

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
SİSPİLATİN' İN NEDEN OLDUĞU NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI
LİKOPENİN ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜLDEN GÖÇÜK

ELAZIĞ - 2013

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



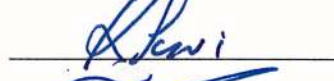
Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU



Prof. Dr. Kadir SERVİ



Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZI



Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN



Doç. Dr. Ömer KIZIL



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler	i
Tablolar Listesi	iii
Şekiller Listesi	iv
Kısaltmalar Listesi	v
Teşekkür	vi
1. Özet	vii
2. Abstract	viii
3. Giriş	1
3.1. Sisplatin ve kimyasal yapısı	1
3.2. Sisplatin nefrotoksisitesinin patogenezi	3
3.3. Sisplatin nefrotoksisitesinin moleküler patogenezi	3
3.4. Diyabet	6
3.4.1. Diyabet ve oksidatif stres	8
3.5. Likopen	8
3.5.1. Likopen ve antioksidan özellikleri	9
3.5.2. Likopen ve kemoterapötik tedavi	10
4. Gereç ve Yöntem	12
4.1. Gereç	12
4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	12
4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	13

4.1.3. Deney Hayvanları	13
4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	16
4.2. Yöntem	17
4.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri Ölçümü	17
4.2.2. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri Ölçümü	19
4.2.3. Böbrek Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü	19
4.2.4. Protein Ölçümü	22
4.2.5. İstatistiksel Analiz	23
5. Bulgular	24
5.1. Canlı Ağırlık ve Kan Şekeri Düzeyleri	24
5.2. Biyokimyasal Parametreler	25
5.2.1. Plazma Üre ve Kreatinin Düzeyleri	25
5.2.2. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri	26
5.2.3. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri	27
5.2.4. Böbrek Dokusu CAT Aktiviteleri	28
6. Tartışma ve Sonuç	30
7. Kaynaklar	35
8. Özgeçmiş	42

Tablolar Listesi

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin bileşimi	13
Tablo 2. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları ve kan şeker düzeyleri	25
Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarına ait üre ve kreatinin düzeyleri	26
Tablo 4. Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda böbrek dokusu oksidatif stres parametreleri	29

Şekiller Listesi

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı	2
Şekil 2. MDA kalibrasyon eğrisi	18
Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi	20
Şekil 4. Gruplara ait böbrek dokusu MDA düzeyleri	27
Şekil 5. Gruplara ait böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri	28
Şekil 6. Gruplara ait böbrek dokusu CAT düzeyleri	29

Kısaltmalar Listesi

MDA	Malondialdehit
GSH	İndirgenmiş glutatyon
CAT	Katalaz
STZ	Streptozotosin
CİS	Sisplatin
NADPH	Nikotin adenin difosfat
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Triklorasetik asit
DTNB	5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
ROS	Serbest oksijen radikalleri
LDL	Düşük yoğunluklu kolesterol

Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince, iyi niyeti, hoşgörüsü, engin bilgi ve deneyimleriyle, her türlü yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Prof. Dr. Kadir SERVİ, Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU ve Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Eğitim ve tez çalışmalarım süresince birlikte olduğum, her türlü acıyı ve tatlıyı birlikte yaşadığım yüksek lisans öğrencilerinden sevgili arkadaşım Serpil BAYRAKTAR' a, deneysel çalışmalarım esnasında her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen Dr. Burcu GÜL BAYKALIR'a ve İbrahim Ozan TEKELİ' ye teşekkür ederim. Beni bugünlere getiren, her türlü kararım da yanımda olan, sonsuz sevgi, anlayış ve desteğiyle hep yanımda olan aileme ve canım eşime en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

1. ÖZET

Günümüzde diyabet ve kanser milyonlarca insanı etkileyen önemli hastalıklardır. Diyabete bağlı böbrek hasarları ve kanser tedavisinde kullanılan sisplatin'in en önemli yan etkilerinden biri böbreklerde oluşturduğu nefrotoksisitedir. Bu çalışmada; deneysel diyabet oluşturulmuş ratlarda sisplatin tarafından oluşturulan nefrotoksisteye karşı, likopenin'in muhtemel koruyucu özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada, ratlar 5 gruba bölünmüş ve ilk grup kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Diğer gruplar ise STZ ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuş gruplar olup ikinci grup tek başına diyabet grubu, üçüncü grup diyabet+sisplatin grubu, dördüncü grup diyabet+likopen grubu, beşinci grup ise diyabet+sisplatin+likopen grubu olarak belirlenmiştir. Dekapite edilen ratlardan kan ve böbrek dokuları alınarak plazmada üre ve kreatinin düzeyleri otoanalizör yardımı ile böbrek dokusunda oksidatif stres parametrelerinden MDA, CAT ve indirgenmiş GSH düzeyleri ise spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda plazma üre, kreatinin ve böbrek dokusu MDA düzeylerinin, diyabet ve sisplatin uygulamalarına (grup 2 ve 3) bağlı olarak artışlar gösterdiği; buna karşın, böbrek dokusunda CAT ve GSH düzeylerinin ise azaldığı belirlenmiştir. Diyabet ve sisplatin ile eşzamanlı likopen uygulamalarının oluşan bu nefrotoksiste bulgularını kısmen iyileştirdiği ve hem diyabet hem de sisplatin tarafından oluşturulan böbrek hasarlarının ise likopen uygulamalarıyla hafifletilebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Sisplatin, Nefrotoksisite, Likopen, Rat

1. ABSTRACT

EFFECTS OF LYCOPENE AGAINST CISPLATIN INDUCED NEPHROTOXICITY ON EXPERIMENTAL DIABETIC RATS

Today, diabetes mellitus and cancer are important diseases affecting people all over the world. Renal injury in diabetes mellitus and nephrotoxicity due to the treatment of cancer by cisplatin are significant adverse effects. In this study, was investigated to evaluate the protective effect of lycopene against nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic rats. Rats were divided into five groups; while the first group was selected as control, the other groups were allocated as experimental models of diabetes by the administration of streptozotocin, Group 2 consisted of diabetes only, Group 3 diabetes plus cisplatin, Group 4 diabetes plus lycopene, and Group 5 included diabetes, cisplatin and lycopene, simultaneously. Following the applications, rats were decapitated and their blood and kidney tissues were removed, plasma urea and kreatinin levels were measured by autoanalyzer. The kidney tissue MDA, reduced GSH levels and CAT activities were determined by spectrophotometry. It was determined that the application of diabetes and cisplatin increased plasma urea/ creatinin and MDA levels, whereas it decreased catalase and GSH levels in kidney tissue. This study showed that applications of lycopene may ameliorate induced nephrotoxicity findings partially; and kidney damage induced by both diabetes and cisplatin, moderately.

Key Words: Diabetes, Cisplatin, Nephrotoxicity, Lycopene, Rat

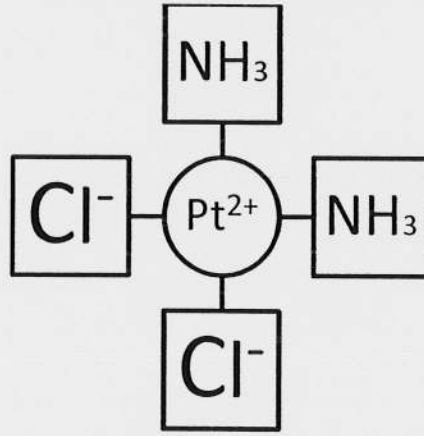
3. GİRİŞ

3.1. Sisplatin ve kimyasal yapısı

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinium II) ovaryum, akciğer, baş-boyun ve testis kanseri gibi birçok kötü huylu tümör tedavisinde faydalı etkileri olan kemoterapötik bir ilaçtır. Ancak, başta böbrekler olmak üzere birçok olumsuz etkileri nedeniyle klinik kullanımında doz sınırlayıcı faktörler mevcuttur (1, 2).

Moleküler yapısında, bir platin etrafında klor ve amonyum içeren ve *cis* formunda bir ajan olan sisplatin, suda çözünebilen organik bir bileşiktir (Şekil 1). Sisplatin, damar içi veya periton içi yolla uygulandıktan sonra yaklaşık %90 oranında serum proteinlerine bağlanarak birçok dokuya dağılabilen ve böbreklerden idrar yoluyla değişmeden atılan kemoterapötik bir ajandır. Böbreklerde özellikle proksimal tübül hücrelerine girişinin enerjiye bağımlı tübüler salgılama şeklinde olduğu bilinmektedir. Radyasyon ve diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanım sisplatin'in sitotoksitesinde sinerjik etkiye neden olmaktadır. En önemli doz sınırlayıcı problemler arasında; kullanımı sırasında görülebilen yan etkiler ve tümör dokusunda sisplatine karşı gelişen direnç problemleri yer alır (3). Sisplatinin etkisinde azalmaya neden olan dirence aşağıda bildirilen 4 olayın katkıda bulunduğu belirtilmiştir. Bunlardan ilki ilacın hücresel birikiminin azalması, ikincisi glutatyon veya glutatyon-S-transferaz aktivitesinin artması, üçüncüsü hücrede metallotionein düzeylerinin artması, son olarak ise hasar gören DNA'nın onarımının artması olarak sıralanmıştır (4, 5).

Hücre içerisinde sisplatin'in en fazla sitozol, mitokondrium, çekirdek ve mikrozomlarda yoğunlaştığı bildirilmiştir. Eğer hücrede klor yoğunluğu düşük ise verilen sisplatin molekülündeki 2 adet klor kaynağı ilacın suda çözünebilen daha toksik türevleri ile sonuçlanmaktadır (5).



Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı.

Sisplatin'in antikanser aktivitesi tam olarak açıklanamamakla birlikte, son zamanlarda tümör hücresinde DNA'ya bağlanarak DNA'nın sentez ve replike olmasını doğrudan durdurduğu ileri sürülmektedir. Sisplatin aynı zamanda hızlı üreme yeteneğine sahip kanser hücrelerinde başta DNA olmak üzere birçok hücresel hasarlara yol açabilmekte ve ilacın seçiciliğinin fazla olmaması nedeniyle birçok tipte yan etkilere sahip olabilmektedir. En önemli yan etkiler arasında nörotoksisite, kulak hasarları, bulantı, kusma ve nefrotoksisitedir. Bu sayılan zararlı etkiler arasında en

önemlisi nefrotoksisite olup sisplatin tedavisi gören hastaların yaklaşık üçte birinde görülebilmektedir (6).

3.2. Sisplatin nefrotoksisitesinin patogenezi

Sitotoksik etkisini gösterebilmesi için sisplatinin öncelikli olarak hücre içerisine girme zorunluluğu vardır. Safirstein ve ark. (7) sisplatinin en fazla biriktiği dokunun böbrek dokusu olduğunu ve diğer dokulara kıyasla bu dokuda 5 katı fazla birikim gösterdiğini bildirmişlerdir. Sisplatinin özellikle taşıt proteinlerine bağlanarak aktif taşıma yoluyla proksimal tübüllerde biriktiğini ve bu hücrelerde biyotransformasyona uğradığını ileri sürmüşlerdir.

Böbreklerde sisplatin nefrotoksisitesinin en önemli histopatolojik bulgusu tübül hücrelerinde meydana gelen hücre ölümleridir. *In vivo* hayvan modellerinde sisplatin özellikle proksimal tübüllerin S3 segmentindeki hücrelerde yoğun nekroz ve sonradan görülebilen rejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir. Tübüllerdeki papillar ve glomerüller hasarlar oldukça az ve önemsiz derecede kalmaktadır. Uzun süreli sisplatin tedavilerinde ise kist oluşumu ve intertisyel bölgede fibröz oluşumu söz konusu olabilmektedir (6, 8).

3.3. Sisplatin nefrotoksisitesinin moleküler patogenezi

Sisplatin tarafından oluşturulan nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte serbest radikal süpürücüleri ve antioksidanların toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Özellikle trion ve süperoksit

dismutaz gibi süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) süpürücülerinin sisplatin tedavisine karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (1, 2).

Oksidatif stres, sisplatin nefrotoksisitesinin ana mekanizmalarından biridir. Çeşitli reaktif oksijen türleri (ROS) sisplatine maruz kalan böbrek tubül hücrelerinde aşırı şekilde oluşabilmekte ve birçok patolojik olayın oluşan bu ROS'lar tarafından meydana getirildiği ileri sürülmektedir. Sisplatin hücreye girdikten sonra daha fazla reaktif bir forma dönüşür ve bu formdaki sisplatin glutatyon gibi antioksidanlar ile hızlıca reaksiyona girebilirler. Bununla birlikte eğer hücre içerisinde reaktif ürünlerin oluşumu aşırı olursa glutatyon ve ilişkili antioksidanlar baskılanır ve ortamda endojen ROS birikimi artar. Böylece artan ROS oksidatif hasarlara neden olur. Başlıca hasarlar ise özellikle mitokondriyal antioksidan sistemlerin bozulmasından dolayı böbreklerde görülebilecek nefrotoksisitedir (6, 9).

Moleküler düzeyde, sisplatin uygulamasıyla böbreklerde bazı genlerin yeniden düzenlendiği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada 7 günlük sisplatin tedavisi olan ratlarda oksidatif strese bağlı olarak gen düzenlemelerinin değiştiği gösterilmiştir. Örneğin metallothionein 1 geninin upregülasyonu olurken, katalaz, süperoksit dismutaz ve gama glutamil transferaz genlerinin ise downregülasyonunun olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak sisplatin tarafından meydana getirilen bu gen değişimleri hücre ölümünü artırarak sisplatin nefrotoksisitesinin temellerini oluşturmaktadır. Aynı zamanda glutatyon düzeylerinin sisplatin uygulamasına bağlı olarak azaldığı ve sisplatin ile birlikte glutatyon verilmesi durumunda sisplatin yan etkilerinin azaldığı bildirilmektedir (6, 10, 11).

Yoğun oksidatif stres sisplatin tarafından neden olunan hücre hasarlarının bir sonucu olarak başta tubüler nekroz ve apoptozis yoluyla hücre ölümlerine neden olabilmektedirler. Bu olaylara ölüm reseptörleri aracılığıyla oluşan ekstrinsik yollar, endoplazmik retikulum stres yolları ve mitokondriyal ile ilişkili apoptotik yollar aracılık etmektedirler. Bazı hücrelerde sisplatin hücre ölümlerine neden olurken bazı hücrelerde ise nekrozlara neden olabilmektedir. Bu farklılığın nedeni ise uygulanan sisplatin miktarlarına göre değişmekte ve yüksek dozda sisplatinin daha fazla hücre ölümlerine neden olduğu bildirilmektedir (12, 13, 14). Üstelik bazı araştırmacılar (15) sisplatinin oluşturduğu ROS ve apoptozis arasında doğrudan bir ilişki olmasına karşın nekroz oluşumu ile arasında bir ilişki olmadığını ileri sürmüşlerdir.

Chirino ve ark. (1) sisplatin tarafından böbreklerde oluşturulan nefrotoksisiteden süperoksit ve nitrik oksit reaksiyonundan oluşan peroksinitrit'in sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondriyal solunumda olmak üzere; ksantin oksidaz, lipoksijenaz, eşleşmemiş nitrik oksit sentaz ve NADPH oksidaz gibi birçok enzim aktivitesinde rol oynamaktadır. Bazı araştırmacılar (16) diyabetli böbrek hasarlarında glomerül ve distal tubüllerde NADPH salınımının arttığını ve bu artışın oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Sisplatin böbreklerde başlıca proksimal tubüller tarafından alıkonulmakta ve başlıca hasarlarını da buradaki hücrelere göstermektedir. Sonuç olarak bu bölgelerde sisplatin nefrotoksisitesinin belirtisi olan nekroz ve apoptozis belirtilerinin yanı sıra yangı hücrelerinin o bölgeye infiltre olduğu gösterilmiştir. Oluşan toksisitenin DNA hasarı, Caspaz aktivasyonu, mitokondriyel fonksiyon bozukluğu, reaktif oksijen

oluşumu, nitrojen türlerinin artışı, poli-polimeraz aşırı üretimi ve yangı olaylarının olaya dahil edilmesiyle karmaşık bir şekilde oluştuğu bildirilmektedir (2).

3.4. Diyabet

Diabetes mellitus dünyadaki insanların yaklaşık %5'ini etkileyen kompleks metabolik bir hastalıktır. Tip 1 ve tip 2 diyabet diye iki farklı modeli belirlenmiştir. Tip 1 diyabet pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarları sonucu oluşan ve tüm diyabetli vakaların yaklaşık %5-10'unu kapsayan bir çeşididir. Bu tip diyabet olayları insülin salgılayan hücrelerin hasarlarına bağlı olarak genellikle hızlıca gelişir ve hastalar dışarıdan insülin almak zorunda kalırlar. Tip 2 diyabet daha sık görülür ve tüm hastalar içerisindeki oranı yaklaşık %90-95'dir. İnsülin direnci ve insülin noksanlığı ile ilişkili bir hastalık olup daha çok kilolu veya obez insanlarda görülebilmektedir. Hiperglisemi genellikle yavaş olarak gelişir ve erken dönemlerde kan glikoz düzeyleri orta derecede yükselir. Tip 2 diyabetlilerde insülin direnci başlangıçta artan insülin ile karşılanmaya çalışılırken, bu uzun süreli insülin salgılanması beta hücrelerinde bitkinlik ve yıkımlanmaya sebep olabilmektedir. Bu tip diyabetli hastaların beta hücrelerinde çok çeşitli anormallikler tanımlanmıştır. Tip 2 diyabetli insanlarda glikoz ile uyarılmış insülin salgılanması büyük ölçüde bozulmakta ancak, aminoasit ve sulfonilüre'ye karşı salgılanma daha az etkilenmektedir. Aynı zamanda beta hücrelerinden insülin salgılanma anormallikleri glikozun oksidasyonunda azalma ve ATP/ADP oranlarında azalmalar ile kendini gösterebilmektedir. Yine tip 2 diyabetli insanların pankreatik adacıklarında insülin salınımı, glikoz taşıyıcıları ve glikokinaz aktiviteleri azalmıştır. Aynı şekilde bu

hastaların pankreatik adacıklarında oksidatif stres ve apoptozis olaylarının da sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında arttığı bilinmektedir. Bununla birlikte birçok konu henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (17-20).

Diyabetin önlenmesi ve tedavi edilmesi amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve özellikle de streptozotosin (STZ) ile deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Nitrozoüre analogu bir madde olan STZ pankreatik hücrelerde sitotoksik etkiyle hasarlar oluşturmakta ve deneysel diyabet modelleri için ideal bir ajan olarak bilinmektedir. Bu hücelere seçici bir etki gösteren STZ glikoz taşıyıcılarını etkileyerek insülin salgılayan hücelere glikozun ancak yarısının geçmesine imkan vermektedir. STZ uygulamasının bu hücrelerde DNA alkilasyonu vb hasarlar yaptığı birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Ancak bu hücrelerin çekirdeğinde bulunan polimeraz enzimleri ise aksine DNA onarımıyla ilişkili yapılardır (17, 21, 22, 23).

Böbrek hasarları ve yetmezliği her iki tip diyabetli hastaların yaklaşık %30'unda sorun oluşturan önemli bir klinik durum olmakta ve nihayetinde tedavi gerektiren sorunları beraberinde getirmektedir. Bu hasarların mekanizmaları yeterince açık değildir. Böbrek yetmezlikleri 5-10 yıl içerisinde oluşabilen ve böbrekler yoluyla protein atılımında artma (%15 µg/dk'dan %30 µg/dk), hipertansiyon ve glomerüler filtrasyon oranlarında azalmalar gibi belirtilerle kendini göstermektedir. Diyabetli hastalardan alınan biyopsi ile alınan böbrek dokusunda saptanan yaygın glomerüler skleroz ya da nodüler interkapiller glomerüler skleroz tipik bulgulardır. Ancak, glomerüler yapı dışında kalan intertisyel doku ve tubül hücreleri gibi yapıların da

etkilendiği ve nefropati oluşumunda bu yapıların da önemli katkıları olduğunu ileri süren birçok araştırma mevcuttur (24, 25).

3.4.1. Diyabet ve oksidatif stres

Tip 2 diabetes mellitus'un patofizyolojik mekanizmaları ve komplikasyonları kan dolaşımındaki kronik aşırı glikoz düzeyleri ile ilişkilidir. Artmış kan glikoz düzeyleri metabolik yolları aktive ederek serbest radikal ve oksidatif stresin artışına neden olmaktadır. Bununla birlikte geç diyabetik komplikasyonlar sadece oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu ya da antioksidan durumdaki azalmaya bağlı değildir. Bu hastalıkta artan serbest radikal oluşumunun temelinde enzimatik olmayan glikolizasyondaki artış, glikoz otooksidasyonu, enerji metabolizmasındaki değişikliklere bağlı metabolik stres, yangı medyatörlerinin düzeyleri ve antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler yer almaktadır (26). Hiperglisemi süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi mitokondriyal DNA hasarlarına neden olan ROS düzeylerini artırır. Özellikle guanin oksidasyon ürünlerinden 8-hidroksi guanin oksidatif DNA hasarının en önemli göstergesi olarak kabul edilmekte ve diyabetli hastalarda bu maddenin düzeylerinin arttığı gösterilmektedir (26, 27).

3.5. Likopen

Likopen, lutein ve astaksantin gibi karotenoidler gıdalarda renklendirici madde olarak geniş bir şekilde kullanılmakta ve bu maddelerin faydaları göz önüne alındığında yiyeceklerde artan bir şekilde destekleyici olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerden en önemlisi başta domates olmak üzere birçok gıdada bulunan likopenin

insan sağlığında çok önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Birçok araştırma likopenin başta kemoterapötik ajanlarla olan tedaviye yardımcı madde olarak kullanılmasından bahsetmektedir (28 - 33).

Likopen, kimyasal olarak beta karoten'in asiklik bir izomeri olup 2 tane konjuge olmayan çift bağa sahiptir. Doğal bitkilerden sağlanan likopen hem *cis* hem de *trans* formlarında ve termodinamik olarak stabil karakterde bulunmaktadır. İnsanlarda serum likopen'inin yaklaşık %85'i domates ve domates ürünlerinden sağlanmaktadır. Likopen beta karoten dioksijenaz için substrat olarak kullanılamaz ve böylece vitamin A'ya dönüştürülemez (29, 34, 35).

Likopen içeren domates ve domates ürünleri ile diğer likopen kaynakları bağırsaklardan emildikten sonra en önemli depo yeri olan karaciğere geçmek için trigliseritten zengin şilomikron partikülleri içerisine girerler. Aynı zamanda likopen akciğer, prostat bezi, testis, kolon ve deride de birikebilmektedir. Diğer karotenoidler ile karşılaştırıldığında vücutta en fazla likopenin depolandığı bildirilmektedir. Bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentez edilebilmesine karşın hayvanlarda sentezi söz konusu olmamaktadır (29).

3.5.1 Likopen ve antioksidan zellik

Yapısında bir molekül likopen içeren maddeler beta karoten ile karşılaştırıldığında iki katı, alfa tokoferol ile karşılaştırıldığında ise 3 katı daha fazla serbest oksijen molekülünü baskılama gücüne sahiptir. Antioksidan etki gücü olarak sıralamak gerekirse likopen>alfa tokoferol>alfa karoten> betacriptoksantin >

zeaksantin=beta karoten > lutein şeklinde sıralanabilmektedir. Aynı zamanda likopenin hipoklorik asit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikal elektronlarını süpürücü özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir (29, 34, 35). Başka bir araştırmada (36, 37) ise *in vitro* ortamda insan endotel hücrelerinin hidrojen peroksit tarafından membran lipidlerinin peroksidasyonuna karşı likopenin koruyucu bir özellik gösterdiği bildirilmektedir.

In vivo birçok çalışmada yine likopenin antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin sağlıklı insan çalışmalarında, serum likopen düzeylerinin serumdaki lipid peroksidasyon ürünleri ile zıt yönde olduğu, lenfositlerdeki okside DNA düzeylerinin yine likopen ilavesi ile azaldığı belirtilmiştir. Özellikle serum LDL partiküllerinin likopen ile iç içe girdiği ve likopen düzeyleri ile LDL düzeyleri arasında zıt yönde bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (29, 38). Yine, likopenin oksijen kovucu yeteneğinin bir sonucu olarak oksidatif DNA hasarlarının önüne geçmek suretiyle kanserin başlaması ve ilerlemesini ciddi bir şekilde önlediği bildirilmektedir.

3.5.2. Likopen ve kemoterapötik tedavi

Antineoplastik tedavi ile ilişkili olarak; artan lipid peroksidasyon ürünlerinin oksidatif stresi arttırdığı, buna karşın antioksidan özellik gösteren vitaminler, glutatyon ve antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı iyi bilinen bir durumdur. Özellikle kemoterapiye bağlı artan oksidatif stres ve azalan antioksidan aktivite bu hastaların kanser ile olan ilişkilerini bozabilmektedir. Dolayısıyla antioksidan maddelerle destekleyici tedavi edilen hastalarda kemoterapötik ilacın etkisini daha da iyi göstermesi ve oksidatif stres nedeniyle tümör hücresinde büyüme inhibe edici

etkinin ortadan kaldırılabileceği ifade edilmektedir (29, 39, 40). Bazı araştırıcıların ise tümör hücrelerine karşı kemoterapötiklerin etkisini antioksidanların önleyebileceğine yönelik zıt yönde çalışmaları mevcuttur (41, 42).

Bu çalışmanın amacı, ratlarda deneysel diyabet oluşturmak ve bu diyabetli hayvanlara sisplatin uygulanmasıyla meydana gelen nefrotoksisteye karşı likopen uygulamalarının böbrek hasarına muhtemel olumlu etkilerini belirlemektir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. GEREÇ

4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Alet ve/veya cihazlar	Markası
Spektrofotometre	Techcomp UV 7500
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvartz)	
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R
İnkübatör	Nüve FN ₅₀₀
Homojenizatör	B.BRAUN 853022
pH metre	WTW pH 340i
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176
Su banyosu	Nüve NB9
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2553 D
Hassas terazi (0,001g - 150g)	Denver instrument Apx-153
Bidistile su cihazı	GFL 2104
Manyetik karıştırıcı	Colara Magnetomix
Glikoz ölçüm cihazı	Smart Chek
Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	Isolab
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab
Beher (25, 50, 100 ml)	Isolab
Mikro pipet (10-100,100-1000 µl)	Thermo Labsystems

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan Likopen DSM redivivo™ %10; Cisplatin EBEWE Pharma; Streptozotosin ise SIGMA (Katalog No S0130) firmasından temin edildi. Analizlerde kullanılan diğerk sarf malzemeleri ise analitik düzeyde olup Sigma firmasından satın alındı.

4.1.3. Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden (FÜDAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 168-187 g olan 6-8 haftalık 50 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. FÜDAM'da gerçekteştirilen çalışmalarda ratlar standart şartlarda (sabit ve ısı havalandırılmal ı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) her bir kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Ratlara su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Ratların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı. Kullanılan yemin bileşimi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Deney hayvanlarının seçimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (Toplantı tarihi 22.11.2011; Toplantı Sayısı: 10; Karar No: 133) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Deney süresi 14 gün olarak belirlendi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin bileşimi

Yem Bileşimi	Oran
Su (en çok)	% 12
Ham protein (en az)	% 24
Ham selüloz (en çok)	% 7
Ham kül (en çok)	% 8
HCL' de çözünmeyen kül (en çok)	% 2
NaCl (en çok)	% 1
Mineral Karması *	% 1.25
Vitamin Karması **	% 1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0 -2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 iü/kg), Vitamin D₃ (1000 iü/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg).

Ratların deneylere başlamadan önce ve deney bitiminden sonra canlı ağırlık tartımları yapılarak canlı ağırlık ortalamaları değerlendirildi. Ayrıca çalışma periyodu boyunca ölen hayvanların ölüm günleri de kaydedildi.

Deney Grupları

Her grupta 10 hayvan olacak şekilde ratlar 5 gruba ayrıldı;

1. Grup (Kontrol): Kontrol grubu hayvanlara ilk gün sitrat tamponu (STZ çözücüsü) periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden itibaren) kan şeker düzeyleri belirlendi. Daha sonra her bir hayvana 0.5 ml mısır yağı gavaj yoluyla uygulandı.

2. Grup (Diyabet): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3nc günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi.

3. Grup (Diyabet + Sisplatin): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3nc günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 5 mg/kg dozda sisplatin periton içi yolla tek doz uygulandı.

4. Grup (Diyabet + Likopen): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3nc günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 10 mg/kg dozunda likopen mısır yağında çözdürülerek gastrik gavaj ile 10 gün sürecince uygulandı.

5. Grup (Diyabet + Sisplatin + Likopen): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3nc günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların

tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 10 mg/kg likopen gavaj yoluyla; 5 mg/kg dozda sisplatin ise periton içi yolla uygulandı.

Araştırmada deneysel diyabet modeli STZ ile gerçekleştirildi. Öncelikle 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH 4.5) içerisinde taze olarak hazırlanmış STZ çözeltisi (soğuk ortamda saklanmak koşuluyla) 60 mg/kg (22) dozunda uygulandı. 72 saat sonra kuyruk venasından bir damla kan alınarak açlık kan şekeri ölçümü yapıldı. 250 mg/dl ve üzerinde olan ratlar diyabetli olarak kabul edildi ve çalışmaya alındı. Diyabetli oldukları kabul edilen hayvanlara yem ve su serbestçe verildi.

Likopen %10 luk çözeltisi şeklinde 10 mg/kg dozunda; sisplatin ise 5 mg/kg dozunda Ateşşahin ve ark (31, 32) tarafından önerilen şekilde uygulanmıştır.

4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar hafif bir eter anestezisine alınarak dekapite edildi. Plazma üre ve kreatinin düzeylerinin belirlenmesi için yeterli kan örnekleri alındı ve plazmaları çıkartıldı. Daha sonra laparotomi yapılarak her iki böbrek dokuları alındı. Alınan böbreklerden biri histopatolojik değerlendirmeler için diğeri ise biyokimyasal analizler için (MDA ve GSH düzeyleri ile CAT aktivitesi) -20 °C’de muhafaza edildi.

4.1.5. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılıp cam tüplere konuldu. Üzerlerine 1/10 (g/v) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15’lik potasyum klorür (KCl) ilave

edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dk hızda 3 dk homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlarda böbrek dokusu MDA tayinleri yapıldı.

Geri kalan homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda ise redükte GSH, CAT aktivitesi ile protein ölçümleri yapıldı.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeylerinin Ölçümü

Böbrek dokusu MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (43) tarafından önerilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Aerobik şartlar altında ve pH 3,5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

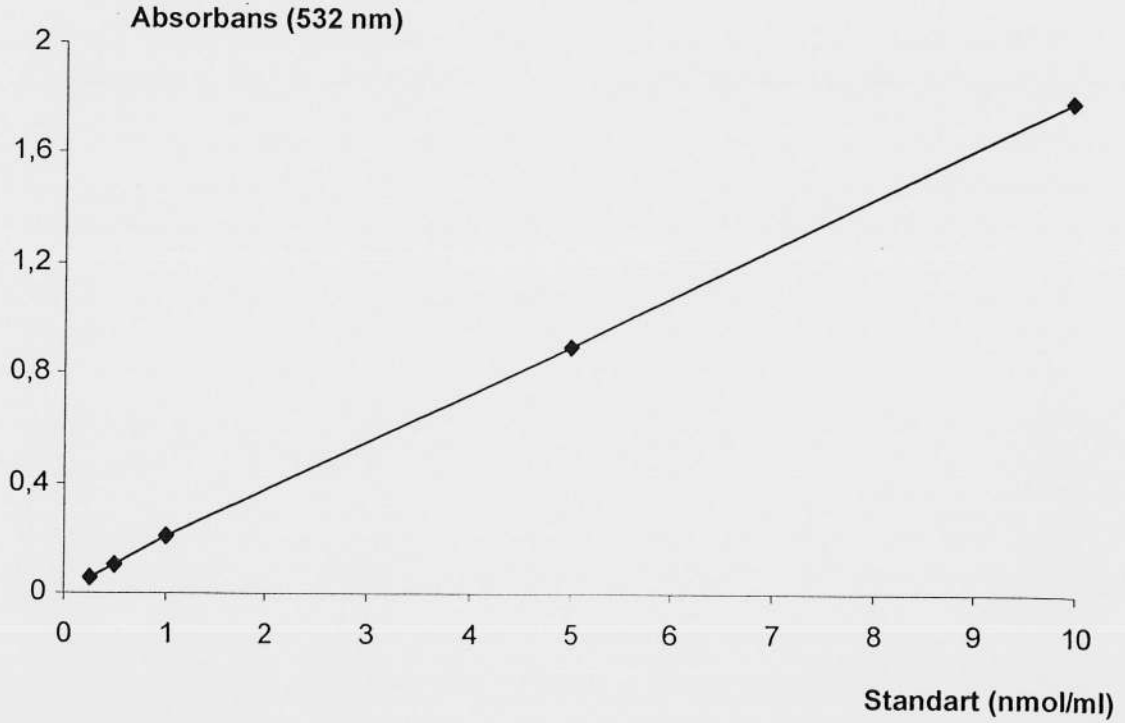
Ayırıcılar

1. Tiyobarbitürik asit (TBA) ayırıcı: 0,25 N HCl içerisinde %0,65 TBA çözdürüldü.
2. Trikloroasetik asit (TCA) ayırıcı: 0,25 N HCl içerisinde %10 TCA çözdürüldü.
3. Standart (1,1,3,3 tetraetoksipropan): %50 Etanol içerisinde hazırlandı.

Stok standarttan konsantrasyonu 20 nmol/ml olan günlük stok hazırlandı. Bu standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 0.25, 0.5, 1, 5, 10 nmol/ml

konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma standartlarından 0,5 ml TCA ve TBA ayraçlarından 1'er ml alınarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 2).

Tüpler karıştırıldıktan sonra 95 C°'de 30 dk kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu. 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üst kısımları pipetlendi. 532 nm'de köre karşı okunup standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen böbrek dokusu MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak ifade edildi.



Şekil 2. MDA kalibrasyon eğrisi

Yöntem

Örnekler için ayıraçlar tüplere standart eğri oluşturulurken uygulanan şekilde (0,5ml homojenat, 1ml TBA, 1ml TCA) hazırlandı ve aynı uygulamalara tabi tutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de absorbanslar belirlendi ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak hesaplandı.

Hesaplama

532 nm'de okunan örnek absorbansları (OD) standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = (\text{Örnek absorbansı} / \text{Std. absorbansı}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.2. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeylerinin Ölçümü

Böbrek dokularındaki redükte GSH düzeyleri Ellman (44) tarafından önerilen ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi.

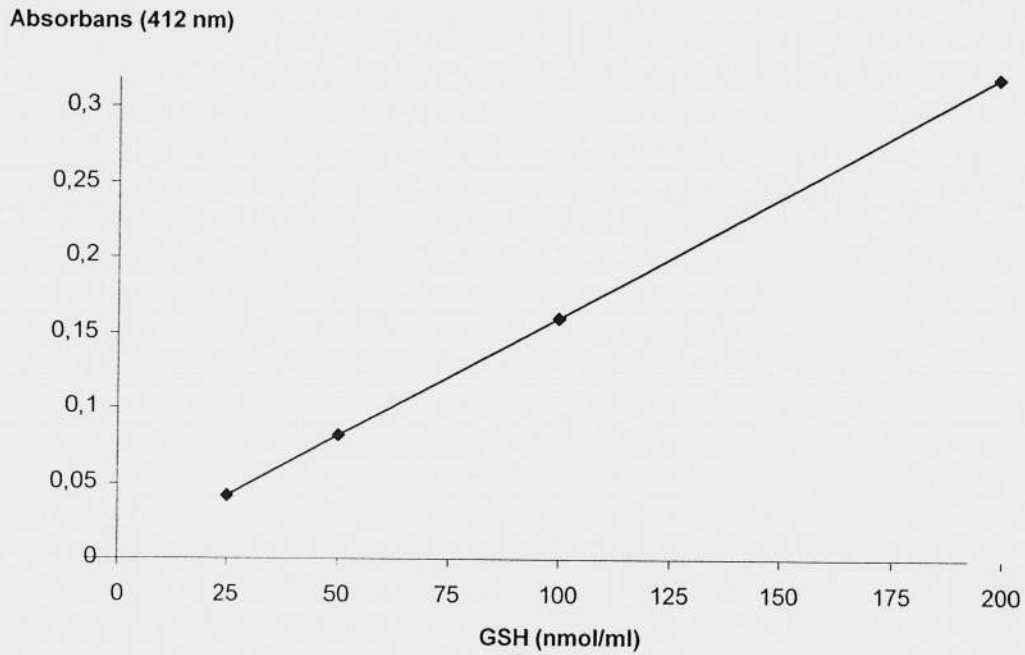
Prensip: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), sülfidril bileşikler tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturulur. Daha sonra bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH düzeyleri saptanır.

Ayıraçlar

1. Tris EDTA Tamponu (0,2 mol/ml, pH: 8,9)
2. TCA Ayırıcı (% 10'luk)

3. DTNB (5-5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) (0,01 mol/L)

Konsantrasyonu 1000 nmol/ml olan stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 25, 50, 100, 200 nmol konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 3 'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi.

Yöntem

Homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. 0,5 ml süpernatant ile 0,5 ml TCA ile çöktürüldü ve tekrar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki kısımdan 0,5 ml alınıp

2 ml Tris EDTA tamponu ilave edildi. Daha sonra 0,1 ml DTNB ilave edilerek karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 412 nm'deki absorbansları köre karşı okunarak belirlendi. Elde edilen değerler $\mu\text{mol/g}$ protein olarak sunuldu.

4.2.3. Böbrek Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü

CAT enzim aktivitesi Aebi (45) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. CAT katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştürmektedir.

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilecek H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanması, UV spektrumunda bir absorbans azalması olarak takip edildi. Absorbanstaki azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ayırıcılar

1. Fosfat Tamponu (pH: 7; 50 mM)
2. H_2O_2 çözeltisi (% 30)

Yöntem

Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna karşı sıfırlanır. Fosfat tamponuna % 30'luk H_2O_2 ilave edilerek absorbans 0,50 oluncaya kadar azar azar ilave edilir.

Numune ilavesi ile 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması her 30 saniyede bir 2 dakika boyunca kaydedildi. Hesaplamada 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

Hesaplama

$$k/dk = k \times dk^{-1} = (2.31 \times \log \text{Okunan Değer 1} / \text{Okunan Değer 2}) / 60 \text{ sn}$$

4.2.4. Protein Ölçümü

Protein miktarı tayini ise yine bu süpernatantlarda Lowry ve ark (46) tarafından tarif edilen yöntemle göre tayin edildi.

Prensip: Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 650 nm’de okunur.

Ayıraçlar

1. Alkali Bakır ayıracı
2. Fenol ayıracı
3. Bovine serum albumin (150 µ/ml)

Yöntem

1/100 oranında sulandırılan doku örneğinden ve alkali bakır ayırıcından 1'er ml alınarak karıştırılır, oda ısısında 10 dk bekletilir. 4 ml fenol ayıracı ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 55 C’de 5 dk bekletilir. İnkübasyon sonucunda hemen soğutularak absorbanları 650 nm’de köre karşı okunur.

4.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler ‘SPSS for Windows 15.0’ paket programı kullanılarak değerlendirildi. Normallik testleri yapıldı ve veriler nonparametrik test

varsayımlarına uyduğu için grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ve ardından gruplar arası karşılaştırmalar için Tukey HSD testleri uygulandı. Canlı ağırlıklardaki değışimler ise nonparametrik testlerden Wilcoxon testine tabi tutuldu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi ve $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5. 1. Canlı Ağırlık ve Kan şeker düzeyleri

Araştırmaya alınan ratlara ait başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları Tablo 2’de gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan ratların başlangıç ağırlıkları homojen olarak oluşturulmuştur. Kontrol grubu hayvanlarda deneyin başlangıcı ile bitişi arasında ölçülen ağırlıklar arasında istatistikî olarak bir artış ($p<0,05$) olmasına karşılık, diyabet oluşturulmuş tüm hayvan gruplarında azalmalar görülmektedir.

Çalışma süresince kontrol grubunda 2; diyabet grubunda 4; diyabet+sisplatin grubunda 1; diyabet+likopen grubunda 3; diyabet+sisplatin+likopen grubunda ise 4 hayvan ölmüştür. Geri kalan hayvanlar çalışmanın bitimine kadar sağlıklı bir şekilde yaşamlarını sürdürmüş ve dekapite edilmişlerdir. Tüm gruplarda laparotomi yapılarak açılan hayvanların iç organlarında herhangi bir makroskopik patolojik duruma rastlanılmamıştır.

Araştırmada diyabet oluşturmak amacıyla STZ uygulaması yapılan hayvanların (toplam 40 ratta uygulandı) hemen tümü diyabetli olarak belirlenmiş sadece 1 hayvandaki açlık kan şekeri 250 mg/kg düzeyinin altında çıkmış, bu hayvana da 30 mg/kg ilave STZ doz uygulaması yapılarak diyabet sayılacak seviyelere getirilmiştir.

Tablo 2. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları ve kan şeker düzeyleri.

Gruplar	Deney başlangıç ağırlığı (g)	Deney sonu ağırlığı (g)	Kan şeker düzeyleri (mg/dl)
Kontrol	187.6±6.6 ^b	200.2±7.1 ^b	69.0±2.64 ^a
Diy	178.3±6.4 ^{ab}	163.2±5.4 ^{ab}	485±6.74 ^b
Diy + Sis	169.7±5.9 ^{ab}	156.2±5.3 ^a	380±36.1 ^b
Diy + Lik	182.7±8.1 ^{ab}	177.5±8.7 ^{ab}	404±47.1 ^b
Diy + Sis + Lik	153.6±5.2 ^a	160.6±9.85 ^a	376±28 ^b
P değeri	0.067	0.000	0.000

a,b ; Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arası fark önemlidir (p<0.05)

5.2. Biyokimyasal Parametreler

5.2.1. Plazma üre ve kreatinin düzeyleri

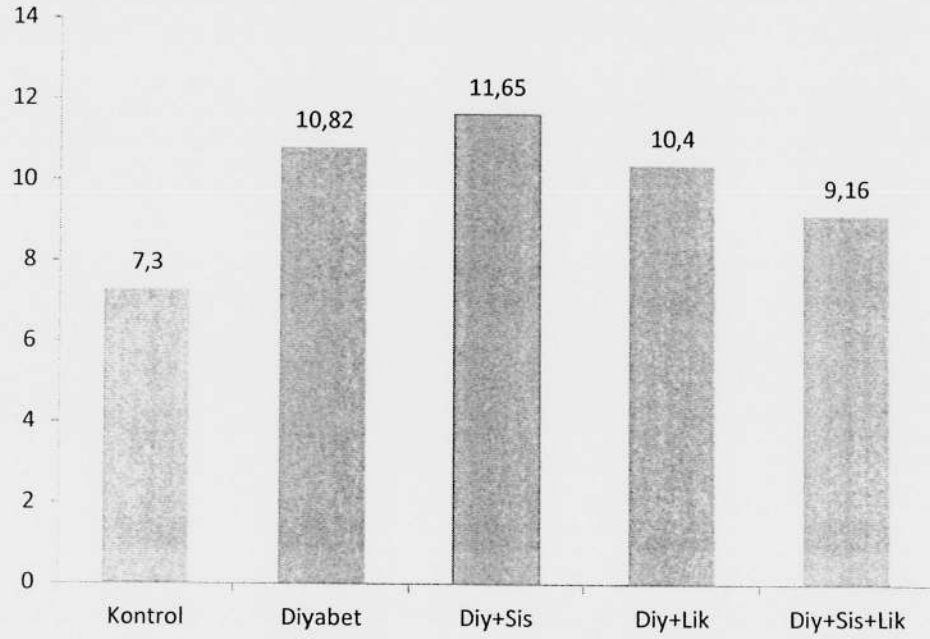
Plazma üre ve kreatinin düzeyleri Tablo 3 te gösterilmiştir. Diyabet oluşturulan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında plazma üre değerlerinin anlamlı (p<0.05) bir şekilde; kreatinin değerlerinin ise hafif bir şekilde yüksek olduğu görülmektedir. Diyabet+sisplatin grubunda üre ve kreatinin değerlerinin tek başına diyabet grubuna göre daha yüksek olduğu (p<0.05); diyabet+sisplatin+likopen grubunda ise üre ve kreatinin düzeylerinin daha düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Likopen uygulamalarının plazma üre ve kreatinin düzeylerinde olumlu bir iyileşmeye neden olduğu görülmektedir.

Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarına ait üre ve kreatinin düzeyleri (mg/dl).

Gruplar	Üre	Kreatinin
Kontrol	33,6±2,96 ^c	0,77±0.02
Diy	88,0±2,76 ^{ab}	0,88±0.06
Diy + Sis	88,5±5,99 ^{ab}	0,92±0.04
Diy + Lik	68,7±7,92 ^b	0,87±0.03
Diy + Sis + Lik	93,3±0,33 ^a	0,88±0.10
P değeri	0.05	1

5.2.2. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri

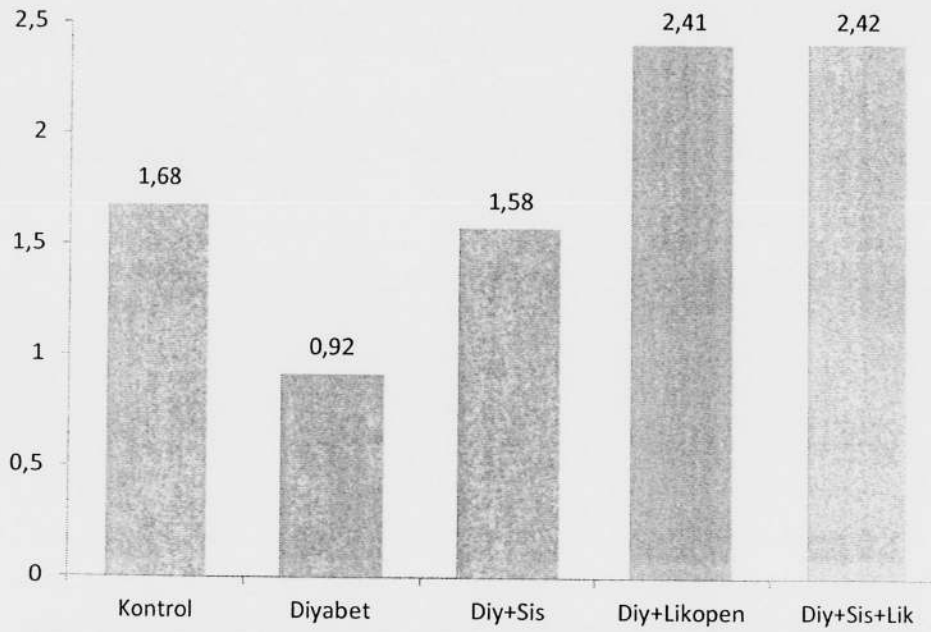
Böbrek dokusu MDA düzeyleri Şekil 4 'te sunulmuştur. Kontrol grubu MDA düzeylerinin 7,30±0,38 nmol/ml homojenat olarak belirlendiği buna karşılık tek başına diyabet oluşturulan grupta ise 10,82±0,34 nmol/ml düzeylerinde olduğu, diyabetli gruba sisplatin uygulandığında ise hafif bir artışla 11,65±0,57 nmol/ml düzeylerine çıktığı görülmektedir. Ancak, Diyabet+Sisplatin+Likopen uygulaması yapılan grupta ise MDA düzeylerinin 9,16±0,58 nmol/ml düzeyleriyle anlamlı bir şekilde iyileşme gösterdiği görülmektedir (p<0,001).



Şekil 4. Gruplara ait böbrek dokusu MDA düzeyleri (nmol/ml homojenat)

5.2.3. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri

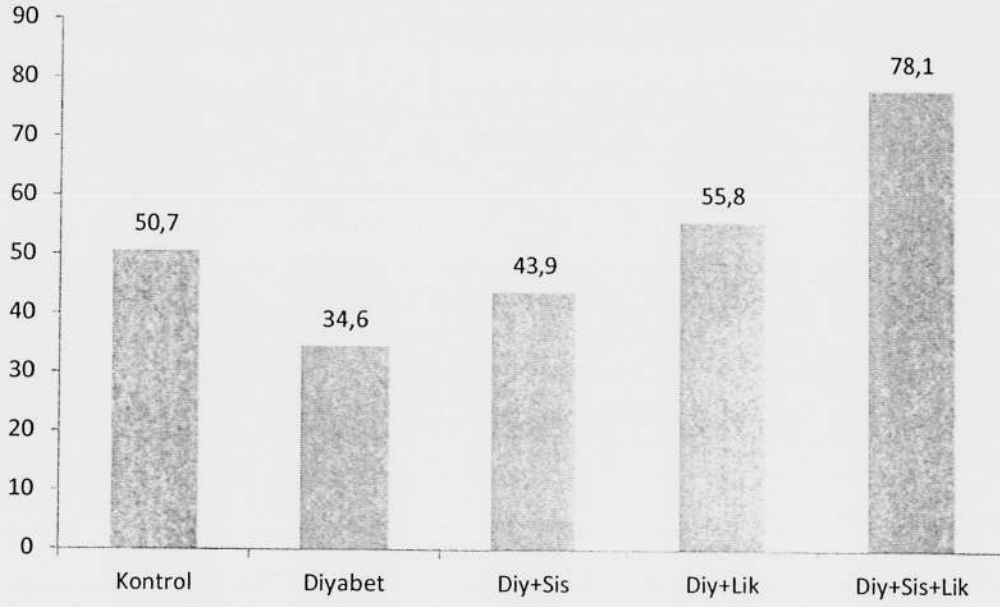
Böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri Şekil 5'te sunulmuştur. Çalışmaya alınan hayvanlardan kontrol grubu ratlarda GSH düzeylerinin $1,68 \pm 0,20$ nmol/g protein olduğu, buna karşılık diyabet grubunda ise $0,92 \pm 0,16$ nmol/g protein düzeylerine indiği belirlenmiştir. Diyabetli gruba sisplatin uygulamasıyla $1,58 \pm 0,21$ nmol/g düzeylerine düşen GSH düzeyleri yine diyabetli gruba likopen uygulamasıyla $2,41 \pm 0,17$ nmol/g değerlerine yükselmiştir. Çalışmada diyabet oluşturulmuş gruba hem sisplatin hem de likopen uygulaması yapılan hayvanların GSH düzeylerinin ise $2,42 \pm 0,11$ nmol/g düzeylerinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5. Gruplara ait böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri (nmol/g protein).

5.2.4. Böbrek Dokusu CAT Aktiviteleri

Araştırmaya alınan hayvanların böbrek dokusu CAT aktivitelerine ait sonuçlar Şekil 6’da sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına diyabet oluşturulan grup arasında bir azalma (sırasıyla $50,7 \pm 7,25$ ve $34,6 \pm 5,62$ ku/g protein) olduğu ancak anlamlı olmadığı ($p > 0,05$) belirlenmiştir. Diyabetli gruba sisplatin ve likopen’in tek başlarına uygulanmasıyla katalaz aktivitelerinde artış olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler olmadığı; buna karşın diyabetli gruba sisplatin ve likopenin eşzamanlı uygulanmasıyla katalaz aktivitelerinde önemli artışlar olduğu görülmektedir ($p < 0,05$).



Şekil 6. Gruplara ait böbrek dokusu CAT düzeyleri (ku/g protein)

Gruplar	MDA (nmol/ml homojenat)	GSH (nmol/g protein)	CAT (ku/g protein)
Kontrol	7.30±0.38 ^a	1.68±0.20 ^{ab}	50.7±7.25 ^{ab}
Diy	10.82±0.34 ^{bc}	0.92±0.16 ^b	34.6±5.62 ^b
Diy + Sis	11.65±0.57 ^{ab}	1.58±0.21 ^b	43.9±4.69 ^b
Diy + Lik	10.40±0.37 ^{bc}	2.41±0.17 ^a	55.8±8.02 ^{ab}
Diy + Sis + Lik	9.16±0.58 ^c	2.42±0.11 ^a	78.1±12.4 ^a
P değeri	0.001	0.002	0.039

Tablo 4. Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda böbrek dokusu oksidatif stres parametreleri.

^{a,b,c} : Farklı harflerle gösterilen değerler arası fark önemlidir.

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fazla yan etkisi olmayan ajanlar kullanılarak diyabet ve diyabet ile ilişkili medikal problemlerin çözümüne yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Günümüzde çok sayıda insanın diyabet ile ilgili problem yaşadığı, alternatif tedavilerin denendiği ve özellikle de bitkisel ürünlerin çok yaygın kullanıldığı bir dönemden geçilmektedir. Bu çalışmada da diyabete ilave olarak sisplatin ve sonrasında gelişen nefrotoksisteye karşı doğal bir karotenoid olan likopenin koruyucu veya tedavi edici etkileri araştırılmıştır.

Deneyssel olarak hayvan modellerinde diyabet oluşturulması birçok araştırmacı (13, 22, 23, 47, 48) tarafından ortaya konmuş ve iyi bir şekilde uygulanmaktadır. Bu çalışmada ratlarda deneyssel diyabet oluşturmak amacıyla STZ 60 mg/kg dozunda ve tek sefer olarak uygulanmıştır. Pankreasın beta hücrelerinde oluşturduğu toksisiteye bağlı olarak uygulama yapılan hayvanların hemen hepsinde kan glikoz düzeyleri uygulamadan 72 saat sonra 350 mg /dl düzeylerinin üzerinde bulunmuştur. Bu değer hiperglisemi değeri olarak kabul edilen 200 mg/dl'nin çok üzerinde bir değer olduğundan araştırmaya alınan hayvanların diyabetli oldukları kabul edilmiş ve yukarıdaki araştırmacıların görüşleri ile paralellik göstermektedir.

Araştırmaya alınan hayvanlar tartılmış ve homojen ağırlık grupları oluşturularak deneylere başlanmıştır. Hayvanların başlangıç ve deney sonu canlı ağırlıkları Tablo 2'de sunulduğu üzere kontrol grubu hayvanlarının deney süresince canlı ağırlık kazancının olduğu ve deney sonunda başlangıca göre yaklaşık %8 gibi bir artış gösterdiği saptanmıştır. Ancak, diyabet oluşturulan gruplardaki ratlara ait canlı ağırlıklarının herhangi bir artış göstermediği, hatta sadece diyabet,

diyabet+sisplatin ve diyabet+likopen gruplarında başlangıç değerlerine göre deney sonunda canlı ağırlıklarda hafif azalmaların olduğu; diyabetli gruba sisplatin+likopen'nin eşzamanlı uygulamasının ise canlı ağırlık değişimlerinde çok hafif bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Deneysel olarak STZ ile oluşturulan diyabette başta pankreasın beta hücreleri olmak üzere birçok doku ve organ etkilenmekte ve hayvanlarda ciddi kilo kayıpları oluşabilmektedir. Diyabetli ratlarda canlı ağırlıktaki azalmalar özellikle yapısal protein kaybı ve yıkımlanmasının neden olabileceği de bildirilmiştir (49, 50, 22). Aynı şekilde sitotoksik ajanlar ile olan tedavilerde hayvanların canlı ağırlıklarının azaldığı ve özellikle hücrelerdeki nekroz, ölüm ve apoptozis olaylarının yanında, yem alımı ve iştahın azalması gibi çeşitli nedenlere bağlı olarak canlı ağırlık kazancının olmadığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (31, 32). Bu çalışmanın canlı ağırlık sonuçları diğer araştırmacıların da belirttiği üzere diyabet ve sisplatin uygulamaları ile azalmış ve yukarıdaki araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Hem diyabet hem de sisplatin uygulamaları sonrasında plazma üre ve kreatinin düzeylerindeki artışlar böbrek nefrotoksitesinin en önemli göstergelerinden biridir (48). Böbreklerde glomerüler süzülme ve özellikle proksimal tübüllerdeki muhtemel hasarlara bağlı olarak deney gruplarındaki ratların plazma üre ve kreatinin düzeyleri çalışmada kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek olarak saptanmıştır. Diyabet ve sisplatin uygulamalarına bağlı olarak oluşan nefrotoksisteye glomerüler damar membranlarının kalınlaşması, mesangial hücrelerdeki proliferasyon ve mesangial matriks oluşumundaki artışa ilaveten yaygın ve nodüler glomerüloskleroz ve intertisyel fibroz sonucu olabileceğine dair patolojik bulgulara rastlanılmıştır. Bu

patolojik oluşumların asıl nedeni olarak ise böbreklerde artan reaktif oksijen türleri ile azalan antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması ileri sürülmektedir (50, 51). Tarafımızdan yapılan bu çalışmada da diyabetli hayvanlara ait üre ve kreatinin düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek olduğu, likopen uygulamalarıyla bu artışların kısmen düşürüldüğü görülmektedir (Tablo 3).

Oksidatif stres ROS oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir. Artan oksidatif stres diyabete bağlı komplikasyonların patogenezisinde rol oynayan en önemli unsurlardan biridir. Diyabetli canlılarda özellikle katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artan hidrojen peroksite tepki olarak önemli azalmaların olduğu ve bunun da aşırı glikozun otooksidasyonu ve proteinlerin enzimatik olmayan glikolizasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmektedir (52, 22). Bu antioksidan enzimlerdeki aktivite azalmalarının bir başka nedeni ise diyabet şartlarında protein sentezindeki azalmadan dolayı olabilir (53). Hem diyabet hem de sisplatin uygulaması sonucu azalan katalaz aktivitelerinin likopen ile kısmen yükseltildiği şekil 6'da görülmektedir. Bazı çalışmalarda artan ROS ve buna bağlı enzim aktivitelerindeki düşüşler çeşitli antioksidan maddeler ile iyileştirilmeye çalışılmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (54, 55). Çok güçlü bir antioksidan madde olan likopenin serbest radikal oluşumunu azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini yükselterek diyabet ve sisplatine bağlı nefrotoksisitenin kısmen iyileştirilmesini sağladığı bu çalışmada sonuçların diğer araştırmacıların görüşleriyle paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

İndirgenmiş GSH düzeylerinin diyabete bağlı olarak azaldığı birçok araştırmada gösterilmiştir (56, 57). Tüklenen GSH düzeyleri oksidatif stres tarafından

oluşturulan hücrel hasarları artırır. GSH düzeylerindeki azalmanın daha çok artan serbest oksijenler ile mücadelesine bağlı olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmada da diyabetli gruptaki hayvanlara ait böbrek dokusu GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı, buna karşın hem tek başına likopen hem de sisplatin+likopen gruplarında kontrol grubuna göre daha yüksek seviyelere geldiği görülmektedir. Likopenin serbest radikallerle mücadelesi sonucu GSH'nin daha az tüketilmesinin bir sonucu olarak dokularda düzeylerinin normal değerlere yakın seyrettiği görülmektedir.

Diyabet ve sisplatin uygulanan ratlarda böbrek dokusu MDA düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Özellikle artan MDA düzeyleri lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmekte ve antioksidan sistemlerdeki azalmaların neticesi olarak olduğu öngörülmektedir. Artan lipid peroksidasyon hücre membranlarında permeabilite bozukluklarına ve hasarlara neden olmakta ve birçok patolojik olayın çıkmasına yol açabilmektedir (58). Bu çalışmada böbrek dokusu MDA düzeylerindeki artışlar, katalaz gibi enzim aktivitelerindeki azalmalar ve GSH düzeylerindeki düşüşler eş zamanlı likopen uygulamalarıyla kısmen iyileştirmiştir. Likopenin çok güçlü bir antioksidan olduğu ve başta singlet oksijen olmak üzere diğer birçok serbest radikali süpürücü özellik gösterdiği bilinmektedir. Singlet oksijendeki enerji likopen molekülüne aktarılarak serbest radikalın zararlı etkilerinin önüne geçilebilmektedir. Böylece likopen lipidler, proteinler ve DNA'yı oksidasyona karşı koruyabilmektedir (31, 32, 33).

Sonuç olarak bu çalışmada deneysel tip 2 diyabet modeli STZ tarafından oluşturulmuş ve diyabetli olarak kabul edilen ratlara verilen sisplatinin özellikle böbrek hasarlarını daha da şiddetlendirdiği görülmektedir. Eş zamanlı likopen

uygulamalarının ise başta lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerini düşürdüğü, antioksidan özellik gösteren GSH ve katalaz aktivitelerini ise artırarak diyabet ve sisplatin tarafından bozulan antioksidan savunma sistemlerini güçlendirilebileceği kanaatine varılmıştır.

7.KAYNAKLAR

1. Chirino YI, Gonzalez DJS, Martinez CMM, et al. Protective effects of apocynin cisplatin induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 2008; 245: 18-23.
2. Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, et al. Cannabidiol attenuates cisplatin induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 708-714.
3. Ali BH, Al Moundhri MS, Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1173-1183.
4. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin. *Br J Cancer* 1993; 67: 1171-1176.
5. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transpl* 1997; 12: 2478-2480.
6. Uehara T, Yamate J, Torii M, Maruyama T. Comparative nephrotoxicity of cisplatin and nedaplatin mechanisms and histopathological characteristics. *J Toxicol Pathol* 2011; 24: 87 -94.
7. Safirstein R, Winston J, Goldstein M, et al. Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 1986; 8(5): 356-67.
8. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1): 1-10.
9. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73 : 994-1007.
10. Guerraro BCE, Calderon OM, Tapia E, et al. Sulforaphane protects against cisplatin induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 2010; 192: 278-285.
11. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, et al. Role of apoptosis in cisplatin –induced toxicity in the renal epithelial cell line LLCK-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 195-201.
12. Bouliskas T and Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10: 1663-1682
13. Wei Q, Don G, Franklin J and Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 2007; 72: 53-62.

14. Park MS, De Leon M, Deverajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC -PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 858-865.
15. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Am J physiol* 1996; 270: 700-708.
16. Tajo A, Asaba K, Onazata ML. Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. *Expert Opin Ther Target* 2007; 11: 1011-1018.
17. Tomasz S, Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimen Biol and Med* 2012; 237: 481-490
18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care* 2006; 29: 43-8.
19. Lencioni C, Lupi R, Del Prato S. Beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2008; 8: 179-84.
20. Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of pancreatic beta cells from type diabetic patients. *Diabetologia* 2005; 48: 282-9.
21. Sato Y, Feng GG, Huang L, et al. Enhanced expression of naofen in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats: possible correlation to apoptosis of tubular epithelial cells. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14(3): 205-12.
22. Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Nishanth K, Kuo CH, Reddy KS. Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. *Food Chemistry* 2011; 124: 1436-1442.
23. Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Kesireddy N, Sathyavelu Reddy K. Neuroprotective effect of ginger on anti-oxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(4): 893-7.
24. Ziyadeh FN, Goldfarb S. The renal tubulo interstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1991; 39(3): 464-75.
25. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in Type I (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1985; 25(6): 496-501.

26. Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macías M, Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2012; 43: 476-481.
27. Singh PP, Farzana M, Ajanta R et al., Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian J Clin Biochem* 2009; 24: 324-342.
28. Böhm F, Edge R, Truscott TG. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochim Pol* 2012; 59(1): 27-30.
29. Sahin K, Sahin N, Kucuk O. Lycopene and chemotherapy toxicity. *Nutr Cancer* 2010; 62(7): 988-95.
30. Palozza P, Catalano A, Simone R. Carotenoids as modulators of molecular pathways involved in cell proliferation and apoptosis, in: Landrum, JT (Ed), *Carotenoids: Physical, Chemical and Biological Functions and Properties*. CRC Press, Boca Raton 2010: pp, 465-484.
31. Atessahin A, Türk G, Karahan I et al. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 2006; 85, Suppl 1; 1216-22.
32. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212: 116-123.
33. Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Yuce A, Ceribasi AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67: 778-785.
34. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000 19; 163(6): 739-44.
35. Nguyen ML, Schwartz SJ. Lycopene: chemical and biological properties. *Food Technol* 1999; 53: 38-45.
36. Mein JR, Lian F, Wang XD. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *Nutr Rev* 2008; 66(12): 667-683.
37. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274(2): 532-8.
38. Riccioni G, Speranza L, Pesce M, et al. Novel phytonutrient contributors to antioxidant protection against cardiovascular disease. *Nutrition* 2012; 28(6): 605-10.

39. Conklin KA. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutr Cancer* 2000; 37(1): 1-18.
40. Lawenda BD, Kelly KM, Ladas EJ, et al. Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy? *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(11): 773-83.
41. D'Incalci M, Steward WP, Gescher AJ. Modulation of response to cancer chemotherapeutic agents by diet constituents: is the available evidence sufficiently robust for rational advice for patients? *Cancer Treat Rev* 2007; 33(3): 223-9.
42. Block KI, Koch AC, Mead MN, et al. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int J Cancer* 2008; 123(6): 1227-1239.
43. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
44. Ellman G. Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77
45. Aebi H, Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
46. Lowry OH, Rosebroug NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
47. Pari L, Srinivasan S. Antihyperglycemic effect of diosmin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2010; 64(7): 477-81.
48. Koder R, Shikata K, Kataoka HU, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011; 54(4): 965-78.
49. Rajkumar L, Srinivasan N, Balasubramanian K, Govindarajulu P. Increased degradation of dermal collagen in diabetic rats. *Indian J Exp Biol* 1991; 29(11): 1081-3.
50. Lin S, Yang J, Wu G, et al. Preventive effect of taurine on experimental type II diabetic nephropathy. *J Biomed Sci* 2010; 17: 546-554.
51. Sung JK, Koh JH, Lee MY, et al. Aldose reductase inhibitor ameliorates renal vascular endothelial growth factor expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Med J* 2010; 51(3): 385-91.

52. Preet A, Gupta BL, Yadava PK, Baquer NZ. Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioxidant status in diabetic rat lenses. *J Biosci* 2005; 30(2): 221-30.
53. Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vaziri ND. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26(1): 43-53.
54. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 358(1-2): 60-7.
55. Young HY, Luo YL, Cheng HY, et al., Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J Ethnopharmacol* 2005; 96 (1-2): 207-210.
56. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *An Review of Biochem* 1983; 52: 711-760.
57. Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Shinohara M, et al. Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissues. *Life Sciences* 2001; 69: 1039-1047.
58. Asayama K, Miyao A, Dobashi K, Amemiya S, Ishihara T, Kato K. Concentration of lipid peroxide in serum lipoproteins of insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr Jpn* 1991; 33(3): 369-74.

9. ÖZGEÇMİŞ

1986 Yılında Elazığ'ın Sivrice ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Sivrice'de tamamladım. 2003 Yılında Sivrice Lisesinden mezun oldum. 2004 Yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik bölümüne girdim ve 2008 yılında mezun oldum. Aynı yıl Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezinde hemşire olarak görev yapmaya başladım. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans yapmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezinde hemşire olarak görev yapmaktayım. Evliyim.