

Sıçanlarda Sispilatinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Metabolik Enzim Aktivitelerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisi

H. Ramazan Yılmaz^{*}, Sadık Söğüt^{**}, Hüseyin Özyurt^{***}, Mustafa Iraz^{****}, Zeki Yıldırım^{*****}, Ömer Akyol^{*****}

Özet:

Amaç: Daha önceden yaptığımız çalışmada sispilatin nefrotoksitesi üzerine kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda kullanılan sıçanların böbrek dokuları yeniden analiz edildi ve sispilatinin böbrek dokusunda heksokinaz (HK), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), laktat dehidrogenaz (LDH) ve malat dehidrogenaz (MDH) enzim aktiviteleri üzerine etkisi ve buna CAPE'nin koruyucu etkisi araştırıldı.

Metod: 22 adet sıçan üç gruba ayrıldı. Grup-I (n=6): sadece intraperitoneal izotonik NaCl; Grup-II (n=9): tek dozda 7 mg/kg sispilatin ve Grup-III (n=7): sispilatin uygulamasından 2 gün önce başlamak üzere CAPE 10µmol/kg 1x1 intraperitoneal yolla 7 gün verildi. Yedinci gün anestezi altında dekapite edilerek öldürülen sıçanların böbrek dokuları alındı. Böbrek dokusunda heksokinaz (HK), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), laktat dehidrogenaz (LDH) ve malat dehidrogenaz (MDH) aktiviteleri spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bulgular: Sispilatin böbrek dokusunda HK ve G6PD aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artmaya neden oldu (p<0.0001). CAPE grubunda HK artışı daha fazlaydı. CAPE, G6PD aktivitesindeki artmayı istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalttı (p>0.05). CAPE verilen sıçanlarda kontrol ve sispilatin grubuna göre LDH aktivitesinde anlamlı bir artma bulundu (Sırasıyla, p<0.0008, p<0.015). Sispilatin tek başına LDH aktivitesini etkilemedi (p>0.05). Üç grupta da MDH aktivitesi değişmedi (p>0.05).

Sonuç: Sispilatinle hasarlanmış böbrek dokusunda, HK ve G6PD enzimi gibi karbonhidrat metabolizmasında rolü olan enzimlerin aktivitelerinin artabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sispilatin, böbrek toksisitesi, heksokinaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz, CAPE, sıçan.

Sispilatin (Cis-dichlorodiammineplatinum [II], CDDP) insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi bir çok solid tümörde etkili bir

antitümör ilaç olarak kullanılmaktadır (1,2). Tedavi esnasında serbest oksijen radikalleri üreterek nefrotoksisiteye neden olabilmekte, sonuçta doz kısıtlamasına gidilmektedir (3). Serbest radikaller, sıklıkla hücre membranındaki lipid komponentlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (1). Ayrıca, protein sentezinde azalmaya sebep olduğu, hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek hücrenin asli görevlerini yapmasını engellediği ve DNA'yı bloke eden organik peroksitlerin oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir (4). Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara da sebep olmaktadır (5). Yapılan çalışmalarda sispilatinin, lipid peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (1,6-10). Sispilatinin oluşturduğu olumsuz etkileri önlemek için sispilatinle birlikte

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

*Bu çalışma, European Respiratory Society Annual Congress 2002, September 14-18, Stockholm'da Poster olarak sunulmuştur.

*Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Isparta,

**Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay,

***Gazi Osmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Tokat,

İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, ****Farmakoloji, *****Göğüs Hastalıkları ve *****Biyokimya Anabilim Dalları, Malatya, Türkiye.

Yazışma Adresi: Yrd.Doç.Dr. H.Ramazan YILMAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / ISPARTA

C vitamini (10), adenozin antagonistleri (11), L-histodiol (12), aminoguanidin (1), CAPE (6,8), nifedipine (13), erdostein (7, 14,15) ve glutamin (16) kullanılmıştır.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), propolis ekstresinin aktif bir bileşenidir (17). 10 µM konsantrasyonda *in vitro* koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder (18). Yapılan çalışmalarda, CAPE'nin antienflamatuvar, antifungal ve antimikrobik (19), immünomodülatör (20), antitumör (21) ve antioksidan (22,23) özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

Daha önce yaptığımız bir çalışmada (24) sıçanlarda CAPE'nin sisplatin nefrotoksitesini önleme potansiyeli olduğunu gösterdik. Bu çalışmada, daha önceki çalışmada kullanılan sıçanların böbrek dokuları yeniden analiz edildi. Böbrek dokusu heksokinaz (HK), glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), laktat dehidrogenaz (LDH) ve laktat dehidrogenaz (MDH) enzim aktiviteleri ölçüldü ve bu enzimler üzerine CAPE'nin etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 g arasında değişen 22 adet dişi erişkin Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Hayvanlara 12/12 saat gece/gündüz periyodunda, standart sıçan pelet yem ve çeşme suyu verildi. Deney grupları şu şekilde belirlendi: Grup 1 (n=6): Kontrol, Grup 2 (n=9): Sisplatin ve Grup 3 (n=7): Sisplatin + CAPE. Hayvanlara sisplatin (Cisplatinum Ebewe, 0.5 mg/ml) 7mg/ kg vücut ağırlığı dozu intraperitoneal olarak tek doz verildi (25). 10 µmol/ml'lik CAPE hayvanlara intraperitoneal olarak 10 µmol/kg vücut ağırlığı dozu şeklinde verildi (26). İlk doz hayvanlara sisplatin uygulamasından 48 saat önce uygulandı ve sisplatin uygulandıktan 5 gün sonraya kadar verildi. Kontrol grubundaki sıçanlara intraperitoneal olarak eşit hacimde izotonik salin solusyonu verildi. Biyokimyasal analiz için, böbrek dokusu çıkarıldıktan sonra 0.15 M'lık soğuk (+4°C) KCl ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Böbrek dokusu tartıldıktan sonra parçalara ayrıldı ve bir homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık soğuk KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi, ısınmayı önlemek için bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen homojenat 5000 x g'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüje edilerek süpernatant elde edildi. Analiz zamanına kadar -40 °C'de bekletildi. HK, G6PD,

LDH ve MDH enzimlerinin aktiviteleri süpernatanda spektrofotometrik olarak tayin edildi (27).

HK tayini: Heksokinaz aktivitesi, glukoz'un HK'la glukoz-6-fosfat'a çevrilmesi ve glukoz-6-fosfat'ın da G6PD enzimiyle glukonat 6-fosfat'a dönüşmesi esnasında oluşan NADPH'nin 25 °C'de 340 nm'de artan absorbansının kaydedilerek dakikadaki absorbans değişiminden hesaplandı (27).

G6PD tayini : G6PD aktivitesi, glukoz 6-fosfat'ın G6PD enzimiyle 6-fosfoglukanolakton'a dönüşmesi sırasında oluşan NADPH'nin 25 °C'de 340 nm'de artan absorbansının kaydedilmesi ve dakikadaki absorbans değişiminden hesaplandı (27).

LDH tayini: Aktivite, piruvat'ın laktat'a çevrilmesi sırasında oksitlenen NADH'nin 25 °C'de 340 nm'de azalan absorbansının kaydedilmesi ve dakikadaki absorbans değişiminden hesaplandı (27).

MDH tayini: Aktivite, oksaloasetat'ın MDH'la malik asit'e dönüştürülmesi esnasında oksitlenen NADH'nin 25 °C'de 340 nm'de azalan absorbansının kaydedilerek dakikadaki absorbans değişiminden hesaplandı (27).

Protein tayini: Lowry metoduna (28) göre süpernatanda protein tayinleri yapıldı.

İstatistiksel analizler: İstatistikler Windows 95-98 uyumlu SPSS® 7.5 ile yapıldı. Grupların dağılımları Non-parametrik testlerden "One-sample Kolmogorov-Smirnov Test" ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım göstermesinden dolayı (p>0.05) istatistiksel karşılaştırma için parametrik testlerden "One-way ANOVA" testi ve post-hoc testlerden LSD (Least significance difference) kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular

Böbrek dokusunda HK, G6PD, LDH VE MDH aktiviteleri Tablo 1'de verilmiştir. Sisplatin verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre HK ve G6PD aktivitelerinde anlamlı bir artma gözlemlendi (p<0.0001). Böbrek dokusu HK enzim aktivitesinde bu artma CAPE grubunda daha fazlaydı. CAPE, böbrek dokusunda sisplatinin neden olduğu G6PD enzim aktivitesindeki artmayı bir miktar önledi fakat bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). Kontrol, sisplatin ve CAPE grupları karşılaştırıldığında MDH aktivitelerinde anlamlı bir fark gözlemlenmedi (p>0.05). CAPE verilen grupta LDH aktivitesi

Tablo I: Böbrek hekzokinaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz enzim aktiviteleri (ortalama $\pm$ standart hata).

	HK mU/mg protein	G6PD mU/mg protein	LDH U/mg protein	MDH U/mg protein
I-Kontrol (n=6)	1.65 $\pm$ 0.18	1.50 $\pm$ 0.08	0.44 $\pm$ 0.01	2.21 $\pm$ 0.03
II-Sisplatin (n=9)	2.74 $\pm$ 0.09	3.34 $\pm$ 0.15	0.45 $\pm$ 0.01	2.06 $\pm$ 0.11
III-Sisplatin +CAPE (n=7)	3.43 $\pm$ 0.16	3.06 $\pm$ 0.14	0.53 $\pm$ 0.03	1.94 $\pm$ 0.15
P değerleri				
I-II	0.0001	0.0001	A.D.	A.D.
I-III	0.0001	0.0001	0.008	A.D.
II-III	0.003	A.D.	0.015	A.D.

A.D. Anlamalı değil.

kontrol ve sisplatin gruplarına göre anlamlı artış gösterdi (Sırasıyla, $p < 0.008$ ve $p < 0.015$).

Tartışma

Sisplatin birçok solid tümörün tedavisinde yaygın bir şekilde antineoplastik bir ilaç olarak kullanılmaktadır (29). Tedavi amaçlı kullanılırken hepatik, kardiyovasküler ve renal bozukluklara, sağırılığa, aşırı duyarlılık ve hematolojik yan etkilere de neden olmaktadır (30). Bu yüzden, çoğu zaman doz kısıtlamasına gidilmektedir. Yapılan bir çalışmada, bir tek doz (7.5 mg/kg i.p.) sisplatinin böbrek homojenatında lipid peroksidasyonunu (LPO) anlamlı bir şekilde arttırdığı, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı belirtilmiştir (1). Daha önce yaptığımız çalışmalarda da, sisplatinin LPO oluşturarak böbrek ve karaciğer hasarına neden olduğu ve CAPE'nin ise LPO'nu azalttığı gösterilmiştir (6,8).

Bu çalışmamızda, sisplatin grubunda kontrol grubuna göre HK ve G6PD aktivitelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Sisplatinin böbrek dokusunda muhtemelen meydana getirdiği hasardan dolayı, HK ve G6PD enzim aktivitelerinde artma meydana gelmiş olabilir. Cyclophosphamide bir antikanser ve immünosupresandır. Al-Nasser (31), cyclophosphamide ile yaptığı çalışmada, tek doz cyclophosphamide (200 mg/kg vücut ağırlığı)'nin serum glutamat-oksalasetat transaminaz, serum glutamat-pirüvat transaminaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve kreatin fosfokinaz izomeraz aktivitelerini arttırdığını belirtmiştir.

Yapılan çalışmalarda, sisplatinin böbrek LPO oluşturarak böbrek hasarına neden olduğu bildirilmiştir (32). Bu çalışmada, sisplatin+CAPE grubunda kontrol grubuna göre HK ve G6PD aktivitelerinde anlamlı artma bulundu.

Sisplatin+CAPE grubunda sisplatin grubuna göre HK aktivitesinde daha fazla artma meydana geldi. Sisplatin+CAPE grubunda sisplatin ve kontrol gruplarına göre LDH enzimi aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Sisplatin+CAPE grubunda HK, G6PD ve LDH enzim aktivitelerindeki artış, sisplatinin böbrekte meydana getirdiği hasarın tamiri için gerekli olan makromoleküllerin sentezine olan ihtiyaçtan kaynaklanmış olabilir. HK, glikoliziste merkezi bir rol oynar (33). Glukoz'u glukoz-6-fosfat'a, çevirir. Glukoz-6-fosfat da G6PD'la 6-fosfoglukonolaktone dönüşür. G6PD, pentoz fosfat metabolik yolun önemli anahtar rolü oynayan antioksidan bir enzimdir (34).

Pentoz fosfat metabolik yolunun temel amacı redükleyici güce sahip olan NADPH molekülleri üretmektir. NADPH'lar yağ asidi sentezinde, kolesterol sentezinde, enerji üretiminde ve çeşitli biyosentez yollarında bir elektron donörü olarak, oksidatif hasara karşı hücreleri korumak için gerekli olan redükte glutatyonun sentezinde gereklidirler (35,36). Glutatyon, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı, hücre savunma sisteminde eşsiz bir role sahiptir (37). Ayrıca protein ve DNA sentezinde, hücre membranının bütünlüğünün korunmasında ve enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde görev almaktadır (37). Hasarın tamiri için NADPH'lara, D-deoksiriboz 5-fosfat ve D-riboz 5-fosfat ve diğer makromoleküllere ihtiyaç vardır.

Ayrıca sisplatinin meydana getirdiği serbest radikallerin etkisinin önlenmesi için, diğer antioksidanlara da ihtiyaç vardır. Glutatyon sentezinin artmasıyla da serbest radikallerin tahribatı önlenmiş olabilir. LDH aktivitesi vücudun hemen bütün hücrelerinde mevcuttur ve yalnız hücrenin sitoplazmasında değişmeden sabit kalır (35). Ortamda yeterli oksijen olmadığı

durumlarda NADH'ı kullanarak, piruvat'ı laktata dönüştürür ve ATP oluşumunu sağlar.

Sonuç olarak, CAPE'nin hasarlı dokuda glikoliz ve pentoz fosfat metabolik yolunun bütünlüğünü daha iyi koruduğu ve böylece nükleik asit sentezini artırarak hasarı azalttığı söylenebilir.

The Effect Of Cafeic Acid Phenethyl Ester On The Activities Of Metabolic Enzymes After Cisplatin-Induced Nephrotoxicity In Rats

Abstract:

Aim: *In a former study, we have showed that CAPE has preventive effect on cisplatin-induced nephrotoxicity. In this study we re-analyzed the renal tissues of the rats used formerly and investigated whether cisplatin has any effects on hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), lactate dehydrogenase (LDH) and malate dehydrogenase (MDH) enzyme activities in renal tissues, and the possible preventive role of CAPE on this effect.*

Methods: *The study was performed with 22 rats in 3 main groups: group I (n=6): 0.9% saline solution was applied to the rats intraperitoneally (i.p.); group II (n=9): 7 mg/kg single dose cisplatin was administered i.p.; and group III (n=7): 10 µmol/kg from 10 µmol/ml CAPE solution was administered daily 1x1 beginning 2 days before cisplatin administration. At the 7th day of treatment, the rats were killed by decapitation under anesthesia, autopsied and their kidney tissues were removed. Spectrophotometric methods were used to determine the activities of above-mentioned enzymes in the kidney tissue.*

Results: *The results of the experiment demonstrated that HK and G6PD activities were increased significantly in the cisplatin group compared with the control group (p<0.05). The most increase of HK was seen in the CAPE group. CAPE prevented the increases of G6PD activities nonsignificantly (p>0.05). LDH activity was increased significantly in the CAPE group compared with cisplatin group or the control group (p<0.05). Cisplatin did not affect solely the LDH activity (p>0.05). There was no significant difference in the LDH activity between cisplatin and control groups, and nor in the MDH activities among cisplatin, CAPE, and control groups (p>0.05).*

Conclusion: *From these results, it can be concluded that the activities of enzymes playing role in carbohydrate metabolism like HK and G6PD may increase in the course of cisplatin-induced nephrotoxicity process.*

Key words: *Cisplatin, nephrotoxicity, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, CAPE, rat.*

Kaynaklar

1. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol C* 132:123-128, 2002.
2. Madasu R, Ruckenstein MJ, Leake F, Steere E, Robbins T. Ototoxic effects of supradose cisplatin with sodium thiosulfate neutralization in patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123:978-981, 1997.
3. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Köhler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol* 72:536-540, 1998.
4. Santovito G, Irato P, Piccinini E, Albergoni V. Relationship between metallothionein and metal contents in red-blooded and white-blooded antarctic teleosts. *Polar Biol* 23:383-391, 2000.
5. Leibbrandt MEI, Grushenka HIW, Metz AL, Oziba AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat proximal tubule cells. *Kidney Int* 48:761-770, 1995.
6. Özyurt H, Söğüt S, Yılmaz HR, Kotuk M, Akyol Ö, Yıldırım Z. Sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan nefrotoksitede plazma SOD, ADA ve XO enzim aktiviteleri ile MDA, NO düzeyleri ve bunlar üzerine CAPE'nin etkileri. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, ANKARA, Kongre Özet Kitabı, s.439, 24-27 Haziran 2002.
7. Söğüt S, Özyurt H, Kotuk M, Yılmaz HR, Yıldırım Z, Akyol Ö. Sıçanlarda Cisplatinle oluşturulan nefrotoksitede plazma SOD, ADA, XO aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri üzerine erdosteinin etkisi. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, ANKARA, Kongre Özet Kitabı, s. 473, 24-27 Haziran 2002.
8. Yılmaz HR, Söğüt S, Özyurt H, Şahin Ş, Işık B, Özyurt B, Akyol Ö. Yüksek doz cisplatin uygulanan sıçanlarda karaciğer ADA, CAT, SOD, XO enzim aktiviteleri ile NO ve MDA düzeyleri üzerine kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu, Kervansaray Termal Otel / Bursa. Özet Kitabı, s.123, 26-29 Eylül 2002.
9. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimota Y, Inui K. Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 59:195-201, 2000.
10. Nefic H. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 498: 89-98, 2001.
11. Knight RJ, Collis MG, Yates MS, Bowmer CJ. Amelioration of cisplatin-induced acute renal failure with 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine. *Br J Pharmacol* 104:1062-1068, 1991.

12. Badary OA, Nagi MN, Al-Sawaf HA, Al-Harbi MM, Al-Bekairi AM. Effect of L-histidinol on cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Nephron* 77:435-439, 1997.
13. Deray G, Dubois M, Beaufils H, Cacoub P, Anouar M, Jaudon MC, Baumelou A, Jouanneau C, Jacobs C. Effects of nifedipine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Clin Nephrol* 30:146-50, 1988.
14. Söğüt S, Kotuk M, Yılmaz HR, Ulu R, Özyurt H, Yıldırım Z. In vivo evidence suggesting a role for purine catabolizing enzymes in pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and effect of erdosteine against this toxicity. *Cell Biochem Func* 2003; (Basımda).
15. Söğüt S, Özyurt H, Yılmaz HR, Şahin Ş, Işık B, Akyol Ö. Yüksek doz cisplatin uygulanan sıçanlarda karaciğer CAT, SOD, ADA, XO enzim aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri üzerine Erdosteinin etkisi. *Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu, Kervansaray Termal Otel / Bursa, Özet Kitabı*, s 124 , 26-29 Eylül 2002.
16. Mora LO, Antenus LMG, Francescato HDCF, Bianchi MLP. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced genotoxicity in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 518:65-70, 2002.
17. Mirzoena OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids* 55:441-449, 1996.
18. Şahin Ş, Söğüt S, Özyurt H, Uz E, İlhan A, Akyol Ö. Tissue xantine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. *Neurosci Res Commun* 31: 111-121, 2002.
19. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SAH, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiameobic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 35: 77-82, 1991.
20. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivate. *Vaccine* 10: 817-823, 1992.
21. Edenharder R, von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavanoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino- 3 methylimidazol (4,5-f) quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat Res* 287: 261-74, 1993.
22. Krol W, Czuba Z, Scheller S, Gabrys J, Grabiec S, Shani J. Anti-oxidant property of etanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem Int* 21: 593-97, 1990.
23. Pascual C, Gonzales R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41: 9-13, 1994.
24. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. The role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Applied Toxicol* 2003 (basımda).
25. Zhang JG, Zhong LF, Zhang M, Xia YX. Protection effects of procaine on oxidative stress and toxicities of renal cortical slices from rats caused by cisplatin in vitro. *Arch Toxicol* 66: 354-358, 1992.
26. İlhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 16: 458-463, 1999.
27. Boehringer Mannheim, Biochemica Information, Glucose 6-phosphate dehydrogenase, Hexokinase, Lactate dehydrogenase, Malate dehydrogenase. sayfalar; 99-100, 113-114, 121-122, 125-126, 1973.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Rondall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
29. Matsumiya T, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Cisplatin inhibits the expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in an oral carcinoma cell line. *Oral Oncol* 37: 296-300, 2001.
30. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe-Taş, Ankara, 2000.
31. Al-Nasser IA. In vivo prevention of cyclophosphamide-induced Ca^{2+} dependent damage of rat heart and liver mitochondria by cyclosporin A. *Comp biochem Physiol A* 121: 209-214, 1998.
32. Yildirim Z, Söğüt S, Odacı E, Iraz M, Özyurt H, Kotuk M, Akyol Ö. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res* 47: 149-156, 2003.
33. Magnani M, Stocchi V, Dacha M, Fornaini G. Regulatory properties of rabbit red blood cell hexokinase at conditions close to physiological. *Biochim Biophys Acta* 804: 145-153, 1984.
34. Ho HY, Cheng ML, Lu FJ, Chou YH, Stern A, Liang CM, Chiu DTY. Enhanced oxidative stress and accelerated cellular senescence in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 29: 156-169, 2000.
35. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. Twenty-fourth edition, Prentice-Hall International, Inc, The United States of America, 1996.
36. Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L: Multiple glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with

- malaria endemicity in Vanuatu Archipelago (Southwestern Pacific). Am J Hum Genet 56: 294-301, 1995.
37. Skrzydlewska E, Farbiszewski R: Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication. Free Radic Res 27: 369-375, 1997.