

## KOBAYLARDA GENTAMİSİN'İN KARACİĞER TOKSİTESİNİN ARAŞTIRILMASI : E VİTAMİNİ'NİN ETKİSİ

Orhan Canbolat\* Mustafa Kavutcu\* Serdar Öztürk\* Ekmel Olcay\*\*  
İsmail Hakkı Gökhan\* Cemil Ekinci\*\*\* İlker Durak\*

Serbest radikaller, üzerlerinde ortaklanmamış elektron taşıyan, hücresel yapılardaki lipit, protein, karbonhidrat grupları ile rahatlıkla etkileşmeye girerek onların yapı ve fonksiyonlarını bozan ve ayrıca DNA yapısındaki hassas yapılar üzerine etki ederek hasar oluşturan aktif kimyasal maddelerdir. Serbest radikaller, günümüzde bir çok hastalığın patolojisinden sorumlu tutulmaktadır (3).

Organizmada radikalik hasardan korunmada, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px E.C. 1.6.4.2), Katalaz (CAT E.C.1.11.1.6.) ve Süperoksit Dismutaz (SOD E.C. 1.15.1.1.) enzimatik olarak, vitamin E ise non - enzimatik olarak görev yaparlar. Çeşitli hücre içi ve hücre dışı kaynaklardan oluşan hidroksil (OH-) ve peroksit (O<sub>2</sub>-) radikalleri enzimatik olarak, diğer radikalik maddeler ise non-enzimatik mekanizmalarla etkisizleştirilirler.

Gentamisin'in (Genta) proksimal renal tübülüslerde birikerek lizozom, mitokondri veya membran hasarı ile böbrek toksitesine yol açtığı bilinmektedir (3,5,8,10,14,17,18). Bu toksitenin mekanizması tam açıklanamamakla beraber bazı anti oksidanların bu toksiteden koruyucu etki yapması bu hasarların radikal metabolizmasıyla ilişkili olabileceği düşüncesini akla getirmektedir (6,4,7,12,13,16).

Genta'nın böbrek toksitesiyle olan ilişkisi üzerine bir çok çalışma olmasına rağmen karaciğer üzerindeki serbest radikal hasarı ile ilgili olarak yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan çalışmamızda gentamisin'in karaciğerdeki serbest radikal metabolizması üzerine olan muhtemel etkisi araştırılmış ve bu metabolizmadaki değişimler enzimatik açıdan incelenmiştir. Ayrıca, organizmada hidrojen

\* A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

\*\* S.S.Y.B. Hıfzısıhha Enstitüsü

\*\*\* A.Ü. Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Geliş Tarihi : Ocak 1, 1995

Kabul Tarihi : Mart 30, 1995

peroksit oluşumunu Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile katalizleyen demir (Fe) ve bakır (Cu) elementlerinin karaciğerdeki konsantrasyonları da tayin edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Vitamin E'nin karaciğer dokusundaki antioksidan etkisi değerlendirilmiştir.

### MATERYAL ve METOD

**İLAÇLAR :** Gentamisin Deva, Vitamin E Roche firmalarından sağlandı. Gentamisin dozu 200 mg/kg/gün, Vitamin E dozu 400 mg/kg/gün olarak intra musküler olarak uygulandı.

**HAYVANLAR :** Yaklaşık 2 aylık ve ortalama 450 gram ağırlığında 30 erkek kobay çalışmamızda deney hayvanı olarak kullanılmıştır. 1. gruptaki 10 hayvan kontrol grubu olarak seçildi ve bu gruba sadece serum fizyolojik uygulandı. 2. gruptaki 10 hayvana gentamisin ve 3. gruptaki 10 hayvana ise gentamisin + E vitamini yine 10 gün süreyle yukarıdaki dozlarda uygulandı. Çalışmada gruplara ilaç uygulaması eş zamanlı olarak yapıldı. Hayvanlar deney şartların hazırlık ve deney süresince normal laboratuvar diyetiyle beslendi. Hayvanlar servikal dislokasyonla öldürüldükten sonra karaciğer dokuları aynı gün yapılan homojenizasyon işlemine kadar buz tankında saklandı.

### DOKULARIN ANALİZE HAZIRLANIŞI VE AKTİVİTE - MİKTAR TAYİNLERİ :

Karaciğer dokuları deiyonize su ile yıkandıktan sonra Braun - Melsungen marka homojenizatör ile 3 dakika 1000 devirde homojenize edildi. Homojenat 20.000 g de 60 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı. Bu süpernatada GSH-Px aktivitesi tayin edildi (10). Geriye kalan süpernatant 5/3 (v/v) oranında hazırlanan Etanol/kloroform çözeltisiyle 1/1 oranında hazırlanıp 10.000 g de 60 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantda SOD (15,12) ve CAT (1) aktiviteleri tayin edildi. Santrifüj işlemlerinin hepsi + 4 C de yapıldı. Fe ve Cu miktarları Varian Techtron atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle tayin edildi. Dokuların protein miktarları Lowry metodu ile tayin edildi (9).

GSH-Px ve CAT aktiviteleri spesifik aktivite cinsinden verildi (İÜ/mg protein). SOD aktivitesi ise NBTH redüksiyon hızını % 50 inhibe eden protein miktarı cinsinden ifade edildi. Fe ve Cu değerleri ise ppm olarak verildi.

Dokulardaki histopatolojik değerlendirilme patoloji Anabilim Dalı tarafından ışık mikroskobu (Nixon ve abot marka) ile yapıldı.

İstatistik çalışmalarında Student's t testi kullanıldı.

### SONUÇLAR :

Çalışma sonuçları Tablo I de verilmiştir. Bu tablodan da anlaşılacağı gibi SOD değerleri genta ve genta + E vitamini grubunda kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu. Genta ve Genta + E vitamini grubundaki SOD aktiviteleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise bir farklılık gözlenmedi.

GSH-Px aktiviteleri her iki grupta kontrol grubuna göre düşük olarak bulunmuştur. Buna karşılık CAT aktivitesi kontrol grubuna göre genta grubunda düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak bir anlamlılık arzetmemiştir. Genta+E vitamini grubunda ise CAT aktivitesi kontrole göre düşük bulunmuştur. GSH-Px ve CAT aktiviteleri açısından genta ve genta+E vitamini verilen iki grup karşılaştırıldığında GSHpx aktivitesinin değişmediği, buna karşılık CAT aktivitesinin genta+E vitamini grubunda düşük olduğu bulunmuştur.

Fe ve Cu miktarları açısından sonuçlar değerlendirildiğinde, genta ve genta+E vitamini gruplarında kontrol gruplarına göre bir farklılık gözlenmemiştir. Genta ve genta+E vitamini grupları Fe ve Cu miktarları açısından yorumlandığında Fe miktarlarının değişmediği buna karşılık Cu değerlerinin genta+E grubunda düşük olduğu bulundu.

Patoloji Anabilim Dalında ışık mikroskobu ile yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda genta ve genta + E grubunda patolojik bir değişime rastlanmamıştır.

### TARTIŞMA

Gentamisin'in serbest radikal metabolizmasıyla olan ilişkisini böbrekler açısından açıklayan birçok çalışma olmasına rağmen ilacın bu metabolizmayla ilgili olarak karaciğer toksitesini araştıran bir çalışmaya literatür taramasında rastlayamadık. Bu açıdan biz sadece çalışmamızdan elde ettiğimiz bulguları kendi içersinde değerlendirmeye karar verdik. SOD enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre diğer iki grupta yüksek bulunması bu enzimin ortamda bulunabilecek peroksit radikallerini ortadan kaldırmasının bir çabası olabilir. Ayrıca genta ve genta + E vitamini grubunda aktiviteler arası bir farklılık olmaması ise E vitaminin peroksit radikallerini söndürmede bu konuda bir etkisinin olmadığını göstergesi olarak açıklanabilir.

GSH-Px aktivitesinin her iki grupta kontrol grubuna göre düşük bulunması buna karşılık CAT açısından anlamlı bir farklılık bulunmaması hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan ve oluşması muhtemel

hidroksit radikallerinden dokuyu koruyan bu iki enzimin aktivitele-  
rindeki baskılanmayı göstermektedir. Gentanın SOD üzerine böyle bir  
etkisi görünmemekle beraber, bu iki enzimden GSH-Px'in daha fazla  
etkilendiği ve aktivitesinin düştüğü yorumu getirebilir. Genta ve gen-  
ta+E vitamini grupları açısından karşılaştırıldığında E vitamininin  
GSH-Px üzerine bir etki göstermediği, buna karşılık katalaz aktivite-  
sini daha da baskılandığı gözlenmiştir. Bu olay E vitamininin bu dokuda  
anti oksidan bir özellik taşımadığı veya henüz açıklanamayan bir me-  
kanizma ve enzim aktivitelerini etkilediği şeklinde açıklanabilir. Bu  
konun daha iyi aydınlatılmasının ise ancak kinetik çalışmalarla müm-  
kün olabilecektir.

Fe ve Cu konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre her iki grup-  
ta bir farklılık göstermemesi karaciğer dokusu için Fenton ve Haber-  
Weiss reaksiyonlarının önemli bir hidrojen peroksit kaynağı olmadığı  
düşüncesini akla getirmektedir. Genta ve genta+E vitamini grubu her  
iki element açısından değerlendirildiğinde, Fe açısından bir farklılık  
gözlenmezken Cu'nun genta+E vitamini grubunda genta grubuna gö-  
re daha düşük bulunmuştur. Bu durum, E vitamininin Cu metaboliz-  
masını olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Histopatolojik incelemede dokuda bir patolojiye rastlanmaması  
gentanın karaciğer üzerinde önemli bir toksitesinin olmadığı tesbitini  
desteklemektedir.

Tablo 1 : Genta ve Genta + E vitamini uygulanan kobayların karaciğer dokularındaki  
enzim aktivite sonuçları ve element konsantrasyonları.

Gruplar	SOD	GSH-Px	CAT	CU	Fe
1	10.92+2.66	0.71 +0.61	102.7+15.8	11.67+4.53	44.5+17.5
2	13.67+2.95	0.526+0.080	95.7+13.6	13.66+5.56	44.7+16.7
3	13.13+2.51	0.530+0.105	69.8+10.4	8.92+3.06	46.8+18.0
1. Grup : Kontrol					
2. Grup : Genta					
3. Grup : Genta + E vitamini					
Student's t-testi sonuçları					
1 - 2	A	A	a	a	a
1 - 3	A	A	A	a	a
2 - 3	a	a	A	A	a

A : P < 0.05 İstatistik olarak anlamlı

a : P > 0.05 İstatistik olarak anlamsız

## ÖZET

Bu çalışma kobaylarda gentanın karaciğer toksitesini araştırmak ve E vitamininin antioksidan etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Karaciğer dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) aktiviteleri ve Demir (Fe), Bakır (Cu) miktarları tayin edilmiştir. Çalışmada kullanılan kobaylar 3 gruba ayrılmış 1. grup kontrol, 2. grup genta uygulanan, 3. grup ise genta + E vitamini uygulanan grup olarak seçilmiştir.

SOD aktivitesi her iki grupta kontrol grubuna göre artış göstermiştir. GSH-Px değerleri genta ve genta + E vitamini uygulanan grupta kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur. Kontrol grubunun CAT aktivitesi ile Genta grubunun CAT aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Buna karşılık CAT aktivitesi, genta + E vitamini verilen grupta düşük olarak bulunmuştur. Fe ve Cu açısından her iki grupta kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir.

Genta tedavisinin karaciğer dokusunda SOD aktivitesini indüklediği, buna karşılık GSH-Px ve CAT aktivitesini baskıladığı anlaşılmıştır. Karaciğer dokusunda Haber - Weiss ve Fenton tipi reaksiyonlar açısından Fe ve Cu nun önemli bir katkısının bulunmadığı tesbit edilmiştir. Ayrıca E vitamininin bu dokudaki enzim aktiviteleri üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Histopatolojik inceleme sonuçları da gentanın karaciğer üzerinde önemli bir toksite göstermediği görüşünü desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler : Gentamisin, Serbest Radikaller, Elementler

## SUMMARY

### Establishment of Gentamicin Hepatotoxicity in Guinea Pigs : The effects of Vitamin E

In our study, activities of major enzymes participating in free radical metabolism [glutathione peroxidase (GSH-Px), Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and levels of Ferrun (Fe), Copper (Cu)] were measured in liver tissues from guinea pigs treated with gentamicin alone and gentamicin + Vitamin E.

In the gentamicin and gentamicin + Vitamini E groups, SOD activities were found higher compared with control groups. GSH-Px activities were found to be decreased in gentamicin and gentamicin +

vitamin E groups. However, there were no meaningful differences between CAT activities of control and gentamicin groups. In the vitamin E group, activity was found lowered.

Fe and Cu levels of the the liver tissues of gentamicin and gentamicin + vitamin E groups were not different from control group. We think that Fe and Cu are not important factors as catalyst of Haber-Weiss and Fenton reactions in the liver tissues treated by gentamicin.

Result suggest that genta causes increases in SOD activities but decreases in GSH-Px and CAT activities. We found that vitamin E did not make any effect on the activities of the free radical metabolising enzymes in the liver tissue. Accordingly, no important changes were observed in the histopathological examinations of the liver tissues due to gentamicin treatment. To sum up, enzymatic antioxidant defense system was not significantly affected with gentamicin treatment.

Key words : Gentamicin, Free radicals, Elements

#### KAYNAKLAR

1. Aebi H In : Methods of Enzymatic Analysis (Ed. H.U. Bergmeyer), p. 673 Academic Press Inc. New York and London (1974).
2. Durak I Yurtlani Z Canbelat O Akyol O : A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on mased on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. Clin. Chim. Acta. 1993; 214 : 103-104.
3. Freeman BA Crapo JD : Biology of Disease Free radicals and Tissue injury, Lab Inv. 1982, 47,5,412.
4. Hoe SD A Rowley and B Halliwell : Reactions of ferrioxamine and desferrioxamine with the hydroxyl radical. Chem. Biol. Interactions. 1982; 41 : 75-81.
5. Humes HD and M Weinberg : Toxic Nephropathies in the Kidney (Eds. B.M. Brenner and F.C. Rector) p. 1491, W.B. Saunders Co. Philadelphia 1986.
6. Kavutçu M Canbolat O Öztürk S : Reduced enzymatic antioxidant defense mechanism in kidney tissues from gentamicin treated guinea pigs : The effect of vitamins E and C. Nephron, 1995 (Baskıya Kabul Edildi).
7. Ngaha EO Ogunleye IO and Madusolumuo MA : Protection of selenium against gentamicininduced renal damage in the rat. Biochem. 1984; 95 : 331-337.
8. Laurenit G Cariler MB Rolman F Van Hoef and P Tulkens : Mechanism of aminoglycosideinduced lysosomal phospholipids : in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. Biochem. Phammacol, 1982; 31 : 3861-3870.

9. Lowy O Rosenbraugn N Farr L Rondall R : Protein measurement with theofilin pnenol reagent J. Biol. Chem. 1951; 183 : 265-275.
10. Paglia DE Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxdase. J. Lab. Clin. Med. 1967; 70 : 158-169.
11. Powell JH and MM Reidenber : Further studies of the response of kidney hysosomes to aminoglycosides and other cations. Biochem. Pharmacol. 1983; 32 : 3213-3220.
12. Ramsammy LS Josepovitz KY Ling PB Lane and Kaloyanides GJ : Failure of inhibition of lipid peroxidation by vitamin eto protect against gentamicin nephrotoxi-city in the rat. Biochem. Pharmacol. 1987; 36 : 2125-2132.
- 13 Ramsammy LS Josepovitz KY Ling BP Lane and Kaloyanides GJ : Effects of diphenlenediamine on gentamicin-induced lipid peroxidation and toxidation and toxicity in rat renal cortex. J Pharmacol. Exp. Ther. 1986; 238 : 83-88.
14. Simmons CF Bogusky RT and Humes HD : Inhibitory effects of gentamicin on renal mitochondrial oxidative phosphorylation. J Pharmacol. Exp. Ther. 1980; 214 : 709-715.
15. Sun Y Oberley LW Li Y : A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin. Chem. 1988; 34 : 479-500.
16. Walker PD and Shah SV : Evidence suggesting a role of hydroxil radical in gentamicin-inducedacute renal failure in rats. Clin. Invest. 1988; 81 : 334-341.
17. Williams PD Holohan PD and Ross CD : Gentamicin nephrotoxicity I. Acute biochemical correlates in rats Toxicol. Appl. Pharmacol. 1981; 61 : 234-242.
18. Williams PD Holohan PD and Ross CR : Gentamicin nephrotoxicity II. Plasma membrane changes. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1981; 61 : 243-251. radicals in acute nephrotoxic nephritis. Lab Invest. 1984; 51 : 396-403.