

Selenyum Siklofosfamid Nedenli Hepatotoksisiteyi İyileştirebilir

¹Adnan Ayhancı, ¹Özge Acar, ²Varol Şahintürk, ¹Sibel Güneş,
³İlknur Kulcanay Şahin, ⁴Ahmet Musmul, ⁵Sema Uslu

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, Türkiye

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Histoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

³Kırıkkale Üniversitesi, Tıbbi Tek. ve Hizm. Böl. İlk Acil Yard. Prog., Kırıkkale, Türkiye

⁴Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

⁵Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

*e-mail: gunes@ogu.edu.tr

Makale Gönderimi: 24 Şubat 2016; Kabul: 20 Mayıs 2016

Online: 20 Mayıs 2016

ÖZET: Siklofosfamid (CP)'in antitümör etkinliği dozu ile doğru orantılıdır. Bununla birlikte, yüksek dozlarda yaygın sitotoksitelere neden olur. Selenyum (Se) yapısına katıldığı glutasyon peroksidaz gibi selenoproteinler yoluyla potansiyel besinsel bir antioksidan olarak biyolojik etkiler göstermektedir. Bu nedenle siklofosfamid nedenli hepatotoksistide selenyumun olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 42 adet erkek Spraque-Dawley sıçan 6 gruba (n=7) ayrıldı (kontrol, 150 mg/kg CP, 0.5 ve 1 mg/kg Se, CP+0.5 ve CP+1 mg/kg Se grupları). Se'un karaciğer toksisitesinde koruyucu etkisini belirlemek için serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusu histolojik olarak da incelendi. CP uygulanan grupta serum ALT (%145), AST (%226), ALP (%88), ve LDH (%73) düzeyleri arttı. CP ile birlikte Se uygulanan gruplarda ALT, AST, ALP ve LDH düzeyleri azaldı ($p<0.05$). Histolojik incelemelerde de CP+Se gruplarında karaciğer doku hasarı önemli düzeyde azaldı. Sonuçlarımız selenyumun antioksidan etkilerinin olduğu ve siklofosfamid nedenli oksidatif hasarı ve çoklu organ toksisitelerini gidermede yararlı olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Siklofosfamid, oksidatif stres, hepatotoksiste, selenyum, rat.

SELENIUM AMELIORATES CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED HEPATOTOXICITY

ABSTRACT: The antitumoral efficiency of CP is directly proportional to its administered dose. However, high doses have a tendency to result in generalized cytotoxicity. Selenium (Se) is a potent nutritional antioxidant that carries out biological effects by its incorporation into selenoproteins, such as glutathione peroxidase. Therefore we aimed to investigate the possible protective effect of Se on CP-induced hepatotoxicity. A total of 42 male Spraque-Dawley rats were divided into 6 groups (n=7) (control, 150 mg/kg CP, 0.5 or 1 mg/kg Se and CP+0.5 and CP+1 mg/kg Se groups). In order to determine the protective effects of Se on liver toxicity, the levels of serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) were determined. Also, the liver tissues were analysed histologically. Serum ALT (%145), AST (%226), ALP (%88), and LDH (%73) levels increased in CP administered rats. In groups where CP and Se were given together ALT, AST, ALP, and LDH levels decreased ($p<0.05$). Histological analysis of liver tissue showed that tissue damage was significantly lower in CP+Se groups. Our results show that Se has antioxidant effects and that it may be useful to eliminate CP related oxidative damage.

KEYWORDS: Cyclophosphamide, oxidative stress, hepatotoxicity, selenium, rat.

1. Giriş

İnsan tümörlerinin antikanser ilaçlara gösterdikleri direncin üstesinden gelebilmek için tümörlü hastalara yoğun bir kemoterapi uygulanmalıdır. Bunun için özellikle CP gibi yüksek doz alkilleyici ajanların kullanılması gerekir (Cavalletti et al., 1986). Ancak yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması ve kanser hastalarının sağkalım sürelerinin uzaması ilaçların yan etkilerini de artırmıştır (Kumar and Kuttan, 2004). Yüksek doz CP kullanımı mesanede akut inflamasyona, böbrek hasarına ve karaciğer hasarına neden olur (Kumar and Kuttan, 2004; Kennedy et al., 2010; Abraham and Rabi, 2011; Rang et al., 2012; Sakthive and Guruvayoorappan, 2014). Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesi oksidatif strese neden olmaktadır. CP ile uyarılmış karaciğer hasarında oksidatif stresin baskın etyolojik rol oynadığı kanıtlarla desteklenmiştir (Stankiewicz et al., 2002; Senthilkumar et al., 2006). Selenyum beden için gerekli bir elementtir. Glutasyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin yapısında bulunması nedeniyle DNA ve diğer hücresel yapıları oksidatif hasara karşı korur. Se'un kanser oluşumunu başlama ve ilerleme safhalarını baskıladığını ve hedef hücrelerde çoğalma hızını düşürdüğünü gösteren bulgular vardır. Se'un antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkili olduğu ve antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini artırdığı bildirilmiştir (Yang et al., 2000; Hatfield et al., 2014). Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında Se'un CP nedenli hepatotoksisiteyi önleyebileceği düşünülmektedir.

2. Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda sağlıklı, erkek, 200±20 gram ağırlığında, yaklaşık 3 aylık, Sprague-Dawley cinsi, albino sıçanlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları T.C. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM)'nden temin edilerek Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi Laboratuvarı'nda normal musluk suyu ve pellet yemle standart bir çevre yaşamında beslendi. Bu çalışma ESOĞÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 27.02.2013 tarihli ve 320/2013 notu kararı ile kabul edilmiş ve ESOĞÜ Bilimsel Araştırma

Projeleri kapsamında (proje kodu: 2014-254) desteklenmiştir.

Kimyasal Maddeler ve Enjeksiyonları

Selenyum (Sigma) ve CP (Sigma-Aldrich) ticari olarak temin edildi. Bu maddelerden, CP'nin 500 mg'ı 25 mL bidistile suda Se'un ise 500 mg'ı 50 mL bidistile suda çözülerek enjeksiyona hazır duruma getirildi. Tüm hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartıldı ve böylece uygulanacak ilaç dozları belirlendi. Deney gruplarına verilen CP ve Se ile kontrol gruplarına verilen serum fizyolojik ve anesteziye kullanılan ketamin/ksilazin intraperitoneal olarak yapıldı. Sadece CP uygulanan gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonundan 1 gün sonra anestezi edildi. CP ile birlikte Se verilen gruplarda Se uygulamasına CP uygulamasından 6 gün önce başlandı ve deney süresince devam edildi. 6. gün hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlendi ve böylece 6. gün CP+Se verildi. 7. gün ketamin/ksilazin anestezisi altında hayvanlardan intrakardiyak kan örnekleri alındı. Se'un karaciğer toksisitesinde koruyucu etkisini belirlemek için serum alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST), alkalen fosfataz (ALP) ve laktat dehidrogenaz (LDH) seviyeleri belirlendi. Ayrıca karaciğer dokusu histolojik olarak da incelendi.

Deney Grupları

Her kafeste en fazla 4 hayvan olacak şekilde yerleştirildi ve bütün deney hayvanları enjeksiyondan önce bir haftalık karantinaya alındı. Hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptandı. Deney bittiğinde, tüm sıçanların etik kurallara uygun olarak, ketamin/ksilazin anestezisi altında göğüsü açılıp yüreğe enjektörle girilerek alınan kan yapılacak işleme göre, normal veya EDTA'lı tüplere alındı. Deney hayvanları arasından rastgele seçimle her birinde yedişer (n=7) sıçan olmak üzere toplam 6 grup oluşturuldu. Bu gruplar aşağıda gösterildiği gibi belirlendi.

- Grup 1: Kontrol: Her hayvana 0.5 mL serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldı.
- Grup 2: Her hayvana tek doz 150 mg/kg CP+0.5 mL SF enjeksiyonu yapıldı.
- Grup 3: Her hayvana 0.5 mg/kg Se+0.5 mL SF enjeksiyonu yapıldı.

- Grup 4: Her hayvana 1 mg/kg Se+0.5 mL SF enjeksiyonu yapıldı.
- Grup 5: Her hayvana 150 mg/kg CP+0.5 mg/kg Se enjeksiyonu yapıldı.
- Grup 6: Her hayvana 150 mg/kg CP+1 mg/kg Se enjeksiyonu yapıldı

Aspartat Transaminaz, Alanin Transaminaz, Alkalen Fosfataz ve Laktat Dehidrogenaz Değerlerinin Belirlenmesi

Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanlardan tüplere intrakardiyak olarak alınan kan örnekleri 3000 devir/dakika'da santrifüj edilerek serumlar elde edilmiştir. Alınan serum örneklerinde Aspartat transaminaz, alanin transaminaz ve alkalen fosfataz değerleri Roche Cobas İntegra 400 otoanalizöründe Roche kitleri kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Organotipik hipokampal kesit kültürleri lumikolşisin ve kolşisin ile uyarıldıktan sonra elde edilen kültür medyumlarında laktat dehidrogenaz aktivitesi ölçüldü. Kolşisin grubunun LDH düzeyi (89.3±23.3 U/mL) ile lumikolşisin grubunun LDH düzeyi (56.2 ±13.4 U/mL) arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptandı ($p<0.01$).

Histolojik Çalışmalar

Otopsileri yapılan sıçanların böbrekleri dikkatli bir şekilde kesilip alındı, serum fizyolojik ile temizlendi. Daha sonra %10'luk formalin bulunan renkli şişelere konuldu. Böbrekler alındıktan üç saat sonra fiksatifleri yeniden değiştirilerek daha iyi fikse edilmeleri sağlandı. Rutin histolojik doku takibinden sonra parafin blokları hazırlandı, dokulardan alınan 5-6 mikronluk kesitler hematoksilin-eosin (H+E) boyası ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendikten sonra Olympus marka DP70 kamera sistemi ile fotoğrafları çekildi.

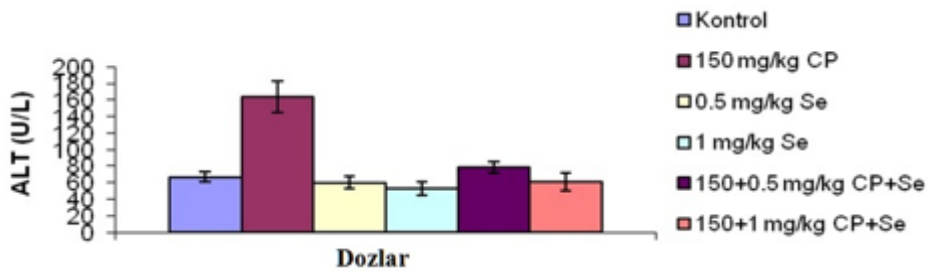
İstatistiksel Analiz

Tüm veri analizleri SPSS 21.0 ve SigmaStat 3.5 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdelik değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler, One Way Anova (bu testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey ve Student Newman Keuls yöntemlerinden yararlanılmıştır) testi ile, normal dağılım göstermeyen skor değişkenlerinden oluşan veriler ise Kruskal-Wallis (bu testin çoklu karşılaştırmalarında Tukey ve Student Newman Keuls yöntemlerinden yararlanılmıştır) testi ile analiz edilmiştir. Tüm istatistik uygulamalar sonucunda sayısal değer (p) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar, $p<0.05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

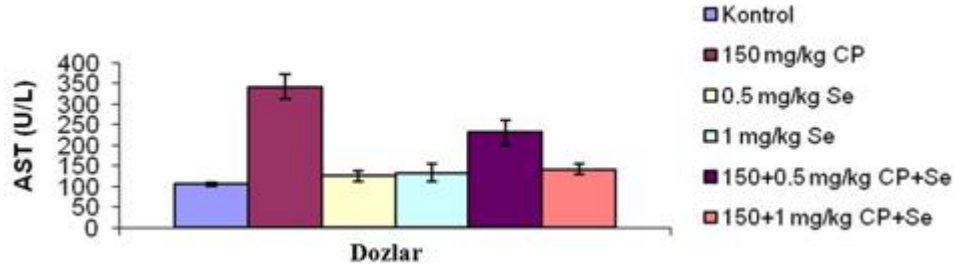
2Bulgular

Biyokimyasal Bulgular

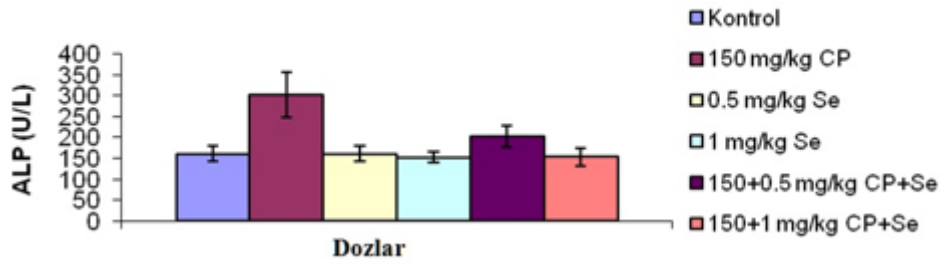
0.5 mg/kg Se, 1 mg/kg Se ve kontrol grupları arasında AST, ALT, ALP ve LDH değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. 150 mg/kg CP verilen deney grubunda AST, ALT, ALP ve LDH seviyeleri kontrole göre sırasıyla %226, %145 %88 ve %73 oranında artmıştır ($p<0.05$). 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda AST ve LDH değerleri kontrole göre sırasıyla %120 ve %52 oranlarında artarken ($p<0.05$) ALT ve ALP değerlerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda AST değeri kontrole göre %34 oranında artarken ($p<0.05$), ALT, ALP ve LDH değerlerindeki artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 1, 2, 3 ve 4).



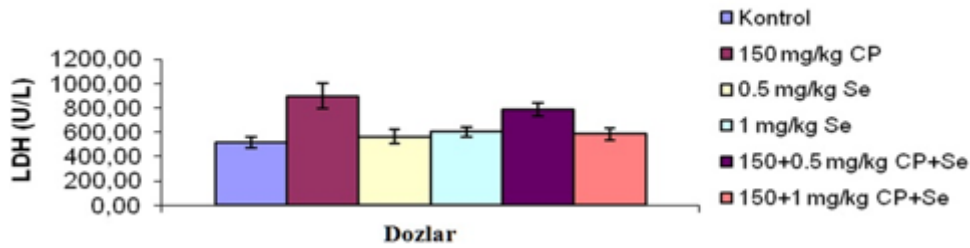
Şekil 1. 150 mg/kg CP, 0.5 ve 1 mg/kg Se, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grupları ile bunların kontrol gruplarının ALT değerleri.



Şekil 2. 150 mg/kg CP, 0.5 ve 1 mg/kg Se, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grupları ile bunların kontrol gruplarının AST değerleri.



Şekil 3. 150 mg/kg CP, 0.5 ve 1 mg/kg Se, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grupları ile bunların kontrol gruplarının ALP değerleri.

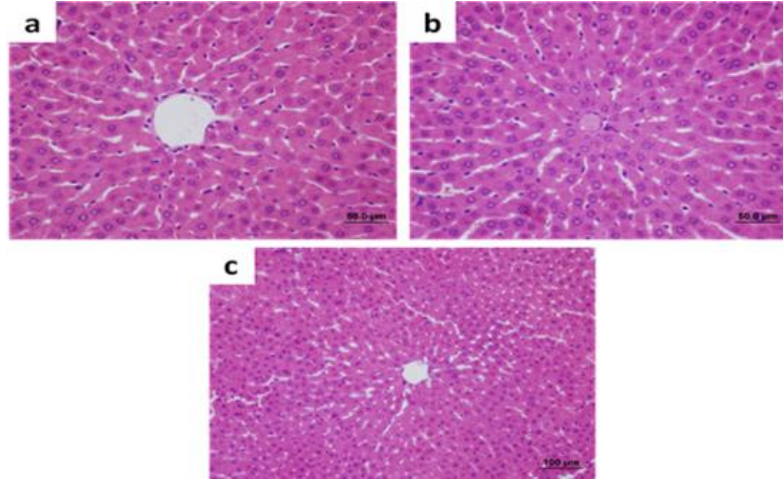


Şekil 4. 150 mg/kg CP, 0.5 ve 1 mg/kg Se, 150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grupları ile bunların kontrol gruplarının LDH değerleri.

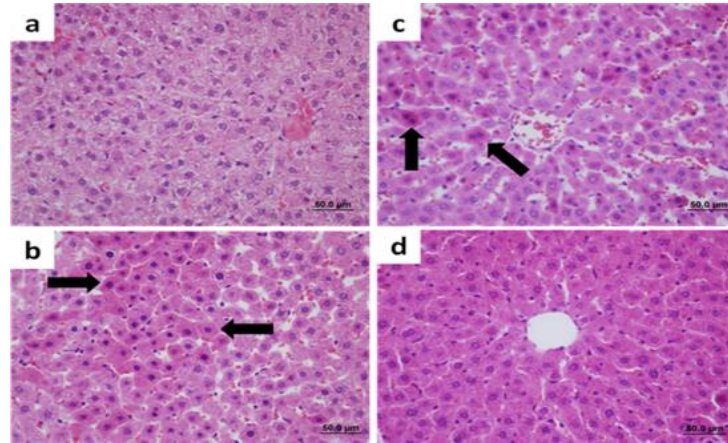
Histolojik Bulgular

Histolojik inceleme sonuçlarına göre; kontrol grubu, 0.5 veya 1 mg/kg Se verilen grupların karaciğer dokularında normal histolojik görünüm saptandı (Şekil 5). Hepatositlerin santral ven çevresinde radyer olarak kordonlar halinde düzenlendiği, gevşek kromatinli çekirdeklerin içinde çekirdekçiklerin seçilebildiği ve sitoplazmanın homojen görümlü ve hafif eozinofilik boyandığı görüldü. CP verilen gruplara ait karaciğer kesitleri Şekil 6'da görülmektedir. Tek başına CP verilen gruba ait sıçanların karaciğerlerinde hepatositlerin sitoplazmalarında hidropik dejenerasyona işaret eden bulanıklaşma ve sitoplazma homojenitesinde bozulmanın yanı

sıra bazı hepatositlerin çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşması sonucu koyu boyanma ve küçülme, çekirdek sınırlarında düzensizlik ve sitoplazmada eozinofili artışı dikkati çekti. Ayrıca sinüzoidlerde genişleme sonucu hepatositlerin birbirinden uzaklaştığı görüldü. Damarsal yapılarda konjesyon artışı ve eritrosit birikimi saptandı. CP+0.5 mg/kg Se verilen grupta tek başına CP verilen gruba kıyasla karaciğerdeki değişikliklerin azaldığı, ancak 0.5 mg/kg selenyum eklenmesinin CP'nin neden olduğu bozuklukları yeterince önleyemediği görüldü. CP+1 mg/kg Se verilen gruba ait karaciğer kesitlerinde yapılan incelemede ise bazı küçük bölgesel değişikliklere karşın histolojik yapının daha iyi korunduğu saptandı.



Şekil 5. Kontrol, 0.5 ve 1 mg/kg/ Se gruplarına ait karaciğer kesitleri, H+E. **a:** Sadece serum fizyolojik verilen grupta, **b:** Sadece 0.5 mg/kg/ Se verilen grupta, **c:** Sadece 1 mg/kg Se verilen grupta normal histolojiye sahip karaciğer kesitleri izlenmektedir.



Şekil 6. CP, CP+0.5 mg/kg Se ve CP+1 mg/kg Se verilen gruplara ait karaciğer kesitleri, H+E. **a:** Sadece CP verilen grupta damarlarda konjesyon, hepatositlerde sitoplazmada bulanıklaşma ve homojenite kaybı, **b:** Tek başına CP verilen grupta bazı hepatositlerde sitoplazmanın koyu eozinofilik boyanması ve çekirdeklerde koyulaşım küçülmeler (oklar) sinüsoidlerde genişlemeler, **c:** CP+0.5 mg/kg Se verilen grupta sinüsoidlerde genişleme ve bazı hepatositlerde eozinofili artışı (oklar), **d:** CP+1 mg/kg Se verilen grupta normale yakın bir histolojik görünüm izlenmektedir.

3. Tartışma ve Sonuç

Siklofosfamidin oksidan öncülü özelliği olduğu, oksidatif strese neden olarak antioksidan enzimlerin işlevlerini azalttığı ve hayati organlarda lipid peroksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Ayhancı et al., 2009; Abraham and Isaac, 2011; Sakthivel and Guruvayoorappan, 2014). Çalışmamızda oluşan karaciğer doku hasarı siklofosfamid metabolitleri tarafından membran hasarlanması ile oluşmaktadır. Zira bu patolojik değişiklikler serum enzim düzeylerinin yükselmesiyle uyumludur.

siklofosfamid ile birlikte uyguladığımız selenyumun her iki dozunda da bu doku hasarı ve nekroz gibi anormal patolojik bulguların azalması karaciğer dokusunun oksidatif hasara karşı korunduğu anlamına gelmektedir. Verilerimiz doğrultusunda siklofosfamid uygulamasının oksidatif stres ve doku hasarına neden olduğunu ve selenyumun karaciğer dokusundaki hasarı serbest oksijen radikallerini elemine etme yoluyla normale yaklaştırdığını söyleyebiliriz. Bu nedenle de selenyum kemoterapi reçetelerinde antikanser ilaçların yan etkilerinin azaltılmasında etkili bir aday olabilir.

KAYNAKLAR

1. Cavalletti, E., Tofanetti, O., & Zunino, F. (1986). Comparison of reduced glutathione with 2-mercaptoethane sulfonate to prevent cyclophosphamide-induced urotoxicity. *Cancer letters*, 32(1), 1-6.
2. Kumar, K. B. H., & Kuttan, R. (2005). Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine*, 12(6), 494-500.
3. Kennedy, R., Groepper, D., Tagen, M., Christensen, R., Navid, F., Gajjar, A., & Stewart, C. F. (2010). Stability of cyclophosphamide in extemporaneous oral suspensions. *Annals of Pharmacotherapy*, 44(2), 295-301.
4. Abraham, P., & Rabi, S. (2011). Protective effect of aminoguanidine against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Redox Report*, 16(1), 8-14.
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G (2012) Rang, and Dale's pharmacology. New York. 673-688.
6. Sakthivel, K. M., & Guruvayoorappan, C. (2015). *Acacia ferruginea* inhibits cyclophosphamide-induced immunosuppression and urotoxicity by modulating cytokines in mice. *Journal of immunotoxicology*, 12(2), 154-163.
7. Stankiewicz, A., Skrzydlewska, E., & Makiela, M. (2002). Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug metabolism and drug interactions*, 19(2), 67-82.
8. Senthilkumar, S., Devaki, T., Manohar, B. M., & Babu, M. S. (2006). Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clinica Chimica Acta*, 364(1), 335-342.
9. Yang, Z., Faustino, P. J., Andrews, P. A., Monastra, R., Rasmussen, A. A., Ellison, C. D., & Cullen, K. J. (2000). Decreased cisplatin/DNA adduct formation is associated with cisplatin resistance in human head and neck cancer cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 46(4), 255-262.
10. Hatfield, D. L., Tsuji, P. A., Carlson, B. A., & Gladyshev, V. N. (2014). Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development. *Trends in biochemical sciences*, 39(3), 112-120.
11. Ayhanci, A., Yaman, S., Appak, S., & Gunes, S. (2009). Hematoprotective effect of seleno-L-methionine on cyclophosphamide toxicity in rats. *Drug and chemical toxicology*, 32(4), 424-428.
12. Abraham, P., & Isaac, B. (2011). Ultrastructural changes in the rat kidney after single dose of cyclophosphamide—possible roles for peroxisome proliferation and lysosomal dysfunction in cyclophosphamide-induced renal damage. *Human & experimental toxicology*, 30(12), 1924-1930.