

Hipotalamik-hipofizer-adrenal aks üzerine sisplatin ve kurkuminin etkileri*

Mehmet Öz¹, Enver Ahmet Demir², Hasan Serdar Gergerlioğlu³, Kısmet Esra Nurulloğlu Atalık⁴, Fatma Hümeysra Yerlikaya⁵

¹Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Hatay

³Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya

⁴Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Konya

⁵Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

Özet

Amaç: Son yıllarda zerdeçaldaki aktif polifenol olan kurkumininsisplatin içeren kemoterapi rejimlerinde sinerjistik bir role sahip olduğunu gösteren bilgiler artmaktadır. Kurkuminin güvenli bir adjuvan olduğunu göstermek için söz konusu ajanların sistemik etkileşimlerinin araştırılması gerektiğinden bu polifenölünsisplatin uygulanan sıçanlarda hipotalamik-hipofizer-adrenal (HPA) aks etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Toplamda 34 erkek Wistar sıçan kontrol (n=7), sisplatin (n=10), kurkumin(n=7) ve sisplatin + kurkumin (n=10) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sisplatin ve kurkumin gruplarındaki sıçanlara 5 hafta süresince (sırasıyla) 5 mg/kg/hafta, i.p. sisplatin ve 300 mg/kg/gün, p.o. kurkumin uygulandı. Sisplatin + kurkumin grubu aynı dozlarda hem sisplatin hem kurkumin aldı. Kontrol grubuna yalnızca taşıyıcı (fizyolojik salin ve mısır yağı) verildi. Hayvanlar adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikosteron (CORT) ölçümleri için kan elde etmek amacıyla eksanguine edildi. Beyin çıkarıldı ve hipokampal dokuda mineralokortikoid (MR) ve glukokortikoid (GR) reseptörleri belirlendi. Analizler ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi.

Bulgular: Sisplatin ve kurkumin tedavilerinin araştırılan parametreleri bozmadığını bulduk (p>0.05). Ayrıca, kurkumin ve sisplatinin birlikte uygulanmasının kontrollere kıyasla ACTH ve CORT'un plazma konsantrasyonları ile hipokampal MR ve GR seviyelerini değiştirmedikini gözlemlendi (p>0.05).

Sonuç: Sonuçlarımıza göre tek başına veya kombine halde sisplatin ve kurkumin tedavisi HPA aksını etkilememektedir.

Anahtar Kelimeler: sisplatin; kurkumin; hipotalamik-hipofizer-adrenal aks; kortikosteroid reseptörleri

Abstract

Objective: There are recently growing evidences as to the synergistic role of curcumin, the active polyphenol of turmeric, in cisplatin containing chemotherapy regimens. The effects of this polyphenol on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in cisplatin-treated rats were investigated to figure out systemic interactions of the mentioned agents which is necessary in order to ascertain the safety of curcumin as an adjuvant.

Material and Methods: A total of 34 male Wistar rats were divided into four groups as control (n=7), curcumin (n=10), and cisplatin + curcumin (n=10). Respectively, 5 mg/kg/week, i.p. cisplatin or 300 mg/kg/day, p.o. curcumin was administered for 5 weeks to the rats in cisplatin and curcumin groups. The cisplatin + curcumin group received both cisplatin and curcumin in same doses. Only vehicle (physiological saline and corn oil) was given to the control group. The animals were exsanguinated to obtain blood for adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) measurements. The brains were excised and hippocampal mineralocorticoid (MR) and glucocorticoid receptors (GR) receptors were estimated. The analyses were conducted by the ELISA method.

Results: We found that the cisplatin and curcumin treatments did not alter the investigated parameters (p>0.05). Also, we observed that the co-administration of curcumin and cisplatin did not change the plasma concentrations of ACTH and CORT as well as the levels of hippocampal MR and GR as compared to the controls (p>0.05).

Conclusion: To our results, singly or combined cisplatin and curcumin treatments do not influence the HPA axis.

Key words: cisplatin; curcumin; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; corticosteroid receptors

Genel Tıp Derg 2017;27(1):28-32

Alınan: 04.04.2016 / 19.07.2016 / Yayınlanma: 30.01.2017

Yazışma adresi: Mehmet Öz, Bozok Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Yozgat

E-posta: ozmht@gmail.com

Giriş

Bir ağır metal kompleksi olan sispaltin (CP-diamminedi-chloroplatinum II) çok sayıda malignansinin tedavisinde yaygın şekilde kullanılmaktadır(1). Sispaltin hücre dön-güsünün bozulmasına yol açan DNA replikasyonu ve onarımını inhibe ederek ve aynı zamanda hücrelerde DNA ile ilişkili apoptotik süreçleri indükleyerek etki gösterir (2). Lakin diğer kemoterapötik ajanlarda olduğu gibibazı yan etkileresahiptir. En sık gözlenen yan etkileri arasında oto-toksisite(3), nefrotoksisite(4) ve hepatotoksisite(5) yer alır ve bu komplikasyonların doz bağımlı olması doz kısıtlan-masına gidilmesi neticesinde sispaltinin anti-kanser etkin-liğinin azalmasıyla sonuçlanır. Sispaltin toksisitesinde dokularda antioksidan etkinliğin düşmesi ve reaktif oksijen türlerinin sentezinde artış olması da önemli rol oynar (6). Bu sebeple sispaltin toksisitesine karşı çeşitli antioksidan moleküllerin kullanılması doz kısıtlanmasının önüne geçerek anti-kanser etkinliğini sürdürülmesinde önemlidir.

Fitokimyasallar bitkilerde doğal olarak bulunan besin değeri olmayan biyoaktif kimyasal maddelerdir. Farklı gıdalardan elde edilen bu diyetel biyoaktif maddelerin çok sayıda hastalığı önlediği ve hatta iyileştirdiği gösterilmiştir. Zerdeçal rizomundan elde edilen sarı renkli fenolik bir pigment olan kurkumin Çin ve Hindistan'da geleneksel tıp alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır (7). Çok sayıda deneysel çalışma kurkuminin anti-inflamatuvar(8), antikanser(9), antioksidan (10), yara iyileştirici (11), anti-depresan(12) ve kardiyoprotektif(13) özelliklerini göstermiştir. Kurkumin kan beyin bariyerini kolayca geçebiliyor olması (14) sebebiyle kognitif disfonksiyonla seyreden patolojilerden nöroprotektif karaktere sahiptir. Ayrıca diyetel kurkuminin takviyesi sıçanlarda kronik kemoterapötik kullanımına bağlı gelişen öğrenme ve bellek bozukluğunu iyileştirir (6).

Kemoterapötik kullanımına bağlı yan etkilerin azaltılması bu ilaçların amacına yönelik kullanımı açısından çok önemlidir. Bu çalışmanın amacı kronik sispaltin alan sıçanlarda kurkuminin hipotalamik-hipofizer-adrenal aks üzerine etkisini hipokampal doku glikokortikoid ve mineralokortikoid reseptör seviyeleri ile birlikte plazma adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortikosteron (CORT) seviyeleri üzerinden değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada 34 adet erişkin Wistar Albino ırkı erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar iklim kontrollü odalarda 22 ± 2 °C oda sıcaklığında, 45 ± 5 % rölatif nem altında ve 12:12 saat aydınlık:karanlık döngüsünde tutuldu. Tüm sıçanlara standart sıçan yemi ve içme suyu kısıtlamasız şekilde verildi. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde ve ilgili kurumun etik kurul onayına (#2014/29) mazhar olunmasına müteakip gerçekleştirildi. Deneysel grupları aşağıda ifade edildiği haliyle oluşturuldu:

Kontrol grubu (n=7): Çalışma süresince her gün kurkumin taşıyıcısı olan mısır yağı oral yoldan ve hafta da bir defa sispaltin taşıyıcısı olan fizyolojik salin intraperitoneal yoldan uygulandı.

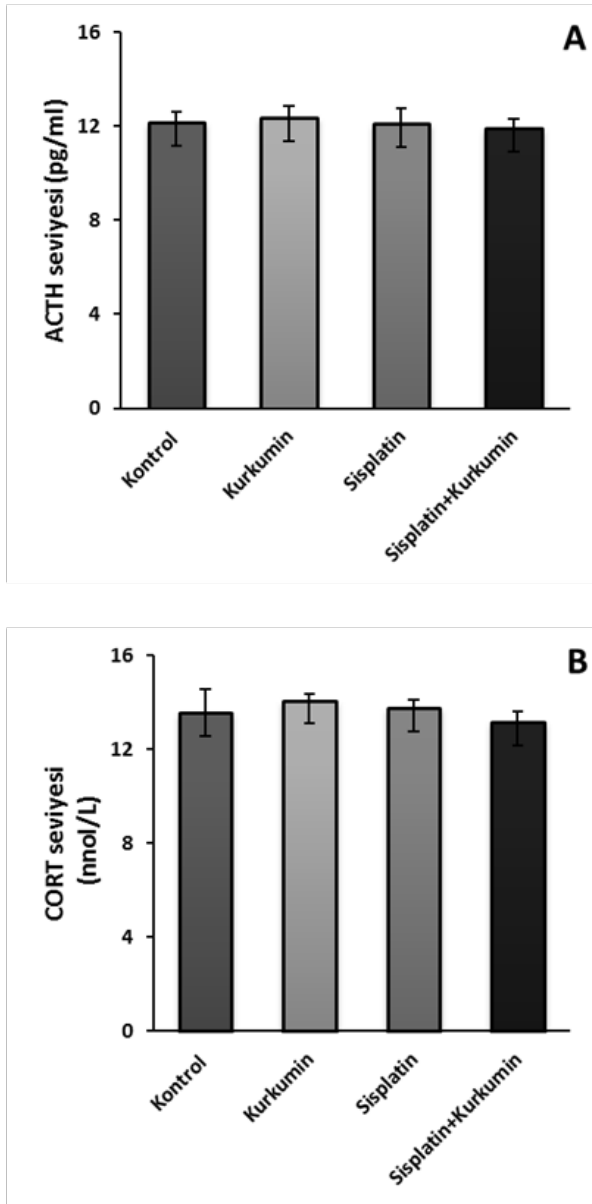
Sispaltin Grubu (n=10): Çalışma süresince haftada bir kez 10 mg/kg dozda sispaltin intraperitoneal yoldan uygulandı. Hergün oral yoldan kurkumin taşıyıcısı olarak kullanılan mısır yağı uygulandı.

Kurkumin Grubu (n=7): Her gün 300 mg/kg dozda kurkumin oral yoldan uygulandı. Haftada bir kez intraperitoneal yoldan fizyolojik salin enjekte edildi.

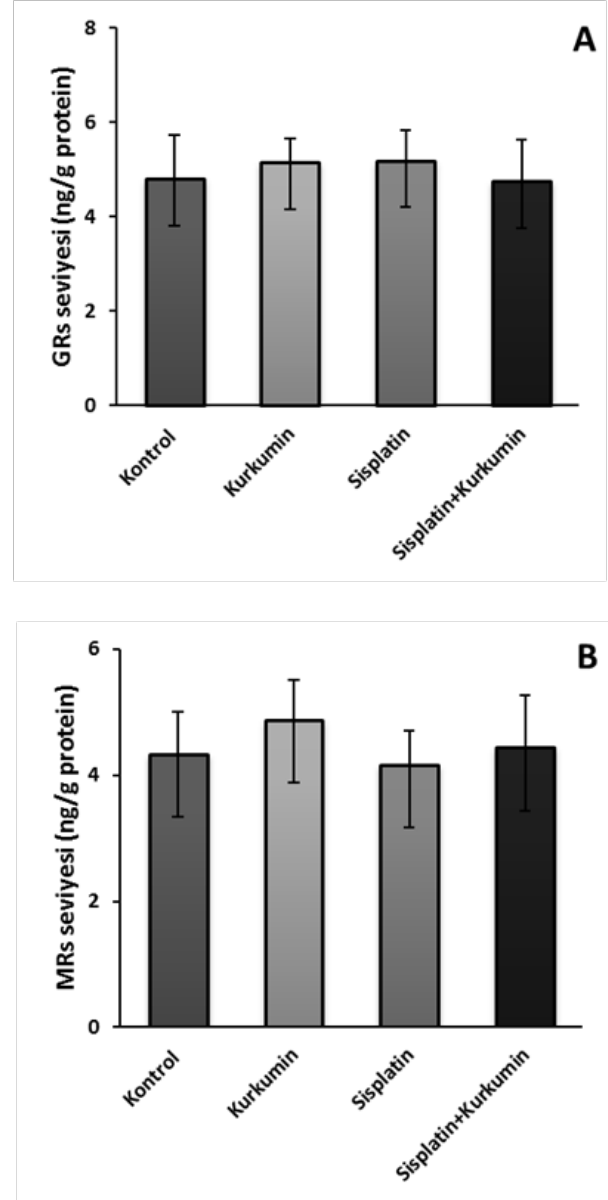
Sispaltin + Kurkumin grubu (n=10): Haftada bir kez 10 mg/kg dozda sispaltin intraperitoneal yoldan uygulandı. Hergün 300 mg/kg dozda kurkumin oral yoldan verildi.

Gruplarda belirtilen işlemler 5 hafta süren çalışma boyunca her gün aynı saatte ve aynı çalışmacı tarafından aksatılmaksızın gerçekleştirildi. Çalışma sonunda tüm sıçanlar ketamin & ksilazin kombinasyonu (60/10 mg/kg) anesteziye alındı. Sıçanlardan kardiyak ponksiyon yoluyla elde edilen kan EDTA içeren tüplere alındı. Kanlar bekletilmeden soğutmalı santrifüjde 3000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüje edildi ve plazmaları ayrı ayrı biyokimyasal analizler gerçekleştirilinceye kadar -80 °C'de saklandı. Akabinde beyin dokuları çıkarılarak buz üzerinde hipokampus dokusu eksize edildi ve 1,5 ml hacminde kapaklı tüplere aktararak analizleri yapılınca kadar -80 °C'de saklandı. Plazma CORT ve ACTH seviyeleri enzim bağı immunosorbent assay (ELISA) yöntemiyle ticari kit (Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd., Hangzhou, China) kullanılarak gerçekleştirildi. Hipokampus dokusu, soğuk homojenizasyon tamponu (0.25 M sükröz, 10 mM Tris-HCl ve 0.25

mMfenilmetilsülfonilflorür; pH 7.4) içinde homojenize edilerek soğutmalı santrifüjde 3000 rpm hızda 10 dakika boyunca santrifüje edildi ve supernatanayrılarak icari kit (HangzhouEastbiopharmCo., Ltd., Hangzhou, China) marifetiyle hipokampal glikokortikoid (GR) ve mineralokortikoid reseptör (MR) seviyeleri belirlendi. Total protein miktarı sığır serum albümini standart olarak kullanılarak Lowry yöntemiyle tayin edildi (15). Elde edilen veriler bir bilgisayar programı (SPSS v18.0) yardımıyla ve tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi.



Şekil 1. Plazma ACTH ve CORT değerleri.



Şekil 2. Gruplara göre hipokampus dokusu GR ve MR seviyeleri.

Bulgular

Kronik sisplatin alan sıçanlarda kurkuminin hipotalamik-hipofizer-adrenal aks üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmamızda plazma ACTH ve CORT seviyeleri Şekil 1'de sunulmuştur. Çalışmamızın verilerine göre kronik sisplatin uygulaması (10 mg/kg/hafta, 5 hafta boyunca) sıçanların plazma ACTH ve CORT seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişikliğe yol açmadı ($p > 0,05$). Aynı zamanda çalışma boyunca her gün

300 mg/kg dozda oral yoldan uygulanan kurkumininde plazma ACTH ve CORT seviyelerinde anlamlı değişikliğe yol açmadığı görüldü ($p>0,05$). Benzer şekilde sisplatin ve kurkumin uygulamasının birlikte yapıldığı grupta plazma ACTH ve CORT seviyelerinde anlamlı değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$).

Sisplatin ve kurkumin uygulamasının hipokampalkortikosteroid reseptör seviyesi üzerine etkisi **Şekil 2**'de sunulmuştur. Buna göre sisplatin enjeksiyonu sıçanların hipokampalglikokortikoid ve mineralokortikoid reseptör seviyelerinde değişikliğe yol açmadı ($p>0,05$). Keza tek başına kurkumin uygulanan sisplatin ve kurkuminin birlikte uygulandığı gruplardada hipokampal GR ve MR seviyelerinde anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$).

Tartışma

Bu çalışmada erişkin erkek sıçanlara kronik sisplatin uygulaması sonrası kurkuminin hipotalamik-hipofizer-adrenal aks ve hipokampus dokusunda glikokortikoid ve mineralokortikoid reseptör seviyeleri üzerine etkisi incelendi. Çalışmamızın bulgularına göre kronik olarak uygulanan sisplatinin sıçanların gerek hipotalamik-hipofizer-adrenal aks aktiviteleri üzerine gerekse hipokampal GR ve MR seviyeleri üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bulundu. Aynı zamanda tek başına veya sisplatin ile kombine halde verilen kurkuminin sıçanlarda HPA aksı ve glikokortikoid reseptör seviyeleri üzerine etkisinin olmadığı gözlemlendi.

Malignansilere karşı kullanılan kemoterapötikler ajanların çeşitli toksisitelere sahip olduğu bilinmektedir. Doz bağımlı yan etkiler için bu durum doz kısıtlamasını gerektirebilmekte ve nihayetinde anti-kanser etkinliğin azalmasıyla sonuçlanabilmektedir. Bir platin bileşiği olan sisplatin farklı malignansiler tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır; ancak toksisitesine dair değildir ve potansiyel faydasını sınırlamaktadır. Sisplatin kullanımının ototoksosite(3), nefrotoksosite(4), hepatotoksosite(5) gibi çeşitli toksisitelere yol açtığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalara göre sisplatin gerek merkezi(7) gerekse periferik sinir sisteminde (16) çeşitli disfonksiyonlara yol açan nörotoksitelere sebep olmaktadır. Sisplatin toksisitesinin mekanizması net değildir. Sisplatin uygulaması reaktif oksijen türlerinin artmasına ve böylece prooksidan ve antioksidan dengesini bozarak oksidatif strese yol açar. Sisplatin toksisitesi için önerilen en olası mekanizma oksidatif stres teorisi dir. Öz ve ark.(6) sisplatinin merkezi sinir

sistemi üzerine olumsuz etkilerinde reaktif oksijen türlerindeki artışın önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. Aynı zamanda sispatine bağlı gelişen ototoksosite(3), nefrotoksosite(4) ve hepatotoksitede(5) reaktif oksijen türlerinin katkısı rapor edilmiştir. Bu sebeple sispatine bağlı toksisitelerin önlenmesinde antioksidan moleküllerin kullanımı artan sayıda araştırmaya konu olmaktadır. Zerdeçal rizomunda elde edilen bir polifenolik bileşik olan kurkuminin oksidatif stresle ilişkili çok sayıda patolojii önlediği gösterilmiştir. Sıçanlarda yapılan bir çalışma 100 mg/kg dozda kullanılan kurkuminin sispatine bağlı nefrotoksititeyi azalttığını ortaya koymuştur(17). Ayrıca sıçanlarda kurkuminin takviyesinin sispatine bağlı hepatotoksitite(10) ve nörotoksititeye(7) karşı antioksidan kabiliyeti vasıtasıyla faydalı olduğu gösterilmiştir. Kurkumin, etkisini stres faktörüne bağlı olarak artan reaktif oksijen türlerinin azaltılması ve ilaveten seviyeleri endojen antioksidanların artırılması yoluyla göstermektedir.

Hipotalamik-hipofizer-adrenal aks fiziksel ve psikolojik deneyimler tarafından aktive edilen çok sayıda sistemden biridir. İnsanlarda HPA aks aktivitesinin gerek düşük gerekse yüksek olması stresle ilişkili psikopatolojilerle bağlantılıdır(18). Stres durumlarına endokrin cevap HPA aks aktivasyonudur ve bu olayda ACTH'ın önemli uyarıcı olan kortikotropin serbestleştirici hormonunun (CRH) hızlı salınımı gözlenir. Dolaşımda ACTH artışı adrenal korteksten kortikosteroidlerin (insanlarda kortizol, rodentlerde kortikosteron) sentezi ve sekresyonunun artmasına ve nihayetinde farklı beyin bölgelerinde glikokortikoid reseptörlerinin aktivasyonuna yol açar. Hipokampalglikokortikoid reseptör gen ifadesi erken yaşam döneminde çevresel koşullar tarafından, puberteden sonra ise HPA aks aktivitesiyle düzenlenir (19). Akut stres yaklaşık 15-30 dakika içerisinde dolaşım CORT seviyesinde artışa yol açar; ancak negatif geribildirim mekanizması sayesinde hormon salgısının aşırı artışı engellenir(20). Negatif geribildirim mekanizması hormonun hızlı bir şekilde bazal seviyesine dönmesine neden olurken böylece HPA aks hiperaktivasyonu önlenmiş olur. CORT, etkisini iki farklı tipte reseptör aracılığıyla gösterir. Beynin çeşitli bölgelerinde eksprese edilen bu reseptörlerden yüksek affiniteli olan GR ve düşük affiniteli olan ise MR'dir(21). GR ve MR antagonistlerinin intrahipokampal enjeksiyonları HPA aks aktivitesini değiştirir. Bu durum HPA aks aktivitesinin düzenlenmesinde hipokampalkortikosteroid reseptörle-

rinin önemini göstermektedir(22). Mevcut çalışmamızda sıçanlarda kronik sisplatin uygulaması sonucunda ACTH ve CORT'un dolaşımdaki seviyelerinde anlamlı bir fark oluşmadığı gözlemlendi. Aynı zamanda kurkuminin tek başına ya da sisplatinle birlikte uygulandığı durumda da benzer bulgular elde edildi.İlaveten hipokampal GR ve MR seviyelerinde sisplatin ve/veya kurkumin uygulaması neticesinde anlamlı bir değişiklik seyredilmedi.

Sonuç olarak, çalışmamızda beş hafta süren kronik sisplatin uygulamasının dolaşım ACTH ve CORT seviyeleriyle değerlendirilen HPA aks aktivitesinde değişikliğe yol açmadığı bulundu. Keza, HPA aks aktivitesinin hedef reseptörleri olan GR ve MR seviyelerinde de farklılık gözlenmedi.

Kaynaklar

1. Lebowitz D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* 1998;34:1522-34.
2. Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncology Reports* 2004;12:955-65.
3. Im GJ, Chang J, Lee S, Choi J, Jung HH, Lee HM, et al. Protective role of edaravone against cisplatin-induced ototoxicity in an auditory cell line. *Hearing Res* 2015;330:113-8.
4. Jamshidzadeh A, Heidari R, Golzar T, Derakhshanfar A. Effect of *Eisenia foetida* Extract against Cisplatin-Induced Kidney Injury in Rats. *J Diet Suppl* 2016;13:551-9.
5. Ateyya H, Yosef H, Nader MA. Ameliorative effect of trimetazidine on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2015;19:1-6.
6. Oz M, Nurullahoglu Atalik KE, Yerlikaya FH, Demir EA. Curcumin alleviates cisplatin-induced learning and memory impairments. *Neurobiol Learn Mem* 2015;123:43-9.
7. Yin HL, Wang YL, Li J F, et al. Effects of curcumin on hippocampal expression of NgR and axonal regeneration in Abeta-induced cognitive disorder rats. *Genetics and molecular research : GMR.* 2014;13:2039-47.
8. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, et al. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis.* 2007;28:1765-73.
9. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Letters* 2008;267:133-64.
10. Waseem M, Pandey P, Tomar B, Raisuddin S, Parvez S. Ameliorative action of curcumin in cisplatin-mediated hepatotoxicity: an in vivo study in Wistar rats. *Arch Med Res* 2014;45:462-8.
11. Sidhu GS, Mani H, Gaddipati JP, et al. Curcumin enhances wound healing in streptozotocin induced diabetic rats and genetically diabetic mice. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 1999;7:362-74.
12. Wang Z, Zhang Q, Yuan L, et al. The effects of curcumin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. *Behav Brain Res* 2014;274:282-90.
13. Imbaby S, Ewais M, Essawy S, Farag N. Cardioprotective effects of curcumin and nebivolol against doxorubicin-induced cardiac toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2014;33:800-13.
14. Mishra S, Palanivelu K. The effect of curcumin (turmeric) on Alzheimer's disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* 2008;11:13-9.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry.* 1951;193:265-75.
16. Erken HA, Koc ER, Yazici H, Yay A, Onder GO, Sarici SF. Selenium partially prevents cisplatin-induced neurotoxicity: a preliminary study. *Neurotoxicology* 2014;42:71-5.
17. Ugur S, Ulu R, Dogukan A, Gurel A, Yigit IP, Gozel N, et al. The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Renal Failure* 2015;37:332-6.
18. Ehlert U, Gaab J, Heinrichs M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biological Psychology* 2001;57:141-52.
19. Weaver IC, La Plante P, Weaver S, et al. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol* 2001;185:205-18.
20. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews Neuroscience* 2005;6:463-75.
21. Kellendonk C, Gass P, Kretz O, Schutz G, Tronche F. Corticosteroid receptors in the brain: gene targeting studies. *Brain Res Bull* 2002;57:73-83.
22. van Haarst AD, Oitzl MS, de Kloet ER. Facilitation of feedback inhibition through blockade of glucocorticoid receptors in the hippocampus. *Neurochem Res* 1997;22:1323-8.