminary double-blind drug vs placebo study. *Presse Med* 1986;15(31):1556-8.
24. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-70.
25. Sun Y, Oberley LW, Li YA. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988;34:497-500.
26. Durak I, Yurtaslan Z, Canbolat O, Akyol O. A methodological approach to superoxide dismutase activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chem Acta* 1993;214:103-4.
27. Giusti G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer MV, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd ed. New York: Academic Press; 1974. p.1092-8.
28. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
29. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, Hanaki Y, Shimizu K, Ozawa T. Adverse effect of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:1121-7.
30. Ramesh G, Reeves WB. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002;110(6):835-42.
31. Kruidering M, van de Water B, de Heer E, Mulder GJ, Nage-Kerke JF. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: Mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280(2):638-49.
32. Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, et al. A Ginkgo biloba extract (Egb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1998;24(2):298-304.
33. Satyanarayan GB, Snigdha M, Yun M, et al. Cisplatin up-regulates the adenosine A₁ receptor in the rat kidney. *Euro J Pharmacol* 2002;442:251-64.
34. Nie Z, Mei Y, Ford M, et al. Oxidative stress increases A₁ adenosine receptors expression by activating nuclear factor κ B. *Mol Pharmacol* 1998;53:663-9.
35. Brady HR, Zeidel ML, Kone BC, Giebisch G, Gullans SR. Differential actions of cisplatin on renal proximal tubule and inner medullary collecting duct cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;265:1421-8.
36. Kim YK, Jung JS, Lee SH, Kim YW. Effects of antioxidants and Ca⁺² in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicol. Appl Pharmacol* 1997;46:261-9.
37. Filly C, Yaw LS, Wei ZC, Karmin O. Inhibitory effect of ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol* 1999;58:1665-73.
38. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989;45:708-12.
39. Gardes-Albert M, Ferradini C, Sekaki A, Droy-Lefaix MT. Oxygen-centered free radicals and their interactions with EGb 761 or CP 202. In: Ferradini C, Droy-Lefaix MT, Christen Y, eds. *Advances of Ginkgo Biloba Extract Research*. Paris: Elsevier; 1993. p.1214-26.
40. Tanaka H, Ishikawa E, Teshima S, Shimuzi E. Histopathological study of human cisplatin nephropathy. *Toxicol Pathol* 1986;14:247-57.
41. Marcocci L, Packer L, Droy-Lefaix MT, Sekaki A, Gardes-Albert M. Antioxidant action of Ginkgo biloba extract Egb 761. *Methods Enzymol* 1994;234:462-75.
42. Fukaya H, Kanno H. Experimental studies of the protective effect of ginkgo biloba extract (GBE) on cisplatin-induced toxicity in rats. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 1999;102(7):907-17.
43. Niadu MU, Shifow AA, Kumar KV, Ratnakar KS. Ginkgo biloba extract ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Phytomedicine* 2000;7(3):191-7.
44. Barth SA, Inselmann G, Engemann R, Heidemann H. Influences of ginkgo biloba extract on cyclosporin A induced lipid peroxidation in human liver microsomes in comparison to vitamin E, glutathione and acetylcystein. *Biochem Pharmacol* 1991;41:1521-6.