

**T.C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İZOLE PERFÜZE RAT BÖBREĞİNDE SİSPLATİN**  
**NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE NECROSTATİN-1 'İN**  
**KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Ecz. MERYEM ASLANTAŞ**

**DANIŞMAN**

**PROF. DR. MERAL ERDİNÇ**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR 2014**

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İZOLE PERFÜZE RAT BÖBREĞİNDE SİSPLATİN  
NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE NECROSTATİN-1 'İN  
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. MERYEM ASLANTAŞ

DANIŞMAN

PROF. DR. MERAL ERDİNÇ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu tarafından  
13 TF-81 nolu Yüksek Lisans proje numarası ile desteklenmiştir.

DİYARBAKIR 2014

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

“İzole perfüze rat böbreğinde sisplatin nefrotoksisitesi üzerine Necrostatin-1’in koruyucu etkilerinin araştırılması” isimli Yüksek Lisans tezi .....tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ

Tezi Teslim Eden: Ecz. Meryem ASLANTAŞ

Jüri Üyesinin

Ünvanı	Adı Soyadı	Üniversitesi-Fakültesi
Başkan	: Prof. Dr. Meral ERDİNÇ	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye	: Prof. Dr. Nuriye METE	D.Ü. Tıp Fakültesi
Üye	: Yrd. Doç. Dr. İlker KELLE	D.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

...../...../2014

Prof. Dr. Ali CEYLAN

Dicle Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin süresince desteğini, bilgisini ve ilgisini esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Meral ERDİNÇ'e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarımnda yardımlarından ötürü Doç.Dr. Hasan AKKOÇ'a, Yrd. Doç. Dr. İlker KELLE'ye, Uzm. Ecz. Zeynep ERDOĞMUŐ ve Uzm. Ecz. Emre UYAR'a çok teşekkür ederim

Ecz. Meryem ASLANTAŞ

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>1.Ön Sayfalar</b>	
1.1. Kapak	
1.2. İç Kapak	
1.3. Onay Sayfası .....	I
1.4. Teşekkür Sayfası .....	II
1.5. İçindekiler Dizini .....	III
1.6. Şekiller Dizini .....	V
1.7. Tablolar Dizini .....	VI
1.8. Simgeler ve Kısaltmalar Dizini .....	VII
<b>2.Özet Sayfalar</b>	
Türkçe Özet .....	X
İngilizce Özet .....	XI
<b>3.Tez Metni</b>	
1. Giriş ve Amaç .....	1
2. Genel Bilgiler .....	2
2.1.Nefrotoksisite .....	2
2.1.1.Nefrotoksisite Açısından Böbreğin Yapısal ve Fizyolojik Özellikleri.....	2
2.1.2. Nefrotoksinler.....	3
2.1.3.İlaça Bağlı Nefrotoksisite .....	3
2.1.4.Nefrotoksik Ajanlar .....	3
2.1.4.1. Analjezikler .....	3
2.1.4.2. Antibiyotikler .....	4
2.1.4.3. Aminoglikozidler .....	4
2.1.4.4. Amfoterisin B .....	5
2.1.4.5. ADE İnhibitörleri ve AT1 Reseptör Blokörleri .....	5
2.1.4.6. Antineoplastikler .....	5
2.2. Antineoplastik İlaçlar .....	6
2.2.1. Antineoplastik İlaçlar ve Böbrek .....	6
2.2.2. Kanser Kemoterapisi ve Nefrotoksik Etki Mekanizması .....	7
2.3. Sisplatin .....	9
2.3.1. Sisplatin Farmokokinetiği .....	9
2.3.2. Sisplatin Etki Mekanizması ve Nefrotoksisite .....	10
2.3.3. Sisplatin Yan Etkileri .....	11
2.4. Serbest Radikaller .....	12
2.4.1. Organizmada Oluşan Serbest Radikaller .....	12
2.4.1.1. Hidroksil Radikali .....	12
2.4.1.2. Süperoksit Radikali .....	13
2.4.1.3. Hidrojen Peroksit Radikali .....	13
2.4.1.4. Singlet (tekli) Oksijen .....	14
2.4.1.5. Nitrik Oksit .....	14

2.4.2.Serbest Radikallerin Etkileri .....	15
2.4.2.1.Proteinlere Etkileri .....	15
2.4.2.2. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri .....	15
2.4.2.3. Karbonhidratlara Etkileri .....	15
2.4.2.4. Membran Lipidlerine Etkileri .....	15
2.4.3.Antioksidanlar.....	16
2.4.3.1.Endojen Antioksidanlar .....	16
2.4.3.1.1.Enzim Olan Antioksidanlar .....	16
2.4.3.1.2.Enzim Olmayan Antioksidanlar .....	18
2.4.3.2.Eksojen Antioksidanlar .....	18
2.5.Hücre ölüm yolları .....	19
2.5.1. Apoptozis.....	19
2.5.2. Nekrozis.....	20
2.5.3. Nekroptozis.....	21
2.5.3.1. Necrostatin-1.....	21
2.5.3.1.1. Necrostatin-1 etki mekanizması.....	21
3.Gereç ve Yöntem .....	23
3.1.Gereç .....	23
3.1.1.Kullanılan Araç ve Gereçler .....	23
3.1.2.Kullanılan Deney Hayvanları .....	23
3.1.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	23
3.2.Yöntem .....	24
3.2.1.Farmakolojik İnceleme .....	24
3.2.2.Biyokimyasal İnceleme .....	25
3.2.3.Histopatolojik İnceleme .....	25
3.3.İstatistiksel Değerlendirme .....	25
4.Bulgular .....	26
4.1.Farmakolojik Bulgular .....	27
4.2.Biyokimyasal Bulgular .....	27
4.3.Histopatolojik Bulgular.....	30
5.Tartışma .....	32
6.Sonuç ve Öneriler .....	34
7.Kaynaklar .....	35
8.Özgeçmiş .....	41

**ŞEKİLLER DİZİNİ****Sayfa**

<b>Şekil.1.</b> Sisplatinin Moleküler Yapısı .....	9
<b>Şekil.2.</b> Bütün gruplarda perfüzyon basıncı .....	27
<b>Şekil.3.</b> Bütün gruplarda doku MDA düzeyleri.....	28
<b>Şekil.4.</b> Bütün gruplarda serum üre düzeyleri.....	29
<b>Şekil.5.</b> Bütün gruplarda serum kreatinin düzeyleri .....	29
<b>Şekil.6.</b> Bütün grupların böbrek kesitlerine ait histolojik resimler.....	31

**TABLULARIN DİZİNİ****Sayfa**

<b>Tablo.1.</b> Kemoterapiye Bağlı Nefrotoksisitenin DOOQ' e Göre Sınıflaması .....	7
<b>Tablo.2.</b> Krebs Henseleit Solusyonu .....	24
<b>Tablo.3.</b> Gruplara ait elde edilen veriler (PP, MDA, Üre, Kreatinin).....	26



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>i.p</b>	: İntraperitoneal
<b>ABY</b>	: Akut Böbrek Yetmezliği
<b>ATN</b>	: Akut Tübüler Nekroz
<b>AİN</b>	: Akut İnterstisyel Nefrit
<b>GEN</b>	: Gentamisin
<b>ADE</b>	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
<b>AT1R</b>	: Anjiyotensin-1 Receptör
<b>GFH</b>	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
<b>Cr</b>	: Serum Kreatinin
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>GSH</b>	: Redükte Glutatyon
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikali
<b>NSAİİ</b>	: Non Steroidal Anti İnflamatuvar İlaç
<b>KBY</b>	: Kronik Böbrek Yetmezliği
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>OH</b>	: Hidroksil Radikali
<b>H2O2</b>	: Hidrojen Peroksit
<b>-O2</b>	: Süperoksit Anyon Radikali
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>GTP</b>	: Guanozin Trifosfat
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz

<b>XO</b>	: Ksantin Oksidaz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>GSH.Px</b>	: Glutatyon Peroksidaz
<b>GST</b>	: Glutatyon S Transferaz
<b>MnSOD</b>	: Manganez Süperoksit Dismutaz
<b>ZnSOD</b>	: Çinko Süperoxide Dismutaz
<b>GSSG</b>	: Oksidize Glutatyon
<b>Fe+2</b>	: Ferröz Demir
<b>Fe+3</b>	: Ferrik Demir
<b>LOOH</b>	: Lipohidroperoksit
<b>SH</b>	: Sülfhidril Grubu
<b>BHT</b>	: Bütil hidroksi toluen
<b>DOQI</b>	: Dialys Outcome Quality Index
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>CDDP</b>	: Cis-Diamin Dikloro Platinum
<b>HE</b>	: Hemotoksilen Eozin
<b>PAS</b>	: Periodik Asit Schiff
<b>KCL</b>	: Potasyum klorür
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>RIPK1</b>	: Receptor-Interacting-Protein Kinase 1

<b>TNF-a</b>	: Tumor nekrosis faktor alfa
<b>ZBP1</b>	: Z-DNA binding protein 1
<b>TLR</b>	: Toll-like receptor
<b>RHIM</b>	: RIP homotypic interaction motif
<b>TICAM1</b>	: Toll-like receptor(TLR) adaptor molecule 1

Sisplatin kanser kemoterapisinde solid tümörlere karşı oldukça etkin ve geniş kullanıma sahip olan bir antineoplastik ajandır. Nefrotoksisite, sisplatinin kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisidir. Böbrekte nekroz sonucu oluşan ve renal hemodinamide değişikliklerle karakterize sisplatin nefrotoksisitesinde başlıca oksidatif stres olmak üzere, bir çok mekanizmanın rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda antioksidan özelliği olan ilaçlarla yapılan birçok çalışmada sisplatin nefrotoksisitesi üzerine farklı mekanizmalar ile koruyucu etkilerin oluştuğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada programlı nekrotik hücre ölümü olan nekroptozisi RIPK-1'i inhibe ederek önleyen Necrostatin-1'in sisplatin ile oluşan nefrotoksisite üzerine koruyucu etkileri araştırıldı. Bu amaçla kullanılan erkek Spraque-Dawley ratlar dört gruba ayrıldı.

1. Grup = Kontrol grubu
2. Grup = Tek doz sisplatin (5mg/kg.ip)
3. Grup = Tek doz sisplatin +Necrostatin-1 (5mg/kg. ip + 1,65 mg/kg/gün. i.p , 5 gün)
4. Grup = Necrostatin-1 (1,65mg/kg/gün,i.p,5 gün)

Bütün gruplarda sisplatin ile oluşturulan deneysel nefrotoksisite sonrası, anestezi altında, böbrekler izole edildi. İzole edilen böbreklerden biri renal arterden kanüle edilerek perfüzyon sistemine takıldı ve peristaltik pompa yardımı ile 37 °C de ısıtılan, karbojen (%5 CO<sub>2</sub> ve %95 O<sub>2</sub> karışımı) ile havalandırılan Krebs-Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi. Böbrek perfüzyon basınçları, serum üre, kreatinin ve doku MDA düzeyleri, histopatolojik değişiklikler, gruplar arasında karşılaştırıldı.

Tek doz sisplatin (5mg/kg, i.p) verilen grupta, perfüzyon basınçlarında, doku MDA, serum üre ve kreatinin düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artış olduğu görüldü(p<0.01). Sisplatin grubunda meydana gelen bu artışın, sisplatin ile beraber necrostatin-1 verilen grupta anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi (p<0.05, p<0.01).

Histopatolojik olarak da sisplatin verilen grupta glomerüller hasar ve tübülüslerde dilatasyon geliştiği gözlemlendi. Buna karşılık, sisplatin ile birlikte Necrostatin-1 verilen grupta tübüler dilatasyon ve glomerüller hasarın, yalnız sisplatin verilen gruba göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak Necrostatin-1'in Sisplatin nefrotoksisitesi üzerine koruyucu etkisinin olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler ;** Sisplatin, Nefrotoksisite, İzole perfüze böbrek, Necrostatin-1, Nekroptozis

## ABSTRACT

Cisplatin is one of the most effective agent in cancer chemotherapy and being used to treat various solid tumors. Nephrotoxicity is one of the major, dose-limiting side effects of cisplatin.

It has been known that different mechanisms contribute to nephrotoxicity of cisplatin and oxidative stress is one of the foremost mechanisms of all. In recent years, studies performed with antioxidant agents, has shown that nephrotoxic effects of cisplatin may be prevented by antioxidants via different mechanims.

This study was performed to investigate the effect of Necrostatin-1-which supresses necroptosis by inhibiting RIP-1kinase activity on cisplatin nephrotoxicity. Changes of, renal perfusion pressures and morphologic structures of rat kidneys, compared with the group treated with cisplatin, which is known by its nephrotoxic effects. For this purpose, male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups (n=8):

- 1- Control
- 2- Cisplatin (a single dose of cisplatin; 5 mg/kg , i.p.)
- 3- Single dose of cisplatin (5 mg/kg, i.p.) + Nec-1 (1,65 mg/kg/day, i.p for 5 days),
- 4- Necrostatin-1 (1,65mg/kg/day, i.p. for 5 days).

After five days , all pretreated rats were operated under anesthesia and kidneys were isolated. One of the isolated kidneys was set on the langendorff system via renal arthery and perfused with Krebs-Henseleit solution which was heated (37 C<sup>o</sup>) and aerated with carbogen (5%CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>), by a perfusion pump.Perfusion pressures, serum urea and creatinine levels, tissue MDA levels and histopathological changes were compared in all groups.

In cisplatin group (a single dose 5 mg/kg, i.p) comparing with control group, perfusion pressures, serum urea and creatinine levels and tissue MDA levels were increased significantly (p<0.01). That increased parameters in cisplatin group were all significantly decreased in Cisplatin + Necrostatin-1 treated group (p<0.05, p<0.01).

Histopathologically, in cisplatin treated group glomeruler damage and dilatation of both tubulus was observed. On contrary in cisplatin + Necrostatin1 group less glomerular and tubular damage was observed in glomerules and both tubules.

With our findings, it is concluded that necrostatin-1 has protective effects on cisplatin induced nephrotoxicity.

**Key words:** Cisplatin, Nephrotoxicity, isolated perfused kidney, Necrostatin-1, Necroptosis

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin önemli nefrotoksik yan etkisinden dolayı, yıllardır deneysel çalışmalarda nefrotoksisite modeli oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Bu model kullanılarak ilacın nefrotoksik etkisinin mekanizmaları araştırılmış ve bu etkiden sorumlu tutulan en önemli mekanizmanın serbest oksijen radikallerinin neden olduğu doku hasarı olduğu düşünülmektedir.

Sisplatin ile oluşan nefrotoksisitede özellikle tübüler nekroz oluşması, söz konusu etkide nekrotik hasarın araştırılmasına neden olmuştur.

Bu çalışmada ratlarda sisplatin ile oluşturulan deneysel nefrotoksik modelde programlı nekrotik hücre ölümü olan nekroptozisi RIPK-1'i inhibe ederek önleyen Necrostatin-1'in koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla ratların böbrekleri izole edilerek in vitro olarak perfüze edildi. Perfüze edilen böbreklerde böbrek perfüzyon basınçları ve renal hemodinamiğindeki değişiklikler karşılaştırıldı. Yapılan farmakolojik deneylere ilave olarak bütün gruplar histopatolojik ve biyokimyasal olarak da incelendi. Alınan kan örneklerinde serum üre kreatinin ve böbrek dokusunda malondialdehit (MDA) düzeyleri ölçüldü.

Oluşan oksidatif hasarlara karşı koruyucu olarak kullanılan birçok antioksidan ajan kullanılmasına rağmen Necrostatin-1 ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar daha çok, histopatolojik, biyokimyasal ve hücre kültürü çalışmalarıdır. Langendorff sistemi kullanılarak yapılan bu çalışmada böbreğin fizyolojik fonksiyonları, perfüzyon basınçları, renal hemodinamik değişimler kaydedilerek incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar daha sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacak ve klinikte sisplatin kullanımına bağlı oluşan nefrotoksik yan etkiyi azaltmak amacı ile yeni ilaç kombinasyonlarını mümkün kılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. NEFROTOKSİSİTE

Yaşayan organizmaların ilaçlara ve kimyasallara maruziyeti sıklıkla toksisite ile sonuçlanır. Her bileşiğin vücudun tamamına toksik etkisi olduğu söylene de; birçok bileşiğin toksik etkisi bazı organlar üzerine daha belirgindir ki bu organlara hedef organlar denir.

Bir bileşiğin farmakokinetiği ve hedef organın toksik maddeye karşı cevap verebilme yeteneği, bir organın toksisiteye karşı duyarlılığını belirleyen önemli faktörlerdir.

Böbrek gibi bazı organlar kimyasalları toksik ara ürünlere metabolize ederler. Bu reaktif ara ürünler hücrel makromoleküllere bağlanarak ya da membranlar veya nükleik asitler gibi fonksiyonel olarak önemli olan hücrel yapıların peroksidatif hasarına yol açan serbest oksijen radikali (SOR) oluşumuna yol açarak toksisiteyi başlatabilirler (1).

Böbrek dinamik bir organdır ve vücut homeostazının korunmasında, su, asit-baz ve elektrolit dengesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca endojen artık ürünlerin atılmasını sağlar ve endokrin fonksiyonları da vardır. Vücut ağırlığının %1' i kadar olmalarına karşılık; kardiyak debinin %20' sini alırlar (1,2).

Yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle nefronlar zedelenmeye oldukça duyarlıdır (2,3).

#### 2.1.1. Nefrotoksisite Açısından Böbreğin Yapısal ve Fizyolojik Özellikleri

Diğer organlarla karşılaştırıldığında, böbreğin bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri onu, iskemik ve toksik hasara karşı daha hassas kılar. Nefronlar arasındaki anatomik, fonksiyonel ve biyokimyasal farklılıklar toksik ajanlara veya iskemi ya da hipoksi gibi patolojik durumlara verecekleri cevabın da farklı olmasına neden olur (2-4).

Nefron heterojenitesi nedeniyle böbreğin bir bölümü bir ajana duyarlı iken diğer bir bölümü dirençli olabilmektedir. Proksimal nefron epitel hücreleri ihtiva ettikleri fazla sayıdaki taşıyıcı sistem nedeniyle, birçok nefrotoksik ajan için hedef bölgedir (3,4).

### **2.1.2 Nefrotoksinler**

Nefrotoksisite gelişiminde asıl belirleyici olay toksik ajana yeterli derecede maruziyettir. Bu toksik ajanlar geniş bir yelpazede incelenebilir. Bazı antibiyotiklerin, analjeziklerin immünsüpresif ilaçların ve diğer birçok ilacın nefrotoksik potansiyeli olduğu eskiden beri bilinmektedir (5,6).

Radyokontrast maddeler gibi bazı diyagnostik amaçlı kullanılan ajanların da nefrotoksik olduğu bilinmektedir (7 ).

Alternatif tıpta kullanılan bazı bitkisel ilaçlar ve doğal ürünler de nefrotoksisiteye neden olabilen diğer maddelerdir. Kadmiyum, bakır, uranyum ve bizmut gibi bazı maddelere karşı çevresel maruziyet de, nefrotoksisite açısından bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır. Alternatif tıpta kullanılan ajanlar kendilerini daha çok akut böbrek yetmezliği ile gösterirken, ilaçlara ve çevresel faktörlere düşük dozda ve devamlı maruziyet daha çok kronik ve son dönem böbrek yetmezliği ile ortaya çıkmaktadır (8).

### **2.1.3. İlaça Bağlı Nefrotoksisite:**

İlaçlar, böbrek hastalıklarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır (2,9). Yaşlı insanlar arasında ilaca bağlı nefrotoksisite insidansı %60'ların üzerindedir. İnsanlar geçmişle karşılaştırıldığında günümüzde, diyabet ve kardiyovasküler sistem hastalıkları yönünden daha fazla risk altındadır (9). İlaçların böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri çok çeşitli olabilir ve nefrotoksik etkiler böbrekle ilgili birçok sorunu taklit edebilir. Bu yüzden ayırıcı tanıda ilaç yan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Buna dikkat edilmez, ilaç ya da ilaçlara devam edilirse böbrek hasarı ilerleyebilir ve geri dönüşümsüz böbrek hasarı gelişebilir.

İlaçlar böbrekte üç ana yan etkiye neden olmaktadır (10).

- Akut böbrek yetmezliği (ABY)
- Kronik böbrek yetmezliği (KBY)
- Nefrotik sendrom

### **2.1.4. Nefrotoksik Ajanlar**

#### **2.1.4.1. Analjezikler**

Aspirin ve diğer nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar(NSAİİ), siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörleri ve asetaminofen (COX-3 inhibitörü), üç önemli analjezik ilaç sınıfıdır(11).



Bu ilaçların toksik etkileri hem akut hem de kronik olabilir. NSAİİ' ların ABY, nefrotik sendrom, hipertansiyon ve papiller nekroza neden olduğu bilinmektedir. NSAİİ' lerin ABY yapmasındaki en önemli sebep böbrekte vazodilatör prostaglandinlerin sentezinde azalmaya neden olmalarıdır. Konjestif kalp yetmezliği, hipovolemi, siroz, anestezi, ilerlemiş yaş ve böbrek nakli, NSAİİ kaynaklı prerenal ABY için başta gelen risk faktörleridir. COX-2 inhibitörleri, NSAİİ' lar kadar nefrotoksik olmasalar da; çalışmalarda böbrek hasarı yaptıkları gösterilmiştir (10,11).

Asetaminofene bağlı gelişen ABY, akut tübüler nekroz (ATN) oluşması ile karşımıza çıkar (Tablo 1) ve yaptığı azotemi geri dönüşümlüdür. Böbrek fonksiyonlarında yavaş bir bozulma görülür. Analjezik nefropatisinden şüphelenildiğinde ilaç hikayesi sorgulanmalıdır. Anemi ve steril piyüri görülebilir. Tedavide ilk yapılacak iş, ilacın bırakılması ve palyatif tedavidir (10,11).

#### **2.1.4.2. Antibiyotikler**

Nefrotoksisiteye en sık yol açan ilaçlar antibiyotiklerdir. Bazı antibiyotikler aşırı duyarlılığa neden olduğu için nefrotoksik olabilirken (penisilin, rifampisin, eritromisin, vankomisin), bazıları direkt nefrotoksik etki göstermekte (aminoglikozidler, sefalosporinler, amfoterisin B), bazıları da böbrekte çökerek nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Bu ilaçların kullanımı sonucunda ATN veya akut interstisyel nefrit (AİN) kaynaklı ABY gelişebilir (10,12).

#### **2.1.4.3. Aminoglikozidler**

ATN' ye en fazla antibiyotikler yol açar. İçerisinde amikasin ve gentamin gibi sık kullanılan ajanları bulunduran, antimikrobiyal kemoterapide önemli bir yeri olan aminoglikozidler, gram negatif sepsiste hayat kurtarıcıdır (12). Nefrotoksisite ve ototoksisite hayvanlarda ve insanlarda aminoglikozidlerin başlıca iki yan etkisidir (13). Nefrotoksik yan etkiler bütün hastalarda oluşurken, sadece böbrek eşiğinin aşıldığı durumlarda klinik bulgu verir. Aminoglikozid nefrotoksisitesi çeşitli böbrek bulgularına neden olabilir. Proksimal tübüler transportun bozulması nedeniyle glukozüri, proteinüri ve aminoasidüri ortaya çıkabilir. Daha sonra serum kreatinin (Cr) ve azot değerlerinde yükselme görülebilir. Bu grup ilaçlar içinde nefrotoksisitesi en yüksek ilaç neomisin iken gentamisin, amikasin ve kanamisin diğer nefrotoksik aminoglikozidlerdir (12,13).

#### **2.1.4.4. Amfoterisin B**

Hayatı tehdit eden mantar sepsislerinde amfoterisin B, hala en etkili tedavi yöntemidir. Fakat amfoterisin B' nin en ciddi toksik etkisi böbrekler üzerinde görülür. Amfoterisin B uygulanan hastaların büyük çoğunluğunda böbrekle ilgili bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Bu bozukluklar arasında azotemi, tübüler nekroz, Glomerüler Filtrasyon hızı(GFH)'nda azalma sayılabilir (14) Amfoterisin B ile ilgili en önemli risk faktörlerinden biri ilacın dozudur. Doz arttıkça böbrek hasarı da artmaktadır. Sıvı replasmanı, hasarı azaltmada kullanılan önemli bir yöntemdir (10,14).

#### **2.1.4.5. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri ve AT1 reseptör blokörleri**

ADE inhibitörleri; konjestif kalp yetmezliğinde, diyabetik nefropati ve proteinürik nefropatilerde kullanılan bir bakıma iki ucu keskin bıçak gibidirler. Böbrek yetmezliği olan hastalarda (iki taraflı renal arter stenozu, tek böbreği olup aynı zamanda renal arter stenozu, diüretiklere ya da diyareye bağlı sıvı kayıpları gibi durumlarda) bu ilaçlar fonksiyonel ABY'ne neden olmaktadır. ADE inhibitörleri ile karşılaştırınca AT1 reseptör blokörlerinin genel yan etkileri daha azdır. ADE inhibitörlerinin aksine, bradikininler veya nörokininler gibi vazodilatör kinin peptitlerle etkileşmez. Bundan dolayı ADE inhibitörlerinin nispeten sık görülen öksürük yapıcı etkilerini göstermemesi avantaj olarak kabul edilse de; ancak bu grup ilaçların da özellikle böbrek yetmezlikli hastalarda risk oluşturduğunu unutmamak gerekir (15).

Diğer risk faktörleri hipovolemi, beraberinde diüretik kullanımı ve böbrek yetmezliğidir. Bu riskleri azaltmak için hastaların sıvı kontrolleri düzenli yapılmalıdır. İlaça düşük dozlarla başlanılmalı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonlarına bakılarak doz ayarlamaları yapılmalıdır (10,15).

#### **2.1.4.6. Antineoplastikler**

Kanser hastalarında tedavi edici ajanların bulunması ve gelişmesi ile mortalite ve morbidite oranları önemli ölçüde azalmıştır. Ama kullanılan sitotoksik ilaçlar nedeniyle ve bu ilaçlara bağlı olarak artan yaşam süreleri, hastaların ilaçlara bağlı yan etkilerle daha fazla karşılaşmalarını beraberinde getirmektedir (16,17).

## 2.2. ANTİNEOPLASTİK İLAÇLAR

Kemoterapi ilaçları böbrekte başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerül olmak üzere nefronun üç ana bölümünde de hasara ve fonksiyon bozukluğuna neden olur. Glomerüler fonksiyon bozukluğuna bağlı GFH' da azalma, serum Cr ve idrar protein/Cr oranında artma görülür. Antineoplastik ilaca bağlı toksik bileşiklerin nötralize edilmesi ve hidrasyon gibi destekleyici tedavilerle böbrek toksisitesi önenebilir (6,16,17).

### 2.2.1. Antineoplastik ilaçlar ve böbrek

Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak antineoplastik İlaçların kanser hücrelerine karşı olan selektiflikleri, antibiyotiklerin bakteri hücrelerine karşı olan selektifliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur; mevcut fark daha çok kantitatif yöndedir. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler. Bu nedenle çoğu kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu üzerine de yan etkileri vardır (16-19).

Böbrek hücrelerinin bölünme hızı yüksek olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır(20).

Sitotoksik ilaçlara bağlı nefrotoksisite kemoterapinin en sık görülen yan etkilerinden birisidir (16). Antimetabolitler, alkilleyici ilaçlar ve antrasiklinler, nefrotoksisiteye en sık neden olan ilaçların başında gelirler. Sisplatin, siklofosfamid ve yüksek doz sitozin arabinozidin, nefrotoksik etkileri bilinmektedir (17-19).

Kanser ilaçlarının nefrotoksik etkisi; serum elektrolit düzensizliği, serum kreatinin artışı, glomerül filtrasyon hızının (GFH) azalması ve kalıcı böbrek yetmezliğine kadar ciddi boyutta olabilir. Kemoterapi alan hastalarda nefrotoksisite derecesi (dialysis outcome quality index) DOQI sınıflamasına göre değerlendirilmektedir (20,21) (Tablo 1) .

**Tablo 1.** Kemoterapiye bağı nefrotoksisitenin DOQI (dialysis outcome quality index)' e göre sınıflaması.

Evre	Tanım	GFH (ml/dk/1.73 m2)
1	Böbrek Hasarı	≥90
2	Hafif GFH azalması	60-89
3	Orta Düzeyde GFH azalması	30-59
4	Ağır GFH azalması	15-29
5	Böbrek yetmezliği(veya diyaliz)	<15

### 2.2.2. Kanser Kemoterapisi ve Nefrotoksik Etki Mekanizması

Kanser hastalarında antineoplastik kemoterapinin gelişmesi ve destek tedavisi ile mortalite ve morbidite oranları önemli ölçüde azalmıştır. Ancak yüksek doz sitotoksik ilaçların kullanılması ve kanser hastalarının daha uzun süre yaşaması ilaçların yan etkilerini de artırmıştır(23).

Antineoplastik ilaçların toksik bileşiklerinin nötralize edilmesi ve hidrasyon gibi destekleyici tedavilerle böbrek toksisitesi önlenebilir (21).

Kemoterapi ilaçları böbrekte başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerüller olmak üzere nefronun üç ana bölümünde yapısal hasara ve fonksiyon bozukluğuna neden olurlar (16,17,22).

Glomerüler fonksiyon bozukluğuna bağlı GFH'nda azalma, serum kreatinin ve idrar protein/kreatin oranında artma görülür. Proksimal tübüler fonksiyon bozukluğuna bağlı ise idrar sodyumunda artma; serum sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum ve fosfat seviyesinde azalma izlenir. Distal tübüler fonksiyon bozukluğunda, idrar pH'ı ve ozmolalitesi artar (22,24).

Kanser hastalarında uygulanan kemoterapi ilaçlarının özelliklerine göre glomerüler fonksiyonların yanında tübüler fonksiyonların da bozulduğu bilinmektedir. Antineoplastik ilaçlar başlıca; glomerülü oluşturan endotelial hücreler, podositler, mezenşimal hücreler ve glomerül bazal membranına hasar verir. Endotelial hücreler ve podositler glomerül bazal membranının yüksek negatif yükünden sorumlu olan siyaloglikoproteinden zengindir. Bu hücrelerin hasarı sonucunda glomerül bazal membranın negatif elektrik yükü bozulur. Ayrıca bazı kemoterapi ilaçları glomerüler podositlerin yerinden ayrılmasına neden olur. Podositlerin ayrılması ile glomerül bazal membran bariyerinin boyutu değişir. Glomerüler bazal membranın negatif elektrik

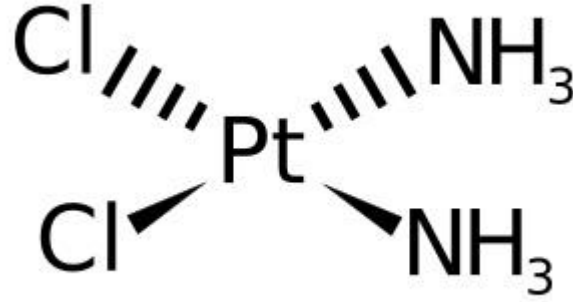
yükünün ve bariyer boyutunun değişmesi sonucunda glomerüler bazal membran geçirgenliği değişir. Buna bağlı olarak idrarda protein atılımı artar ve GFH düşmeye başlar (25,26).

Tavşanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, doksorubisinin glomerüler hasarlanmaya neden olduğu bulunmuştur (27). Harmon ve ark. kemoterapiden sonraki 6 ile 12 aylar arasında sisplatin bağlı glomerülopati (glomerülosklerozis) rapor etmişlerdir (28).

Nitrozürelere doza bağımlı olarak kronik interstisyel nefrit ve glomerüloskleroz tarzı tutulum ile kronik böbrek yetmezliği yapabilirler. Mitomisin C alan hastalarda da doza bağımlı olarak proteinüri ve renal yetmezlik tespit edilmiştir. Kanserli vakalardaki böbrek hasarından immün komplekslerin sorumlu olduğu ve bunların glomerüllerde depolanmasının doku hasarına neden olduğu rapor edilmiştir. Glomerüler hastalıkların en sık eşlik ettiği kanser türleri akciğer, gastrointestinal sistem tümörleri, lenfoma ve lösemilerdir. Karsinomalarda membranöz glomerülofrit, lenfomalarda da minimal değişiklik hastalığının daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Kanser hastalarında nefrotoksisite için risk faktörleri; bu hastaların çoğunun yaşlı olması, öncesinde renal hastalık, hipovolemi, kombine kemoterapi almaları, tedavi sırasında nefrotoksik ajanlarla kombinasyon, hastaların değerlendirme aşamasında radyokontrast maddeye maruz kalmalarıdır(29-31).

Akut böbrek yetmezliği (ABY) gelişmesi antineoplastik kemoterapi alan hastalarda sık görülen bir olaydır. ABY, kemoterapinin, tübüller üzerine direk toksik etkisi ya da glomerüllerde harabiyete yol açması sonucu oluşur. Tek doz sisplatin sonrasında bile akut böbrek yetmezliği bildirilmiştir (19,32).

## 2.3. SİSPLATİN



Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı

Yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen platin türevi ilaçlardır. Bu gruptaki ilaçlardan tedaviye ilk giren sisplatin, diaminodiklorürdür. Sıvı ortamda platin elektrotlarının oluşturduğu elektriksel alanın E.coli 'nin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler sırasında elektrottan sıvıya gecen platin türevlerinin anti bakteriyel ve anti neoplastik etki yaptıkları fark edilmiş bu gözlem sayesinde sisplatin bulunmuştur. Sisplatin 0.5 mg/ml, cis-diamindikloroplatinyum içeren inorganik ağır metaldir. İlaç, DNA zincirinde çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezini inhibe eder. Ayrıca daha az bir oranda protein ve RNA sentezini de inhibe etmektedir. Sisplatin ayrıca immünosupresif, radyasyona duyarlaştırıcı ve antimikrobiyal özelliklere de sahiptir. Sisplatinin etkinliği hücre siklusuna spesifik görünmemektedir ve onkolitik özellikleri açısından alkilleyici ajanlara benzer. Sisplatin, sitotoksik etkisini bütün DNA-bazlarına, özellikle guanin ve adeninin N-7-pozisyonuna bağlanarak gösterir. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır (33-35).

En önemli yan etkis nefrotoksisite olan sisplatin, testis, over, mesane, prostat, serviks, özofagus ve akciğer kanserleri, baş ve boyun kanserleri, osteojenik osteosarkom ve nöroblastoma gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılır. Miyelosupresif etkinliği orta derecede olduğu için kombinasyonlar için elverişli bir ilaçtır (18,19,35,36).

### 2.3.1. Sisplatin Farmakokinetiği

İntravenöz uygulamadan sonra, sisplatin hızlı bir şekilde tüm dokulara dağılır; karaciğer, böbrek ve prostat dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, mesane, kaslar, testis, pankreas ve dalakta daha düşük ve barsak, adrenal, kalp, akciğer, beyin ve beyincikte en düşük konsantrasyonlarda bulunur. Mide barsak kanalından absorbe edilmez, sadece iv uygulanır (36).

Uygulamadan sonra 4 ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir. Eliminasyon ömrü 60 saat kadardır, uygulamadan iki saat sonra plazma sisplatininin %90'dan fazlası muhtemelen irreversibl bir şekilde proteinlere bağlanır. Sisplatin non-linear farmakokinetiğe sahiptir. Enzimatik olmayan bir şekilde metabolitlerine dönüşür. 50-100mg/m<sup>2</sup> sisplatinin intravenöz bolus şeklinde enjeksiyonundan sonra, plazma eliminasyonu bifaziktir.

İnsanlarda bildirilen yarılanma ömürleri; t<sub>1/2</sub> (dağılım) 10-60 dakika ve t<sub>1/2</sub> (terminal) yaklaşık 2-5gündür. Toplam platinin proteinlere aşırı bir şekilde bağlanması, uygulanan dozun toplam olarak %27-45'inin 84-120 saatten fazla bir sürede, uzun süreli veya tam olmayan bir kümülatif üriner atılım ile sonuçlanır. Fekal atılımı çok azdır.

Plazma yarı ömrü, azalmış böbrek fonksiyonu ile artar ve teorik olarak sisplatin plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanır ve bu sebepten karında asit varlığında artabilir(35,36).

### **2.3.2.Sisplatin Etki Mekanizması ve Nefrotoksisite**

Sisplatin (cis-diamindikloroplatinum, CDDP) DNA çift zincirlerine zincir arası ve zincir içi çapraz bağlanır. Bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzer. DNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozar. Döneme özgü olmayan bir ilaçtır. Sisplatinin nefrotoksik etkisinden, metaboliti sorumludur. Sisplatinin üç boyutlu moleküler yapısı toksik potansiyelini belirler. Cis ve trans dikloridamin platinin, her ikisinin de renal platin konsantrasyon miktarları birbirine yakın olmasına rağmen trans izomeri nefrotoksisiteye yol açmaz. Nefrotoksik etki oluşumunda bu moleküllerin geometrik yapısı, platin atomunun varlığından daha kritik bir rol oynamaktadır (37). Sisplatinin biyotransformasyonu da böbrek hasarında rol oynar. İn vitro koşullarda kompleksin klor ligandları sulu ortamda değişme eğilimindedir. Sisplatin in vivo koşullarda ekstrasellüler sıvı içerisinde nötral kompleks halde bulunur.

Ekstrasellüler sıvıdaki klor konsantrasyonunun yüksek olması kompleksin hidrolizini engeller. Klorun, intrasellüler konsantrasyonunun oldukça düşük olması, su molekülleri tarafında klorun yer değiştirmesini kolaylaştırarak, kompleksin hidrate ve hidrokstile edilmesine neden olur. Sisplatinin hidrasyonu sonucunda monokloromonoakuadiaminplatin veya diakuodiaminplatin açığa çıkar. Bu ajanlar nükleer materyallerin temeli olan pürin ve pirimidini alkiler (36,37).

Sisplatinin nefrotoksisitesinin bir başka açıklaması ise; reaktif metabolitlerinin doku makromoleküllerine kovalent bağlarla bağlanmasıdır. Nefrotoksik etkiler ayrıca ağır metallerin

sülfidril gruplarına bağlanması sonucunda olur. Ratlarda, renal fonksiyonların azalmasından önce renal korteks hücrelerindeki mitokondri ve sitozol içerisinde (platinin hücre içinde en yüksek konsantrasyonda bulunduğu bölgeler) sülfidril gruplarının azaldığı gösterilmiştir (38). Sisplatinin klinik kullanımını sınırlandıran en önemli yan etkisi nefrotoksisitesidir (39).

Böbrek tutulumunun erken safhalarında histolojik olarak özellikle distal ve toplayıcı tübüleri etkileyen, tübüllerde dilatasyon ve tortu oluşumu ile giden fokal akut tübüler nekroz oluşur. Proksimal tübüllerde ise, özellikle S3 segmentinde doza bağımlı nefrotoksisite görülür (40). Tek doz sisplatin uygulaması sonrası akut böbrek yetmezliği gözlenmiştir (39). Doğal ilaç (%30) ve metabolitleri üriner yolla atılır. Sisplatin uygulamasından sonra erken dönemde tübüler disfonksiyon geliştiği gösterilmiştir. Bir çalışmada ilk tedavi küründen sonra %25-35 akut tübüler nekroz geliştiği ve doza bağımlı kümülatif renal yetmezlik oranının %20-25 olduğu bildirilmiştir. Sisplatin kullanımı sırasında gelişen akut böbrek yetmezliği, idrar konsantrasyon yeteneğinin erkenden bozulmasına bağlı non-oligüriktir(39,40).

Bir çalışmada, 4 saatin üzerinde ve 20 mg/m<sup>2</sup> dozunda sisplatin alan hastalarda başlangıçta filtrasyon fraksiyonu artmış, sonradan renal vasküler direnç artışına bağlı GFH'nda azalma saptanmıştır (41). 12 aydan uzun süreli sisplatin tedavisinin kalıcı böbrek hasarına yol açabileceğini bildiren çalışmalar rapor edilmiştir (40). Sisplatin ile tedavi edilen hastalarda elektrolit bozukluğu sık görülür. En sık görülen elektrolit bozuklukları hipomagnezemi, hipokalsemi ve hipokalemidir. Çoğu hastada serum magnezyum düzeyinin 1,4 mmol/l nin altına düştüğü ciddi hipomagnezemi gelişir. Hastaların yarıya yakınında sisplatin tedavisi kesildikten sonra 20 aya kadar uzayan hipomagnezemi izlenmiştir(42,43). Nefrotoksisitenin doz ile ilişkisini araştıran çalışmalarda 1mg/kg'dan az sisplatin kullanıldığında nefrotoksisitenin en az oranda görüldüğü bildirilmiştir.

Sisplatin alan hastalarda tedavinin 8-12 saat öncesinden tedavi bitiminden 6 saat sonraya kadar serum fizyolojik ile hidrasyon (150-200 ml/saat) yapıldığında nefrotoksisite oranının belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Hidrasyonda amaç en az saatte 125 cc idrar çıkışı sağlamaktır. Ayrıca sisplatin toksisitesini azaltmak için hipertonic salin infüzyonu, mannitol ve furasemid ile diürez yapılabilir (44).

### **2.3.3. Sisplatin'in Yan Etkileri**

Sisplatinin klinik kullanımını sınırlandıran en önemli yan etkisi nefrotoksisitesidir. Sisplatin kullanımına bağlı nefrotoksisite çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Yapılan çalışmalarda



yaşlı hastalarda,kadınlarda,hipoalbuminemi ve daha önce altta yatan renal yetmezliği olan hastalarda nefrotoksisite riski daha yüksek bulunmuştur (39). Aminoglikozit ilaçlar sisplatin nefrotoksisitesini artırır (12). Bunun yanısıra, sisplatin, ototoksiktir, periferik noropati yapabilir, ateş ve hemoliz gibi alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Hipomagnezemi ve buna bağlı hipokalsemi yapabilir ve tetaniye yol açabilir. Hipomagnezemi ve hipokalsemi, i.v magnezyum sülfat solusyonu uygulanarak düzeltilir. Kemik iliği üzerindeki baskılayıcı etkisi diğer birçok anti neoplastik ilaca oranla düşüktür. Doza bağımlı bulantı ve kusma yapar. Antineoplastik ilaçlar içinde en çok bulantı ve kusma yapan ajanlardan biridir. Bu reaksiyon fenotiazin türevi anti emetiklerle kontrol altına alınamayabilir. Yüksek emetojenik ilaçlar uygulandığında hastalara, ondansetron, granisetron gibi serotonin (5-HT3) reseptör antagonistleri, deksametazon ve birlikte benzodiazepin türevi bir hipnosedatif verilmesi önerilir. Sisplatin, mutajenik teratojenik ve olasılıkla karsinojenik bir ilaçtır(39,40,41).

## **2.4. SERBEST RADİKALLER**

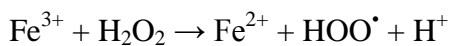
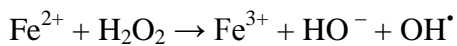
Serbest radikaller dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir.Eşlenmemiş elektronlar stabil olmadığından serbest radikaller bir başka molekülle etkileşerek kararlı hale gelme eğilimindedir (45). Söz konusu radikallerin başlıcaları oksijeninin dokularda belirli koşullarda indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksitleyici nitelikli oksijen metabolitleridir(46).

### **2.4.1.Organizmada Oluşan Serbest Radikaller**

#### **2.4.1.1.Hidroksil Radikali (OH<sup>-</sup>)**

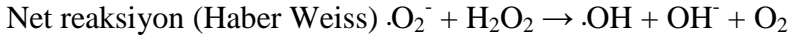
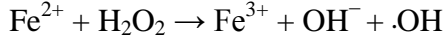
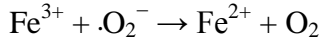
Bunlardan en reaktif ve sitotoksik olanı OH<sup>-</sup> radikalidir. OH<sup>-</sup> oluşum reaksiyonlarından biri serbest demir iyonunun katalizör etkisi altında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' den OH<sup>-</sup> oluşumu reaksiyonudur (47).

Fenton Reaksiyonu



Süperoksit anyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> etkileşmesi sonucu hidroksil radikali oluşur.

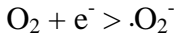
Haber Weiss Reaksiyonu



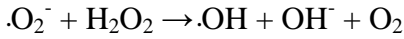
Hidroksil radikali, ile reaksiyona girerek dokuda diğer bir sitotoksik madde olan HOCl (hipoklorik asid) oluşumuna sebep olur. Süperoksit anyonu damar endotelinde nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek daha fazla peroksinitrit ve sonrası peroksinitröz asid oluşur (46).

#### **2.4.1.2. Süperoksit Radikali ( $\cdot\text{O}_2^-$ ):**

Aerobik organizmalarda O<sub>2</sub>' nin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit anyon radikali meydana gelir(69).



Ayrıca



#### **2.4.1.3. Hidrojen Peroksit Radikali (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olmaktadır. Bu reaksiyon süperoksit (SOD) enziminin katalizasyonu ile oluşur. İki süperoksit, iki proton olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijeni oluştururlar.



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içinde yer alır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metalleri ile reaksiyona girerek daha güçlü oksidanlar oluşturur. Ortamda fazla miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunması durumunda proteine bağlı ferröz (Fe<sup>+2</sup>), ferrik (Fe<sup>+3</sup>) haline dönüşür ve OH<sup>-</sup> radikali oluşur. Oluşan bu reaksiyona Fenton Reaksiyonu denir (47,48).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biyolojik membranları geçebildiğinden intraselüler olarak fosfolipitleri, karbonhidratları, proteinleri ve DNA' yı hasara uğrattır (48,49).

#### 2.4.1.4. Singlet (tekli) Oksijen ( $O_2(a^1\Delta_g)$ , $O_2^*$ )

Enerji absorpsiyonu ile uyarılan oksijen paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirerek ayrı ayrı ya da aynı orbitali işgal edebilirler. Bu iki forma singlet oksijen adı verilmektedir. Gerçekte ise Singlet oksijen bir serbest radikal değildir. Fakat serbest radikal reaksiyonları sırasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilen bir reaktif oksijen ürünüdür.

#### 2.4.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Endotel kaynaklı gevşetici faktör olan NO insan vücudunda çok çeşitli hücreler tarafından salgılanan en önemli fizyolojik transmitterlerden biridir.

NO, siklik guanozin monofosfat (cGMP) üzerinden etki gösteren potent bir periferik vasküler düz kas gevşeticisi olarak 1979'da tanımlanmıştır. NO hem hücre içi hemde hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük reaktif serbest radikal molekülüdür.

NO'nun önemli fizyolojik hedefi solübl guanil siklaz enziminin hem grubudur. Lipofilik serbest radikal olan NO, damar endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile L-arjinin'den hareketle sentezlenir. Düz kas hücresine geçen NO, guanilat siklazı uyararak guanozin tri fosfatın (GTP), cGMP'ye dönüşümünü sağlar. Artan cGMP de protein kinazı ve iyon kanallarını aktif hale getirir. Sekestrasyon ve hücre dışına çıkarılma yolu ile hücre içi kalsiyum azalır ve gevşeme sağlanır. cGMP nin fizyolojik etkisi 3'S bağının fosfodiesteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ile sağlanır (49).

NO aynı zamanda tiyol gruplarını S nitrolizasyonuna uğratarak protein reseptör fonksiyonlarını da değiştirir. NO oluşmuş serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşturmakta ve bunu da ileri dekompozisyonla  $OH^-$  radikaline dönüştürmektedir (47).

Vurgulanması gereken bir nokta serbest oksijen radikallerinin hücrelerde hiperoksi olmaksızın da fizyolojik olaylar veya patolojik olaylar sonucu meydana gelmesidir.

## **2.4.2.Serbest Radikallerin Etkileri**

### **2.4.2.1. Proteinlere etkileri**

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküller serbest radikallerle kolayca reaksiyona girdiği için triptofan, triozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolay etkilenir (50,51).

Glutasyon redüktaz , gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz gibi reaktiviteleri için aminoasitlere bağımlı enzimler serbest oksijen radikallerinin etkisiyle inhibe edilirler.

Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle proteinlerde fregmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelir. Bunlarda protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceği gibi immun sistemi uyurabilecek antijenik değişiklikler meydana gelir.

### **2.4.2.2. Nükleik Asit ve DNA' ya etkileri**

DNA yapısında oksidatif hasara yol açan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) meydana getirip DNA hasarına yol açarlar.

ROS lar DNA da tek veya çift bağ kırıklarına yol açarak demir ve bakır ile reaksiyona girerek OH<sup>-</sup> radikalini oluşturur. Oluşan OH<sup>-</sup> radikali, nükleik asitlerde kromozom değişikliğine ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (52,53).

DNA hasarı > hücre disfonksiyonu > hücre ölümü

### **2.4.2.3. Karbonhidratlara Etkileri**

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit ve okzoaldehit meydana gelir (49).

### **2.4.2.4. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)**

Serbest radikallerin etkilerine en duyarlı olan dokular lipidlerdir. Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir. Çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Membran yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu oluşturur. Zincirleme reaksiyonlar sonucu oldukça zararlı ürünler oluşur ve oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun çıkmasıyla peroksidasyon başlar ve lipid radikali oluşur. Bu radikal çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikaline dönüşür. Lipid peroksil radikali diğer doymamış yağ asitlerine de etki ederek yeni radikaller oluşturur. Hidrojen, çevreden atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler. Hidroperoksitlerin parçalanması sonucu lipid alkoksi radikalleri açığa çıkar (47,49). Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin tiobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu Malondialdehit (MDA) ortaya çıkar. MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılır.

### **2.4.3.ANTİOKSİDANLAR**

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen ve geciktirebilen maddelere, antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma sistemi denir. Organizma sürekli olarak serbest oksijen radikallerine maruz kalmasına rağmen, antioksidan savunma sistemleri aracılığı ile sağlanan dinamik denge ile zararlı etkilerin oluşumu engellenir.

Oluşan oksidanları inaktif hale getirmek amacı ile kullanılan antioksidanlar, doğal (endojen kaynaklı) ve ekzojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca 2 ana gruba ayrılabilirler (54).

- 1- Endojen Antioksidanlar
  - a. Enzim yapısında olan antioksidanlar
  - b. Enzim yapısında olmayan antioksidanlar
- 2- Eksojen Antioksidanlar

#### **2.4.3.1.Endojen antioksidanlar**

Endojen Antioksidanlar 2 Bölümde incelenir(49,55).

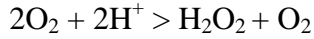
##### **2.4.3.1.1.Enzim Olan Antioksidanlar**

##### **Süperoksit dismutaz (SOD):**

SOD, süperoksit serbest radikalının, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayan antioksidan enzimdir.

SOD un 3 tipi bulunmaktadır.

## 1- Ekstraselüler SOD



Süperoksit serbest radikalini  $H_2O_2$  ve  $O_2$  ne dönüşümünü katalizleyen enzim ekstraselüler SOD'dur.

2- Cu-ZnSOD, Sitozolde bulunur. Dimerik yapıdadır. Siyanidle inhibe edilir.

3- MnSOD, Mitokondride bulunur. Tetramerik yapıdadır. Siyanidle inhibe olmaz (55).

### **Glutasyon peroksidaz (GSH.Px), Glutasyon S Transferaz(GST):**

Glutasyon hücre içinde bulunan ve hücreleri oksidasyona karşı koruyan en önemli antioksidan maddedir. Karaciğer başta olmak üzere birçok dokuda sentezlenir. Hemoglobinin oksitlenmesini ve methemoglobine dönüşmesini engeller, proteinlerdeki sülfidril gruplarını redükte ederek oksidasyona karşı korur. Bu sayede fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller.

#### **Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):**

Hiperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu enzim. GSH-Px sitozolde bulunur. 4 selenyum atomu içerir. Tetramerik yapıdadır.

GSH-Px vasıtasıyla, hiperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG), tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize eder (49).

#### **Glutasyon S Transferazlar (GST):**

Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı, GST, selenyum bağımsız, GSH-Px aktivitesi göstererek bir anti oksidan savunma mekanizması oluştururlar.

#### **Katalaz (CAT):**

Hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) suya ve oksijene parçalarlar. Esas olarak peroksidomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Eritrositler, karaciğer ve böbrek yüksek miktarda CAT içerirler (45,49).

#### 2.4.3.1.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

**Albumin:** Hipoklorik asit ve lipidhidroperoksit (LOOH) (46,49).

**Vitamin E (Alfa- tokoferol):** Miyokard ve mitokondri membranında fazla miktarda bulunur. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikallerden korur. O<sub>2</sub>, OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Singlet oksijeni, Lipid peroksi radikalini ve diğer radikalleri indirger (49).

**Karotenoidler:** Beta-karoten, A vitamininin prekürsörüdür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve süperoksit radikali ile direkt etkileşir ve antioksidan etki gösterir.

**Seruloplazmin:** Ferroz demiri (Fe<sup>+2</sup>), ferrik demire (Fe<sup>+3</sup>) yükselterek fenton reaksiyonu ve serbest OH<sup>-</sup> radikali oluşumunu inhibe eder (49,50).

**Ürik Asit:** Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşur. Singlet O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikali için güçlü bir temizleyicidir (49,52).

**Sistein:** OH<sup>-</sup> ve O<sub>2</sub> radikali toplayıcısıdır (53).

**Transferin:** Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.

**Vitamin C (Askorbik Asit):** Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) ve (OH<sup>-</sup>) ile reaksiyona girerek inaktif hale gelir (55).

**Glutasyon (GSH):** Serbest radikaller ve peroksitler ile reaksiyona girer. Proteinlerdeki SH gruplarını redükte halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Fonksiyonel proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (54).

#### 2.4.3.2. Eksojen antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar serbest radikallerin salınımını engelleyerek oluşmuş radikalleri temizleyerek ve endojen antioksidan savunma sistemini güçlendirerek etki eder.

Allopürinol, mannitol, melatonin, N asetil sistein, vitaminler ve pentoksifilin gibi ilaçların antioksidan etkileri görülmüştür (55,56).

## 2.5. HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARI

Hücre ölümü, nekrozis, apoptozis ve nekroptozis olmak üzere üç temel başlık altında incelenebilir (57).

### 2.5.1. Apoptozis

İlk defa 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı bir hücre ölümü gerçekleştiği gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen “apoptozis” adı verilmiştir (58).

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşar. Deri, gastrointestinal sistem ve immün sistem gibi pek çok dokuda devamlılık apoptozis ve hücre yenilenmesine bağlıdır (57,58).

Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3’ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır.

Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (58,59). Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzeyine göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (58,59,60).

Programlı hücre ölümünde birbirini izleyen basamakların neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır. Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde (primer) başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişir (59,60).



Hücre dışı uyarılar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni stimüle edici faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (İGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarılar olabilir (60,61).

### **2.5.2.Nekrozis**

Bir diğer hücre ölüm şekli olan nekrozis ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, enfeksiyon, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyarılar, toksinler gibi sebepler nedeniyle, yaşayan dokuların otoliz yolu ile yıkılmasına sebep olan, bir çeşit hücre hasar mekanizmasıdır (62).

Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir . Apoptozis temel olarak organizmaya yararlı olurken, nekrozis organizma için zararlı hatta ölümcül olabilmektedir (61,62).

Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar hücrenin iyon dengesini bozar. DNA tamirinden sorumlu nuklear enzim PARP (Poli ADP-riboz polimeraz) NAD<sup>+</sup>'ı ikiye bölerek NAD kaybına neden olur. Bu durumda gerçekleşen ATP noksanlığı, iyon pompası yetersizliğine yol açar. Böylece hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plazma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması enflamasyon olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir (63,64).

Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücre stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olur. RIP1 ve RIP3 mitokondriyonu ya direkt aktive eder ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indükler.

Nekrotik uyarı ayrıca PARP'i aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza neden olur (64,65,66). Kalpain, Ca<sup>++</sup> ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesidir ve lizozomal enzim salınımına neden olan kathepsin aktivasyonuna katkıda bulunur. Kalsiyum, endoplazmik retikuluma yakın olan mitokondriyon matriksine geçer ve mitokondriyal porların açılmasına neden olur. RIP kinazlar da ROS üretimini elektron transport zinciri yoluyla sağlarlar(64,65,66).Aşırı Ca<sup>++</sup> ve ROS artışı mitokondriyal porların uzun süre açık kalmasına neden olur. Bu durumda hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmez hale gelir ve nekroz gerçekleşir (65,66).

### **2.5.3. Nekroptozis**

Nekrotik hücre ölümünün büyük bir kısmı programlanmamış bir şekilde meydana gelirken, yapılan son çalışmalar nekrozisin de programlı olabileceğini göstermiştir ve bu olay nekroptozis olarak tanımlanmıştır(67). Nekroptozisin özellikle miyokard enfarktüsü (MI), kalp yetmezliği, inme gibi durumlarda önemli rolü vardır. (68).

Son yıllarda nekroptozis hücre ölüm reseptörleri aracılığı ile ortaya çıkan kaspaz bağımsız, regüle edilen ve morfolojik olarak nekroza benzeyen bir ölüm şekli olarak tarif edilmektedir. Nekroptozisin, otofajik hücre ölümü gibi temel apoptotik yolak defektif olduğunda hücre ölümü için ortaya çıkan bir destek sistemi olduğu ifade edilmiştir. Nekroptozisin, ATP düzeylerinin azalması ve  $Ca^{++}$  düzeylerinin artışı ile ortaya çıktığı,  $Ca^{++}$  artışının kalpainleri aktive ederek lizozomal parçalanmaya, katepsinler gibi protezların aktivasyonuna ve salınımına yol açarak hücrenin yok edildiği bildirilmiştir. (69) .

Klinik olarak nekroptozis özellikle hasar görmüş beyin hücrelerinde olmak üzere iskemiye giden tüm dokularda görülür. Nekroptozis özellikle, iskemik zedelenme, nörodejenerasyon ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların patogenezinde rol alır. Nekroptozis, kaspazlardan bağımsız olarak tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligand aktivasyonu ile başlar. Programlı olarak gerçekleşir ancak morfolojik olarak nekroza benzer . TNFR1 gibi ölüm reseptörleri; RIPK-1 (Receptor-interacting protein kinase 1) ve RIPK-3 (Receptor-interacting protein kinase 3) kinazlarının aktivitesine ihtiyaç duyar. Mitokondriyal, lizozomal ve plazma membranlarının disintegrasyonu bu süreci aktive eder (69-72) .

#### **2.5.3.1. Necrostatin-1**

Necrostatin-1, nekroptozis olarak tanımlanan, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a) ile indüklenmiş, programlı nekrotik hücre ölümünü, RIPK1'i inhibe ederek engelleyen bir moleküldür (69). Necrostatin grubu moleküller , 2005 yılında Degretev ve ark. (2005) tarafından sentez edilmiş ve bu moleküllerin RIP1'i inhibe ederek iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkinliğinin bulunduğu saptanmıştır (70).

##### **2.5.3.1.1. Necrostatin-1 etki mekanizması**

Nekroptozis ilk defa, 2005 yılında bulunan necrostatin molekülünün RIPK1'i inhibe etmesi vasıtasıyla, programlanmış hücre ölümünün engellenebileceğinin bulunması ile ortaya atılmış ve kabul görmüş bir kavramdır. Nekroptozis, farmakolojik veya genetik olarak kaspazın inhibe

olduğu durumlarda, TNF-a'nın aktive edilmesi ile oluşan kontrollü nekrotik hücre ölüm yolağıdır (70).

RIPK1, RIPK1 geni tarafından kodlanan, nekroptozisi de içeren birçok hücreyel olayda görev alan serin/treonin kinaz ailesinin üyesi olan bir enzimdir (71). RIPK1, kendisinin homoloğu olan RIPK3 ile fiziksel ve fonksiyonel olarak etkileşerek, pronekrotik sinyalleri iletir ve nekroptozisi başlatır (72-74). Nekroptozis sırasında RIP3 aktive olarak, RIP1 i içeren ya da içermeyen supramoleküler kompleks (Kompleks IIb)'i oluşturur (75,76). RIPK3 ün aktifleşmesini sağlayan bu kompleks, genellikle nekrozom olarak tanımlanır (77).

RIP1 ve RIP3, RHIM (RIP homotypic interaction motif) aracılığıyla iletişim kurarlar, ayrıca, ZBP1 (Z-DNA binding protein 1) ve TICAM1 (Toll-like receptor(TLR) adaptor molecule 1) gibi RHIM içeren diğer bazı moleküller de RIP3 ile etkileşerek, supramoleküler kompleks oluşturabilirler. RHIM içeren bu iki proteinin nekroptozis ile ilişkili olduğu kanıtlanmış ve RHIM'in nekrozomun aktivasyonu için vazgeçilmez olduğu saptanmıştır (78,79). RIP1 ve RIP3, kinaz kısımları açısından %33 benzerlik göstermelerine rağmen, Necrostatin-1, RIPK1' i inhibe ederken, RIPK3 ile etkileşim göstermez (80-82).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1.Gereç:

##### 3.1.1.Kullanılan Araç ve Gereçler

Biopac MP30 Amplifikatör (Dört kanalda birçok parametrenin kayıt ve analizini yapar).

MAY WBC30-440C Organ Banyosu için su sirkulatör cihazı

MAY FDT-10A Force Displacement Transducer cihazı

Langendorff Sistemi (MAY 0702)

Hassas Terazi (Sartorius BP 1215)

Santrifüj Cihazı (Janetzki T5)

UN-1208 Shimadzu Skeptrofotometre

Rotary Mikrotom (LeicaRM, Germany)

Homojenizatör

Cerrahi alet seti

Bilgisayar

##### 3.1.2. Kullanılan Deney Hayvanları:

Çalışmada 27.03.2013 tarihli etik kurul onayı ile Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM) den temin edilen 32 adet Sprague-Dawley erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince 'Hayvan Haklarının Korunması' hususundaki esaslara özenle uyuldu.

##### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler:

Sisplatin (Koçak-farma)

Ketamin HCL (Ketalor 50 mg/ml,10ml flakon, Pfizer)

Ksilazin (Rompun %2, Bayer)

Heparin (Liquemine flakon 25.000 IU, Roche)

Krebs-Henseleit Solusyonu

Northwest Life Science (NWLLC) NWK-MDA01 Kiti

**Tablo 2. Krebs Henseleit solüsyonu**

NACl	6,9 gr/L
NAHCO <sub>3</sub>	2,1 g/L
KCl	0,35 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,28 g/L
MgCl <sub>2</sub>	0,11 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,12g/L
Glukoz	2 g/L

### **3.2. Yöntem:**

Bu çalışmada DÜSAM'dan temin edilen Sprague-Dawley erkek ratlar kullanıldı. Deneyler Kontrol, Sisplatin (tek doz 5 mg/kg, i.p), Tek doz sisplatin (5mg/kg. ip) + Necrostatin-1 (1,65 mg/kg/gün. i.p, 5 gün) ve sadece Necrostatin-1 (1,65 mg/kg/gün. i.p, 5 gün) verilen grup olmak üzere toplam dört grupta yapıldı. Tek doz cisplatin verildikten beş gün sonra, anestezi altında (100 mg/kg Ketamin + 15 mg/kg Ksilazin, i.m) ve cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek bir koagulasyonu önlemek amacı ile heparinize edilen ratlarda orta hatta yapılan insizyon ile her iki böbrek çevre dokulardan temizlenerek izole edildi.

#### **3.2.1. Farmakolojik İnceleme:**

İzole edilen böbreklerden biri renal arterden kanüle edilerek perfüzyon sistemine takıldı ve peristaltik pompa yardımı ile sabit hızda 37 °C'de ısıtılan % 5 CO<sub>2</sub> ve % 95 O<sub>2</sub> karışımı ile havalandırılan Krebs Henseleit solüsyonu ile perfüze edildi.

Renal basınç değişiklikleri bir basınç transduceri ile MP30 software sistemi ile (Biopac systems) kaydedildi. Perfüzyon basınçlarındaki değişiklikler gruplar arasında karşılaştırıldı.

İzole edilen ikinci böbrek ise biyokimyasal ve histopatolojik incelemeler için kullanıldı.

### **3.2.2.Biyokimyasal İnceleme:**

Bütün guruplarda anestezi sonrasında intrakardiyak olarak alınan kanlar, serumda üre ve kreatinin düzeylerine bakılmak üzere ayrıldı. Ayrıca izole edilen diğer böbreğin bir kısmı, doku MDA (Malondialdehit) düzeyini ölçmek amacı ile ayrıldı. Dokular, Okhawa yöntemi (83) ile UN-1208 Shimadzu spektrofotometresinde, Northwest Life Science (NWLLC) NWK-MDA01 kiti ile, 532 nm’de köre karşı okundu. Sonuçlar nmol/gram doku olarak hesaplandı ve değerlendirildi.

### **3.2.3.Histopatolojik İnceleme:**

Bütün gruplarda izole edilen ikinci böbreklerin bir kısmı histopatolojik olarak incelenmek üzere %10’luk formol içerisinde konuldu. Parafin bloklara gömüldü ve Rotary Mikrotom (LeicaRM, Germany) yardımı ile 5 µm’lik kesitlere bölünüp, Hematoxylin-Eosin (H-E), Azan ve Masson Trikrom boyları ile boyandı ve ışık mikroskopu vasıtasıyla incelenip, morfolojik ve morfometrik açıdan değerlendirildi (Bar:50 µm, 20 µm).

### **3.3. İstatistiksel Değerlendirme**

Çalışmamızda elde edilen veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 16.0 (Chicago, ill., USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma Kruskal Wallis varyans analizi, ikili grupların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi  $p<0.05$  olarak kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bütün gruplarda (n=8) sonuçlar aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak hesaplanmış ve tablo 3' te toplu olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.**Gruplara ait MDA, perfüzyon basıncı, üre ve kreatinin verileri aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. (n=8) \* p<0.01 Kruskal Wallis test sonucu, <sup>a</sup> p<0.01 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>b</sup> p<0.05 Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>c</sup> p<0.01 Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında

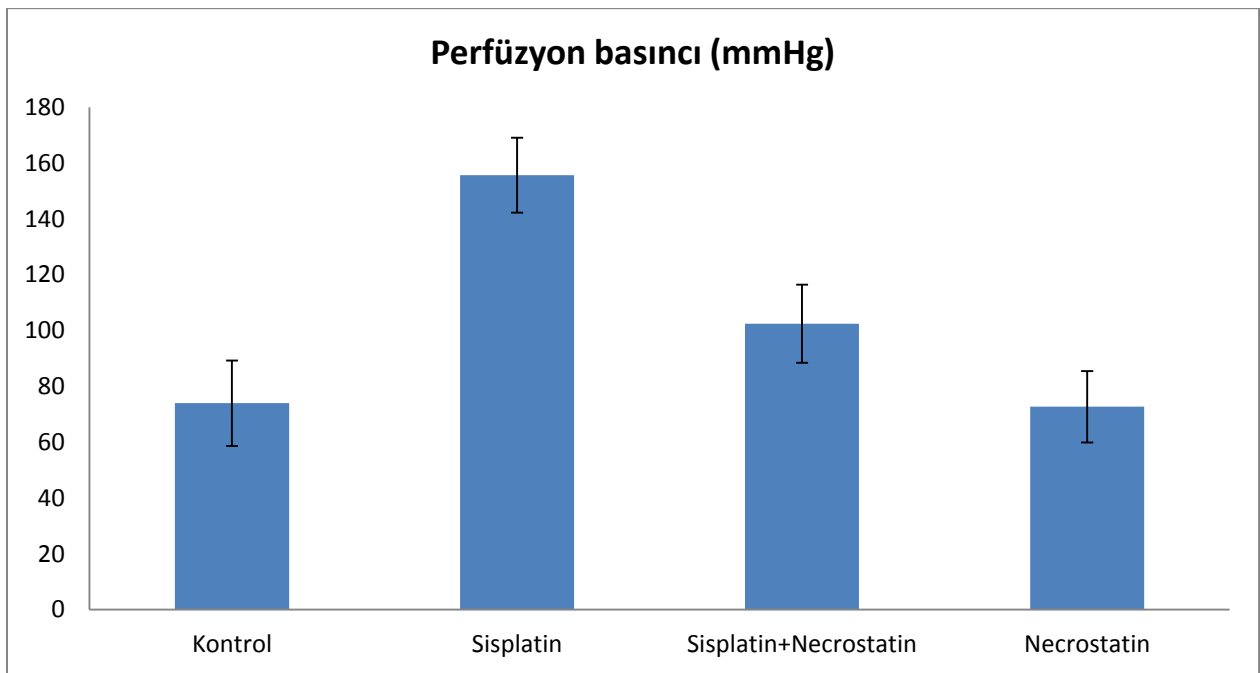
Gruplar	MDA* (nmol/gram doku)	Perfüzyon basıncı* (mmHg)	Üre* (mg/dl)	Kreatinin* (mg/dl)
Kontrol	27,59 $\pm$ 2,63	73,98 $\pm$ 15,32	41,30 $\pm$ 4,27	0,43 $\pm$ 0,05
Sisplatin	51,79 $\pm$ 15,71 <sup>a</sup>	155,68 $\pm$ 13,47 <sup>a</sup>	117,88 $\pm$ 21,48 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>
Sisplatin+Necrostatin	37,96 $\pm$ 7,74 <sup>b</sup>	102,45 $\pm$ 14,03 <sup>c</sup>	59,23 $\pm$ 20,06 <sup>c</sup>	0,68 $\pm$ 0,20 <sup>c</sup>
Necrostatin	31,97 $\pm$ 6,48	72,73 $\pm$ 12,80	47,14 $\pm$ 9,65	0,41 $\pm$ 0,03

#### 4.1.Farmakolojik Bulgular

Bütün gruplarda (n=8) stabilizasyon süresi sonunda böbrek perfüzyon basınçları mmHg olarak ölçülmüştür ( tablo 3)(Şekil.2).

Tek doz (5 mg/kg, i.p) Sisplatin verilen grupta perfüzyon basıncı Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.01).

Sisplatin +Necrostatin-1 verilen grupta ise perfüzyon basınçları Sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.01). Sadece Necrostatin-1 verilen grup ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil.2. Bütün gruplarda Perfüzyon basıncı (mmHg) (n=8)

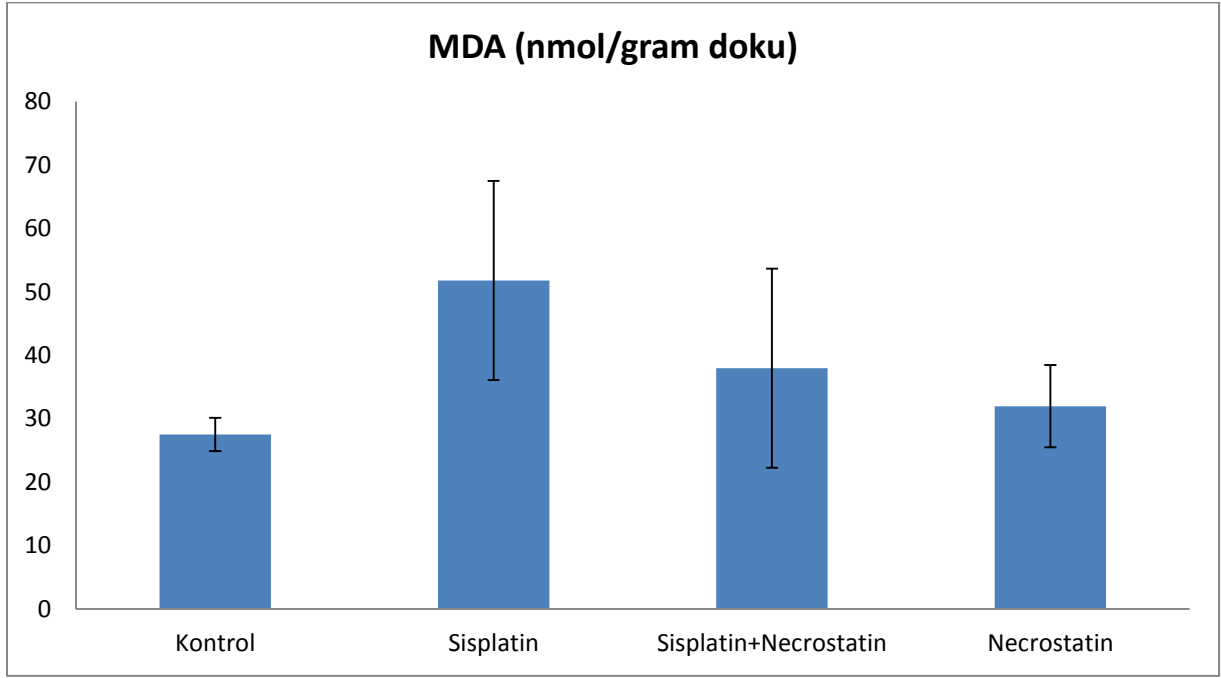
#### 4.2.Biyokimyasal Bulgular

Bütün gruplarda (n=8) izole edilen böbreklerde, doku MDA düzeyleri nmol/gram doku olarak hesaplanmıştır.( tablo 3 ).(Şekil.3)

Kontrol grubuna göre Sisplatin verilen grupta MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (p<0.01).

Sisplatin +Necrostatin-1 verilen grupta ise MDA düzeyi Sisplatin grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (p<0.05).



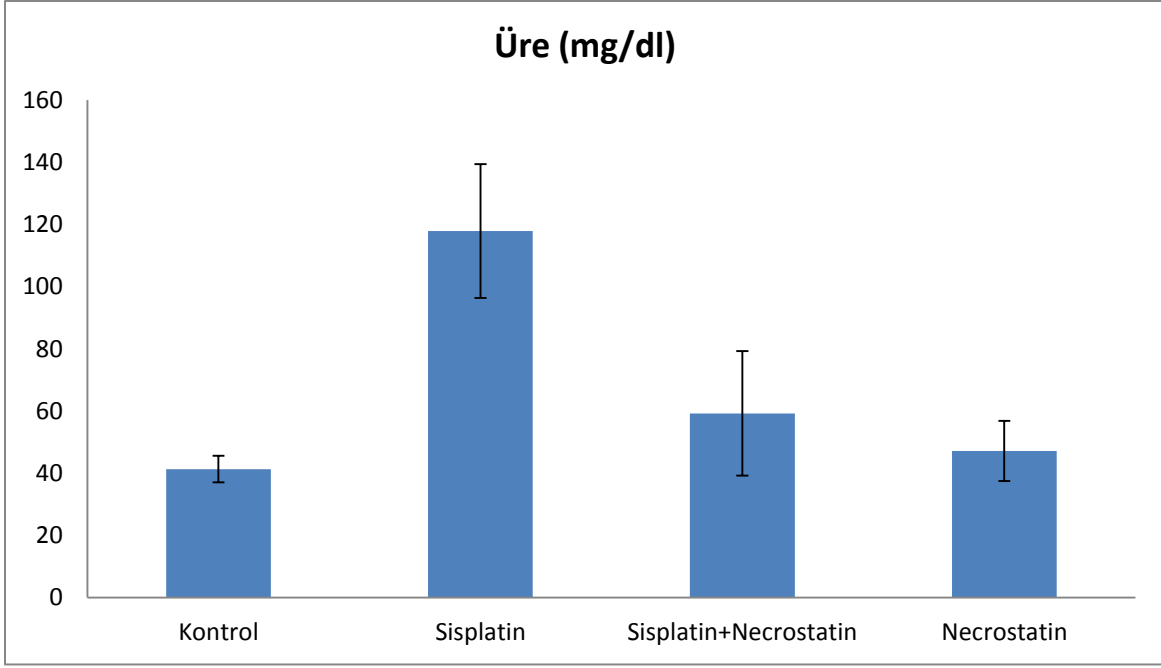


**Şekil.3.** Bütün gruplarda doku MDA düzeyleri ( nmol/gram doku) (n=8)

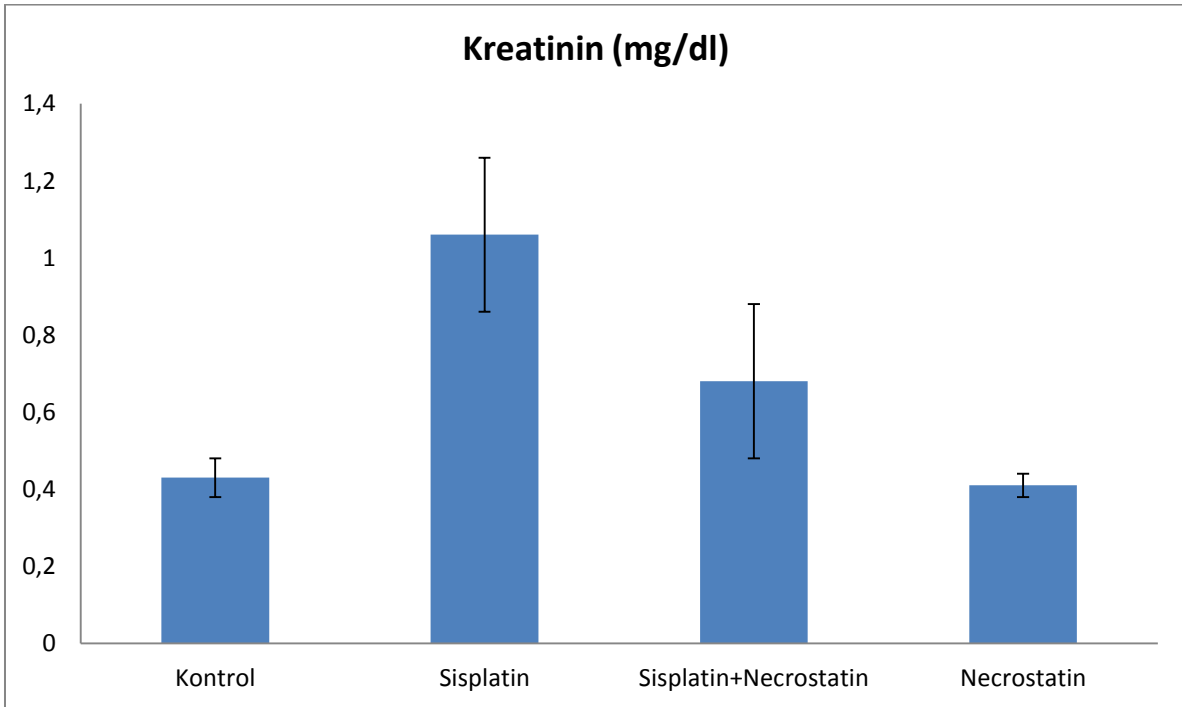
Bütün gruplarda (n=8) serum üre ve kreatinin düzeyleri mg/dl olarak hesaplanmıştır. (Tablo 3 ).(Şekil.4), (Şekil.5)

Kontrol grubuna göre Sisplatin verilen grupta üre ve kreatinin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ( $p<0.01$ ).

Sisplatin +Necrostatin-1 verilen grupta Sisplatin grubuna göre üre ve kreatinin düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır ( $p<0.01$  ).



**Şekil.4.** Bütün gruplarda serum üre düzeyleri (mg/dl) (n=8)



**Şekil.5.** Bütün gruplarda serum kreatinin düzeyleri (mg/dl) (n=8)

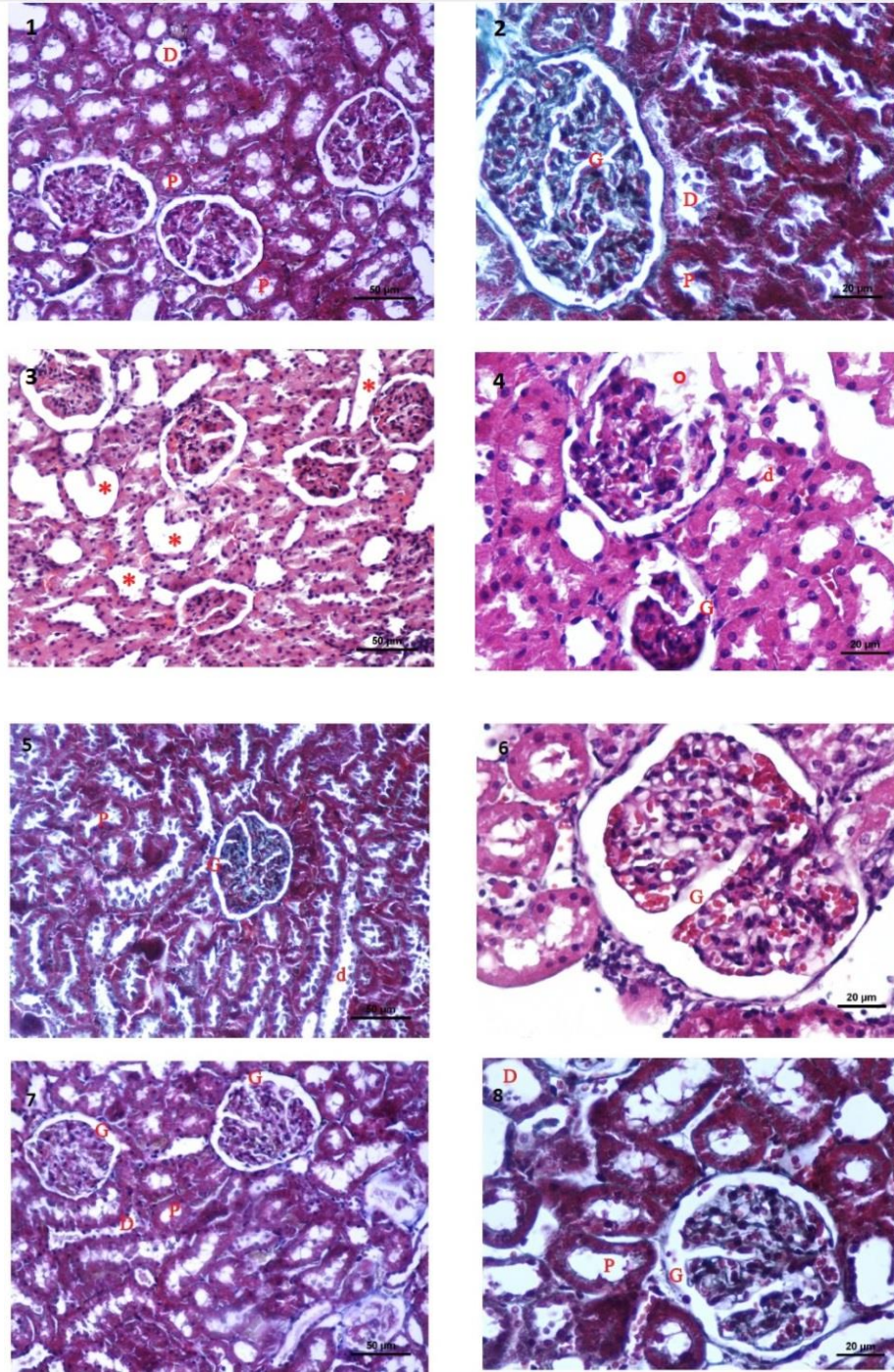
### 4.3.Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait böbrek kesitlerinde normal görünümde böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübüller ile interstisyel doku gözlemlendi (Şekil.6-1). Böbrek cisimciklerinde glomerüller yumağın düzenli görünümünün yanı sıra glomerüller bazal membranın normal kalınlıkta olduğu izlendi (Şekil.6-2).

Sisplatin grubunda böbrek korteksi incelendiğinde, en çarpıcı morfolojik değişiklikler böbrek cisimciklerinde gözlemlendi. Glomerül yapısı kısmen veya tamamen kalkmıştır (Şekil.6-3). Kortikomedüller bölgeden başlayıp kortekse doğru uzanan, lumenleri ileri derecede dilate olmuş uzun veya spiral şekilli tübüller saptandı (Şekil.6-4).

Sisplatin ile birlikte Necrostatin-1 verilen grupta böbrek cisimciklerinin çoğunun normal şekil ve yapısını koruduğu, buna karşın glomerülü hasarlanmış bazı böbrek cisimciklerinin olduğu gözlemlendi. Tübül dilatasyon ve tübül hücre hasarlarının Sisplatin grubuna göre daha az olduğu ve mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi (Şekil.6-5,6).

Necrostatin-1 verilen grupta böbrek cisimcikleri, proksimal ve distal tübüller normal yapıda izlendi (Şekil.6-7,8).



**Şekil.6.**Bütün grupların böbrek kesitlerine ait histolojik resimler ( H.E )

6-1,2 : Kontrol grubu (Bar:50 µm, 20 µm); 3,4: Sisplatin grubu (Bar:50 µm, 20 µm); 5,6: SİS+NEC grubu (Bar:50 µm, 20 µm); 7,8 : NEC grubu (Bar:50 µm, 20 µm)

G: Glomerül, P: Proksimal tübül, d: Distal tübül, B : Bowman aralığı, D : Tübül epitelinde deskuamasyon, \* : yaygın tubuler dilatasyon, o : glomerul yapısının kısmen ortadan kalkması

## 5.TARTIŞMA

Testis, over, mesane, akciğer gibi organlara ait birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili antineoplastik ilaçlardan biri olan Sisplatin'in (18) kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. İstenmeyen bu yan etkiye karşı doz kısıtlamasına gidilmekte ve bu durum tedavide aksaklıklara neden olmaktadır(19).Yaptığımız bu çalışmada sisplatin nefrotoksisitesi üzerine Necrostatin1'in koruyucu etkisi araştırılmıştır.

Sisplatinin nefrotoksisitesinin hücresel mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber özellikle oksidatif stresin önemli rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sisplatin kullanımı ile reaktif oksijen türlerinin arttığı ve bu durumun DNA hasarı ve membranlarda lipid peroksidasyonuna yol açtığı bildirilmiştir.Membran bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak ve artan osmotik basınç nedeniyle hücrenin patlaması ve hücre içeriğinin, hücreler arası boşluğa salınması ile, enflamasyonla karakterize nekrotik hücre ölümünün meydana geldiği gösterilmiştir (84). Sisplatine bağlı meydana gelen bu hücresel hasarı azaltma veya önlemek amacıyla antioksidan özelliği olduğu bilinen birçok madde ile çalışmalar yapılmıştır (85-88).

Yaptığımız bu çalışmada ratlarda sisplatin verilerek deneysel olarak oluşturulan nefrotoksisite modeli kullanılmıştır. Tek doz 5m/kg olarak verilen sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak perfüzyon basınçlarında yükselme olduğu görülmüştür.Bu da meydana gelen glomeruler hasarda ortaya çıkan vazokonstrüksiyona bağlı olarak renal arterden yaptığımız perfüzyona karşı direnç oluşmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

Sisplatin verilen grupta aynı zamanda izole edilen böbreklerde doku MDA düzeylerinin de anlamlı olarak yükseldiği görülmüştür.Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak sisplatine bağlı olarak oluşan hücre hasarında oluşan lipid peroksidasyonunun sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Sisplatin grubunda serum üre ve kreatinin düzeylerinin anlamlı olarak artması da oluşan hücre hasarını göstermektedir.

Histopatolojik olarak incelendiğinde Sisplatin grubunda glomerül yapısının kısmen veya tamamen bozulduğu, tubüller dilatasyon ve tubül hücre hasarlarının olduğu, kortikomedüller bölgeden başlayıp kortekse doğru uzanan lumenlerin ileri derecede dilate olduğu gözlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda sisplatin kullanımına bağlı nefrotoksisitenin , böbrek tutulumunun erken safhalarında histolojik olarak özellikle Proksimal tübüllerin S3 segmentinde

dilatasyon ve glomeruler hasar ile karakterize akut tübüler nekroz şeklinde olduğu gösterilmiştir (87-89). Yaptığımız çalışmada sisplatine bağlı olarak oluşan morfolojik değişiklikler ile bu hasar gözlenmiştir.

Oluşan bu sisplatin nefrotoksisitesi üzerine Necrostatin 1'in etkisini görmek amacı ile yaptığımız bu çalışmada sisplatin+Necrostatin1 verilen grupta gerek perfüzyon basınçlarındaki, gerekse biyokimyasal sonuçlardaki artışların, sisplatin verilen gruba göre anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar Necrostatin1'in sisplatine bağlı olarak oluşan hücre hasarını önlediğini ve buna bağlı olarak böbrek fonksiyonlarında düzelme olduğunu göstermektedir.

Histopatolojik olarak da Necrostatin1'in böbrek morfolojisi üzerinde düzelme yaptığı , sisplatin ile birlikte Necrostatin-1 verilen grupta böbrek cisimciklerinin çoğunun normal şekil ve yapısını koruduğu, buna karşın glomeruler hasar ve tubular dilatasyonun azaldığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bulguların Necrostatin-1 ile yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çalışmada farmakolojik ve genetik olarak kaspazın inhibe olduğu ve daha çok TNF-a'nın aktive edilmesi ile oluşan kontrollü nekrotik hücre ölüm yolağı olan nekroptozisi RIPK1'i inhibe ederek önleyen Necrostatin 1'in iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkinliğinin bulunduğu bildirilmiştir (70).

I/R hasarı üzerine Necrostatin-1'in bir apoptozis inhibitörü ile birlikte etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada , farelerde Necrostatin-1'in serebral arter oklüzyonu ile oluşan hipoksi ve I/R hasarı üzerine apoptozis inhibitörü olan humanin ile birlikte kullanıldığında koruyucu etkisinin arttığı gösterilmiştir (82).

Kalp üzerinde yapılan bir başka çalışmada da Necrostatin-1'in myokardiyal infarktüse karşı koruyucu olduğu ve morfolojik olarak iskemiye bağlı gelişen hasarı düzelttiği infarkt alanı azalttığı bildirilmiştir(90). Necrostatin-1'in, sisplatin üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada böbrek tübül hücre kültüründe, non-apoptotik mekanizma üzerinden koruyucu etkili olduğu- nekroptozisi önlediği ve apoptozis inhibitörü bir ilaç ile beraber kombine olarak verildiğinde oluşan koruyucu etkinin daha da arttığı gösterilmiştir (91). Böylece Necrostatin-1'in böbrek tübül hücre ölümünü inhibe ettiği ve akut böbrek hasarını önlediği, non-apoptotik mekanizma üzerinden hücre canlılığını sağladığı, yapılan bu hücre kültürü çalışması ile gösterilmiştir(91).

Yaptığımız bu çalışmada elde ettiğimiz, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik bulguların literatür ile uyumlu olduğu , Necrostatin 1'in, programlı nekrotik hücre ölümü olan nekroptozisi önleyici etkisi olduğu gözlenmiştir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, geniş kullanıma sahip bir antineoplastik ilaç olan sislantin ile birlikte nekroptotik hasarı önleyici etkisi olan Necrostatin-1 kullanıldığında sislantinın nefrotoksik etkisine bağılı olarak böbreklerde oluşan fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin şiddetinin önemli derecede azaldığı gözlenmiştir.

Bu bulgulara göre, sislantin ile yapılan tedavilere Necrostatin-1 eklenmesi, ilacın nefrotoksik yan etkisinin belirli ölçüde azaltılmasına bağılı olarak klinik kullanım açısından daha yararlı sonuçlar oluşturabilecektir.

## KAYNAKLAR

- 1- Brady HR, Brenner BM. Acute Renal Failure. Harrison's Principles of Internal Medicine 13th Ed. Vol.2, (Eds) Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. New York, St. Louis, San Francisco, Colorado Springs, Auckland, Bogota.
- 2- Hoste EA, Kellum JA. Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 531- 537.
- 3- Perazella MA. Renal Vulnerability to Drug Toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1275–1283.
- 4- Jones DP. Renal metabolism during normoxia, hypoxia and ischemic injury. *Annu Rev Physiol* 1988; 48: 33-50.
- 5- Elseviers MM, DeBroe ME. Analgesic nephropathy: Is it caused by multi-analgesic abuse or single substance use? *Drug Saf* 1999; 20: 15–24.
- 6- Lamieire NH, Flombaum CD, Moreau D, et al. Acute renal failure in cancer patients. *Ann of Med* 2005; 37: 13–25.
- 7- Briguori C, Colombo A, Airoidi F, et al. Nephrotoxicity of low-osmolality versus iso-osmolality contrast agents: Impact of N-acetylcysteine. *Kidney Int* 2005; 68: 2250–2255.
- 8- Van Vleet TR, Schnellmann RG. Toxic nephropathy: Environmental chemicals. *Semin Nephrol* 2003; 23: 500– 508.
- 9- Leblanc M, Kellum JA, Gibney RT, et al. Risk factors for acute renal failure: inherent and modifiable risks. *Curr Opin Crit Care* 2005; 11: 533-536.
- 10- Guo X, Nzerue C. How to prevent, recognize, and treat drug-induced nephrotoxicity. *Cleve Clin J Med* 2002; 69: 289-90.
- 11- Buckalew VM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the kidney. *A Primer on Kidney Diseases*. San Diego, 1998.
- 12- Edson RS , Terrell CL. The aminoglycoisides: streptomycin,kanamycin, gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin and sisomicin. *Mayo clin Proc.*1987 oct;62(10): 916-20.
- 13- Hottendorf GH. Comparative ototoxicity (cats) and nephrotoxicity (rats) of amikacin and gentamicin. *Am J Aled* 1977; 61: 97-104.
- 14- Branch RA. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment: a review on the use of sodium supplementation. *Arch Intern Med* 1988; 148: 2389-2396.
- 15- Fraune C, Lange S, Krebs C, et al. AT1 antagonism and renin inhibition in mice: pivotal role of targeting angiotensin II in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal*



- 16-** Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety* 2001; 24:19-38.
- 17-** Vogelzang NJ. Nephrotoxicity from chemotherapy: prevention and management. *Oncology (Huntingt)* 1991;5:97.
- 18-** Weiner, M.W and Jacobs, C.: Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc* ,1983; 42:2974-2978.
- 19-** Goldstein, RS and Mayor GH.:The nephrotoxicity of cisplatin.*Life Sci* ,1983;32:685-690.
- 20-** Boogaard PJ, Nagelkerke JF, Mulder GJ: Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem.Biol. Interact* 1990; 76: 281-291
- 21-** Fillastre JP, Godin M. Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, et al. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York: Oxford University Press 1998; 2645-2657.
- 22-** Ikarashi Y, Kakihara Y, Imai C, et al. Glomerular dysfunction, independent of tubular dysfunction, induced by antineoplastic chemotherapy in children. *Pediatrics International* 2004; 46: 570-575.
- 23-** Meister LA, mcadows AT. Late effects of childhood cancer therapy. *Curr Probl Pediatr* 1993;23,102-131.
- 24-** Fels LM, Bokemeyer C, van Rhe J. Evaluation of late nephrotoxicity in long-term survivors of Hodgkin's disease. *Oncology*,1996; 53:73-78.
- 25-** Sciler MW, Rennka HG, Venatachalam MA, Cotran RS. Pathogenesis of polycation-induced alteration's 'fusion' of glomerular epithelium. *Lab. Invest* 1977; 36:48-61.
- 26-** Watanabe A, Kakihara T, Hara Metal. Morphological differences between glomerular epithelial cells (GEC) excreted during chemotherapy with antineoplastic drugs and GEC excreted in renal discases. *Pediatr. Int* 2001; 43: 587-591.
- 27-** Fajardo LF, Eltringham JR, Stewart JR, Klauber MR. Adriamycin nephrotoxicity. *Lab. Invest* 1980; 43:242-253.
- 28-** Harmon WE, Cohen HJ, Scneeberger EE, Grupe WE. Chronic renal failure in children treated with methyl CCNU *NEJM* 1979;300: 1200-1203.
- 29-** Alpers C Cotran RS. Neoplasia and Glomerular injury. *Kidney International* 1986; 30: 465-473.
- 30-** Dabbs DJ, Striker LMM, Mignon F, Striker G. Glomeruler lesions in lymphomas and leukemias. *Am J Med* 1986;80:63-7

- 31-** Glasscock RJ, Massry SG. Neoplasia Textbook of Nephrology-Glas RJ, Massry SG(eds). Williams and Wilkins, Baltimore 1996: 1117-1123
- 32-** Skinner R, Pearson AD, English MW, Cisplatin dose rate as a risk factor for nephrotoxicity in children. *Br J Cancer* 1998; 77: 1677-1682.
- 33-** Loehrer PJ, Einhorn LH: Drugs five years later Cisplatin. *Ann Intern Med* 1984; 704-713.
- 34-** Kayaalp O, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji cilt 1 pelikan tıp ve teknik kitapçılık tic.ltd.şti. 323-333
- 35-** Emmerson BT. Toxic Nephropathy. Oxford Textbook of Medicine 3rd Ed. Vol.3 (Eds), Wearherall, DJ, Ledingham, JGG, Warrell DA. Oxford, New York: Tokyo, Oxford University Pres, 1996:3258-3267.
- 36-** Links M. Lewis C: Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 1999;57: 293-308.
- 37-** Leonard BJ, Eccleston E, Jones D, Todd P, Walpoles A: Antileukemic and nephrotoxic properties of platinum compounds. *Nature* 1971;234:43-45
- 38-** Levi J, Jacobs C, Kalman SM: Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys. *J Pharmacol Exp Ther* 1980;213:545-550.
- 39-** Anand AJ, Basbey B. Newer insights into cisplatin nephrotoxicity. *Ann Pharmacother* 1993;23:1519-1527.
- 40-** Dentino M, Luft FC, Moo N Y, et al. Long term effect of cis-diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. *Cancer* 1978; 41:1247-1251.
- 41-** Offerman, JGG. Acute effects of cis-diammine dichloroplatinum (CDDP) on renal function. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984; 12: 36-38.
- 42-** Schilsky RI, Anderson T. Hypomagnesemia and renal magnesium wasting in patients receiving cisplatin. *Ann Intern Med* 1979; 90: 929-931
- 43-** Go R, Adjel A. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol* 1999; 17: 409-422.
- 44-** Goren MP, Wright RK, Horowitz ME, Pratt CB. Ifosfamide- induced subclinical nephrotoxicity despite MESNA. *Cancer Treat Rep* 1987; 71: 127-130.
- 45-** Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB.: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The Am.J. Of Surgery* 1991; Vol161; April; 488-503
- 46-** Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

- 47-** Li C, Jackson RM.: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; 28; Feb; C;227-241.
- 48-** Emerit J, Beamont C, Trivin F.: Iron metabolism, free radicals ,and oxidative injury.*Biomed Pharmacother* 2001; 55; 333-339.
- 49-** Barber DA ,Harris SRE.: Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *Am Pharm.* 1994; Sep; NS; 34; 9; 26-35.
- 50-** Mitchell JB, Russo A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer.* 1987,55:96-104.
- 51-** Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation In guinea pigs. *Biochemical Med.* 1984,31:217-227.
- 52-** Mason RP. Free radical reactions with DNA and its nucleotids. *Basic LIFE Sci.* 1990,52:119.
- 53-** Blakely WF. Hydrogen peroxide induced base damage in DNA. *Radiat Res.*1990,121:338-343.
- 54-** Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 1993,49(3):479-480.
- 55-** Clarkson PM, Thompson HS.: Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 2000; Aug;72;2 Suppl; 637-646.
- 56-** Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36: 1-9
- 57-** Danian NN, Korsmeyer SJ. Cell death: Critical control points. *Cell.* 2004;116:205-219
- 58-**Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
- 59-** Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis:the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993; 14: 133-150.
- 60-**Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology.* 1986; 10: 995-8.
- 61-** Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
- 62-** Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: a specific form of programmed cell death. *Exp. Cell Res.* 2003; 283 (1): 1–16.
- 63-** Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007;32:37-43.
- 64-** Nicotera P, Bernassola F, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004;23:2757-2765.

- 65-** Baines CP. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol.* 2010 Nov 29;1:156.
- 66-** Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006 Jan 1;20(1):1-15.
- 67-** Christofferson, D.E, Yuan, J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr. Opin. Cell.* 2010;22,263-268.
- 68--** Russell S. Whelan, Vladimir Kaplinskiy, Richard N. Kitsis. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu. Rev. Physiol.* 2010; 72:19-44.
- 69-** Tian Xie, Wei Peng, Yexing Liu, Chuangye Yan, Jenny Maki, Alexei Degterev, Junying Yuan and Yigong Shi. Structural Basis of RIP1 Inhibition by Necrostatins, *Structure.* 2013; 21, 493–499.
- 70-** Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1:112–9.
- 71-** Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B. RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995; 513–23.
- 72-** Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates pro-programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell.* 2009;137:1112–23.
- 73-** Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009;325:332–6.
- 74-** He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell.* 2009;137:1100–11.
- 75 -** Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell.* 2012;148:213–27.
- 76-** Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity.* 2013;39:443–53.
- 77-** Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 2010;3:re4.
- 78-** Rebsamen M, Heinz LX, Meylan E, Michallet MC, Schroder K, Hofmann K, et al. DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF- $\kappa$ B. *EMBO Rep.* 2009;10:916–22.

- 79-** He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:20054–9.
- 80-** Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008, 4:313-321.
- 81-** Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1–RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137:1112-1123.
- 82-** Xu X, Chua K-W, Chua CC, Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Res*. 2010;1355:189-94.
- 83-** Ohkawa H, Oshishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 84-** Leibbrandt ME, Wolfgang GH, Metz AL, Ozobia AA, Haskins JR: Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 1995; 48: 761-770.
- 85-** Mishima K, Baba A, Matsuo M, Itoh Y, Oishi R. Protective effect of cyclic AMP against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1564-1577.
- 86-** Mohan IK, Khan M, Shobha JC, Naidu MU, Prayag A, Kuppusamy P, Kutala VK. Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by Spirulina in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58:802-808.
- 87-** Fatima S, Arivarasu NA, Mahmood R. Vitamin C attenuates cisplatin-induced alterations in renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. *Hum Exp Toxicol*. 2007; 26:419-426.
- 88-** Fujieda M, Naruse K, Hamazu T, Miyazaki E, Hayashi Y, Enomoto R, Lee E, Ohta K, Wakiguchi H, Enzan H. Effect of selenium on Cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Exp Nephrol*. 2006;104:112-122.
- 89-** Taguchi T, Nazneen A, Ruhul-Abid M, Razzaque MS: Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 2005; 148: 107-121.
- 90-** Chua BHL, Gao J, Wang H. Necrostatin-1 is a novel protector of myocardial infarction. *Circulation*, 2006;114:11-212.
- 91-** Tristao VR, Gonçalves PF, Dalboni MA et al., Nec-1 Protects against Nonapoptotic Cell Death in Cisplatin-Induced Kidney Injury. *Renal Failure*, 2012, 34(3): 373–377

## ÖZGEÇMİŞ

1966 yılı Konya doğumluyum. İlkokul öğrenimimi Şırnak ve Konya'da, orta ve lise öğrenimimi ise Ankara Atatürk Lisesin'de okudum. 1988 yılında Ankara Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesin'den mezun oldum. 1988-1989 Yılların'da Ankara Topraklık Diş Tedavi Merkezi, 1989-1997 Yılların'da SSK Diyarbakır Bölge Hastanesin'de çalıştım. 1997 yılından itibaren serbest eczacılık yapmaktayım.