

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNE KARŞI
N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ**

**Hazırlayan
İnayet GÜNTÜRK**

**Danışman
Prof. Dr. Cevat YAZICI**

Doktora Tezi

OCAK-2018

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNE KARŞI
N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ**

**Hazırlayan
İnayet GÜNTÜRK**

**Danışman
Prof. Dr. Cevat YAZICI**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TDK-2014-5056 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK-2018

KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: İnayet GÜNTÜRK

İmza:



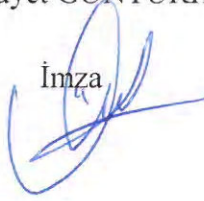
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Deneysel Sisplatin Nefrotoksisitesine Karşı N-Asetilsisteinin Etkisi” adlı Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

İnayet GÜNTÜRK

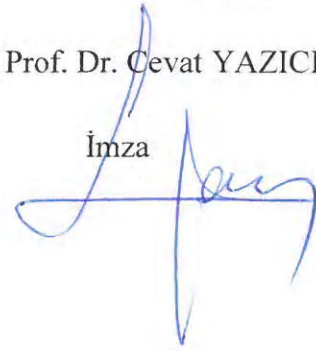
İmza



Danışman

Prof. Dr. Cevat YAZICI

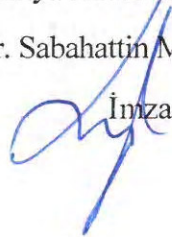
İmza



Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

İmza



Prof. Dr. Cevat YAZICI danışmanlığında **İnayet GÜNTÜRK** tarafından hazırlanan “Deneysel Sisplatin Nefrotoksisitesine Karşı N-Asetilsisteinin Etkisi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

15/ 01/ 2018

Danışman

Prof. Dr. Cevat YAZICI

Üye

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Üye

Doç. Dr. Arzu Hanım YAY

Üye

Doç. Dr. Çiğdem KARAKÜKÇÜ

Üye

Yrd. Doç. Dr. Mustafa NİSARİ

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun.....tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

.....

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yapmış olduğum doktora tez çalışmam sırasında benden yardımlarını, destek ve hoşgörülerini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Cevat YAZICI'ya, değerli ve yol gösterici katkıları için sayın Prof. Dr. Kader KÖSE'ye, histolojik çalışmalarımda gösterdiği yakın ilgi ve samimi desteği için Histoloji- Embriyoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Arzu Hanım Yay'a, yüksek lisans ve doktora öğretilerimi boyunca ders aldığım hocalarıma, çalışmalarımın her aşamasında göstermiş oldukları özveriden dolayı sevgili arkadaşım Dr. Fatma Dağlı'ya ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.



**DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİTESİNE KARŞI
N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ**
İnayet GÜNTÜRK
Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ocak 2018
Danışman: Prof. Dr. Cevat YAZICI

KISA ÖZET

Sisplatin solid organ tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan oldukça etkili kemoterapötik bir ajandır. En yaygın görülen ve klinik kullanımını sınırlayan yan etkisi nefrotoksitedir. Son yıllarda, nefrotoksisite gelişimine katılan en önemli mekanizmaların oksidatif stres ve enflamasyon olduğu öne sürülmektedir.

N-asetilsistein (NAC), doğrudan radikal yakalayıcı olarak ve/veya hücre içi redükte glutasyon düzeylerini artırarak etki gösteren bir antioksidandır.

Bu çalışmada, NAC'ın ratlarda sisplatinle indüklenen nefrotoksisite üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla, ratlar her grupta sekiz rat olmak üzere, dört gruba ayrıldı: KONT, NAC-250, CP ve CP+NAC. Sisplatin uygulaması intraperitoneal (*ip*) tek doz, 10 mg/kg rat ağırlığı ve NAC uygulaması *ip*, ardışık 3 gün, 250 mg/kg rat ağırlığı şeklinde yapıldı. Nefrotoksisite gelişimi plazma BUN, kreatinin ve idrar mikroalbümin seviyeleri ile belirlendi. Ayrıca böbrek dokularında histolojik değerlendirme yapılarak da nefrotoksisite tanısı desteklendi. Kan ve doku örneklerinde miyeloperoksidaz (MPO), nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve “high mobility group box-1” (HMGB-1) seviyeleri ölçüldü.

Sisplatinin plazma ve doku örneklerinde MPO, NF-κB ve HMGB-1 düzeyleri üzerinde etkili olmadığı, ancak NAC'ın MPO ve HMGB-1 doku seviyelerini anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte, NAC böbreklerdeki fonksiyonel ve histolojik değişiklikleri iyileştirdi.

Sonuç olarak, bu deneysel modelde sisplatin nefrotoksisitesine enflamasyonun katkısının sınırlı olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, farklı kanser hücre hatlarında çok yönlü ve birbirine zıt etkiler gösterebilen NF-κB ve HMGB-1'in seviyelerini

etkilemeksizin, böbrek fonksiyonlarını iyileştirebilen NAC'ın; tüm kanser tiplerinde, kemoterapi etkinliğini değiştirmeksizin sisplatin yan etkilerinin azaltılmasında güvenle kullanılabileceği öne sürülebilir.

.

Anahtar kelimeler: Rat, sisplatin, oksidatif stres, enflamasyon, N-asetilsistein



**THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AGAINST EXPERIMENTALLY
INDUCED CISPLATIN NEPHROTOXICITY**

İnayet GÜNTÜRK

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences, Department of
Biochemistry, Doctoral Dissertation, January 2018**

Supervisor: Prof. Dr. Cevat YAZICI

ABSTRACT

Cisplatin is a widely used and highly effective chemotherapeutic agent used in the treatment of solid organ cancers. The most common side effect that limits its clinical usage is nephrotoxicity. In recent years it has been suggested that the most important mechanisms that contribute to nephrotoxicity are oxidative stress and inflammation.

N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant, that acts directly as a free radical scavengers and/or increase intracellular reduced glutathione.

In the present study, the effects of NAC is investigated, on cisplatin induced nephrotoxicity in rats.

For this purpose, rats were divided into four groups each group including eight rats: CONT, NAC-250, CP, CP+NAC. Cisplatin was administrated intraperitoneally (*ip*), single dose, 10 mg/kg body weight and NAC was administrated *ip*, 250 mg/kg body weight for three consecutive days. Nephrotoxicity was determined by plasma BUN, creatinine and urine microalbumin levels. Nephrotoxicity was also supported by histological analysis in kidney tissue samples. In blood and tissue samples myeloperoxidase (MPO), nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and high mobility group box-1 (HMGB-1) levels were measured.

It was found out that cisplatin was not effective on MPO, HMGB-1 and NF- κ B levels in blood and tissue samples, however, NAC elevated MPO and HMGB-1 levels significantly. Nevertheless NAC ameliorated histological and functional changes in kidney tissues.

In conclusion, it can be said that inflammation has limited effect on cisplatin nephrotoxicity in this experimental design. However NAC, which can ameliorate renal

function without effecting the levels of NF- κ B and HMGB-1 that have versatile and opposite effects on different cancer cell lines, is suggested to be safely used to reduce the side effects of cisplatin without altering chemotherapy efficacy for all cancer types.

Keywords: Rats, cisplatin, oxidative stress, inflammation, N-acetylcysteine



İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
KISA ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.SİSPLATİN.....	3
2.1.1.Kimyasal Yapı.....	3
2.1.2.Terapötik Kullanımı.....	4
2.1.3.Farmakokinetik ve Metabolizma.....	4
2.1.4.Yan Etkileri.....	7
2.2.SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ.....	7
2.2.1.Akut Nefrotoksisite.....	8
2.2.2.Kronik Nefrotoksisite.....	9
2.3.SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNİN OLUŞUM MEKANİZMALARI... 9	
2.3.1.Sisplatinin Hücrede Birikimi.....	9
2.3.2.Sisplatinin Moleküler Biyotransformasyonu.....	10
2.3.3.DNA Hasarı.....	10

2.3.4.Hücresel Taşıyıcı Sistemlerin İnhibisyonu	10
2.3.5.Mitokondriyal Disfonksiyon	11
2.3.6.Sisplatin Aracılı Hücre Ölümü.....	11
2.3.6.1.Apoptotik Yolakların Aktivasyonu	11
2.3.7.Enflamasyon.....	12
2.3.7.1. High-Mobility Group Box-1 (HMGB-1):.....	13
2.3.7.2. Nükleer Faktör-Kappa B.....	15
2.3.8.Oksidatif Stres.....	16
2.3.8.1. Serbest Radikaller	16
2.3.8.2. Serbest Radikal Kaynakları	17
2.3.8.3.Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri.....	18
2.3.8.4. Miyeloperoksidaz.....	20
2.4.ANTİOKSİDAN SİSTEMLER.....	21
2.4.1.N-Asetilsistein.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. GEREÇ.....	24
3.2. ÇALIŞMA PLANI.....	25
3.3. YÖNTEM.....	27
3.3.1 Rutin Analizler	27
3.3.2. Biyokimyasal Çalışma	27
3.3.2.1. Protein Tayini.....	28
3.3.2.2. MPO Tayini	29
3.3.2.3. NF-κB Tayini	31
3.3.2.4. HMGB-1 Tayini	33
3.3.3. Histolojik Değerlendirme	35
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	37

4. BULGULAR	38
4.1.FİZİKSEL BULGULAR.....	44
4.2. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA BULGULARI.....	46
4.2.1. Rutin Çalışma Bulguları	46
4.2.2. Biyokimyasal Çalışma Bulguları.....	48
4.3. HİSTOLOJİK ÇALIŞMA BULGULARI.....	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
6. KAYNAKLAR.....	83

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

AIF:	Apoptoz indükleyici faktör
ApG:	Adenin-platin-guanin
ATP7A/7B:	Bakır taşıyıcı p tipi ATPaz
BUN:	Kan üre azotu
Ctr:	Bakır taşıyıcı
CV:	Değişim katsayısı
DAMP:	Hasar ilişkili moleküler patern molekülleri
DEKAM:	Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
dk.:	dakika
DMTU:	Dimetiltiyoüre
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ER:	Endoplazmik retikulum
ETS:	Elektron transport zinciri
ETZ:	Elektron Transport Zinciri
GFR:	Glomerüler filtrasyon hızı
GGT:	Gama glutamil transferaz
GpG:	Guanin-platin-guanin
GSH:	Redükte Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon peroksidaz
GSSG-Rd:	Glutasyon redüktaz
GST:	Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HMGB-1:	High mobility group box-1
HOCl:	Hipokloröz asit
İκB:	İnhibitör kappa B
IKK:	İnhibitör kappa B Kinaz
IL:	İnterlökin
<i>ip</i> :	İntraperitoneal
<i>iv</i> :	İntravenöz
KAT:	Katalaz
KKr:	Kreatinin klirensi
KONT:	Kontrol
MAPK:	Mitojen aktive protein kinaz

MATE:	Çoklu ilaç ve toksin atılım taşıyıcısı
MDA:	Malondialdehit
MPO:	Miyeloperoksidaz
mtDNA:	Mitokondriyal deoksiribonükleik asit
NAG:	N-asetil β D-glukozaminidaz
NET:	Nükleotid eksizyon tamiri
NF- κ B:	Nükleer faktör-kappa B
NO:	Nitrik oksit
NOX:	NADPH oksidaz
O ₂ ⁻ :	Süperoksit
OCT:	Organik katyon taşıyıcı
OD:	Optik dansite
OH:	Hidroksil radikali
ONOO-:	Peroksinitrit
PARP-1	Poli ADP-riboz polimeraz 1
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PRR:	Patern tanıma reseptörleri
RAGE:	İleri glikasyon son ürünleri reseptörleri
SF:	Serum fizyolojik
-SH:	Sülhidril
SOD:	Süperoksit dismutaz
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
TLR:	Gişe benzeri reseptörler
TNF:	Tümör nekrozis faktör
TNFR:	Tümör nekrozis faktör reseptörü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışma grubunu oluşturan ratların deney planı	26
Tablo 3.2. Doku protein ölçümünde kullanılan yöntemin CV değeri.....	29
Tablo 3.3. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği	35
Tablo 3.4. Hematoksilen-eozin boyama tekniği	36
Tablo 3.5: Tanımlama ve skora tablosu	36
Tablo 4.1. Sisplatin dozunu belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları	38
Tablo 4.2. Sakrifikasyon zamanını belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları.....	39
Tablo 4.3. Sisplatin/ NAC uygulama sırasını belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları.....	43
Tablo 4.4. Ana çalışma gruplarının deney planı	43
Tablo 4.5. Rat vücut ağırlıkları	44
Tablo 4.6. Çalışma öncesi ve sonrası ratların 24 saatlik idrar hacimleri.....	45
Tablo 4.7. Ratların çalışma öncesi ve sonrası idrar üre azotu ve kreatinin değerleri	46
Tablo 4.8. Ratların çalışma öncesi ve sonrası idrar mikroalbümin düzeyleri	47
Tablo 4.9. Ratların çalışma sonrası plazma BUN ve kreatinin düzeyleri	47
Tablo 4.10. Ratların plazma MPO düzeyleri	48
Tablo 4.11. Ratların plazma NF- κ B düzeyleri.....	48
Tablo 4.12. Ratların plazma HMGB-1 Düzeyleri.....	49
Tablo 4.13: Ratların doku MPO düzeyleri	49
Tablo 4.14. Ratların doku NF- κ B düzeyleri	50
Tablo 4.15. Ratların doku HMGB-1 düzeyleri.....	51
Tablo 4.16. Histolojik çalışma sonuçları	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Platin türevi ilaçların kimyasal yapıları	4
Şekil 2.2. Sisplatin DNA Bağlanmaları	7
Şekil 2.3. Serbest oksijen radikalleri	17
Şekil: 3.1 Albümin standart grafiği	29
Şekil 3.2. MPO standart grafiği.....	31
Şekil 3.3. NF-κB Standart grafiği.....	33
Şekil 3.4. HMGB-1 Standart grafiği.....	35
Şekil 4.1. Kontrol grubu böbrek dokusu histolojik görünümü (HE, x200).	52
Şekil 4.2. Kontrol grubu böbrek dokusu histolojik görünümü (HE, x400).	52
Şekil 4.3. NAC-250 grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x200).....	52
Şekil 4.4. NAC-250 grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x400)..	52
Şekil 4.5. CP grubu böbrek dokularının histolojik görünümü (HE, x200).....	53
Şekil 4.6. CP grubu böbrek dokularının histolojik görünümü (HE, x400).....	53
Şekil 4.7. CP+NAC grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x200).....	53
Şekil 4.8. CP+NAC grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x400).....	53

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin [cis-diaminodikloroplatin (II)], genital, üriner sistem, baş, boyun ve akciğer malign tümörlerinin tedavisinde yoğun olarak kullanılan bir antineoplastik ajandır (1). Daha az toksik ve klinik kullanımı daha kolay, alternatif platin bileşiklerinin geliştirilmesi için gösterilen yoğun klinik ve deneysel araştırmalara rağmen; sisplatin halen yaygın bir şekilde reçete edilmekte ve farklı solid organ tümörleri tedavi rejimlerinin standart bir bileşeni olmaya devam etmektedir (2).

Tümör hücre direnci, ototoksisite, nörotoksisite, kardiyotoksisite, nefrotoksisite gibi yan etkiler, ilacın klinik olarak kullanımını kısıtlayan nedenlerdir. Bunlar arasında en sık rastlanılan ve bu nedenle de klinik kullanımını en sık engelleyen yan etki, nefrotoksisitedir (3).

Sisplatin çoğu hücre komponenti ile etkileşime girse de, ilacın biyolojik hedeflerinin başında deoksiribonükleik asit (DNA) gelir (4). Ancak proksimal tübül hücreleri, bölünmeyen hücreler olduğundan nefrotoksik etkinin DNA hasarı mekanizmalarından farklı olduğu düşünülmektedir. Nefrotoksisite gelişiminde farklı mekanizmalar öne sürülmekle beraber, en yaygın kabul gören ve araştırılan mekanizmalar apoptoz, oksidatif stres ve enflamasyondur (5).

Serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin aşırı miktarda üretildiği ya da antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı durumlarda, oksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması oksidatif stres olarak adlandırılır. (6). Sisplatin ile ortaya çıkan SOR artışı hem doğrudan biyomoleküllerle etkileşerek hasara neden olabilir hem de farklı yollara etki ederek enflamasyonu tetikleyebilir (7). Literatürde SOR artışı ve enflamasyonun sisplatin aracılı nefrotoksisiteye katkısı gösterilmiştir (8).

Sistein amino asidinin N-asetil türevi olan N-asetilsistein (NAC), klinikte yıllardır kullanılmakta olup hem antioksidan hem antienflamatuvar özellikleri gösterilen bir ajandır (9).

Bu çalışmada, deneysel sisplatin nefrotoksisitesi oluşturulan ratlarda, hem oksidatif stres hem de enflamasyon ile ilişkili olduğu bilinen miyeloperoksidaz (MPO), nükleer faktör-kappa B (NF-κB) ve “high mobility group box-1” (HMGB-1) düzeyleri değişiminin ve NAC’ın bu parametrelerle birlikte nefrotoksisiteye etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. SİSPLATİN

Sisplatin, *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂] veya *cis*-diaminodikloroplatin (II), kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan en potent kemoterapötik ilaçlardan biridir. Sisplatinin keşfi, diğer metal içeren bileşiklerin de kanser tedavisinde kullanımına olan ilgiyi tetikleyen bir etken olmuştur (10). Sisplatinin klinik kullanımı; baş, boyun, akciğer, testis, over gibi pek çok solid organ tümörünün tedavisinde başarılı sonuçlar sağlamıştır (2). Ancak sisplatin ve türevlerinin kullanımını kısıtlayan yan etkileri de mevcuttur (10).

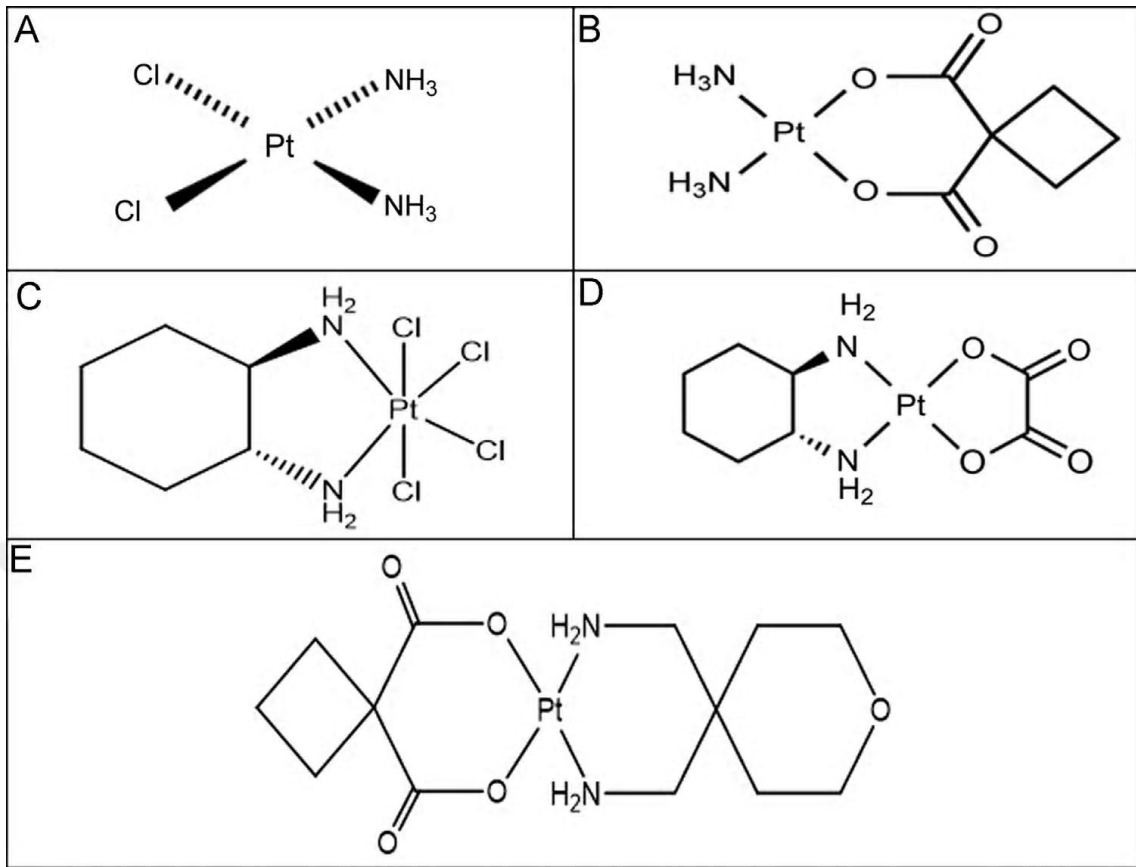
2.1.1. Kimyasal Yapı

1965 yılında, Barnett Rosenberg, inert platin elektrotu bulunan büyüme çözeltisi içerisinde, *Escherichia coli* bakteri bölünmesinin inhibisyonuna bağlı olarak, hücrenin filamentöz bir şekil aldığını gözlemlemiştir. Bu durumun platin iyonları nedeniyle oluştuğunu tespit etmesi üzerine sisplatinin tümör hücre büyümesini de durdurabileceğini öne sürmüştü ve bu buluşla birlikte sisplatin kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Rosenberg çalışmalarında ayrıca inhibisyondan sorumlu olan formun “*cis*” formu olduğunu, “*trans*” formunun ise etkisiz olduğunu bildirmiştir (1).

Sisplatin, *cis* konfigürasyonunda merkezi bir platin atomunu çevreleyen, iki klor atomu ve iki amonyak molekülünden oluşur. Bağ açıları sabittir ve DNA’ya bağlanmada yapısal uyum sağlarlar. Farklı platin bileşikleri de benzer şekilde aynı merkezi yerleşimli platin atomuna sahipken, diğer gruplar açısından farklılık gösterirler (11).

Sisplatinin yanısıra nedaplatin, oksaliplatin, lobaplatin, karboplatin ve heptaplatin gibi birçok platin türevi klinik çalışmalarda test edilmiştir; sadece karboplatin ve oksaliplatin klinik kullanım için onay almıştır (10).

Platin türevi ilaçların kimyasal yapıları Şekil 2,1’de gösterilmiştir (12).



Şekil 2.1. Platin türevi ilaçların kimyasal yapıları: A-Sisplatin; B-Karboplatin; C-Oksaliplatin; D-Ormaplatin; E-Enloplatin (12)

2.1.2. Terapötik Kullanımı

Mide-bağırsak kanalından absorbe edilmeyen sisplatin, sadece intravenöz (*iv*) uygulanır. İnsanlarda kullanılan dozu, 5 gün boyunca 20 mg/m²/gün; 3-4 hafta boyunca 20-30 mg/hafta veya 4 haftada bir 100 mg/m² şeklindedir. Renal toksisiteyi önlemek üzere, tedavi öncesi 1000-2000 mL serum fizyolojik (SF) infüzyonu ile klor diürezisi sağlamak önemlidir. Uygun miktarda sisplatin, dekstroz ve salin solüsyonlarında dilüe edildikten sonra, 4-6 saat boyunca *iv* uygulanır (13).

2.1.3. Farmakokinetik ve Metabolizma

Platinin %90'dan fazlası plazma proteinlerine kovalent bağlı bulunurken; sitozolde serbest formdadır. İntravenöz enjeksiyondan 12 gün sonra bile plazmada önemli miktarda platin saptanabilir (11). Uygulama sonrası başlangıç plazma eliminasyon yarı ömrü 25-50 dakika (dk.) kadardır; serbest ve bağlı formdaki ilaç konsantrasyonu daha sonra 24 saat veya daha uzun süreli bir yarılanma ömrü ile düşmeye başlar (13).

Böbrek, karaciğer, bağırsak ve testislerde yüksek konsantrasyonda bulunan sisplatinin, santral sinir sistemine penetrasyonu ise çok zayıftır (13).

Uygulanan ilacın 24 saate kadar %25'i; 5 güne kadar %43'ü idrarla atılır. Safra ve intestinal atılımı minimal düzeydedir (13).

Serbest platin klirensi, kreatinin klirensinden (KKr) yaklaşık %156 daha fazladır. Bu durum ekskresyona ek olarak sisplatin ve metabolitlerinin böbrek tarafından sekrete edildiğini gösterir. Diğer bir ifadeyle renal hücrelerde aktif olarak birikime uğrayan sisplatin, pasif transportla da tübüllere sekrete edilmektedir (11).

Sisplatinin intraselüler transport mekanizması çok açık değildir ve hücre tipine göre değişiklik gösterir. Önceleri sisplatinin hücre içine girişinin 60 dk.'ya kadar lineer olması, 1 mM'a kadar doyumluğa ulaşmaması, analoglarla inhibe edilebilmesi gibi nedenlerle pasif difüzyon yolu ile olduğu düşünülmekteydi. Daha sonra yapılan çalışmalarda hücre içi platin ve bakır düzeyleri arasında doğrudan bir ilişkinin gösterilmesi; sisplatinin bakır transport proteinleri aracılığı ile hücreye alındığı görüşünü desteklemiştir (4). Bazıları da bakır geçişinden de sorumlu olan, sisplatinin hücre membranından geçişini kolaylaştıran çeşitli taşıyıcı proteinler gösterilmiştir; bakır taşıyıcı 1 (cupper transporter 1: Ctr1) ve Ctr2, bakır taşıyıcı P tipi ATPaz'lar (ATP7A ve ATP7B), organik katyon taşıyıcılar (organic cation transporters: OCT1 ve OCT2) ve çoklu ilaç ve toksin atılım taşıyıcısı-1 (multidrug and toxin extrusion transporter-1: MATE-1) (14, 15). Özellikle karaciğer ve böbrek gibi sekreter dokularda OCT2 ve MATE-1 eksprese edilirken, diğer taşıyıcılar daha genel dağılım gösterir (14).

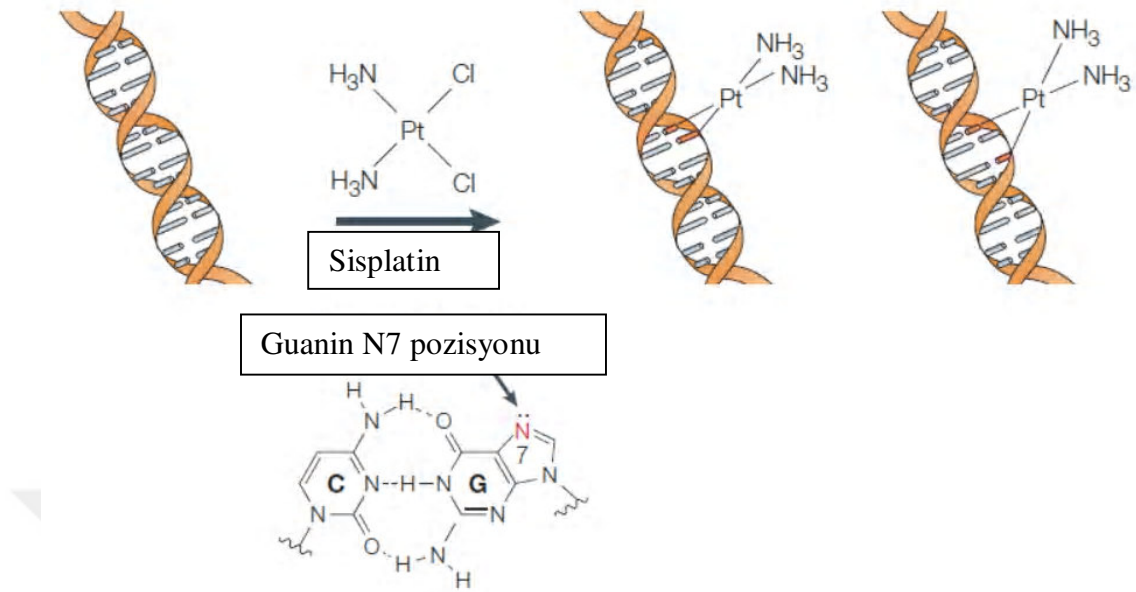
Yüksek affiniteli bir bakır transport proteini olan Ctr1'i kodlayan gendeki herhangi bir delesyon veya mutasyonun hem maya hem de fare hücrelerinde sisplatin direncinde artışa ve platin düzeylerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Ancak insan Ctr1'in aşırı ekspresyonu hücrelerde sisplatin birikimini artırsa da sitotoksik hedeflere ulaşımını etkilememektedir. Sisplatinin bakır düzeyleri ile ilişkisini gösteren bir başka kanıt da hücre dışına çıkışı ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir. Hücre bakır seviyelerinin regülasyonunda önemli rol oynayan ATP7B, sisplatinin hücreden çıkışından sorumludur ve dolayısıyla sisplatin direnciyle ilişkilidir (4).

Renal sistemde, sisplatinin hücre içine taşınmasında özellikle OCT'ler rol oynar. Bu proteinler renal tübül hücrelerinde sadece sisplatinin değil, farklı katyonik bileşiklerin de bazolateralinden apikale transportuna aracılık eder. Böbrekte sisplatin alımında kritik

olan OCT2'dir, diğer platin türevlerinin ise bu proteinle etkileşimi gösterilmemiştir. OCT1 ise özellikle karaciğerde eksprese edilir. Farklı dokulardaki farklılaşmış ekspresyon paterni sisplatinin organ spesifik toksisitesinin nedeni olarak düşünülebilir (7). Rodentlerde, erkek hayvanlarda dişilere göre OCT2 ekspresyonu daha yüksek olmakla birlikte, OCT1 ve 2'nin her ikisinin de renal ekspresyonunun proksimal tübül bazolateral membranında çok yüksek olduğu gösterilmiştir (14).

Sisplatin hücreye girdiğinde, üzerindeki klor atomları sitoplazmada su molekülü veya hidroksil iyonları ile yer değiştirerek aktive olur; "monoaqua" $[\text{cis}-(\text{NH})\text{PtCl}(\text{HO})]^+$ ve "diaqua" $[\text{cis}-(\text{NH})\text{Pt}(\text{HO})]^{2+}$ olarak isimlendirilen formlar oluşur. Bu hidroliz olmuş ürünler sisplatine göre 1000 kat daha reaktif olan güçlü bir hidrofildir ve proteinler üzerindeki sülfidril grupları ve nükleik asitler üzerindeki nitrojen donörleri gibi herhangi bir nükleofil grupla etkileşime girerler (12). İntraselüler klor konsantrasyonu (20 mM) kandakine (100 mM) göre oldukça düşük olduğundan, dolaşımında değişmeden kalan sisplatin hücre içinde hidroliz olur (3). Hidrasyon hücre içerisinde ve idrarda düşük klor konsantrasyonlarında daha fazladır, bu durum nefrotoksisiteyi önlemede klor diürezinin etkisini açıklar (13). Yüksek klor konsantrasyonlarında ise sisplatin nötral formda kalır ve biyolojik olarak bu formun inaktif olduğu düşünülür (11).

Sisplatin çoğu hücre komponenti ile etkileşime girse de DNA ilacın biyolojik hedeflerinin başında gelir (4). Sisplatin pürin artıkları üzerindeki N7 reaktif merkeze bağlanır ve kanser hücrelerinde DNA hasarına, hücre bölünmesinin durdurulmasına ve apoptotik hücre ölümüne neden olur (3,12). DNA-platin etkileşimleri özellikle guanin rezidüleri üzerinde olur, ikinci klor aynı zincirde başka bir baz ile bağlanarak zincir içi çapraz bağlanmalar oluşur, ayrıca karşı zincirin pürin residüleri ile bağlanmalar yaparak zincirler arası çapraz bağlanmalar da oluşturabilir (15). Sisplatin ile pürin bazlarının 1,2 zincirler arası çapraz bağları DNA'da meydana gelen değişiklikler arasında en önemli olanıdır (3, 12). Zincir içi bağlanmalar %90 oranında guanin-platin-guanin (GpG) ve %10 oranında ve adenin-platin-guanin (ApG) bağlanmalarını içerir. Zincirler arası ve non fonksiyonel bağlanmalar da sisplatin toksisitesine katkı sağlar (12).



Şekil 2.2. Sisplatin DNA Bağlanmaları (4)

2.1.4. Yan Etkileri

Sisplatin alan hastalarda doz sınırlayıcı ciddi yan etkiler görülebilmektedir. Başarılı bir kanser kemoterapisi için bu toksisitenin kontrol edilmesi kritiktir. Yan etkileri arasında genel hücresel hasarın neden olduğu bulantı, kusma, kemik iliği baskılanmasına bağlı azalmış kan hücreleri üretimi, enfeksiyona azalmış cevap (immünosupresyon) sayılabilir. Daha spesifik olan yan etkileri ise nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisitedir (10).

Klinik kullanımını, antikanser etkinliğini kısıtlayan ve doz sınırlamasına yol açan en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir (16). Başlangıç dozları olan 50-100 mg/m² sisplatin tedavisi alan hastalarda bile yaklaşık % 28-36 oranında akut renal yetmezlik gelişmektedir (11).

2.2. SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ

Böbrekler sisplatin atılımından sorumlu primer organ olduğundan, toksisitesine de oldukça duyarlıdır. Platin yoğun olarak plazma proteinlerine bağlanır. Proteinlere bağlanmayan serbest platin bileşikleri, yüksüzdür ve düşük molekül ağırlığına sahiptir. Bu nedenle renal glomerüler bariyeri serbestçe geçer ve daha az oranda da tübüler epitelden idrara sekrete edilir (14, 16). Tübüler reabsorpsiyonu ile ilgili bir bilgi yoktur. Sisplatin hem proksimal hem distal tübülde birikirerek, nefrotoksik etkileri oluşturur.

Toksik etki özellikle dış medullada yerleşik olan proksimal tübül S3 segmentinde belirgindir (16).

Sisplatin ile indüklenen nefrotoksisite, tübüler hücrelerde renal disfonksiyonla sonuçlanan ılımlı ve geri dönüşümlü yapısal değişikliklerden, kronik ve progresif renal yetmezliğe kadar farklılık gösterebilir. Kronik yetmezlik tekrarlayan uygulamalardan ve yüksek dozlardan sonra ortaya çıkabilir (16). Nefrotoksisite sadece renal yetmezlik olarak düşünülmemelidir. Hidrasyon ve diürez terapisinden önceki dönemlerde yaklaşık %100 olan akut renal hasar, günümüzde sisplatin tedavisi alan hastaların yaklaşık %20-30'unda görülmektedir. En yaygın komplikasyon hipomagnezemi iken diğer sık görülen komplikasyonlar arasında Fanconi benzeri sendrom, distal renal tübüler asidoz ve renal konsantrasyon defektleri sayılabilir (1, 14).

Hayvan çalışmalarında nefrotoksisite gelişimi ilk kez 1971 yılında, azotemi ile birlikte giden akut tübüler nekroza işaret eden histopatolojik değişikliklerle gösterilmiştir (2). Daha sonraki çalışmalarda sisplatinle indüklenen nefrotoksisite fare, rat, köpek ve insanlarda da gösterilmiştir (11).

Tipik olarak, renal yetmezliğin ortaya çıkışı sisplatin uygulamasından birkaç gün sonra başlar, serum kreatinin ve kan üre azotu (Blood Urea Nitrogen; BUN) konsantrasyonlarında artışla gösterilir. İdrar çıkışı genellikle korunur (non-oligürik) ve proksimal tübül disfonksiyonunu gösterecek şekilde idrarda glukoz ve düşük miktarda protein görülebilir. Renal fonksiyonların geri kazanımı 2-4 haftada gerçekleşir veya bazı durumlarda hiç gerçekleşmeyebilir. Başarılı tedavi protokolleri sırasında alınan önleyici girişimlere rağmen, progresif ve kalıcı nefrotoksisite oluşabilir. (2).

2.2.1. Akut Nefrotoksisite

Klinik olarak sisplatin kaynaklı akut nefrotoksisite, değişmiş tübüler fonksiyon, azalmış glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve çoğunlukla geri dönüşümlü renal hasar ile gösterilir. Renal hasar, ılımlı sub-lethal değişikliklerden nekrotik hücre ölümüne kadar farklılık gösterebilir. Ortaya çıkan akut renal yetmezlik sisplatin uygulamasından sonraki 3 saat içinde böbrek kan akımında azalma ile karakterizedir ve bu durum GFR'nin azalmasına öncülük eder. Bu hipofiltrasyon ise minimal proteinüri, artmış BUN ve kreatinin seviyeleri ile ilişkilidir. Diğer yaygın komplikasyonlar ise hipomagnezemi, hiponatremi, hipokalsemi ve hipokalemi gibi elektrolit anomalilerinin

varlığıdır. Bu ciddi tuz kaybı ortostatik hipotansiyon gelişmesi ile sonuçlanabilir ve hatta hastaların çok az bir kısmında görülse de distal tübüler asidoza neden olabilir (16).

Poliüri sisplatin uygulamasına devamlı olarak eşlik eder ve iki ayrı fazda oluşur. İlk 24-48 saatte idrar ozmolalitesi düşer ve bu dönemde GFR normaldir. Bu erken poliüri genellikle spontan olarak düzelir. İkinci faz 72. ve 96. saatler arasında oluşur, GFR düşer ve bu durum kalıcı olur. Alanin aminopeptidaz, alkalen fosfataz, gama glutamiltransferaz (GGT) ve N-asetil β D-glukozaminidazın (NAG) artmış üriner ekskresyonu sisplatine bağlı proksimal tübüler hasarın önemli belirteçleridir (16).

2.2.2. Kronik Nefrotoksisite

Kronik sisplatin nefrotoksisitesi olan hastalar, değişmiş nefron yapısı, progresif nefron fonksiyon bozukluğu ve geri dönüşümsüz renal hasar gösterirler. Klinik işaretler, artmış BUN, serum kreatinin seviyeleri, artmış üriner elektrolit ekskresyonu, proteinüri ve enzimürinin eşlik ettiği kalıcı ve sıklıkla progresif GFR azalması ile karakterizedir. Kronik nefrotoksisite genellikle terapiden 5 ay kadar sonra gözlenir ve kalıcı renal hasara işaret eder (16).

2.3. SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNİN OLUŞUM MEKANİZMALARI

Sisplatin nefrotoksisitesinin oldukça karmaşık ve multifaktöriyel olan patofizyolojisini çeşitli başlıklar altında incelemek, mekanizmayı daha anlaşılır kılacaktır.

2.3.1. Sisplatinin Hücrede Birikimi

Sisplatin, böbreklerden hem glomerüler filtrasyonla hem de tübüler sekresyonla uzaklaştırılır. Böbrek sisplatin konsantrasyonunun kan dolaşımındaki miktarın üzerinde olması renal parankimal hücrelerde aktif birikimi destekler. Sisplatinin hücre içine alınmasında rol oynayan transport sistemlerinden olan Ctr1, böbrekte oldukça fazla eksprese edilir ve proksimal tübül bazolateral membrana yerleşiktir. Ctr1 ekspresyonunun “down-regüle” edildiği *in vitro* koşullarda, böbrek hücrelerine sisplatin girişinde ve sitotoksisitede azalma saptanmıştır (1, 2). Bir diğer sisplatin taşıyıcı mekanizma olan ve yine proksimal tübül bazolateralinde eksprese edilen OCT2, sisplatinin böbrek dokusunda birikiminden sorumlu olan ana taşıyıcı proteindir, (2, 3,16). OCT2 substratlarından olan simetidinin, yarışmalı inhibisyon mekanizması ile hücreye sisplatin girişi ile sitotoksisiteyi (*in vitro*) ve nefrotoksisiteyi (*in vivo*) azalttığını gösteren çalışmalar vardır (2).

2.3.2. Sisplatinin Moleküler Biyotransformasyonu

Sisplatinin, fare ve ratlarda glutatyonla konjugasyonu ile oluşan ve sisplatinden daha potent bir nefrotoksin olan reaktif tiyol bileşiklerine dönüştüğü gösterilmiştir (1, 14). Bu süreç dolaşımında, glutatyon-S-transferaz (GST) aracılığıyla, glutatyon konjugatlarının oluşumu ile başlar. Glutatyon konjugatları glomerülü rahatlıkla geçtiğinden, proksimal tübül hücre yüzeyinde eksprese edilen gama glutamil transferaz tarafından sisteinil-glisin konjugatlarına yıkılır. Ardından proksimal tübül hücrelerinde eksprese edilen aminodipeptidazlar tarafından sistein konjugatlarına yıkılırlar. Proksimal tübül hücrelerine alınan sistein konjugatları sistein-S-konjugat beta liyaz tarafından oldukça reaktif tiyollere metabolize edilirler. Bu ürünler de nefrotoksik özellik göstererek, sisplatin nefrotoksisitesinin oluşumuna katkıda bulunur (14).

2.3.3. DNA Hasarı

Antitümör etkinliğine benzer şekilde, sisplatin normal böbrek hücrelerinde de DNA ile zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanmalar oluşturur; hücre döngüsünü durdurarak DNA replikasyonunu inhibe eder (1, 16). Ayrıca sadece nükleer değil mitokondriyal DNA (mtDNA) da sisplatinin hedefleri arasındadır ve mtDNA'ya bağlanma oranı nükleer DNA'ya nazaran 4-6 kat daha fazladır (1). Renal proksimal tübüllerin sisplatine hassasiyetini destekler şekilde mitokondrilerin en yoğun olduğu bölgeler bu hücrelerdir (1, 2). Çeşitli yollar ile mtDNA deplesyonu oluşturulan hücreler sisplatine karşı oldukça dirençli hale gelirler. MtDNA'nın DNA tamir mekanizmalarının nükleer DNA'ya göre yetersiz olmasının, MtDNA'yı hasara daha duyarlı hale getirdiği iddia edilmiştir (2).

2.3.4. Hücresel Taşıyıcı Sistemlerin İnhibisyonu

Sisplatin kaynaklı nefrotoksisite proksimal tübül hücrelerinin fonksiyon kaybı ile karakterizedir. Özellikle renal fırçalı kenar membranların taşıyıcı aktivitesi inhibe olur; apikal ve bazolateral sodyum taşıyıcıları aracılığı ile düzenlenen su, besin ve elektrolit transportu bozulur. Bu hasar sitoskeleton bütünlüğünü ve hücre polaritesini sürdürebilmek için hidrojen, potasyum, magnezyum ve kalsiyum iyonlarının azalmış reabsorbsiyonuna ve artmış üriner ekskresyonuna neden olur. Ek olarak tübüler epitel hücre bariyerinin ve/veya bağlantı noktalarının kaybı glomerüler filtratın yeniden dolaşıma kaçışına dolayısıyla GFR azalmasına neden olur (16).

2.3.5. Mitokondriyal Disfonksiyon

Mitokondriyal disfonksiyon sisplatin ile indüklenen renal hasarda anahtar rol oynar. Sisplatinle tedavi edilen ratlarda membran elektrokimyasal potansiyelinde bozulma, kalsiyum homeostazisinde dengesizlik, azalmış ATP sentezi ve bozulmuş mitokondriyal solunum gösterilmiştir. Sisplatin kompleks 1, 2 ve 3'te süperoksit anyonunun (O_2^-) oluşumunu arttırarak solunum zincirinin komplekslerinde hasara neden olabilir (3). *In vivo* sisplatin uygulaması aynı zamanda membran elektrokimyasal potansiyelinde bozulma sonucu mitokondriyal kalsiyum alımında azalmaya ve mitokondriyal antioksidan sisteminde zayıflamaya neden olur (2).

Pozitif yüklü metabolitlere hidrolize olan sisplatin negatif yüklü mitokondride birikme eğilimi gösterir (3). Sisplatin nefrotoksisitesinde mitokondriyal disfonksiyon oldukça erken dönemde ortaya çıkabilir ve kritiktir (16). ATP sentez hızındaki bir azalma hücrede strese ve sonuçta kaspaz aracılı apoptoza ayrıca serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin artışına neden olur (1).

2.3.6. Sisplatin Aracılı Hücre Ölümü

Sisplatin apoptoz ve nekroz olmak üzere iki farklı hücre ölümü modelini indükler. Fare proksimal tübül hücre kültüründe 800 μ M gibi yüksek sisplatin konsantrasyonlarında nekrozun, 8 μ M gibi düşük konsantrasyonlarda ise apoptozun indüklendiği bildirilmiştir. Daha sonraları, her iki mekanizmanın sisplatinle uyarıldığı *in vivo* olarak da gösterilmiştir. Terapötik dozlar apoptoz ile ilişkili olduğundan yapılan çalışmalar özellikle bu yönde olmuştur (3).

2.3.6.1. Apoptotik Yolakların Aktivasyonu

Renal tübüler epitel hücreler (RTEH)'de sisplatin tarafından farklı apoptotik mekanizmalar tetiklenir. Ana yolaklar; mitokondri tarafından tetiklenen intrinsik yolak ve tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör/ligand ve Fas/Fas ligand sistem aracılı ekstrinsik yolaktır (3).

İntrinsik veya Mitokondriyal Apoptotik Yolak

Renal tübüler epitel hücrelerde gerçekleşen mitokondriyal hasar; sitokrom c, Smac/DİABLO, Omi/HtrA2, apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi apoptogenik faktörlerin salınımına yol açar. Sitokrom c'nin sitozole göçü kaspaz aktivasyonunda anahtar bir olaydır ve ardından gelen olayların akışı şu şekildedir; Apaf-1/sitokrom c apoptozomunun oluşumu, kaspaz 9 aktivasyonu, sonuç olarak da (infazcı) kaspaz 3 aktivasyonu (3, 12). Smac/DİABLO ve Omi/HtrA2, sitokrom c/ Apaf-1/ kaspaz 9 aktivasyon yolağına dâhil olan apoptoz süpresörleri olan apoptoz inhibitör proteinlerini baskılar. Omi/HtrA2 aynı zamanda kaspazlardan bağımsız olarak kendi serin proteaz aktivitesi ile de apoptozu uyarabilir. AIF ise nükleusa geçebilen ve apoptozu kaspaz aktivasyonu olmaksızın tetikleyen bir proteindir (3).

Sisplatin mitokondriyal apoptotik yolları, artmış SOR üretimi; sit c, AIF ve Omi/HtrA2 salınımını indükleyen ve dış mitokondri membranının geçirgenliğini arttıran pro-apoptotik proteinlerin aktivasyonu gibi farklı şekillerde de tetikleyebilir (3).

Ekstrinsik Yolak

Ekstrinsik apoptotik yolak, hücrelerin stoplazmik membranında bulunan ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman aktive olur böylece kaspaz 8 ve ardından da kaspaz 3 aktivasyonu ile sonuçlanır (3, 16). Sisplatin hem TNF alfa ekspresyonunu hem de onun reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2'yi artırır. TNFR1 ekstrinsik apoptotik yolağı doğrudan indüklerken; apoptozu tetikleyebilecek bir domaine sahip olmayan TNFR2 ise esas olarak enflamatuvar cevapla ilişkilidir, ek olarak TNFR1'in etkisini de artırır (3).

Sisplatin aynı zamanda Fas ligand/reseptör sistemini de uyarır. Fas ve TNFR1'in her ikisi de Fas ilişkili ölüm domaini ile etkileşime girerek kaspaz 8 üzerinden kaspaz 3 aktivasyonuna ve hücre ölümüne neden olur. Aynı zamanda mitokondride artmış SOR oluşumunun Fas-1 ekspresyonunda ve TNF aracılı apoptozda rol oynadığı da gösterilmiştir (3).

2.3.7.Enflamasyon

Bir immün reaksiyon olan enflamasyon, patojenlere karşı konakçı savunmasında hayati önem taşır. Patojene yanıt olarak başlar; nötrofil ve makrofaj gibi enflamatuvar hücrelerin birikimi, patojenin fagositozu, çeşitli sitokin ve kemokinlerin salınması ve bu

moleküllerin lenfositleri aktive ederek immün yanıtı başlatması ile devam eder. Enfeksiyona yol açan patojenin ortadan kaldırılmasıyla ya da patojenin ortadan kaldırılamadığı durumlarda, kronik enflamatuvar yanıtların başlatılmasıyla sonlanır (17).

Travma, iskemi reperfüzyon hasarı veya kimyasal doku hasarı sonrasında, herhangi bir mikroorganizma olmaksızın gerçekleşen enflamatuvar durum ise “steril enflamasyon” olarak adlandırılır. Steril enflamatuvar yanıtlarda, mikrobiyal enflamasyona benzer şekilde, nötrofil ve makrofajların proliferasyonu; TNF ve interlökin (IL) gibi proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salınması gerçekleşir (18).

Steril enflamatuvar yanıtlar mikrobiyal enfeksiyon sırasında görülen olaylara benzer olduğundan, mikroorganizmalara karşı oluşan immün yanıtlara aracılık eden reseptörler steril enflamasyonda da yer alabilir. Patern tanıma reseptörleri (Pattern Recognition Receptor; PRR) olarak adlandırılan reseptörler mikroorganizmaların tanınmasında ve ardından uygun proenflamatuvar cevabın indüklenmesinde önemlidir. Özgül ligandı ile bağlanan bu PRR’ler, nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ve tip 1 interferon yolaklarını uyararak proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimini ve salgılanmasını başlatırlar (17).

PRR’ler, hasar ilişkili moleküler patern molekülleri (Damage-associated Molecular Pattern; DAMP) olarak bilinen endojen molekülleri de tanırlar (18). DAMP’lar normal fizyolojik koşullarda hücre içinde yerleşen ve böylece immün sistemden gizlenen, ancak hücrel stres veya hasar koşullarında hücre dışına çıktığında immün sistemi tetikleyen moleküllerdir (19). Nekrotik hücre ölümü sonrasında serbestleşen IL-1a ve IL-33, ısı-şok proteinleri, ATP, ürik asit ve kromatin ile ilişkili bir protein olan high-mobility group box-1 (HMGB-1) (18, 19) ile ekstraselüler matriks yıkımı sonrası açığa çıkan hyaluronan ve heparan sülfat steril enflamasyonu başlatabilen DAMP’lardan bazılarıdır (18).

2.3.7.1. High-Mobility Group Box-1 (HMGB-1):

HMG proteinleri, ilk olarak 1973 yılında Goodwin ve Johns tarafından, asitle ekstrakte edilebilen kromatin bileşenleri şeklinde sığır timusundan izole edilmiş ve tanımlanmıştır (20). Elektroforetik göçlerinin oldukça hızlı olması nedeniyle “High-Mobility Group” olarak isimlendirilmişlerdir. Nükleus ve mitokondride DNA’ya bağlanan yapısal

proteinler olmaları, sitoplazmada sinyal düzenleyici ve ekstraselüler ortamda enflamatuvar sitokinler olarak rol oynamaları, HMG proteinlerini oldukça popüler hale getirmiştir (21).

HMG proteinleri her biri farklı karakteristik fonksiyonel sekansa sahip olan 3 üst aileye ayrılmıştır; HMGB, HMGN ve HMGA. Fonksiyonel kısım; HMGB için HMG 'boxes' kutuları, HMGN için nükleozom bağlayıcı protein ve HMGA için AT kancalarıdır. HMGB ailesi HMGB-1, HMGB-2 ve HMGB-3 olmak üzere, %80 oranında aynı amino asit sekansına sahip üç üye içerir (22). Aralarında ilk izole edilen HMGB-1'dir (23).

HMGB-1, pozitif yüklü bir "Box A" ve "Box B", bir de asidik C kuyruğu olmak üzere üç bölüm içeren 215 aminoasitten oluşur. Taşıdığı domainlerle birlikte 25-30 kDa kadardır. Bir tanesi "Box A" da diğeri "Box B" ve C kuyruğu arasında olmak üzere iki nükleer lokalizasyon sekansı içerir. "Box B" sitokin aktivitesi gösterirken "Box A" bunun antagonisti olarak işlev görür (24).

Birçok hücrede HMGB-1 üretilebilir ancak üretim miktarı hücrenin yaş ve gelişimine göre değişiklik gösterir. İlk olarak nükleusta gösterilmesine rağmen, hücre döngüsünün fazına göre değişmekle beraber, nükleus ve sitoplazma arasında geç edebilir. Beyin ve karaciğer dokusunda sitoplazmada bulunurken lenfoid hücrelerde hem sitoplazma hem nükleusta lokalizedir. Ayrıca bu protein ekstraselüler ortama nekrotik veya hasarlı hücrelerden pasif olarak veya enflamasyon durumunda aktive olmuş makrofaj, monosit ve dentritik hücrelerden aktif olarak salınabilir (23).

HMGB-1 için en az on bir farklı reseptör tanımlanmıştır. Bunlar arasında HMGB-1'in biyolojisinin anlaşılmasında önemli olan ve üzerinde en çok çalışılanlar ileri glikasyon son ürünleri reseptörleri (receptor for advanced glycation end-products, RAGE), gişe benzeri reseptörler (Toll-like receptors, TLR) TLR2, TLR4 ve TLR9'dur. HMGB-1'in bu reseptörlere bağlanması, NF- κ B bağımlı transkripsiyon yolağının aktivasyonu dolayısıyla da proenflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin salınımı ile sonuçlanır (23). Reseptör tercihi ve buna bağlı olarak aktivitesi, 23, 45 ve 106. sistein residülerinin redoks durumuna göre farklılık gösterir (24).

Nükleusta en bol bulunan non-histon protein olan HMGB1, burada DNA şaperonu gibi rol oynar. Ayrıca DNA replikasyonuna, transkripsiyonuna, rekombinasyonuna ve onarımına da katılır. Bunların yanında p53, p57, retinoblastoma protein, östrojen

reseptörleri, NF- κ B gibi çoğu sekans spesifik transkripsiyon faktörünün de DNA bağlanma afinitesini de artırır (25).

HMGB1 sekans spesifitesi göstermeksizin hasarlı DNA molekülüne olduğu kadar tek veya çift zincirli DNA molekülüne de bağlanabilir. Böylece nükleozom yapısının stabilizasyonunda rol oynar. İntraselüler aktivitelerinin yanısıra farklı hücre tiplerinde çeşitli reseptörler üzerinden birçok mekanizmayı tetikleyen sitokinler olarak da işlevleri bilinmektedir (23).

Oksidatif DNA hasarı olan canlı hücrelerde HMGB-1 birikimi, bu proteinin DNA hasarına erken cevapta rol oynadığını göstermektedir (26).

2.3.7.2. Nükleer Faktör-Kappa B

İlk olarak 1986 yılında Sen ve Baltimore tarafından aktive olmuş B hücrelerinde tanımlanan (27) NF- κ B; hücrel cevapta rol oynayan 150' den fazla genin ekspresyonuna katıldığı bilinen, beş üyesi olan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir (28). NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), Rel A (p65), RelB ve c-Rel (27, 28) şeklinde sınıflandırılan bu üyeler homodimer/ heterodimerleri oluşturarak farklı DNA bağlanma özellikleri ve transaktivasyon potansiyelleri olan kompleksler üretirler (28, 29). Bu ailenin her üyesi korunmuş bir N terminal bölge (Rel-homoloji domain) içerir ve bu bölge dimerizasyon, nükleer lokalizasyon ve DNA bağlama domainleri taşır (28).

Birçok hücre tipinde inaktif NF- κ B kompleksleri, inhibitör kappa B (I κ B) olarak bilinen, inhibitor proteinlerle kovalent etkileşimler yaparak sitoplazmada tutulurlar (28). TNF alfa, IL-1b, IL-6 gibi sitokinler, viral/bakteriyel patojenler, DNA hasarına neden olan ajanlar, TNFR, SOR gibi etkenlerle I κ B kinaz (IKK) aktivitesi sonucu I κ B'nin fosforilasyonu ile bu kompleks aktive olur (27, 30). Sonuç olarak aktive NF- κ B nükleusa geçer ve spesifik genlerin "enhancer" veya "promoter" bölgelerine bağlanır (28).

NF- κ B'nin sağlıklı kişilerde, B ve T hücrelerinin gelişimi, proliferasyonu ve fonksiyonunda önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte ateroskleroz, astım, tümör oluşumu, AIDS, diyabet, müsküler distrofi, enflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi pekçok patolojik durumla ilişkisi gösterilmiştir (28).

Sisplatin, İKB üzerinden NF-κB'yi fosforile ederek nükleusa translokasyonunu indükler. Nükleus içerisinde aktive olan NF-κB, TNF alfa'yı da içeren enflamatuvar mediyatörlerin transkripsiyonuna yol açar (31). TNF alfa kaspaz 8 aktivasyonuna neden olurken ek olarak da proenflamatuvar sitokin ve kemokinlerin aktivasyonu ile lökositöze, oksidatif strese ve renal hasara neden olur (3).

Özellikle hidroksil radikali (OH[•]) aracılı SOR artışına neden olan NF-κB ve TNF alfa, aynı zamanda SOR ile indüklenebilir. Bu kısır döngü antioksidan savunma sisteminin tolere edemeyeceği bir biçimde sürekli ve aşırı SOR üreterek, karbohidratlar, proteinler, nükleik asitler ve lipitler üzerinde oksidatif hasar oluşumuna neden olur (3).

2.3.8. Oksidatif Stres

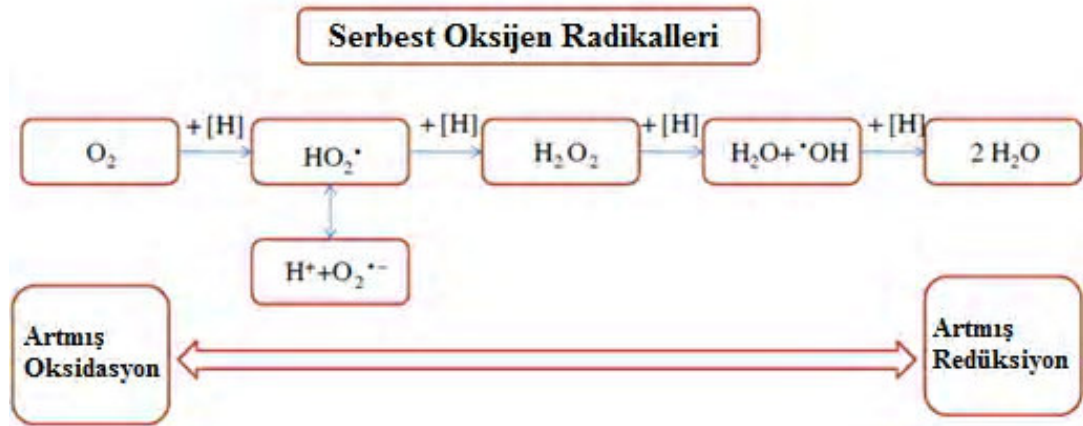
Oksidatif stres, organizmada serbest radikallerin üretimi ve antioksidan savunma sistemi tarafından tüketimi arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanabilir (32).

Sisplatin uygulaması ile renal tübüler hücre hatlarında, böbrek dokularında ve hayvanlarda çeşitli SOR türlerinin artışının gösterilmesi ile oksidatif stresin sisplatin nefrotoksisitesine katkı sağlayan önemli bir faktör olduğu uzun zamandır kabul edilmektedir. Bu patolojik durumda SOR oluşmu için üç mekanizma önerilmiştir. Bunlardan ilki sisplatinin akua formunun hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutasyon dâhil olmak üzere tiyol içeren moleküller ile hızlı etkileşimidir. Bir diğeri, mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle SOR üretiminin artması ve sonuncusu da sitokrom p450 sistemi aracılığı ile SOR oluşumunun artmasıdır (7).

2.3.8.1. Serbest Radikaller

Dış orbitalinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron taşıyan, serbest bulunabilen atom veya moleküllere serbest radikal denmektedir. Eşlenmemiş elektronlara sahip oluşu o radikali kararsız, kısa ömürlü ve oldukça reaktif hale getirir. Bu radikaller en dış orbitallerine ya bir elektron alarak ya da bu elektronu vererek, kararlı hale gelmeye çalışırlar. Elektronlarını verdikleri veya elektron aldıkları diğeri moleküller de “radikal” haline gelir. (33).

SOR ve serbest nitrojen radikalleri (SNR) terimleri serbest radikalleri ve diğeri radikal olmayan reaktif türleri içine alır (33). SOR türevleri şekil 2.3'te gösterilmiştir (34).



Şekil 2.3. Serbest oksijen radikalleri (34)

2.3.8.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikaller normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Sigara, ksenobiyotikler, ilaçlar, ağır metaller, pestisitler, radyasyon, mental stres, yoğun egzersiz veya yaşlanma gibi ekzojen ve bunların yanında bir takım endojen kaynaklar intraselüler SOR/SNR oluşumuna katılır. İntraselüler SOR üretiminin en fazla olduğu bölgeler mitokondriyal elektron transport sistemi (ETS), NADPH oksidaz (NOX) kompleksleri ve endoplazmik retikulum (ER)'dir (35).

Metabolik reaksiyonlar sırasında en sık oluşan ve en önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı olanlardır (33). Moleküler oksijen farklı orbitallerinde iki eşlenmemiş elektron taşımaya rağmen tam anlamıyla bir radikal sayılmaz (35). Ancak bu orbital yapısından dolayı her seferinde tek elektron kabul eder. Moleküler oksijenin bu eşlenmemiş elektronları geçiş metalleri ve organik radikallerle hızlı etkileşimine izin verir. Tek elektron transferinin diğer bir sonucu da oksijenin $O_2^{\cdot -}$ 'e indirgenbilmesidir (36).

Hücresel metabolizma sırasında elektronlar, indirgenmiş halde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve flavin adenin dinükleotid (FAD)'den ETS'ye transfer edilir. ETS sırasında elektronların kompleksler arası taşınması ve kompleks 1, 3 ve 4 enzimlerinde proton gradiyenti oluşması ve kompleks 5'in aktivasyonu sonucu, oksidatif fosforilasyon denilen olayla ATP sentezlenir. Oksidatif fosforilasyon süresince oksijen son elektron alıcı olarak kullanılır ve reaksiyonların sonucu olarak da moleküler oksijen suya indirgenir. Ancak elektron kaçaklarından dolayı bu sistem mükemmel değildir. Elektronların matriks içine ve hücre sitozolüne sızıntısı sonucu enerji

üretimindeki azalmanın yanı sıra oksijenin O_2^- 'e indirgenmesi söz konusudur. Tahmini olarak serbest oksijen radikallerinin %90'ı ETS' den elektron kaçakları sonucu oluşur. (37). Dolayısıyla bu organel O_2^- oluşumunun primer alanını oluşturur (35).

HücreSEL SOR üretimi için bir diğer ana kaynak da primer fonksiyonu SOR üretmek olan NOX kompleksleridir. Bunlar çok sayıda alt birimden oluşan, yedi farklı üyesi olan bir enzim sınıfıdır. NOX'ların spesifik selüler ve sub-selüler dağılımları, hücre motilitesi gibi SOR aracılı çeşitli fonksiyonların düzenlenmesindeki önemini temelini teşkil eder (35).

Ayrıca ksantin oksidaz, açıl koA oksidaz gibi peroksizomal enzimler, NADPH bağımlı oksidazlar, lipoksijenaz, siklooksijenaz, myeloperoksidaz (MPO), nitrik oksit sentaz gibi enzimler de yine endojen serbet radikal kaynakları arasında sayılabilir (35, 37).

2.3.8.3. Serbest Radikallerin Moleküler Hedefleri

SOR/SNR yaşayan sistemler için hem faydalı hem toksik bileşikler olarak iki yönlü rol oynar. İlmli veya düşük seviyelerde, immün fonksiyon, hücre sinyal yollarına katılma, mitojenik cevap ve redoks düzenleme gibi yararlı fonksiyonları yanında yüksek konsantrasyonlarda SOR/SNR biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olan, sırasıyla oksidatif ve nitrozatif stres oluştururlar. Oksidatif ve nitrozatif stres, bir tarafta aşırı SOR/SNR üretimi diğer tarafta antioksidanların eksikliği durumunda gelişir. Daha önemlisi aşırı SOR, diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, respiratuvar hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda DNA, protein ve lipitleri içeren çeşitli biyomoleküllerin yapısında hasara neden olabilir (33).

Serbest radikaller nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar ve proteinler, gibi biyomoleküllere hasar vererek fonksiyon kaybına yol açar ve patolojik sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Oksidatif stresin primer hücreSEL hedefi hücre tipine, serbest radikalın özelliğine ve oluşum yerine (hücre içi/dışı), oluşan stresin derecesine ve hedefe yakınlığına ve ortamın antioksidan savunma gücüne göre farklılık gösterebilmektedir (38).

Deoksiribonükleik asit ve ribonükleik asit: MtDNA SOR oluşum yerine yakınlığından dolayı nükleer DNA'ya kıyasla SOR saldırısına daha duyarlıdır. SOR özellikle de OH \cdot , DNA'nın pürin/pirimidin bazları ve şeker omurgasını içeren bütün komponentleri ile doğrudan etkileşime girebilir ve DNA'da tek ve çift zincir

kırılmalarına neden olur. RNA ise, tek zincirli yapısı, aktif tamir mekanizmalarının ve şaperonlarının azlığı ve mitokondriye olan konumsal yakınlığı nedeniyle SOR ataklarına karşı DNA'dan daha hassastır (33).

Lipitler: membran lipitleri özellikle fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikal aracılı oksidasyona oldukça duyarlıdır. Lipit peroksidasyonu, membran akışkanlığının azalması, membrana bağlı enzim ve reseptör aktivasyonunun azalması gibi membran fonksiyon bozukluklarına yol açması nedeniyle oldukça önemlidir. Lipit peroksidasyonu bir yağ asidinin metilen grubundan serbest radikallerle etkileşimi sonucu hidrojen atomunun çıkarılması ve lipit radikallerinin oluşumu ile başlar. Bu radikal de lipit peroksil radikali (LOO[·]) oluşturmak üzere moleküler oksijenle etkileşime girer. Oluşan bu LOO[·] diğer lipitlerle etkileşerek zincirleme bir reaksiyon başlatabilir veya siklizasyon reaksiyonu aracılığıyla yeniden düzenlenir ve malondialdehit, hidroksinonenal gibi DNA ve proteinlerde hasara neden olan toksik son ürünler oluşur. İzoprostanlar da yine araşidonik asitin lipit peroksidasyon ürünüdür ve oksidatif lipit hasarının önemli belirteçleridir (33).

Karbonhidratlar: Deoksi şekerlerin serbest karbon ve hidrojenleri SOR tarafından okside edilebilir ve sonuçta karbon merkezli radikaller oluşur. diğer karbonhidratlarla bu radikaller arasında etkileşim sonucu otokatalitik bir reaksiyon kaskadı başlamış olur. Ketoaminler ve ketoaldehitler, karbonhidratların en yaygın oksidasyon ürünleridir (32).

Proteinler: Oksidatif protein modifikasyonları veya başka bir deyişle protein oksidasyonu, posttranslasyonel modifikasyonların önemli bir kısmını oluşturur. Bu modifikasyonlar geri dönüşümsüz veya geri dönüşümlü olabilir (39). Oksidatif stres durumunda oluşan okside moleküllerin yaklaşık %70'i protein yapısında oluşu oksidanların primer hedefinin proteinler olduğuna işaret etmektedir (40). Bu reaksiyonlar, O₂^{·-}, OH[·], peroksil, alkoksil, hidroperoksil gibi radikal veya hidrojen peroksit (H₂O₂), ozon, hipokloröz asit (HOCl) gibi radikal olmayan türlerle indüklenebilir (41). SOR aminoasit yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein/protein çapraz bağlanmalarına ve protein fragmentasyonlarına neden olan protein omurga oksidasyonuna yol açabilir (42).

Oksidatif protein modifikasyonları farklı üç aşama gösterebilir. İlk aşama ılımlı bir oksidasyon hızı ile karakterizedir. İkinci aşamada ek olarak protein katlanmaları bozular. Son aşamada ise okside proteinler daha ileri derecede kronik olarak okside

olurlar ve birikirler. Bu aşamada proteinler benzer oksidasyon durumundaki proteinlerle kovalent çapraz bağlar yapabilirler. İleri derecede okside olmuş proteinler, malondialdehit ve hidroksinonenal gibi lipid peroksidasyon ürünleri ile de çapraz bağlanmalar yaparak “lipofuskin” olarak adlandırılan agregat oluşumuna neden olurlar. Bu ileri derece okside olmuş agregatlar proteazların yıkımına dirençli olduklarından organizmada birikirler. Çeşitli biyolojik sıvılarda bu agregatların ölçümü protein oksidasyonunun derecesi hakkında fikir verebilir (41).

Meydana gelen bu modifikasyonlar proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında bozulmalara böylece de aktivite, stabilite ve solubilité değişimlerine neden olmaktadır. Dahası hücrel proteom bütünlüğü aynı zamanda fosforilasyon, ubikuitinasyon, asetilasyon gibi düzenlenmiş posttranslasyonel mekanizmalara bağlıdır ve bu mekanizmaları düzenleyen enzimler de oksidatif modifikasyonların hedeflerindedir (40).

2.3.8.4. Miyeloperoksidaz

Yoğun bir şekilde glikozilasyona uğramış, “hem peroksidaz” süper ailesinin bir üyesi olan, peptid yapıda bir enzimdir. Molekül ağırlığı 146-150 kD kadardır ve iki benzer dimerin disülfid bağları ile bağlanmasıyla oluşan bir tetramerdir (43). MPO nötrofillerin azurofilik granülleri içinde paketlenir ve mikrobiyal aktiviteye karşı oluşturulan spesifik olmayan immün savunma sistemine katılır (44). MPO dolaşımında primer olarak azurofilik granüllerde bulunsa da aynı zamanda monositlerde de varlığı gösterilmiştir. Ancak monositlerin dokularda makrofajlara farklılaşması sonucunda kayboldukları öne sürülmektedir. Enflamatuvar bir durum olmadığında ekstravasküler dokuda MPO bulunmamakla birlikte enflamasyon alanında nötrofil infiltrasyonunun en erken sonucu doku MPO aktivitesidir (45).

MPO'nun esas substratı NOX aracılı solunumsal patlamada moleküler oksijenden süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ile sentezlenen H_2O_2 'dir. Enzim esas olarak klor ve hidrojen peroksidin oldukça potent bir antimikrobiyal oksidan olan HOCl'ye enzimatik dönüşümünü katalizler. Diğer halidleri de substrat olarak kullanabilmesine rağmen klor diğer halidlere oranla çok daha yüksek konsantrasyonda bulunduğundan başlıca ürün olarak HOCl kabul edilmektedir. Ancak doğrudan ya da HOCl ile brom reaksiyonu ile dolaylı olarak önemli miktarda hipotiyosiyanat da üretmektedir (45).

HOCl; lipid, DNA ve lipoproteinlere karşı, halojenizasyon, nitrasyon ve oksidatif çapraz bağlanmaları içeren modifikasyon reaksiyonlarını başlatır. Ayrıca proteinlerin tiyoeter ve sülfidril gruplarını okside ederken, amino gruplarından kloraminlerin oluşumuna neden olur (43). *In vivo* ve *in vitro* koşullarda HOCl biyomoleküllerle, tiyol içeren moleküllerle, nitrojen bileşikleriyle veya çift karbon bağı içeren moleküllerle reaksiyona girebilir. HOCl'nin protein aminoasit rezidüleriyle reaksiyonu sonucu hızlı bir şekilde aldehitlere yıkılan mono- ve dikloraminler oluşurken; tirozin rezidüleriyle reaksiyonu ile 3 klorotirozin ve 3,5 diklorotirozin oluşumu gerçekleşir (46).

MPO ayrıca nitrik oksit (NO)'in oksijenle oksidasyonu sonucu ortaya çıkan nitritin, güçlü bir nitratlayıcı ajan olan nitrojen dioksit radikaline dönüşmesini de katalizler (47).

2.4.ANTİOKSİDAN SİSTEMLER

Biyolojik bir antioksidan, okside edilebilen substrattan daha düşük konsantrasyonda bulunan (48), hedef molekülün oksidasyonunu ortadan kaldıracak, önleyebilecek veya geciktirebilecek bir bileşiktir (49). Antioksidan fonksiyonlar oksidatif stresi, DNA mutasyonlarını, malign dönüşümleri ve hücrede hasara neden olan diğer olayları azaltmaya yöneliktir. İlk tanımlanan antioksidan savunma sistemi oksidatif hasara karşı geliştirilmiştir (32).

Antioksidanlar yapısal özellikleri, çözünürlükleri, kaynakları, fonksiyonları gibi özellikleri göz önüne alınarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir (50).

Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olabilirler (32, 35, 50). Endojen kaynaklı olanlar genellikle kendi içinde non-enzimatik veya enzimatik olmak üzere iki gruba ayrılır: Non-enzimatik antioksidanlar arasında vitamin C ve E, karotenoidler, flavonoidler, redükte glutatyon (GSH) sayılabilir. Bu grupta bulunan moleküller SOR yakalayıcısı olarak fonksiyon gösterirler. Enzimatik antioksidanlara SOD, katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx), GST, tiyoredoksin örnek verilebilir. Bu enzimler doğrudan veya dolaylı olarak SOR'a karşı savunmaya katılırlar (50).

Ekzojen kaynaklı olanlar ise metabolik ve besinsel antioksidanlar olarak gruplandırılabilir. Metabolik olanlar endojen sınıfa dâhildir ve metabolizma sırasında üretilir (GSH, lipoik asit, ürik asit, bilirubin vb.); besin kaynaklı olanlar ise diyetle alınır (E ve C vitamini, selenyum, magnezyum, omega 3 ve 6 vb.) (51).

Antioksidanlar aktivitelerine göre iki şekilde gruplandırılabilir:

*Primer veya zincir kırıcı antioksidanlar (32, 50); bu etkinin klasik örneği lipit peroksidasyonudur. Ardışık olarak radikal oluşumu zincirinbu tür antioksidanlarca (Vit C, E, karotenoidler gibi) stabilize edilir veya zararsız bir ürüne parçalanır (51).

*Sekonder veya önleyici antioksidanlar (32, 50); bu gruptaki antioksidanlar arasında SOD, GPx, KAT sayılabilir (51) oksidasyon zincirini başlatacak radikali yakalarlar, ortadan kaldırırlar veya geçiş metalini stabilize ederler (50). Ayrıca asidik bir ortam sağlayarak primer antioksidanları stabilize ederler veya proton vererek onları rejenere edebilirler (32).

Özellikle intrinsik yolak aracılığı ile apoptotik hücre ölümünü indüklemeye SOR ve oksidatif stresin öneminden dolayı sisplatin nefrotoksitesine karşı en fazla çalışılan yaklaşım doğal veya sentetik antioksidanların kullanımınıdır. Bunlar arasında A, C ve E vitaminleri, resveratrol, dimetil sülfoksit, quersetin, edavarone, N-asetilsistein (NAC) ve diğer birçok bileşik sayılabilir (3).

SOR inflamatuvar yolakta da rol oynadığından, antioksidanlar enflamatuvar süreci de de pozitif interfere edebilir (3).

2.4.1. N-Asetilsistein

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (UIPAC) adı: “(2R)-2-acetamido-3-sulfanylpropanoic acid” olan N-asetilsistein ($C_5H_9NO_3S$, N-acetyl-L-cysteine, NAC, PubChem Compound ID: 12035), moleküler ağırlığı 163,191 g/mol olan bir tiyol bileşiktir (52). Tiyoller fonksiyonel grup olarak “SH” içeren bileşiklerdir. Sülfenik asite okside olabilir ve disülfid oluştururlar. Fizyolojik oksidanların neredeyse tamamı ile reaksiyona girebilirler ve bu sayede hücre ve doku düzeyinde antioksidan tampon olarak anahtar rol oynarlar (47, 53).

L-sisteinin asetillenmiş prekürsörü olan NAC mukolitik bir ajan olarak ve asetaminofen intoksikasyonu, doxorubisin kaynaklı kardiyotoksikite, stabil anjina pectoris, akut respiratuvar distres sendromu, kemoterapi kaynaklı toksisite ve psikiyatrik bozukluk gibi durumlarda uzun süredir kullanılmaktadır (54).

NAC’ın *iv*, oral ve inhalasyon yolu ile kullanılabilen formları mevcuttur. Tek doz *iv* uygulamadan sonra terminal yarı ömrü 5-6 saat kadardır ve ilacın %30’u renal ekskresyonla atılır. Düşük olarak kabul edilen (%5’den düşük) biyoyararlanımı, ajanın

intestinal mukozada deasetile edilmesi ve karaciğerdeki ilk geçiş metabolizması ile ilişkilendirilmiştir (54).

Toksisitesi göreceli olarak düşüktür ve bulantı, kusma, kaşıntı ve taşikardi gibi ılımlı yan etkiler bildirilmiştir (54). Günlük 8000 mg oral NAC'ın herhangi bir klinik yan etkiye neden olmadığı bildirilmiştir (55). NAC için oral LD50 dozu, farelerde 7888 mg/kg ve ratlarda ise 6000 mg/kg olarak bildirilmiştir. Hayvan fertilité çalışmalarında 250 mg/kg'a kadar herhangi bir yan etki rapor edilmemiş, ayrıca 2000 mg/kg kadar yüksek dozlarda bile teratonerjik etki gösterilmemiştir (52).

Çeşitli radikaller tarafından okside edilebilen ve aynı zamanda da bir nükleofil olarak görev yapan NAC (54, 55), bu özelliklerinden dolayı proteinlerdeki disülfid bağlarını indirgeyebilir, serbest radikal yakalayıcısı olarak rol oynayabilir ve metal şelasyonu yapabilir (53, 55). Aynı zamanda NAC proenflamatuvar transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'yi inhibe ederek ve apoptoz yolağında sinyal düzenleyici olarak görev yapan p38 mitojen aktive protein kinaz (p38 MAPK) aktivasyonunu önleyerek antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellik göstermektedir (56). NAC doğrudan etkilerinin yanısıra GSH düzeylerinin artışı ile de etkisini göstermektedir (52-55).

Genel olarak, oral yolla alınan NAC portal yolla çoğunlukla sistine dönüştürüleceği karaciğere ulaşır ve burada GSH sentezine katılarak dolaşıma salınır (55). Bazı kaynaklarda NAC'ın karboksil grubundan kaynaklanan yükünden dolayı hücre içerisine giremeyeceği dolayısıyla plazmada NAC, sistin ve sistein proteinleri arasındaki redoks değişim reaksiyonları sonucu, NAC-sistein, NAC-NAC ve sistein üretiminin gerçekleştiği öne sürülmektedir. Bu kaynaklara göre sistein epitel hücre membranını geçerek vücut tiyol havuzunun başlıca kaynağı ve aynı zamanda önemli bir antioksidan olan GSH sentezine katılır. GSH'nın katıldığı süreçler arasında elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, redoks bağımlı sinyal aktarımının, immün cevabın, prostoglandin ve lökotrien metabolizmasının, nörotransmitter sinyalinin ve hücre çoğalmasının düzenlenmesi sayılabilir. GSH sentezi oldukça sıkı kontrol edilir ve mM düzeyinde tutulur. Dolayısıyla NAC'ın fizyolojik fonksiyonları ve terapötik hedefleri büyük ölçüde intraselüler GSH seviyelerini koruması ile ilişkilidir ve NAC'ın doğrudan etkisini ayırt etmek sıklıkla zordur (54).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TDK.-2014-5056) ve Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan (11.12.2013 tarih, 12 toplantı sayılı, karar no: 13/150) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Gülser-Dr. Mustafa Gündoğdu Merkez Laboratuvarı ve Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM)'nde yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, analitik saflıkta ve/veya HPLC kalitesinde, Sigma (St Louis, MO., USA), Merck (Darmstad, Germany), Roche (Basel, Switzerland), Aldrich (Steinheim, Germany), MP Biomedicals (California, NorthAmerica), Fluka (Buchs, Switzerland) marka kimyasal maddeler ve Sunred marka enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleri (Shangai, P.R.China) kullanıldı. Çalışma sırasında saf su cihazları (MINIpure, EASYpure® RF. Barnstead), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), konik polipropilen tüp santrifüjü (Hettich EBA 12), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), otoanalizörler (Roche Cobas 702), mikro ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) okuyucusu (BioTek ELx800), mikro ELISA yıkayıcısı (BioTek ELx50), pHmetre (Trans Instruments-BP3001), hassas terazi (Sartorius, AND GR), su banyosu (Kottermann), etüv (Nüve), derin dondurucu (Haier), manyetik karıştırıcı (Nüve, Labor Brand L-81), buzdolabı (Arçelik), vorteks (Elektromag), kronometre, homojenizatör (Ultra-Turrax T25 Basic IKA Werke), otomatik pipetler (Brand, Socorex, Nichipet EX), balon jojeler, kapaklı küçük polipropilen ve cam tüpler, beher, mezür ve cam pipetler kullanıldı.

Kullanılan pipet, tüp, mezür, beher, balon joje gibi cam malzemeler ve polipropilen tüpler, % 20 nitrik asit içinde 24 saat bekletildikten sonra, sırasıyla Tip II ve Tip I saf su ile 3 kez yıkanarak deiyonize edildi. Ölçümlerde kullanılan çözelti ve tamponlar, Tip I

saf su ile hazırlanarak çalışma süresince soğuk odada saklandı. Dayanıklılık süresi sınırlı olan çözeltiler, belli aralıklarla yeniden hazırlandı.

3.2. ÇALIŞMA PLANI

Çalışma Grubu: Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya DEKAM'da üretilen Wistar albino, 250-300 günlük, 280-445 g ağırlığında 50 erkek rat, çalışma grubunu oluşturdu.

Çalışma süresince, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, normal oda sıcaklığı ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Çevreye uyumlarını sağlamak amacıyla; ratlar, çalışmaya başlamadan en az bir hafta önce aynı deney ortamına alındı.

Ön Çalışma: Nefrotoksisite modeli oluşturmak için kullanılan sisplatin dozu ile ilgili literatür bilgileri farklılıklar göstermektedir. Wistar ratlarda, sisplatin intraperitoneal (*ip*) yoldan kg vücut ağırlığı başına 3 mg (57), 5 mg (58), 10-25-50 mg (59) gibi farklı dozlarda uygulandığında nefrotoksisite oluşturulduğu bildirilmiştir. Bu nedenle nefrotoksisite oluşturabilecek sisplatin dozunu belirlemek amacıyla bir ön çalışma yapılması planlandı. Bu amaçla her biri 2 rat içeren iki farklı gruba, 7.5 ve 10 mg/kg rat ağırlığı olacak şekilde tek doz *ip* sisplatin (Cisplatin DBL[®], 100 mg/100 mL) uygulandı. İki rat içeren diğer bir gruba sadece *ip* serum fizyolojik (SF) uygulandı ve kontrol grubu olarak kabul edildi. Ön çalışma grubunda yer alan ratların ketamin hidroklorür (Ketalar[®]- Pfizer, 80 mg/kg rat ağırlığı)/ ksilazin hidroklorür (Rompun[®]- Bayer, 10 mg/kg rat ağırlığı) anestezisi altında, uygulamalardan önce intrakardiyak yoldan ve deney sonrası (sisplatin uygulamasından 72 saat sonra) abdominal aortadan heparinize enjektörle kan örnekleri alındı ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3500 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Plazma örnekleri, BUN ve kreatinin ölçümleri yapılmak üzere Gülser-Dr. Mustafa Gündoğdu Merkez Laboratuvarı'na gönderildi. Ön çalışma verilerine göre *ip* 10 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uygulamasının, plazma BUN ve kreatinin seviyeleri ile gösterilen nefrotoksisite tablosu oluşturduğuna karar verildi. Toksik etkilerin en belirgin olduğu zamanı bulmak amacıyla, sadece sisplatin (*ip*, 10 mg/kg rat ağırlığı) verilen ilave 6 hayvanın 2'li gruplar halinde 72., 120. ve 168. saatlerde kanları alınarak BUN ve kreatinin ölçümleri yapıldı.

Sisplatinden önce veya sonra uygulanan NAC'ın nefrotoksisiteye etkisini araştırmak amacıyla yapılan ayrı bir ön çalışmada da, her biri 2 rat içeren 3 gruba sırasıyla;

sisplatin uygulamasından 4 saat önce, eşzamanlı ve 4 saat sonra NAC uygulandı. NAC preparatı olarak Asist[®] (Bilim ilaç 300 mg/3 mL, %10) kullanıldı.

Ana Çalışma:

Ana çalışmada her biri 8 rat içeren 4 grup oluşturuldu: Kontrol (KONT), sisplatin (CP), NAC (NAC-250) ve CP+ NAC grubu.

Çalışma öncesi deneyde kullanılması planlanan tüm ratlar tartılarak, gruplar birbirinden farklı olmayacak şekilde deney grupları oluşturuldu ve *ip* olarak uygulanacak maddelerin kg rat ağırlığı başına günlük dozları ayarlandı.

Uygulamalardan bir gün önce ratlar metabolik kafeslere alındı, yem ve su sınırlaması yapılmadan 24 saatlik idrarları toplandı. Ratların pellet yemleri yem haznesinden idrar/gaita toplama alanına taşımalarına ve idrar/gaita örneklerinin yem ile kontamine etmelerine engel olmak amacıyla, yemler havanda dövülerek toz haline getirildi. Kontrol grubuna uygulamanın ilk günü 4 saat arayla 2 kez SF enjeksiyonu yapıldı ve ardışık iki gün daha tek doz SF ile devam edildi. CP grubuna ilk gün 10 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin enjeksiyonu yapılırken diğer enjeksiyon zamanlarında sadece SF uygulandı. NAC-250 grubuna üç gün süreyle 250 mg/kg rat ağırlığı NAC uygulanırken; CP+NAC grubuna çalışmanın ilk günü önce 10 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin, bunun 4 saat sonrasında ve ardışık iki gün daha 250 mg/kg rat ağırlığı dozunda NAC uygulandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışma grubunu oluşturan ratların deney planı

GRUP	n	Uygulanan Maddeler ve Dozları	Uygulama Şekli: <i>ip</i>
			Süresi (Gün)
KONT	8	SF	3
CP	8	10 mg* Sisplatin	1
NAC-250	8	250 mg* N-asetilsistein	3
CP+NAC	8	10 mg* Sisplatin + 4 saat sonra ve ardışık 2 gün 250 mg* N-asetilsistein	3

*: /kg rat ağırlığı/gün

Çalışmanın son günü ratlar yeniden metabolik kafeslere alındı ve 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Sisplatin uygulamasından sonraki 72. saatte tartılan ratların kanları

ketamin hidroklorür/ ksilazin hidroklorür anestezisi altında, steril şartlarda, abdominal aortadan heparinize enjektör ile EDTA'lı tüplere alındıktan hemen sonra, böbrekleri çıkartıldı. Böbrek dokuları kandan temizleninceye kadar, soğuk SF ile 4-5 kez yıkandı ve gazlı bez ile fazla suyu alındı. Sağ böbrekler histolojik inceleme için formaldehit çözeltisi içinde Erciyes Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji AD'ye gönderildi. Kan örnekleri ve sol böbrekler soğuk zincir ile hızlı bir şekilde laboratuvara taşındı. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri 3500 g'de +4°C'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra ayrılan plazmalar ve küçük parçalara bölünen böbrek dokuları alikotlar halinde çalışma gününe kadar -40°C'de saklandı.

Uygulamanın başlangıcında ve bitiminde, ratlardan toplanan 24 saatlik idrar örnekleri, hacimleri ölçüldükten sonra santrifüjlenerek alikotlar halinde -40 °C'de saklandı.

Ayrıca nefrotoksisite ile olan ilişkilerini araştırmak üzere, çalışma süresince ratların vücut ağırlıkları da kaydedildi.

3.3. YÖNTEM

Ratlardan alınan plazma örneklerinde BUN, kreatinin, MPO, NF-κB, HMGB-1; böbrek dokularında MPO, NF-κB, HMGB-1; idrarlarında kreatinin, üre azotu ve mikroalbümin düzeyleri ölçüldü.

3.3.1 Rutin Analizler

BUN, kreatinin, mikroalbümin düzeyleri otoanalizör kullanılarak uygun ticari kitler ile analiz edildi.

3.3.2. Biyokimyasal Çalışma

Çalışılan parametrelerin ölçümünde kullanılan yöntemlerin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla; ratlardan elde edilen plazma ve dokulardan homojenat havuzu oluşturuldu. Bu havuzlarda ölçümler yapılarak değişim katsayısı (coefficient of variation; CV) değerleri hesaplandı.

Böbrek doku örneklerinin biyokimyasal ölçümlere hazırlanması:

Doku MPO, NF-κB, HMGB-1 tayini için;

Çözdürülen dokular 3 kez soğuk SF ile yıkandı ve süzgeç kâğıdıyla kurulandı. Hassas terazide tartılan doku örnekleri 1/4 oranında fosfat tamponlu salin (Phosphate Buffered Saline, PBS) ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlemi, teflon uçlu homojenizatör

ile (4. kademedede, dakikada 17500 devirde, 30 saniye, her örnek için 6 vuruş), buz içinde gerçekleştirildi. Hazırlanan homojenatlar bir gece -40°C 'de bekletildikten sonra son homojenizasyon oranı 1/10 olacak şekilde PBS ile aynı şekilde homojenize edildi. Homojenatlar, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 3000 g'de 25 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatantlarda MPO, NF- κ B, HMGB-1 ve protein ölçümleri yapıldı.

3.3.2.1. Protein Tayini

Ratlardan elde edilen doku örneklerinde ölçülen MPO, NF- κ B ve HMGB-1 düzeylerini mg protein başına verebilmek için Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı.

Lowry yöntemi alkali koşullarda meydana gelen iki farklı reaksiyona dayalıdır. Bunlardan birincisi amid bağları ile bakır atomları arasında meydana gelen ve indirgenmiş bakır oluşumu ile sonuçlanan Biüret reaksiyonudur. İkincisi ise Folin Ciocalteu ayırıcının (fosfomolibden ve fosfotungsten) tirozin ve triptofan amino asitleri ile tepkimeye girerek indirgenmesidir. Sonuçta oluşan mavi renk spektrofotometrik olarak 750 nm dalga boyunda ölçülür (60).

Çözeltiler:

Reaktif-1: 0.1 N NaOH içinde hazırlanan %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi

Reaktif-2: 1:1, v/v şeklinde karıştırılan %1'lik $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve %2'lik $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi

Protein çözeltisi: 50 kısım Reaktif-1 ve 1 kısım Reaktif-2 karıştırılarak hazırlanır

1.0 N Folin Ciocalteu-Fenol reaktifi (Sigma F9252)

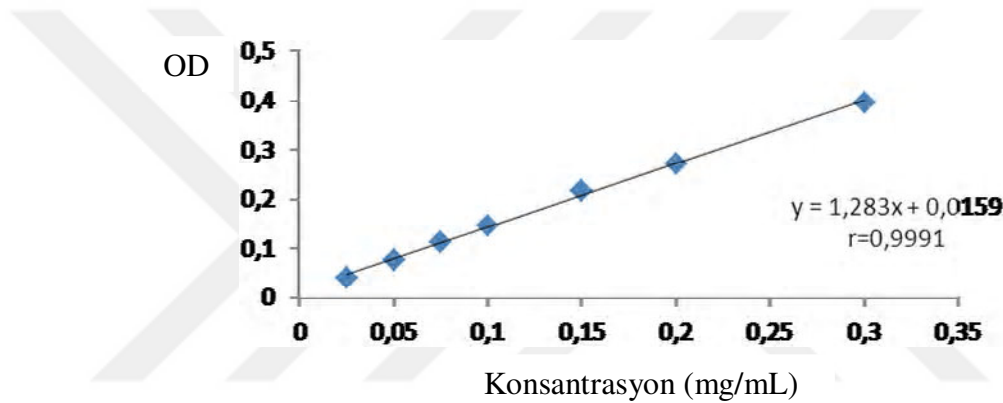
Çalışma planı:

	Kör	Numune
Distile su	0.1 mL	-
Numune	-	0.1 mL
Protein çözeltisi	1 mL	1 mL
Karıştırılıp oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildi.		
Folin reaktifi	0.1 mL	0.1 mL

Hazırlanan reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 30 dk. inkübe edildikten sonra 750 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı numune ve standart tüplerinin optik dansite (OD)'leri ölçüldü ve standart eğri üzerinden değerlendirme yapıldı.

Standart serinin hazırlanması:

1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan stok albümin çözeltisi, SF ile uygun şekilde dilüe edilerek, 0.025; 0.05; 0.075; 0.1; 0.15; 0.2 ve 0.3 mg/ mL konsantrasyonlarında standart seriler hazırlandı. Standartlar numune gibi çalışılarak albümin standart grafiği çizildi (Şekil 3.1).



Şekil: 3.1 Albümin standart grafiği

Protein ölçümünde kullanılan metodun CV değeri, %5.49 olarak bulundu ve Tablo 3.2'de gösterildi.

Tablo 3.2. Doku protein ölçümünde kullanılan yöntemin CV değeri

	Ölçüm sayısı	X±SD	CV (%)
Protein (mg/mL)	10	167.09±9.17	5.49

3.3.2.2. MPO Tayini:

Plazma ve doku MPO düzeyleri SunRed marka rat ELISA kiti (Katalog No: 201-11-0575) kullanılarak ölçüldü.

Yöntemin prensibi; yarışmasız olarak antijen-antikor komplekslerinin oluşumuna dayanmaktadır. Plazma örneklerinde bulunan MPO (işaretsiz antijen), rat MPO monoklonal antikoruna ile kaplı kuyucuklara bağlanır. Biotinle işaretli antikor

eklenmesiyle oluşan, “antikor–antijen–işaretili antikor” komplekslerine (sandwich ELISA), biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlanan, peroksidaz [horseradish (yabanturpu) peroksidaz; HRP] ile konjuge, streptavidin proteini ilave edilir. Yıkama işlemi ile tutunmayan kısım uzaklaştırılır. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, plazma MPO konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450 nm’de ölçülür.

Çözeltiler

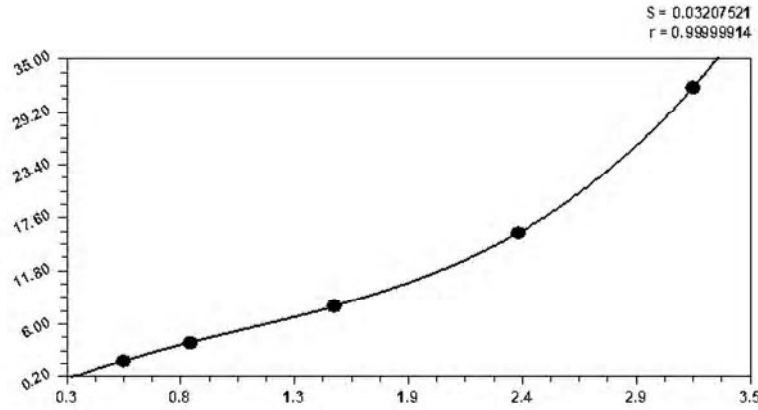
- Stok standart (64 ng/mL)
- Standart dilüsyon tamponu
- Standart seri (32 ng/mL, 16 ng/mL, 8 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL)
- Biyotinlenmiş rat MPO antikor (Bio-MPO Ab)
- Streptavidin-HRP konjugat çözeltisi (Str- HRP)
- Yıkama çözeltisi
- Kromojen çözeltisi A
- Kromojen çözeltisi B
- Stop çözeltisi

Çalışma

	Kör	Numune	Standart
Plazma	-	40 µL	-
Standart	-	-	50 µL
Bio-MPO Ab	-	10 µL	-
Str- HRP	-	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37°C ‘de bir saat inkübe edildikten sonra, her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.			
Kromojen çözeltisi A	50 µL	50 µL	50 µL
Kromojen çözeltisi B	50 µL	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37°C ‘de 10 dk. süre ile karanlıkta inkübe edildi.			
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL	50 µL
Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 nm’de okundu.			

Hesaplama:

Kör kuyucuğun OD değeri, tüm numune ve standart seriye ait OD değerlerinden çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen net OD değerleri kullanılarak, CurveExpert ver 1.4 programı kullanılarak MPO standart grafiği çizildi (Şekil 3.2). Tüm ELISA testlerinin standart eğri grafikleri bu programın ekran görüntüsünden elde edildi.



Şekil 3.2. MPO standart grafiği

Plazma için MPO düzeyleri hesaplandı ve mL plazma başına nanogram cinsinden verildi (ng/mL). Böbrek homojenatlarında tayin edilen MPO değerleri aynı homojenatın protein konsantrasyonuna oranlanarak verildi (ng/mg protein).

3.3.2.3. NF-κB Tayini:

Plazma ve doku NF-κB seviyeleri SunRed marka rat ELISA kiti (Katalog No: 201-11-0288) ile ölçüldü.

Kitin ölçüm prensibi, yarışmasız olarak antijen-antikor komplekslerinin oluşumuna dayanmaktadır. Plazma örneklerinde bulunan NF-κB (işaretsiz antijen), rat NF-κB monoklonal antikoruna ile kaplı kuyucuklara bağlanır. Biotinle işaretli antikor eklenmesiyle oluşan, “antikor-antijen-işaretli antikor” komplekslerine biyotinlenmiş antikora yüksek bir afiniteyle bağlanan, HRP ile konjuge streptavidin proteini ilave edilir. Yıkama işlemi ile tutunmayan kısım uzaklaştırılır. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, plazma NF-κB konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450 nm’de ölçülür.

Çözeltiler

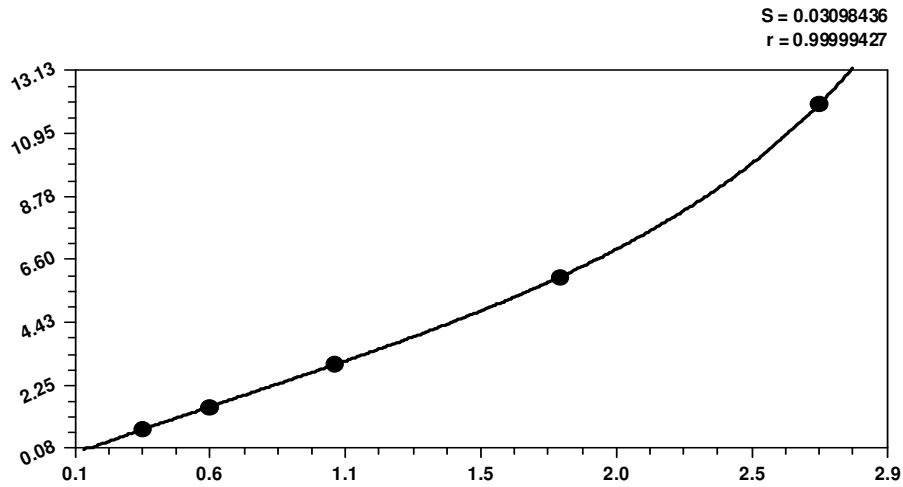
- Stok standart (24 ng/mL)
- Standart dilüsyon tamponu
- Standart seri (12 ng/mL, 6 ng/mL, 3 ng/mL, 1,5 ng/mL, 0,75 ng/mL)
- Biyotinlenmiş rat NF-κB antikoru (Bio-NF-κB Ab)
- Streptavidin-HRP konjugat çözeltisi (Str-HRP)
- Yıkama çözeltisi
- Kromojen çözeltisi A
- Kromojen çözeltisi B
- Stop çözeltisi

Çalışma

	Kör	Numune	Standart
Plazma	-	40 µL	-
Standart	-	-	50 µL
Bio-NF-κB Ab	-	10 µL	-
Str-HRP	-	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37 °C 'de bir saat inkübe edildikten sonra, her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.			
Kromojen çözeltisi A	50 µL	50 µL	50 µL
Kromojen çözeltisi B	50 µL	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37 °C 'de 10 dk. karanlıkta inkübe edildi.			
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL	50 µL
Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 nm'de okundu.			

Hesaplama:

Kör kuyucuğunun OD değeri, tüm numune ve standart seriye ait OD değerlerinden çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen net OD değerleri ile, CurveExpert ver 1.4 programı kullanılarak NF-κB standart grafiği çizildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. NF-κB Standart grafiği.

Plazma NF-κB düzeyleri hesaplandı ve mL plazma başına nanogram cinsinden verildi (ng/mL). Doku için hesaplanan NF-κB değerleri ise aynı dokudaki protein konsantrasyonuna oranlanarak verildi (ng/mg protein).

3.3.2.4. HMGB-1 Tayini:

Plazma ve doku HMGB-1 düzeyleri SunRed marka rat HMGB-1 ELISA kiti (Katalog No: 201-11-0258) ile ölçüldü.

Yöntemin prensibi; yarışmasız antijen–antikor komplekslerinin oluşumuna dayanmaktadır. Plazma örneklerinde bulunan HMGB-1 (işaretsiz antijen), rat HMGB-1 monoklonal antikoruna ile kaplı kuyucuklara bağlanır. Biotinle işaretli antikor eklenmesiyle oluşan, “antikor–antijen–işaretli antikor” komplekslerine biyotinlenmiş antikora bağlanan, HRP ile konjuge, streptavidin proteini ilave edilir. Yıkama işlemi ile tutunmayan kısım uzaklaştırılır. Enzim substratıyla inkübasyonu takiben, plazma HMGB-1 konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak, enzimatik reaksiyonla oluşan rengin şiddeti, 450 nm’de ölçülür.

Çözeltiler

- Stok standart (32 ng/mL)
- Standart dilüsyon tamponu
- Standart seri (16 ng/mL, 8 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL, 1 ng/mL,)
- Biotinlenmiş rat HMGB-1 antikoruna (Bio- HMGB-1 Ab)
- Streptavidin-HRP konjugat çözeltisi (Str- HRP)

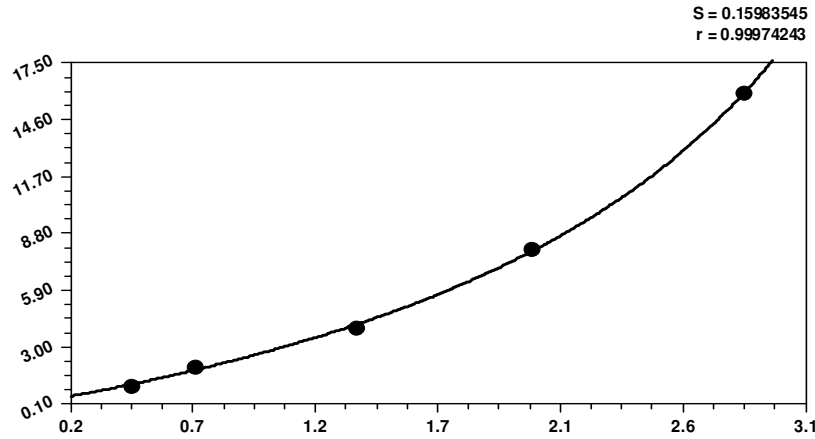
- Yıkama çözeltisi
- Kromojen çözeltisi A
- Kromojen çözeltisi B
- Stop çözeltisi

Çalışma

	Kör	Numune	Standart
Plazma	-	40 µL	-
Standart	-	-	50 µL
Bio-HMGB-1 Ab	-	10 µL	-
Str-HRP	-	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37 °C 'de bir saat inkübe edildikten sonra, her kuyucuk 350 µL yıkama tamponu ile beş kez yıkandı.			
Kromojen çözeltisi A	50 µL	50 µL	50 µL
Kromojen çözeltisi B	50 µL	50 µL	50 µL
Yapışkan folyo ile kapatılan plate, 37 °C 'de 10 dk. karanlıkta inkübe edildi.			
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL	50 µL
Enzimatik reaksiyonla kuyucuklarda oluşan rengin şiddeti, 450 nm'de okundu.			

Hesaplama

Kör kuyucuğun OD değeri, tüm numune ve standart seriye ait OD değerlerinden çıkarıldı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen ΔOD değerleri kullanılarak, CurveExpert ver 1.4 programı ile HMGB-1 standart grafiği çizildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. HMGB-1 Standart grafiği

HMGB-1 düzeyleri hesaplandı ve mL plazma başına nanogram cinsinden verildi (ng/mL). Doku için hesaplanan HMGB-1 değerleri ise protein konsantrasyonuna oranlanarak verildi (ng/mg protein).

3.3.3. Histolojik Değerlendirme

Böbrek doku örnekleri histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonu ile 48 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra böbrek dokuları akan musluk suyunda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirildi ve ksilen ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Yapılan işlemler Tablo 3.3'te ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.3. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Musluk suyu	1 saat	7	Absolü Alkol	1 saat
2	%50 Alkol	1 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
3	%70 Alkol	1 saat	9	Ksilen	20 dk.
4	%80 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dk.
5	%96 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dk.
6	Absolü Alkol	1 saat	12	Eriyik parafin (60 °C)	1 gece

Parafin bloklardan alınan 5-6 µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilen ile parafini uzaklaştırıldı ve

dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidrate edildi. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilin-eozin (H-E) (Tablo 3.4) ile boyanarak Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobunda incelendi.

Tablo 3.4. Hematoksilin-eozin boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	14	Eozin	3-5 dk.
2	Ksilen I	10 dk.	15	Akarsu	1 dk.
3	Ksilen II	10 dk.	16	%50 Alkol	1 dk.
4	Ksilen III	10 dk.	17	%70 Alkol	1 dk.
5	Absolu Alkol I	5 dk.	18	%80 Alkol	1 dk.
6	Absolu Alkol II	5 dk.	19	%96 Alkol	1 dk.
7	%96 Alkol	5 dk.	20	Absolu Alkol I	1 dk.
8	%80 Alkol	5 dk.	21	Absolu Alkol II	2 dk.
9	%70 Alkol	5 dk.	22	Absolu Alkol III	2 dk.
10	%50 Alkol	5 dk.	23	Ksilen I	20 dk.
11	Akarsu	2 dk.	24	Ksilen II	20 dk.
12	Hematoksilin	5-8 dk.	25	Ksilen III	20 dk.
13	Akarsu	5 dk.	26	Kapatma	

Doku örnekleri Abdelrahman et al. (58) tarafından önerilen ve Tablo 3.5'te verilen tanımlama ve skorlama tablosu doğrultusunda değerlendirildi:

Tablo 3.5: Tanımlama ve skorlama tablosu

	Yok	Hafif	Orta	Şiddetli
Hemoraji	0	1	2	3
Tübül Epitel Hücre Hasarı	0	1	2	3
Nekroz	0	1	2	3

3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışma gruplarını oluşturan ratlardan elde edilen plazma ve dokularda çalışılan verilerin “IBM SPSS 23.0” paket bilgisayar programı kullanılarak, istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenlerin özet istatistikleri aritmetik ortalama \pm standart sapma ($\bar{x} \pm SD$) olarak verildi. Normal dağılıma uymayan sayısal değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri için ortanca - yüzde çeyreklik (% 25. - % 75. persentil) değerleri kullanıldı.

Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılması, “Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)” ve fark çıkan grupların çoklu karşılaştırılması da post ANOVA (Sheffe testi) ile yapıldı.

Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılmasında, Kruskal-Wallis analizi ve fark çıkan grupların ikili karşılaştırmasında Mann Whitney U testi kullanıldı.

Grup içi karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren veriler için Eşleştirilmiş Student *t* test; normal dağılım göstermeyen veriler için Wilcoxon testi kullanıldı.

Tüm istatistiki karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya DEKAM'da üretilen Wistar albino, 250-300 günlük, 280-445 g ağırlığında 50 erkek rat kullanıldı.

Uygun sisplatin dozuna, sakrifikasyon zamanına ve sisplatin/ NAC uygulama sırasına karar verebilmek amacıyla, toplam 18 rat ile bir ön çalışma yapıldı.

Nefrotoksisiteye neden olan sisplatin dozunu belirlemek amacıyla yapılan ön çalışma grubu ratlarının ölçülen plazma BUN ve kreatinin düzeyleri Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. Sisplatin dozunu belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları

Uygulanan Madde/Doz	Rat No	Plazma BUN (mg/dL)	Plazma Kreatinin (mg/dL)
SF	1	16.2	0.46
	2	9.8	0.53
Sisplatin (7.5 mg *)	1	122.1	2.19
	2	141.9	2.49
Sisplatin (10 mg *)	1	199.6	4.48
	2	147.1	3.03

*: kg rat ağırlığı başına verilen mg sisplatin miktarı

Tüm uygulamalar *ip* ve tek doz yapıldı. SF grubuna steril % 0.09'luk NaCl; sisplatin gruplarına sırasıyla, kg rat ağırlığı başına olacak şekilde, 7.5 ve 10 mg sisplatin uygulandı. Hayvan ölümleri görülmeksizin, plazma BUN ve kreatinin değerlerinin belirgin artışı nedeniyle ana çalışmada kullanılacak sisplatin dozunun 10 mg/kg rat ağırlığı olmasına karar verildi.

Sakrifikasyon zamanını belirlemek için yapılan ön çalışma hayvanlarının plazma BUN ve kreatinin değerleri Tablo 4.2’de gösterildi.

Tablo 4.2. Sakrifikasyon zamanını belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları

Uygulanan doz (ip)	Sakrifikasyon zamanı	Rat No	Plazma BUN (mg/dL)	Plazma Kreatinin (mg/dL)
10 mg/kg rat ağırlığı sisplatin	72. saat	1	269.0	5.33
		2	284.0	6.74
	120. saat	1	148.4	3.91
		2	167.1	4.58
	168. saat	1	31.9	1.11
		2	29.4	1.31

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, her bir deney için 2 rat olmak üzere toplam 6 hayvana 10 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin uygulandı ve ikişerli gruplar halinde 72. (3. gün), 120. (5. gün) ve 168. (7. gün) saatlerde sakrifiye edildi. Sisplatin uygulaması sonrası geçen süre uzadıkça, ratların böbrek fonksiyonlarının 72. saatten sonra giderek iyileştiği ve 168. saatte SF grubu değerlerine (Tablo 4.1) yaklaştığı gözlemlendi. NAC uygulamasıyla elde edilebilecek anlamlı düzelmenin tam olarak ortaya konulabilmesi için, sisplatin uygulanan ratların sisplatin sonrası 72. saatte sakrifiye edilmesine ve NAC kullanımının ilk üç günle sınırlandırılmasına karar verildi.

NAC uygulamasının sisplatin öncesi veya sonrası yapılmasına karar verebilmek amacıyla yapılan ön çalışmada elde edilen plazma BUN ve kreatinin değerleri Tablo 4.3’te gösterildi.

Tablo 4.3. Sisplatin/ NAC uygulama sırasını belirlemek için yapılan ön çalışma sonuçları

Uygulanan İlaç/ Doz / Süre		Plazma BUN (mg/dL)	Plazma Kreatinin (mg/dL)	
NAC 250 mg*, 3 ardışık gün	10 mg* sisplatin	1.Rat	97.2	1.68
	öncesi 4. Saat	2.Rat	95.6	2.22
	10 mg* sisplatin	1.Rat	32.5	0.75
	ile eş zamanlı	2.Rat	22.0	0.35
	10 mg* sisplatin	1.Rat	65.2	2.89
	sonrası 4. Saat	2.Rat	46.2	1.96

*: kg rat ağırlığı başına verilen madde miktarı

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi sisplatin ile eş zamanlı NAC uygulaması ile elde edilen sonuçların kontrol değerlerine (Tablo 4.1) yakın olduğu belirlendi. Muldoon et al. (61) çalışması da dikkate alındığında iki kimyasal ajan uygulanması arasında 4 saat süre bırakılmasına; NAC'ın sisplatinden önce veya sonra verilmesinin belirgin fark oluşturmaması ve klinik kullanıma daha uygun olması nedeniyle de NAC'ın sisplatin sonrası uygulanmasına karar verildi.

Ana çalışmada her biri 8 rat içeren, Kontrol (KONT), sisplatin (CP), N-asetilsistein (NAC-250) ve CP+NAC olmak üzere dört grup oluşturuldu (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Ana çalışma gruplarının deney planı

GRUP	n	Uygulanan Madde ve Dozları	Uygulama Şekli: <i>ip</i>
			Süresi (gün)
KONT	8	SF	3
CP	8	10 mg* Sisplatin	1
NAC-250	8	250 mg* N-asetilsistein	3
CP+NAC	8	10 mg* Sisplatin + 4 saat sonra ve ardışık 2 gün 250 mg* N-asetilsistein	3

*: kg rat ağırlığı başına verilen madde miktarı

Çalışma gruplarına ait tüm veriler, Ek Tablo 1 ve 2’de gösterildi. Bu verilerden elde edilen tanımlayıcı istatistik değerleri, aritmetik ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$; normal dağılıma uyan veriler için) ve ortanca - yüzde çeyreklik (% 25. - % 75. persentil; normal dağılıma uymayan veriler için), şeklinde Tablo 4.5 - 4.15’te verildi. İstatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

Ratların vücut ağırlıkları ve idrar hacimleri fiziksel bulgular; idrar, plazma ve böbrek dokularında yapılan ölçümlerden elde edilen bulgular biyokimyasal çalışma (rutin/ araştırma) bulguları ve böbrek dokularındaki histolojik incelemeler, histolojik çalışma bulguları başlıkları altında toplandı.

4.1.FİZİKSEL BULGULAR

Çalışmanın başlangıcında ve sonunda ratların vücut ağırlıkları kaydedildi ve meydana gelen değişimler Tablo 4.5’te gösterildi.

Tablo 4.5. Rat vücut ağırlıkları (g)

GRUP	n	Öncesi	Sonrası	% Değişim
KONT	8	363.14 \pm 60.98	353.5 \pm 54.81*	2.45 \pm 1.72
NAC-250	8	353.63 \pm 24.38	348.0 \pm 21.29*	1.54 \pm 1.35
CP	8	357.54 \pm 28.24	308.97 \pm 21.24*	13.44 \pm 3.88* ^a
CP+NAC	8	370.69 \pm 51.08	317.55 \pm 43.69*	14.32 \pm 1.75* ^a

İstatistiki karşılaştırma:

- Grup içi karşılaştırmalarda Eşleştirilmiş Student *t* test (•: çalışma öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılması sonucu ile elde edildi; $p < 0.05$).
- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (Anlamli bulgular: *: KONT grubu ile diğer grupların karşılaştırılması ile elde edildi. ^a: NAC-250 grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p < 0.05$).

Tablo 4.5’te görüldüğü gibi; ratların çalışma öncesi vücut ağırlıkları bakımından anlamlı bir fark göstermediği belirlendi ($p > 0.05$). Uygulamaların sonunda tüm gruplarda öncesine göre istatistiksel açıdan anlamlı bir düşme olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$). Çalışma sonunda gruplar arasında anlamlı bir fark olmasa da ($p > 0.05$) gruplar arası yüzde değişimler karşılaştırıldığında; NAC uygulanan ratlarda gözlenmeyen kilo

kaybının, sisplatin uygulanan her iki grupta da (CP ve CP+NAC grubu) meydana geldiği görüldü ($p<0.05$).

Çalışma öncesi ve sonrası ratların 24 saatlik idrar hacimlerinde meydana gelen değişimler Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6. Çalışma öncesi ve sonrası ratların 24 saatlik idrar hacimleri (mL)

GRUP	n	Öncesi	Sonrası
KONT	8	6.17 ± 2.05	9.89 ± 3.17*
NAC-250	8	8.24 ± 2.08	7.37 ± 1.23
CP	8	6.79 ± 2.89	14.34 ± 5.43 ^{*,a}
CP+NAC	8	6.65 ± 1.70	20.47 ± 6.84 ^{*,*,a}

İstatistiki karşılaştırma:

- Grup içi karşılaştırmalarda Eşleştirilmiş Student *t* test (*: çalışma öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p<0.05$)
 - Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı.
- (Anlamli bulgular: *: KONT grubu ile diğ er grupların karşılaştırılması ile elde edildi, ^a: NAC-250 grubu ile diğ er grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p<0.05$).

Tablo 4.6' da görüldüğü gibi gruplar çalışma öncesi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlendi ($p>0.05$). Çalışma öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldığında ise NAC-250 grubu hariç diğ er tüm gruplarda çalışma sonunda idrar hacimlerinin arttığı görüldü ($p<0.05$). Çalışma sonunda, gruplar arası karşılaştırmada kontrole göre sadece CP+NAC grubunda artma gösteren idrar hacminin, CP ve CP+NAC gruplarında kendi aralarında fark yokken; bu gruplarda NAC-250 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

4.2. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA BULGULARI

4.2.1. Rutin Çalışma Bulguları

Ratların çalışma öncesi ve sonrası idrarlarında üre azotu, kreatinin ve mikroalbümin; çalışma sonrası plazmalarında BUN ve kreatinin düzeyleri ölçüldü.

Çalışma gruplarındaki ratların çalışma öncesi ve sonrası idrar üre azotu ve kreatinin değerleri Tablo 4.7’de gösterildi.

Tablo 4.7. Ratların çalışma öncesi ve sonrası idrar üre azotu ve kreatinin değerleri

GRUP	n	İdrar Üre Azotu (mg/dL)		İdrar Kreatinin (mg/dL)	
		Önce	Sonra	Önce	Sonra
KONT	8	3976 ± 625	3872 ± 464	144 (114-150)	116 ± 20
NAC-250	8	4043 ± 578	4006 ± 398*	128 ± 30	126 ± 16
CP	8	3993 ± 753	695 (600-1191)*,*, ^a	144 ± 42	30 (23-45)*,*, ^a
CP+NAC	8	3960 ± 289	1234 (509-1341)*,*, ^a	128 ± 15	41 ± 17*,*, ^a

İstatistiki karşılaştırma:

- Grup içi karşılaştırmalarda Eşleştirilmiş Student *t* test (°: çalışma öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılması sonucu ile elde edildi; $p < 0.05$).
- Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis ve ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U test uygulandı. (Anlamli bulgular: *: KONT grubu ile ^a: NAC-250 grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p < 0.05$).

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi gruplar arası başlangıç idrar üre azotu ve kreatinin değerlerinde anlamlı fark olmadığı görüldü ($p > 0.05$). İdrar üre azotu ve kreatinin değerlerinin çalışma öncesine göre sadece CP ve CP+NAC gruplarında azaldığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Çalışma sonrası idrar üre azotu değerlerine bakıldığında NAC-250 grubu değerlerinin KONT grubu değerlerine göre anlamlı şekilde arttığı buna karşılık CP grubu değerlerinin ise azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). NAC-250 grubu ile karşılaştırıldığında CP ve CP+NAC grubu değerlerine göre anlamlı bir düşme izlendi

($p < 0.05$). Çalışma sonrası idrar kreatinin değerleri karşılaştırıldığında CP ve CP+NAC grubunda KONT ve NAC-250 grubuna göre anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0.05$).

Çalışma gruplarındaki ratların öncesi ve sonrası idrar mikroalbümin değerleri Tablo 4.8’de gösterildi.

Tablo 4.8. Ratların çalışma öncesi ve sonrası idrar mikroalbümin düzeyleri (mg/dL)

GRUP	n	İdrar Mikroalbümin (mg/dL)	
		Öncesi	Sonrası
KONT	8	3.47 ± 2.08	3.80 ± 2.08
NAC-250	8	2.98 ± 1.69	5.00 ± 2.68
CP	8	1.87 ± 1.56	5.97 ± 4.50*
CP+NAC	8	2.97 ± 1.60	5.59 ± 3.73

İstatistiki karşılaştırma:

- Grup içi karşılaştırmalarda Eşleştirilmiş Student *t* test (*: çalışma öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılması sonucu ile elde edildi; $p < 0.05$)
- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı ($p < 0.05$).

Gruplar arasında hem çalışma öncesi ve hem de çalışma sonrası mikroalbümin değerleri açısından fark gözlenmezken ($p > 0.05$); grup içi karşılaştırmalarda sadece CP grubunda çalışma öncesine göre anlamlı bir yükselme görüldü ($p < 0.05$).

Çalışma gruplarındaki ratların çalışma sonrası plazma BUN ve kreatinin değerleri Tablo 4.9’da gösterildi.

Tablo 4.9. Ratların çalışma sonrası plazma BUN ve kreatinin düzeyleri

GRUP	n	Plazma BUN (mg/dL)	Plazma Kreatinin (mg/dL)
KONT	8	18.77 ± 1.90	0.44 ± 0.08
NAC-250	8	16.09 ± 2.10	0.38 ± 0.04
CP	8	137.09 ± 33.82* ^a	3.59 ± 1.01* ^a
CP+NAC	8	102.4 ± 4.67* ^{a,b}	1.87 ± 0.20* ^{a,b}

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (Anlamlı bulgular: *:KONT grubu ile ^a: NAC-250 grubu ^b: CP grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p < 0.05$).

Çalışma sonrası plazma BUN ve kreatinin değerlerine bakıldığında KONT ve NAC-250 grubu arasında herhangi bir fark gözlenmezken, CP ve CP+NAC gruplarında KONT ve NAC-250 gruplarına göre anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p < 0.05$). Yine her iki parametre açısından değerlendirildiğinde, CP+NAC grubunda CP grubuna göre anlamlı bir düşme gözlemlendi ($p < 0.05$).

4.2.2. Biyokimyasal Çalışma Bulguları

Çalışma gruplarındaki ratların plazma MPO değerleri Tablo 4.10'da gösterildi.

Tablo 4.10. Ratların plazma MPO düzeyleri

GRUP	n	MPO (ng/mL)
KONT	8	8.47 ± 1.83
NAC-250	8	9.17 ± 1.18
CP	8	8.15 ± 0.86
CP+NAC	8	8.51 ± 1.61

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı ($p < 0.05$).

Tablo 4.10'da görüldüğü gibi plazma MPO değerleri açısından gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0.05$).

Çalışma gruplarındaki ratların plazma NF- κ B değerleri Tablo 4.11'de gösterildi.

Tablo 4.11. Ratların plazma NF- κ B düzeyleri

GRUP	n	NF- κ B (ng/mL)
KONT	8	4.77 ± 1.25
NAC-250	8	4.59 ± 0.54
CP	8	3.63 ± 0.49
CP+NAC	8	3.79 ± 0.72

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (p <0.05).

NF-κB düzeyleri incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi (p>0.05).

Çalışma gruplarındaki ratların plazma HMGB-1 değerleri Tablo 4.12’de gösterildi.

Tablo 4.12. Ratların plazma HMGB-1 Düzeyleri

GRUP	n	HMGB-1 (ng/mL)
KONT	8	4.50 ± 1.56
NAC-250	8	4.75 ± 0.57
CP	8	3.36 ± 0.74
CP+NAC	8	3.41 ± 0.87

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (p<0.05)

Plazma HMGB-1 düzeyleri bakımından, gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi (p>0.05).

Çalışma gruplarındaki ratların böbrek dokusu MPO değerleri Tablo 4.13’ te gösterildi.

Tablo 4.13: Ratların doku MPO düzeyleri

GRUP	n	MPO (ng/ mg protein)
KONT	8	1.12 ± 0.29
NAC-250	8	1.64 ± 0.32*
CP	8	0.82 ± 0.20 ^a
CP+NAC	8	0.84 ± 0.18 ^a

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (Anlamlı bulgular: *:KONT grubu ile ^a: NAC-250 grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; p<0.05).

Tabloda görüldüğü gibi, doku MPO değerlerinin KONT grubuna göre sadece NAC-250 grubunda anlamlı olarak arttığı izlendi ($p<0.05$). NAC-250 grubu ile karşılaştırıldığında CP ve CP+NAC gruplarında anlamlı düşme görüldü ($p<0.05$); sisplatin verilen bu gruplar arasında ise anlamlı bir fark belirlenmedi ($p>0.05$).

Çalışma gruplarındaki ratların böbrek dokusu NF- κ B değerleri Tablo 4.14'te gösterildi.

Tablo 4.14. Ratların doku NF- κ B düzeyleri

GRUP	n	NF- κ B (ng/mg protein)
KONT	8	0.46 \pm 0.05
NAC-250	8	0.56 \pm 0.09
CP	8	0.35 \pm 0.05 ^a
CP+NAC	8	0.40 \pm 0.14 ^a

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (Anlamlı bulgular: ^a: NAC-250 grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; $p<0.05$).

Tablo 4.14'te görüldüğü gibi, NF- κ B düzeyleri açısından KONT grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmezken ($p>0.05$), NAC-250 grubu ile karşılaştırıldığında CP ve CP+NAC gruplarında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0.05$). CP ve CP+NAC grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çalışma gruplarındaki ratların böbrek dokusu HMGB-1 değerleri Tablo 4.14'de gösterildi.

Tablo 4.15. Ratların doku HMGB-1 düzeyleri

GRUP	n	HMGB-1 (ng/ mg protein)
KONT	8	0.58 ± 0.16
NAC-250	8	0.82 ± 0.20*
CP	8	0.44 ± 0.11 ^a
CP+NAC	8	0.47 ± 0.06 ^a

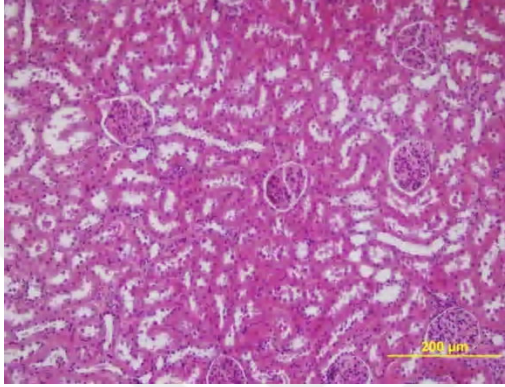
İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda ANOVA ve post-ANOVA test uygulandı. (Anlamli bulgular: *:KONT grubu ile ^a: NAC-250 grubu ile diğ er grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; p<0.05).

Tablo 4.15'te görüldüğü gibi, HMGB-1 düzeylerinin kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, sadece NAC-250 grubunun anlamli olarak arttığı görüldü (p<0.05). Bununla birlikte CP ve CP+NAC grupları arasında anlamli bir fark olmasa da (p>0.05) her iki grupta da NAC-250 grubuna göre anlamli bir azalma izlendi (p<0.05).

4.3. HİSTOLOJİK ÇALIŞMA BULGULARI

Sisplatin uygulanan ratlara ait böbreklerin genel olarak yıpranmış ve doğal rengini kaybetmiş morfolojik görünümüne sahip olduğu izlendi. Işık mikroskopik incelemede kontrol grubuna ait böbrek dokularında korteks ve medulla normal yapıda gözlemlendi (Şekil 4.1 ve 4.2).

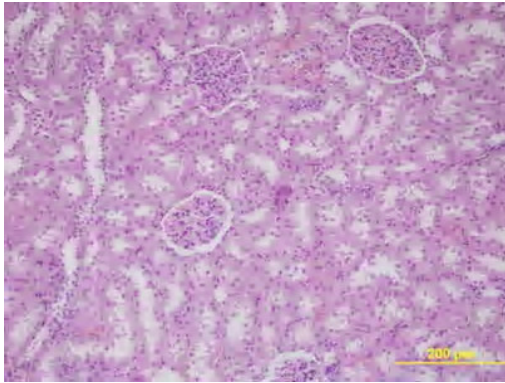


Şekil 4.1. Kontrol grubu böbrek dokusu histolojik görünümü (HE, x200).

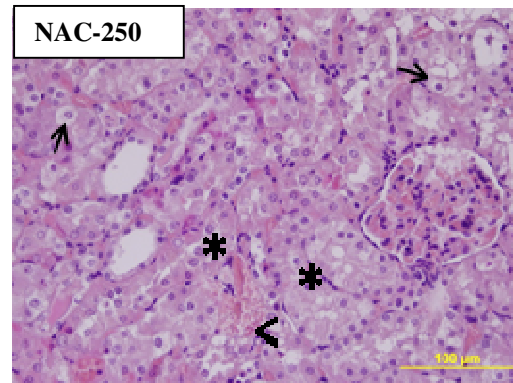


Şekil 4.2. Kontrol grubu böbrek dokusu histolojik görünümü (HE, x400).

NAC-250 grubundaki böbrek dokularında çok hafif şiddette hemoraji, nekroz ve tübül epitel hücrelerinde hasar mevcuttu (Şekil 4.3 ve 4.4).

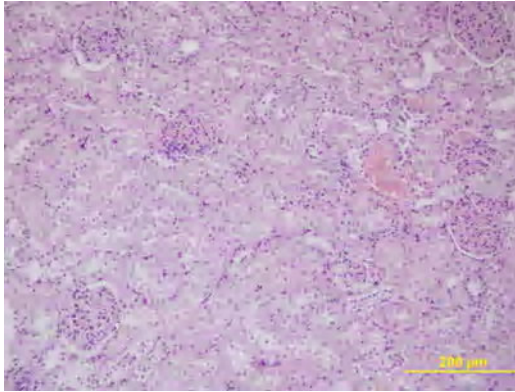


Şekil 4.3. NAC-250 grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x200).

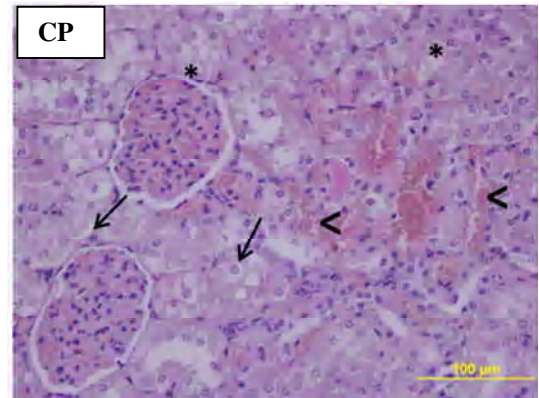


Şekil 4.4. NAC-250 grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x400). Hemoraji (\blacktriangleleft), nekroz($*$) vakuolizasyon (\blacktriangleright).

Sisplatin grubunda ise belirgin hemoraji, nekroz ve tübül epitel hasarı bulunmaktaydı. Tübül hücrelerinde vakuolizasyon, proksimal tübülde fırçamsı kenar kaybı gözlemlendi (Şekil 4.5 ve 4.6).

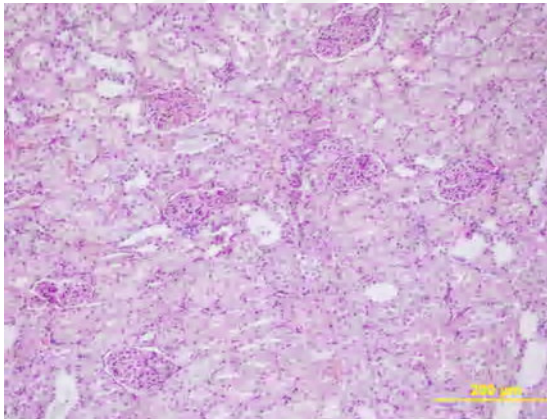


Şekil 4.5. CP grubu böbrek dokularının histolojik görünümü (HE, x200).

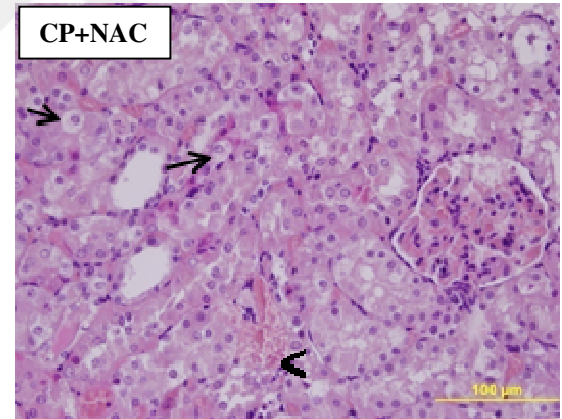


Şekil 4.6. CP grubu böbrek dokularının histolojik görünümü (HE,x400). Hemoraji (<), nekroz (*), vakuolizasyon (➔).

CP+NAC grubundaki kesitlerde CP grubuna yakın şekilde hemoraji, tübül epitel hücre hasarı gözlemlenirken (Şekil 4.8); nekroz görülen hücreler daha az sayıdaydı. Tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve fırçamsı kenar kaybı mevcuttu (Şekil 4.7 ve 4.8).



Şekil 4.7. CP+NAC grubu böbrek dokularının görünümü (HE, x200).



Şekil 4.8.CP+NAC grubu böbrek dokularının görünümü (HE,x400). Hemoraji (<), nekroz (*), vakuolizasyon (➔).

Çalışma gruplarının histolojik skorlama sonuçları Tablo 4.16’da gösterildi.

Tablo 4.16. Histolojik çalışma sonuçları

GRUP	n	Hemoraji	Tübül Epitel Hücre Hasarı	Tübüler nekroz
KONT	8	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-0.0)
NAC-250	8	0.5 (0.0-1.0)	1.0 (0.25-0.1)	0.0 (0.0-1.0)
CP	8	3.0 (2.25-3.0)* ^a	3.0 (2.0-3.0)* ^a	2.0 (2.0-2.75)* ^a
CP+NAC	8	1.5 (0.0-2.0) ^b	2.0 (2.0-2.0) * ^{a,b}	0.0 (0.0-1.0) ^b

İstatistiki karşılaştırma:

- Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis ve ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U test uygulandı. (Anlamlı bulgular: *:KONT grubu; ^a: NAC-250 grubu; ^b: CP grubu ile diğer grupların karşılaştırılması sonucu elde edildi; p<0.05).

Böbrek dokuları hemoraji, tübül hücre hasarı ve tübüler nekroz açısından değerlendirildiğinde, KONT ve NAC-250 grubu arasında anlamlı bir fark yokken; sadece sisplatin verilen grupta bu iki gruba göre anlamlı bir artış izlendi (p<0.05). CP+NAC grubunda hemoraji ve nekroz alanlarında kontrol grubu ile fark vermeyecek şekilde iyileşme görüldü (p<0.05). Tübül hücre hasarı açısından incelendiğinde KONT ve NAC-250 grubu ile hala farklı olsa da (p<0.05); CP+NAC grubunda, CP grubuna göre anlamlı bir düzelme olduğu belirlendi (p<0.05).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sisplatin, solid tümörlerin tedavisi için kullanılan en etkili kemoterapötiklerden biridir. Antitümör etkinliğine rağmen majör yan etkileri nefrotoksisite, nörotoksisite ve miyelosupresyondur; bunlar arasında klinik kullanımını ve antikanser etkinliğini kısıtlayan en ciddi ve doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir. Ancak belirgin toksik özelliklerine rağmen, risk fayda oranı dikkate alındığında; terapötik etkinliğinden dolayı hala en yaygın kullanılan ajanlardan biridir (16).

Yoğun profiltik girişimlere rağmen doza bağımlı olarak, tek doz sisplatin alan hastalarda bile %25-30 oranında farklı derecelerde nefrotoksisite oluştuğu bildirilmiştir (16). Renal toksisitenin aynı zamanda kümülatif olduğu kabul edildiğinden ardışık sisplatin kullanımının, toksisitenin insidans ve şiddetini artıracığı öne sürülmektedir (11, 16). Ancak genel görüşün aksine; sisplatin tedavisi sırasında ölen hastaların böbrek dokusu platin düzeylerinin, hastanın aldığı total doza değil ölüm zamanından hemen önceki son tedavi dozuna bağılı olduğu da gösterilmiştir (62). Bu nedenle hastalarda tek doz sisplatin uygulaması bile nefrotoksisiteden şüphelenmek ve önlem almak amacıyla ilave girişimlerde bulunmak için yeterli bir sebep olarak düşünülebilir.

Halen sisplatin kullanımı sırasında oluşabilecek toksik etkilere karşı kullanılabilecek, onaylanmış bir tedavi protokolü ve spesifik bir antidot bulunamadığından (10), günümüzde yoğun şekilde farklı toksisite önleyici stratejiler araştırılmaktadır.

Klinikte nefrotoksisiteyi önlemeye yönelik rutin uygulamalar arasında mannitol ve furosemid ile güçlü diürez oluşturmak, hipertonic klor çözeltileri kullanmak, alternatif sisplatin rejimleri uygulamak, diğer nefrotoksik ajanlarla kombinasyondan kaçınmak ve nefrotoksisiteyi önleyebileceği düşünülen bileşiklerle birlikte kullanmak sayılabilir (16).

Bu çalışmada, sisplatin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı NAC'ın koruyucu etkiye sahip olup olmadığı, rat modeli üzerinde araştırıldı.

Deneysel çalışmalarda kullanılan hayvan ve insan metabolizmalarındaki benzerlik ve farklılıkların dikkate alınması, uygulama kolaylığı ve ekonomik olma gibi faktörler; çalışmaların planlanması, sürdürülmesi ve değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada tek batında benzer genomik yapıya sahip çok sayıda yavru verebilme, standardizasyon, uygulama kolaylığı ve ekonomik olması gibi faktörler de göz önünde bulundurularak, rat kullanılmasına karar verildi.

Literatürde böbrek dokusunda sisplatin birikiminden, dolayısıyla nefrotoksisite gelişme olasılığının yüksekliğinden sorumlu tutulan OCT2 gen ekspresyonu ve protein düzeylerinin erkek ratlarda anlamlı derecede yüksek olduğu (63) ve yüksek testesteron seviyelerin sisplatin nefrotoksisini arttırdığı (64) yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca Nematbakhsh et al. (65), 7 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin uyguladıklarında, NO⁻ metabolitleri ve nitrit seviyelerinin sadece erkek ratlarda anlamlı olarak arttığını rapor etmişlerdir. Bu bulgulardan yola çıkarak erkeklerin sisplatin nefrotoksisitesine daha duyarlı oldukları öne sürülmektedir (63- 66).

Bununla birlikte erkek ratlarda testesteron düzeylerinin etkisine benzer şekilde, dişi ratlarda serum östrojen seviyelerinin de sisplatin nefrotoksisitesini etkilediği bildirilmiştir (67). Dişi ratların menstrual döngülerinin senkronize edilmesinin güçlüğü ve grup içi/ gruplar arası istenmeyen östrojen seviye farkları nedeniyle; ayrıca nefrotoksisiteye yatkın olmaları da dikkate alındığında bu çalışmada erkek rat kullanılmasına karar verilmiştir.

Cinsiyetin yanısıra sisplatine bağlı renal toksisitenin derecesi ile yaşın da ilişkili olduğu gösterilmiştir (68, 69).

Tek doz (2.5 ve 10 mg/kg rat ağırlığı arası değişen dozlarda) veya ardışık 5 gün (1, 1.5, 2 mg/kg rat ağırlığı) sisplatin uygulanan, genç (3 haftalık) ve erişkin (12 hafta ve üzeri) ratlarda vücut ağırlığı, GFR, efektif renal plazma akımı, böbrek ve idrar platin konsantrasyonları üzerinden; erişkin ratlarda renal platin seviyelerinin ve buna bağlı olarak da nefrotoksisitenin daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Genç ratların daha düşük vücut ve daha büyük böbrek ağırlığına sahip olduğu dikkate alındığında; gerek verilen total sisplatin dozunun daha düşük olması, gerek fonksiyonel böbrek dokusunun büyüklüğü nedeniyle daha az toksik etkiye maruz kaldıkları iddia edilmiştir (68). Bu literatür bilgileri ışığında, bu çalışmada yetişkin ratların kullanılmasına karar verildi.

Literatürde sisplatin nefrotoksisitesini farklı rat türleri üzerinde inceleyen oldukça fazla sayıda yayın mevcuttur. Sisplatin nefrotoksisitesine duyarlılık açısından farklı rat türlerini karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada Wistar rat tercih edildiğinden uygun deneysel modele karar verebilmek için yapılan ön çalışmalarda sadece Wistar ratlar üzerinde gerçekleştirilen literatür çalışmaları dikkate alındı.

Literatürde nefrotoksisiteyi hedefleyen deneysel çalışmalarda kullanılan sisplatin dozu, uygulama şekli, süresi vb. oldukça farklılık göstermektedir. Sıkça kullanılması ve uygulama kolaylığı nedeniyle bu çalışmada *ip* uygulama tercih edildi. Tümü *ip*, tek doz ve kg rat ağırlığı başına olmak üzere; yapılan çalışmalarda 4 mg (8), 5 mg (70-74), 6 mg (75, 76), 7 mg (65, 77-81), 7.5 mg (82-91), 10 mg (59, 92), 25 ve 50 mg (59) dozlarının tercih edildiği görülmüştür.

Bu çalışmaların ve yapılan ön çalışmanın (7.5 ve 10 mg/kg rat ağırlığı) verileri birlikte değerlendirildiğinde; hayvanlarda ölüme neden olmaksızın belirgin nefrotoksisite oluşturabilmek amacıyla uygulanacak sisplatin dozunun 10 mg/kg rat ağırlığı olmasına karar verildi.

Sisplatinle yapılan çalışmalarda, spontan bir iyileşme olması da söz konusu olduğundan (68, 72) nefrotoksisiteyi ve kemoprotektan ajanın etkisini en iyi şekilde görebilmek için sakrifikasyon zamanını belirlemek de önem taşımaktadır. Bu konuda literatürde farklı süreler öneren çalışmalar bulunmaktadır. Mahmoud et al. (79), 7 mg/kg rat ağırlığı dozunda *ip* sisplatin uyguladıkları Wistar ratlarda, 24 saat arayla ardışık 4 gün boyunca takip ettikleri serum kreatinin düzeylerinin, sürekli bir artış olmakla beraber, en yüksek değere 96. saatte ulaştığını bildirmişlerdir. Palipoch et al. (59) bu çalışmada uygulanan doza (10 mg/kg rat ağırlığı) benzer şekilde, Wistar ratlara sisplatin uygulamasından sonra serum BUN ve kreatinin değerlerinin 72. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını göstermişlerdir. Bununla birlikte 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin verilen ratlarda oligürik ve proteinürik etkinin de 24. ve 48. saat arasında artmaya başladığı ve 72. saatte maksimum düzeye ulaştığı da rapor edilmiştir (93). Doz, uygulama şekli ve rat türü de dikkate alındığında Palipoch et al. (59)'un çalışması bu çalışmanın ön çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Bu nedenle sakrifikasyon zamanının sisplatin uygulamasından 72 saat sonra olmasına karar verilmiştir.

Sisplatinle indüklenen enflamasyon ve oksidatif stresin böbrek üzerindeki etkisinin antioksidanlarla belirli ölçüde önlenemediği farklı çalışmalarla belirtilmiştir.

Nefrotoksisitenin önlenmesinde selenyum, E vitamini, dimetiltiyöüre (DMTU), teofilin, amifostin ve NAC gibi ajanlarla çalışmalar yapılmış ve olumlu etkileri gösterilmiştir (94). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve ilerlemiş over kanserinde, sisplatin nefrotoksisitesini önlemek amacıyla “Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi” tarafından sadece amifostin onay almıştır (1). Ancak yüksek maliyeti, yan etkileri ve her ne kadar bazı çalışmalarla olmadığı gösterilse de sisplatinin antitümör etkinliğini azaltabilmesi amifostinin kullanımını sınırlayan etkenlerdendir (3). Amifostine kimyasal benzerliğinin yanısıra; klinikte yıllardır kullanılan, daha uygun maliyetli ve ciddi yan etkisi olmayan bir ajan olan NAC (9) bu çalışmada tercih edilmiştir.

Kullanılan kemoterapötik ajanın antikanser etkinliğinin azalması olasılığı kemoprotektif bir ajanın kullanımını kısıtlayan majör nedenlerden biridir (95). Aynı çözültide birarada bulunan asetilsistein ve sisplatinin, ultraviyole spektrum değişikliği ile de belirlenen, böbreklerden reabsorbe edilemeyen bir kompleks oluşturduğu ve bu durumun kombine uygulama yapılan ratların düşük böbrek dokusu platin düzeylerinin nedeni olduğu öne sürülmüştür (93). Appenroth et al.’a göre (93) oluşan asetilsistein ve sisplatin kompleksi nedeniyle böbrek dokusunda azalan platin konsantrasyonu azalmış nefrotoksisite gibi “olumlu” bir sonuca neden olacak; ancak aynı zamanda sisplatinin antitümör etkisini de kısıtlayacak “olumsuz” bir sonuca dönüşecektir.

Tedavide kullanılan kemoterapötik ve kemoprotektan etkileşimini en aza indirmek ve kemoprotektandan maksimum fayda sağlamak için uygulama zamanı ve/veya yolunun avantaj sağlayacağı farklı çalışmalarla gösterilmiştir (61, 96- 99).

NAC ile elde edilen nefroprotektif etkinin tümör kemoterapisi üzerine etkisini birarada gösteren Muldoon et al. (61), medullablastoma ve nöroblastoma geliştirilen rat modellerinde *iv* uygulanan NAC ve sisplatin uygulama zamanının hem tümör boyutlarına hem de böbrek fonksiyonları üzerine etkisini araştırdıklarında; sisplatinden 30 dk. önce uygulanan NAC ile sisplatine bağlı antitümör etkinin olumsuz etkilendiğini, fakat 4 saat sonra uygulanan NAC’ın antitümöral etkinlik üzerine herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını göstermişlerdir. Ancak bu çalışmada BUN ile değerlendirilen nefroprotektif etkinin tam anlamıyla oluşturulamadığı da rapor edilmiştir.

Jones et al (99), Walker 256 karsinosarkoma hücreleri inoküle ederek tümör indüksiyonu yaptıkları ratlarda 0.5 mg/kg rat ağırlığı sisplatin ve 500 mg/kg rat ağırlığı olmak üzere GSH’yı sırasıyla, *iv* ve *ip* olacak şekilde farklı yollar kullanarak

uyguladıklarında; sisplatinin tümör ağırlığını azaltıcı (antitümör) etkisini değiştirmedini göstermişlerdir. Ancak bu iki ajanı eş zamanlı, her ikisi de *iv* olmak üzere uyguladıklarında, her ne kadar uygulanan GSH miktarı daha düşük olsa da (250 mg/kg rat ağırlığı) antitümöral etkinin nötralize olduğunu öne sürmüşlerdir.

NAC uygulama zamanını belirlemek üzere yapılan ön çalışma bulguları, eş zamanlı uygulanan NAC ve sisplatinin kimyasal olarak etkileştiği olasılığını düşündürmektedir. Dolayısıyla sisplatinden 4 saat sonra uygulanan NAC ile antitümör etkinliği değiştirmedini gösterildiğinden (61), nefroprotektif etkiyi değerlendirmek için iki ajanın uygulanması arasında 4 saat süre olmasına; sisplatinden önce veya sonra uygulanan NAC ile böbrek fonksiyonlarının benzer şekilde değiştiği ve kemoterapi sonrası uygulamanın klinik bakımdan daha uygun olduğu düşünüldüğünden, NAC uygulamasının sisplatinden sonra yapılmasına karar verildi.

Bu çalışmada, ön çalışma ve literatür verileri genel olarak değerlendirilerek, *ip* 10 mg/kg rat ağırlığı sisplatin tek doz ve *ip* 250 mg/kg rat ağırlığı NAC 3 gün süre ile uygulandı; bu iki ajanın birlikte uygulandığı grupta da iki ajan arasında 4 saat zaman aralığı olmasına dikkat edildi.

Sisplatin gibi platin içeren kemoteröpatik ajanların en yaygın gastrointestinal yan etkileri arasında bulantı, kusma, diare, konstipasyon ve oral mukozit sayılabilir. Bu yan etkilerin sonucu da hastalarda malnutrisyon ve dehidrasyona sekonder ortaya çıkan hızlı kilo kaybıdır. Özellikle akut olarak ortaya çıkan bu gastrointestinal yan etkilerin nedeninin mukozal hasar olduğu kabul edilir. Ancak intestinal innervasyonda da hasar meydana geldiğinde bu semptomlar tedavi sonrası kalıcı olabilir (100).

Literatürde sisplatin verilen ratlarda vücut ağırlıklarının değişmediğini gösteren birkaç çalışmaya (74, 75, 86) rastlansa da, yapılan çalışmalar genel olarak vücut ağırlığının azaldığını rapor etmiştir (58, 59, 61, 90, 97, 98, 101- 105).

Ashrafi et al. (75), 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları hayvanlarda kilo kaybı olmadığını ancak deney süresince kontrol hayvanlarındaki kilo artışının bu grupta gözlenmediğini; diğer ifade ile sisplatinin kilo kaybına neden olmasa da kilo artışını engellediğini öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmada KONT grubu da dâhil olmak üzere, sisplatin uygulanmayan gruplarda gözlenen anlamlı kilo kaybının nedeni, deneyin başlangıcında ve sonunda olmak üzere

ratların toplam 2 gün metabolik kafeste kalmaları ve bu nedenle beslenmelerinin bozulması olabilir.

Sisplatin uygulama yolu, süresi, sakrifikasyon zamanı ve rat türleri benzer olmak üzere; 5 mg/kg rat ağırlığı (58) ve 7.5 mg/kg rat ağırlığı (90) sisplatin uygulayan iki ayrı çalışmada vücut ağırlığındaki yüzde azalma sırasıyla %19 ve %13 olarak rapor edilmiştir. Bu durumun uygulanan doz ile gözlenen kilo kaybı arasında lineer bir ilişki olmadığına işaret ettiği düşünülebilir.

Bu çalışmada 10 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin uygulanan gruplarda (CP ve CP+NAC), deney süresince izlenen kilo kaybının, diğer gruplara göre oldukça belirgin olmak üzere, yaklaşık %14 oranında olduğu belirlendi. Bu kilo kaybının nedeninin, tüm gruplarda ortak olan metabolik kafes kaynaklı beslenme yetersizliğinin yanısıra gastrointestinal toksisiteye işaret eden ılımlı diare ve tübüler hasar kaynaklı şiddetli poliüri olduğu düşünülebilir.

Bu iddiayı destekler şekilde, Abdelrahman et al. (58) da sisplatin uygulaması ile ortaya çıkan kilo kaybını nedeni olarak ratlarda gözlenen şiddetli diyareye işaret etmişlerdir. Benzer şekilde Kishore et al. (103), sisplatin uyguladıkları (ip, 5 mg/kg rat ağırlığı) ratlarda, vücut ağırlığındaki azalmanın, poliüri ve böbreğin idrar konsantre etme yeteneğindeki azalma ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.

Sisplatin kaynaklı poliüri birinci ve ikinci faz olmak üzere iki farklı tipte ortaya çıkabilir (5, 16). Sisplatinin neden olduğu proksimal tübül hasarı, bozulmuş su ve sodyum reabsorpsiyonu ile sonuçlanır ve bu makula densada sodyum klorür artışına neden olur. Sonuçta renin anjiyotensin sistemi aracılığı ile GFR düşer ve renal kan akımı azalır. Artmış sodyum ve suyun distal tübüle ulaşması sonucu distal tübülde beklenen reabsorpsiyon artışının ortaya çıkmaması sisplatinin bu bölgede de hasara neden olduğunu gösterir. Yine Henle kulpunda sisplatin nedeniyle oluşan hasardan dolayı ters akım mekanizması bozulur; su reabsorpsiyonu ve idrar konsantre etme gücü azalır (106). Bu, ikinci faz poliüri olarak adlandırılır ve sisplatin enjeksiyonunu takiben 72. ve 96. saatler arasında ortaya çıkar. (5). Bu çalışmada sakrifikasyon zamanı sisplatin uygulaması sonrası 72. saat olsa da, idrar ve plazma kreatinin değerleri göz önüne alındığında GFR de düşüş olduğu söylenebilir, dolayısıyla ikinci faz poliüriye daha uygundur.

Sisplatin uygulanan (*ip*, 5 mg/kg rat ağırlığı) ratlarda histopatolojik bulgularla da desteklenen tübül epitel hücre hasarı ile ilişkili renal reabsorbsiyon kapasitesinde belirgin bir azalma, fraksiyonel sodyum ekskresyonunda yaklaşık 20 kat artış ile de gösterilmiştir (107).

Ayrıca sisplatinin toplayıcı kanallardaki akuaporin ekspresyonunu azaltarak su reabsorbsiyonunda daha da ileri bir bozulmaya sekonder poliüriye neden olduğu da gösterilmiştir (103, 106).

Bu çalışmada ve literatürdeki farklı çalışmalarda (72, 102, 103, 105) poliüri gösterilmişse de aksini rapor eden çalışmalar da mevcuttur (58, 93, 108). Abdelrahman et al. (58) sisplatin uygulaması ile idrar çıkışının değişmediğini rapor etmiş ve bu durumu diare sonucu aşırı sıvı kaybı ve KKr'de %95 azalma ile ilişkilendirmiştir. Appenroth et al. (93) ise, 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uygulanan ratlarda genel görüşün aksine özellikle 72. saatte belirgin oligüri göstermişlerdir.

Kishore et al. (103), sisplatin (5 mg/kg rat ağırlığı) uyguladıkları ratlarda idrar çıkışının uygulamanın 5. gününde 4.8 kat arttığını; oluşan bu ciddi poliürinin de toplayıcı tübül su kanalları aquaporin 2 ve 3'ün, ayrıca proksimal nefron ve mikrovasküler su kanalı aquaporin 1'in ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

Sisplatin uygulanan hayvanlarda azalmış glomerül fonksiyonunun belirteçleri arasında, idrarda azalmış üre azotu ve kreatinin seviyeleri sayılabilir. Bu çalışmanın sonuçları ile de uyumlu olarak, literatürde farklı doz ve sürelerde sisplatin uygulaması sonucu idrar üre azotu ve kreatinin değerlerinin azaldığı gösterilmiştir (71, 102).

Sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarı, GFR'deki azalmayı da şiddetlendiren renal kan akımının azalması ile karakterize akut böbrek yetmezliği olarak tarif edilebilir. Bu hipofiltrasyon genellikle minimal tübüler proteinüri ve artmış BUN ve serum kreatinin düzeyleri ile yakından ilişkili olduğundan (16); sisplatin nefrotoksitesisi çalışmalarında sıklıkla bu parametreler değerlendirilmiştir.

Sisplatin uygulaması ile ortaya çıkan glomerüler hasar, tübüler ya da vasküler hasar kadar yaygın değildir ve özellikle yüksek dozlarda ortaya çıkar. Sisplatin doğrudan glomerül hücrelerinde hasara neden olabilir ve bu durum proteinüri ile sonuçlanan histoloji ve permabilite değişikliğine neden olur. Proteinüri de nefropatinin önemli bir işareti olarak düşünülmektedir (16).

Bu çalışmada da sisplatin uygulaması ile birlikte mikroalbümin düzeylerinin yaklaşık olarak 3 kat arttığı gösterilmiştir. Her ne kadar literatürde idrar protein düzeyleri farklı metotlarla değerlendirilmiş olsa da, tümü benzer şekilde idrar protein seviyelerinin artışına işaret etmektedir (93, 98, 101, 109). Appenroth et al. (93), proteinürik etkinin sisplatin uygulamasından sonra 24. ve 48. saatler arasında artmaya başladığını ve 72. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını göstermiştir. Bununla birlikte farklı bir çalışmada da sisplatin (*ip*, 7 mg/kg rat ağırlığı) sonrası idrar protein düzeylerinin 10. günde hala yüksek olduğu öne sürülmüştür (109). Abdel-Wahab et al. (101), 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları ratlarda idrar protein miktarının yaklaşık 2 kat kadar arttığını rapor etmişler ve bu artışın sisplatin uygulaması ile artan SOR seviyelerine sekonder olarak ortaya çıkan renal damarlardaki hasarla ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bununla birlikte, nefrotoksisitenin gösterilmesi için en yaygın olarak kullanılan parametreler serum/plazma BUN ve kreatinin değerleridir. Yapılan çalışmalarda sisplatin uygulaması sonucu hayvanlarda nefrotoksisite yalnızca BUN (61, 93); üre ve kreatinin (58, 70, 83, 86, 91, 101) veya BUN ve kreatinin değerleri birlikte kullanılarak (71, 75, 82, 97, 98, 102, 110) gösterilmiştir. Bu çalışmada sisplatin uygulanan hayvanlarda artmış plazma BUN ve kreatinin değerlerinin her ikisinin de nefrotoksisiteyi destekleyici yönde, sırasıyla yaklaşık 7 ve 8 kat arttığı belirlenmiştir. Shalby et al (111), sisplatin uyguladıkları ratlarda artmış serum üre ve kreatinin değerleri ile birlikte üriner β 2-mikroglobülin ve NAG ekskresyonunun arttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak artan üre ve kreatinin seviyelerinin, bozulmuş glomerül fonksiyonunun yanı sıra NAG artışı ile de saptanan tübüler hasarın da belirtici olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Ayrıca bu çalışma da dâhil olmak üzere pek çok çalışmada böbrek fonksiyon testleri ile gösterilen nefrotoksisite, histopatolojik bulgularla da desteklenmiştir (58, 71- 73, 75, 98, 102, 108). Hatta Dickey et al. (98), *ip* 10 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları ratlarda yüksek BUN değerleri ile renal tübüler hasar arasında doğrudan bir korelasyon göstermişlerdir.

Sisplatin nefrotoksisitesi morfolojik olarak; akut tübüler hasar, proksimal tübül S3 segmentinde nekroz, proksimal ve distal tübüllerde baskın olmak üzere Henle kulpunun çıkan kalın kolunda apoptoz ile tanımlanır. Hücre ölümünün derecesi uygulanan doz, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişiklik gösterir (16).

Bununla birlikte, sisplatinin düşük dozlarda apoptozu, yüksek dozlarda nekrozu tetiklediği bilinmektedir (3). Yano et al. (112), 7.5 mg/kg rat ağırlığı sisplatin verilen ratlarda renal tübüllerde apoptoza işaret eden “TdT-dUTP nick-end-labelling” (TUNEL) pozitif hücre varlığının gösterilmesini uygulanan yüksek doz ilacın hızlı ekskresyonunun ardından uzun süre düşük dozda renal dokuda kaldığına işaret ettiği şeklinde yorumlamışlardır. Bu çalışmada apoptoz değerlendirilmemiş olmakla beraber, yüksek doz uygulamayı yansıtmayacak şekilde nekroz varlığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada da gözleendiği gibi sisplatin uygulanan ratların böbrek morfolojileri yıpranmış ve rengini kaybetmiş olarak rapor edilmiştir (113).

Literatürde sisplatin uygulaması sonrası ratların böbrek dokularında gözlenen histolojik değişiklikler akut tübüler nekroz (58, 79, 82, 113), tübüler atrofi/dejenerasyon (75, 98), glomerül atrofisi varlığı (82, 113), tübüler hücrelerde şişme (58, 79), vakualizasyon (58, 71), dökülme (58, 71), eozinofiliik nekrotik materyal içeren tübüler distansiyon (58, 71, 82), renal tübül lümenlerinde apoptotik hücre varlığı (58), intertisyal dokuda lenfosit varlığı (75, 79, 82, 98) gibi oldukça farklı bulgular üzerinden değerlendirilmiştir. Bu farklılığın sebebi araştırmacıların farklı histolojik parametrelere odaklanmaları ve/veya kullanılan deney modellerinin (rat türü ve cinsiyeti, sisplatin dozu, uygulama süresi ve yolu, sakrifikasyon zamanı vb.) birebir örtüşmemesinden kaynaklanabilir.

Bu çalışmada sisplatin alan ratlarda yüksek plazma BUN ve kreatinin düzeyleri ile doğrudan pozitif ilişkili olarak gözlenen belirgin hemoraji, nekroz ve tübül epitel hücre hasarı (tübül hücrelerinde vakuolizasyon, proksimal tübüllerde fırçamsı kenar kaybı) gibi bulgular nedeniyle, sisplatin uygulanan ratlarda histopatolojik düzeyde de nefrotoksisite oluştuğu söylenebilir.

Literatürde her ne kadar farklı skorlama parametreleri kullanılmış olsa da, tek başına sisplatin uygulanan ratların en yüksek hasar skoruna sahip olduğu ifade edilmiştir (58, 71, 75). Bu çalışmada da hemoraji, tübül epitel hücre hasarı ve tübüler nekroz açısından ayrı ayrı skorlama yapıldığında, en yüksek skorun sadece sisplatin uygulanan ratlara ait olduğu belirlendi.

Sisplatin ile ortaya çıkan nefrotoksisitenin etiyolojisi oldukça komplike ve kesin olmayan çok sayıda faktörü ve çeşitli sinyal yollarını içerir. Ancak, özellikle SOR üretimi ve antioksidan sistem disfonksiyonu (7) ve bunun bir uzantısı olarak kabul

edilen prototipik bir proenflamatuvar ajan olan NF- κ B aracılı enflamatuvar cevap (95) özellikle öne çıkanlardır.

Matsushima et al. (105), serbest radikallerin sisplatin kaynaklı akut renal yetmezliğe katkısını destekleyecek şekilde; serbest radikal yakalayıcısı olarak rol oynayan DMTU ve sodyum benzoatın sisplatin kaynaklı malondialdehit (MDA) artışını önlediğini; serum kreatinin düzeylerindeki yükselmeyi ve NAG ekskresyonunu, dolayısıyla tübüler hasar oluşumunu azalttığını ve renal tübüler hücre rejenerasyonunu artırdığını göstermişlerdir.

Shalby et al. (111), sisplatin uyguladıkları ratlarda antioksidan sistemin yetersizliğine bağlı olarak, yüksek plazma/doku MDA ve NO[•] seviyelerinin yanısıra, total antioksidan kapasitesinin de azaldığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Park et al. (114), sisplatin nefrotoksitesisi sırasında artan 8-OH deoksiguanozin ve lipit hidroperoksit değerlerini göstermişler ve ortaya çıkan nekrotik hücre ölümünün sadece ATP azalmasına bağlı olmadığını, oksidatif stresin artmasından da kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Hücre içinde birçok kaynağı olan SOR, üretilme nedenine göre iki ana kategoride incelenebilir. Birincisi, normal fizyolojik süreçte ara ürün veya atık ürün olarak SOR oluşturan sistemler; ikincisi ise hücre savunma sisteminin veya sinyal iletim yolağının bir parçası olarak doğrudan kullanılmak üzere SOR üreten sistemlerdir. İkinci grupta özellikle proenflamatuvar medyatörler aracılığı ile aktive edilen fagositik NADPH oksidaz-2 (NOX-2) yer alır (30). NOX-2 moleküler oksijenden bir elektron eksilterek O₂^{•-} oluşumunu katalizler ve oluşan bu radikal fagositik vezikül içerisine salınır (46). Süperoksitin fagositik veziküller içerisinde dismutasyonu sonucu MPO'nun esas substratı olan H₂O₂ üretilir (115). Özellikle nötrofillerin azurofilik granüllerinde bulunan MPO ürettiği oksidanlarla, özellikle de HOCl ile vücudun mikrobiyal ajanlara karşı savunmasında görev alırken aynı zamanda biyomoleküllerin oksidasyonuna ve doku hasarına katılır (46). Bununla birlikte birçok enflamatuvar hastalıkta artmış MPO düzeylerinin gösterilmesi, MPO aracılı oksidasyonun hastalık sürecine bizzat katıldığını desteklemektedir (45). Dolayısıyla MPO'nun hem enflamasyon hem de oksidatif stresle bağlantılı bir enzim olduğu söylenebilir.

Ancak bu süreç sırasında oluşan O₂^{•-}'in bir kısmı fagosit dışına veya ekstraselüler ortama sızabilir ve oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunur (46). Süperoksit anyonları özellikle demir olmak üzere, geçiş metalleri tarafından Fenton reaksiyonu olarak

adlandırılan kısmi indirgenme reaksiyonu ile OH⁻ meydana getirebilir (3). Baliga et al (116), bir çeşit “hem” proteini olan ve SOR oluşumuna katkıda bulunan sitokrom P-450'nin sentetik inhibitörü olan piperonil bütoksit ile sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarının anlamlı derecede azaldığını göstermişlerdir. Bu bulgularından yola çıkarak OH⁻ oluşumunun sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye katkısını ortaya koymuşlardır.

Sonuç olarak sisplatin aracılı toksisiteye farklı SOR türevlerinin farklı şekillerde katıldığını, diğer bir ifade ile sisplatin toksisitesinin oldukça farklı ajanlarla ve farklı mekanizmalarla oluşabileceği düşünülebilir.

Sisplatin nefrotoksisitesine, oksidatif stres ve enflamasyonun bir arada katıldığı bilindiğinden (1); MPO aktivite ve/veya konsantrasyon ölçümünün, nefrotoksisitenin tanı ve takibi açısından önemli olacağı söylenebilir.

Nötrofil aktivasyonunu/infiltrasyonunu ve buna bağlı olarak, MPO aktivitesini azaltan anti-CD54 monoklonal antikoru kullanımıyla; farelerde renal damar obstrüksiyonunun, SOR üretiminin ve hücre hasarın, dolayısıyla sisplatin kaynaklı nefropatinin azaltılabileceğinin gösterilmesi (117), MPO inhibisyonu ile renal hasarın önlenmesi arasındaki neden sonuç ilişkisini desteklemektedir.

Literatürde sisplatinle ortaya çıkan akut böbrek hasarında plazma MPO düzeylerini değerlendiren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte tamamı böbrek dokusunda olmak üzere; farklı rat türleri, sisplatin dozları ve MPO ölçüm metodları kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmış ve MPO düzeylerinin sağlıklı hayvanlarla karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (74, 78, 83, 88, 91, 92, 108, 109, 118- 121). Tüm bu çalışmalarda sakrifikasyon zamanı 1-14 gün arasında değiştiğinden, literatüre göre MPO'nun erken dönemde yükseldiği ve uzun süre yüksek kaldığı söylenebilir.

Bu çalışmadakine benzer rat türü ve sisplatin dozu kullanan Sener et al. (92) ve Bami et al. (119); spektrofotometrik yöntemle doku MPO aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, sırasıyla 14. ve 3. günde sakrifiye ettikleri ratlarda böbrek MPO aktivitesinin benzer şekilde yaklaşık 2.5 kat arttığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada ELISA yöntemi ile değerlendirilen plazma ve böbrek doku MPO düzeylerinin, istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da, sisplatin uygulaması ile azaldığı belirlendi.

Her ne kadar nötrofil infiltrasyonu sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin olası nedenleri arasında gösterilse de bunun aksini gösteren bu çalışmanın sonuçlarını da destekleyecek çalışmalar da mevcuttur (98, 122).

Hem periferde hem de böbrek dokularında nötrofil depleasyonu oluşturmak amacıyla RB6-8C5 monoklonal antikoru uygulanan ve sisplatinle akut böbrek yetmezliği oluşturulan farelerde; nötrofil infiltrasyonu olmadığı halde tübüler nekroz ve renal fonksiyonlarda herhangi bir düzelme gözlenmediği rapor edilmiştir (122).

Ayrıca Dickey et al. (98), sisplatin uyguladıkları ratlarda tübüler hasar ile BUN seviyeleri arasında doğrudan bir korelasyon olmasına rağmen, söz konusu dokularda enflamasyonun minimal düzeyde olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer bir ifade ile gerek böbrek fonksiyonları ile gerekse histolojik olarak gösterilen ciddi renal hasar durumunda aşikâr bir enflamatuvar durum gösterilemeyebilir.

Bu bulgulara benzer şekilde, bu çalışmada da yüksek BUN ve kreatinin düzeyleri ile gösterilen nefrotoksisiteye rağmen plazma MPO düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmediği gösterilmiştir. Böbrek dokularında ise sisplatinin MPO üzerine doğrudan bir etkisi olduğunu düşündürecek şekilde, sisplatin uygulanan grupta genel görüşün aksine MPO aktivitesinde düşme saptanmıştır.

Bu çalışmanın bulgularını destekleyecek şekilde, Ueta and Osaki (123), çeşitli kemoteröpatiklerin nötrofiller tarafından SOR oluşumu üzerine etkilerini ve bu yolda görevli ikincil habercilerin aktivitelerini inceledikleri *in vitro* çalışmalarında, sisplatinin nötrofillerle doğrudan etkileşimi ile MPO'yu doza bağımlı olarak azalttığını göstermişlerdir.

Her ne kadar bu çalışmada plazma ve renal sisplatin düzeyleri gösterilmemiş olsa da literatürde farklı çalışmalarla renal platin birikimi gösterilmiş (58, 93) olduğundan, doku MPO değerlerindeki azalmanın, uygulanan sisplatinin renal dokuda birikimi sonucu nötrofil aktivasyonunu inhibe edici etkisine sekonder gözlenen bir durum olduğu söylenebilir.

Bir takım sitokinler, iyonize radyasyon ve oksidatif stres gibi faktörlerle aktive edilebilen ve bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan NF- κ B; immünite, enflamasyon, hücre gelişimi, büyümesi, yaşamsal faaliyetlerinin sürdürülmesi ve apoptoz gibi geniş bir alanda etkilidir (27, 30). Enflamatuvar etkilerinin yanısıra, IL-10

gibi antiinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu veya proinflamatuvar genlerin ekspresyonunun inhibisyonu aracılığı ile antiinflamatuvar etkilerinin olduğu da bildirilmiştir. NF- κ B belli şartlarda lökosit apoptozisini uyarabilir ve enflamasyonun ortadan kaldırılmasına, dolayısıyla enflamasyonun feedback kontrolüne de katkı sağlar (95).

Organizmanın redoks durumunun, NF- κ B aktivitesinin çeşitli basamaklarında pozitif veya negatif yönde düzenlenmesine katılabildiği ve bu aktivasyonda özellikle H₂O₂'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir. H₂O₂, normal aktivasyon yolağında olduğundan farklı olarak, I κ B-alfa'nın 42. pozisyonunda bulunan tirozin artışı üzerinden fosforilasyonuna neden olur; bu fosforilasyon sonucu aktivasyonun gerçekleşip gerçekleşmeyeceği ise değişiklik göstermektedir. Diğer taraftan SOR, I κ B-alfa'nın glutatyonilasyonuna neden olarak degradasyonu doğrudan önleyebilir (30). H₂O₂'nin yanısıra O₂'nin de NF- κ B'nin aktivasyonunda etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (27).

SOR üretimine karşı oluşan hücresel cevap, ilerleyen oksidatif stresin önlemesi ve hücrenin canlılığını sürdürmesi için kritik olduğundan, oksidatif hasarın ilerlemesinin sonuçlarından biri de SOR tarafından apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün tetiklenmesidir. Dolayısıyla ılımlı koşullarda SOR ile aktive edilen NF- κ B'nin, hücre ölümünün tetiklendiği ağır koşullarda canlılığı korumaya yönelik olarak SOR tarafından inhibisyonu beklenen bir sonuçtur (30).

Literatürde NF- κ B'nin SOR ile inhibe veya aktive edilebileceğini rapor eden birbirine zıt sonuçların varlığı, farklı metodların kullanımına bağlı olabileceği gibi farklı yolların çalışılmasına veya farklı hücre tiplerine de bağlanabilir (30). Brzoska et al. (124), CuZn-SOD enzimi taşımayan yani dolaylı olarak SOR oluşumunun tetiklendiği farelerin karaciğer ve böbrek dokularında NF- κ B ilişkili 84 genin analizini yapmış ve sonuçta farklı dokularda ortak genlerin yanısıra farklı genlerin de up-regülasyonunun ve down-regülasyonunun varlığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin oksidatif strese duyarlı bir transkripsiyon faktörü oluşunu yansıtabilecek şekilde, NF- κ B'nin artışı ile oksidatif stresi gösteren SOD, KAT, GSH gibi parametrelerin azalması arasında belirgin bir korelasyon söz konusudur (8, 73, 79-81, 125).

Ayrıca SOR ile aktive/inhibe olabilen NF- κ B'nin aynı zamanda SOR üretimi ve tüketimi üzerine etkili olduğu da bilinmektedir. NOX-2, indüklenebilen nitrik oksit sentetaz, siklooksijenaz, sitokrom P450 gibi SOR üreten enzimleri indüklediği ve bu etkisine zıt bir şekilde SOR'un etkilerinden organizmayı korumaya yönelik olarak da MnSOD, glutasyon peroksidaz, hem oksijenaz, GST ailesinin bir üyesi olan GST-pi gibi antioksidan enzimleri de artırdığı gösterilmiştir (30).

Literatürde sisplatin uygulanan hayvanlarda NF- κ B'nin değişimi; western blotlama (80, 125, 121), immünohistokimyasal yöntemler (72, 73, 126), ELISA (8, 127), polimeraz zincir reaksiyonu (76, 79, 81) gibi farklı yöntemlerle gösterilmiştir. Farklı rat türleri, sisplatin konsantrasyonları, sakrifikasyon zamanları ve ölçüm yöntemleri kullanılmasına rağmen yukarıdaki tüm çalışmalarda sonuçlar benzer şekilde böbrek dokusunda NF- κ B'nin artışına işaret etmektedir. Buna ek olarak, Elseweidy et al. (8), *ip*, 4 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları Wistar ratlarda, NF- κ B ile üre ve kreatinin düzeyleri arasında belirgin korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, Francescato et al. (72), *ip*, 5 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları Wistar ratlarda NF- κ B düzeylerinin sisplatinle arttığını; ayrıca uygulamanın 5. ve 20. gününde sakrifiye ettikleri ratlarda, 20. günde kreatinin düzeyleri kontrol grubu ile fark vermeyecek şekilde düşse de NF- κ B düzeyleri açısından 5. gün değerleri ile anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir.

Morais et al. (128), sisplatin uygulaması ile metastatik renal karsinoma tüm hücre lizatlarında yapılan ölçümlerde NF- κ B aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığını; ancak beklenmeyen bir şekilde nükleus lizatlarında farklı subünitlerin artışını rapor etmişlerdir. NF- κ B nükleusa transloke olabildiğinden, aynı doku örneğinde yapılan aktivite ölçümleri farklı hücre kompartmanlarında farklı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu çalışmada farklı hücre kompartmanları değil, doğrudan tüm böbrek dokusu homojenatları kullanılmıştır. Bu nedenle sisplatinin NF- κ B üzerine etkilerini ve literatür verilerini incelerken; ölçümün hangi numunede, hangi hücre kompartmanında çalışıldığına dikkat etmek gerektiği söylenebilir.

Literatür verileri genel olarak sisplatin ile NF- κ B aktivasyonunun arttığı yönünde olsa da, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde sisplatin uygulamasının NF- κ B'nin down regülasyonu ile sonuçlandığı bu durumun da apoptotik etkiyi artırdığı gösterilmiştir

(129). NF- κ B'nin down regülasyonunun, başlangıçta artan stimülasyonuna cevap olarak κ B aracılığıyla ortaya çıkan negatif feedback etkisi ile (130) veya doku türüne bağlı olarak (129) ortaya çıkmış olabileceği söylenebilir.

Bu çalışmada, sisplatin uygulanan hayvanlarda plazma ve doku NF- κ B düzeylerinde istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da sayısal bir azalma saptanmıştır. Bu çalışmanın plazma ve doku NF- κ B değişimleri her ne kadar literatür verileri ile uyumlu olmasa da, bu çalışmanın MPO düzeyleri ile kendi içinde uyumludur. Sonuçta artmadığı gösterilen plazma/doku MPO düzeylerine bağlı olarak lökosit infiltrasyonunun ve aktivasyonunun gerçekleşmediği varsayılabilir. Bu koşullar altında SOR oluşumu azalacağından; oksidatif stres ile aktive de olabilen (30) NF- κ B düzeylerinin azalmış olması beklenebilir.

SOR'un yanısıra, çeşitli etkenlerle oluşturulan DNA hasarı ile de indüklendiği bilinen NF- κ B'nin, farklı ajanlarla ortaya çıkan DNA hasarının türüne göre, apoptotik veya anti-apoptotik etki gösterebileceği; bunun yanında sisplatinin DNA üzerinde oluşturduğu hasarın ise apoptotik etkiye yol açtığı gösterilmiştir (131).

Bununla birlikte, NF- κ B inhibisyonu yapılan transgenik farelerin renal toplayıcı tübül hücrelerine düşük konsantrasyonda sisplatin uygulaması ile nekrotik hücre ölümü engellenmeksizin, apoptotik etkinin arttığı gösterilirken; yüksek konsantrasyonda hücrelerin sisplatinine duyarlılığı diğer bir ifade ile hücrelerin ölüm oranı kontrol grubuna benzer bulunmuştur (132). Dolayısıyla NF- κ B'nin sisplatin kaynaklı apoptoza katıldığı ancak yüksek dozlarda daha yaygın olarak görüldüğü bilinen ve bu çalışmada histopatolojik olarak varlığı gösterilen nekroz ile ilişkili olmadığı söylenebilir.

Ayrıca sisplatinin, *in vitro* koşullarda, NF- κ B DNA bağlanma bölgeleri olan “ κ B” bölgelerine bağlanarak NF- κ B'nin inhibisyonuna ve sonuçta tümör hücrelerinin apoptoz ve nekroz duyarlılıklarının artışına yol açtığı gösterilmiş olması da bu çalışmanın bulgularını desteklemektedir (133). Daha genel bir ifadeyle Chiao et al. (130)'un bulguları da dikkate alındığında, sisplatin uygulamasının erken dönemlerinde doku hasarı gibi steril enflamasyona yol açacak faktörlerle de tetiklenebilen NF- κ B düzeylerinin; DNA üzerindeki “sisplatinle bloke κ B” bölgelerine bağlanamayıp, negatif feedback ile sakrifikasyon zamanına kadar azalmış olabileceği de düşünülebilir.

Sisplatinin enflamatuvar etkilerinin, kemokin ve sitokinlerin salınımının uyarılmasına yol açan, intraselüler hasara sekonder gelişen DAMP aracılığı ile de ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (1). Bu nedenle DAMP ailesinin iyi bilinen bir üyesi olan ve steril enflamasyona katıldığı bilinen HMGB-1'in (19), sisplatin tedavisi ile ortaya çıkan toksik duruma katkısı olduğu düşünülebilir.

Nefrotoksisite, iskemi reperfüzyon hasarı, sepsis gibi farklı nedenlerle ortaya çıkabilen akut böbrek hasarında HMGB-1'in arttığı ve bu akut hasarı TLR4 reseptörleri aracılığı ile gerçekleştirdiği bilinmektedir. Günümüzde böbrek hastalıklarında HMGB-1'in rolünün ve HMGB-1 aracılı sinyal yollarının katkısının anlaşılması ile böbrek hastalıklarının tedavisinde yeni stratejiler geliştirilebileceği öne sürülmektedir (134).

Hücre içinde bir transkripsiyon faktörü olarak hücre döngüsünün ve çeşitli genlerin transkripsiyonunun regülasyonuna katılan HMGB-1, hücre dışında ise doku tamirine katılan hücreler için kemokin olarak rol oynarken; lökosit salınımını indükleyen bir proenflamatuvar medyatör olarak da sitokin salınımını indükler (135). HMGB-1'in ekstraselüler ortama geçişi iki şekilde olmaktadır; nekrotik/ hasarlı hücrelerden pasif olarak veya uyarılmış monosit ve makrofajlardan aktif olarak (23, 136).

H₂O₂ stimülasyonu ile monosit ve makrofajlardan, doza ve zamana bağımlı olmak üzere, aktif ve pasif HMGB-1 salınımının indüklendiği gösterilmiştir. Non-toksik dozlarda H₂O₂ uygulaması, 3 ila 24 saat arasında HMGB-1'in aktif salınımına neden olurken; yüksek dozların sitotoksik etkiden dolayı HMGB-1'in hem aktif hem pasif salınımını tetiklediği rapor edilmiştir (26).

HMGB-1 ve sisplatin sitotoksitesi arasında genel olarak kabul edilen bir korelasyon yoktur (137). HMGB-1 knockout farelerin yaşamlarını sürdürememeleri nedeniyle, HMGB-1^{-/-} ve HMGB-1^{+/-} fare embriyonik fibroblast hücrelerinden oluşturulan hücre kültürlerine sisplatin uygulandığında canlı hücre oranlarının farklı olmadığı; diğer bir ifade ile endojen HMGB-1'in sisplatine hücresel cevapta anlamlı bir rol oynamadığı iddia edilmiştir (138). Ancak aksini gösteren çalışmalar da vardır (139, 140). Meme kanseri hücrelerinde steroid hormonlarla indüklenen HMGB-1'in artmış ekspresyonunun, sisplatin ve karboplatine duyarlılığı arttırdığı (140); insan servikal kanser hücre hattında artmış HMGB-1 düzeylerinin sisplatine bağlı apoptozu indüklediği (139) rapor edilmiştir.

Ancak servikal kanser hücrelerinde yapılan aynı çalışmada, uzun süre sisplatine maruz kalması sonucu oluşan yüksek HMGB-1 düzeylerinin, bu hücrelerin apoptoza karşı daha dirençli hale gelmesine neden olduğu da gösterilmiştir (139).

Çeşitli yollarla artırılan endojen HMGB-1 düzeylerinin sisplatin ile ilişkili toksik mekanizmalarla etkileşiminin incelendiği bu çalışmalardan (139, 140) farklı olarak; Huang et al (141), insan osteosarkoma hücrelerinde sisplatin uygulamasının HMGB-1 ekspresyonunu zamana bağımlı olarak anlamlı derecede artırdığını, aynı zamanda sisplatin duyarlılığını da azalttığını göstermişlerdir. HMGB-1 ekspresyonunun baskılandığı deney koşullarında ise, apoptotik hücre ölümünde gözlenen artış ile belirlendiği üzere, HMGB-1 yokluğunun sisplatine karşı hücre duyarlılığı anlamlı derecede artırdığını öne sürmüşlerdir.

Sisplatine hücresel cevapta HMGB-1'in rolü genel olarak değerlendirildiğinde hücre tipine, HMGB-1 seviyelerinin ölçümünde kullanılan metoda, hatta hücre kültür ortamına ve pasaj sayısına göre de farklı sonuçlar alınabileceği ifade edilmiştir (142). Ayrıca bu farklılıkların yanısıra, hücre hatlarına eklenen sisplatinin uygulama süresi ve konsantrasyonundaki değişiklikler de (138, 140, 141) alınan sonuçların birbirinden farklı olmasında etkili olabilir.

Sisplatin uygulamasına sekonder ortaya çıktığı bilinen ve bu çalışmada da histolojik olarak varlığı gösterilen nekrotik hücre ölümünün ekstraselüler HMGB-1 düzeylerinde artışa neden olacağı beklenirken, KONT grubu ile farklı olmayan plazma HMGB-1 düzeyleri, CP grubu böbrek dokusunda gösterilen azalmış ekspresyona bağlanabilir. Bu ekspresyon azalmasının nedeninin HMGB-1'in sisplatin DNA bağlanma bölgelerine olan artmış affinitesi olabileceği düşünülebilir. Bununla birlikte Sharma et al. (143), düşük dozlarda sisplatinle HMGB-1 hipoasetilasyonu ve kromatindeki yapısal değişikliklerle beraber HMGB-1'in DNA'ya bağlanma oranının da arttığını dolaylı olarak ılımlı yüksek HMGB-1 sonuçlarına neden olduğunu göstermişlerdir.

Sisplatin DNA bağlanmalarının yaklaşık %90'ını oluşturan 1,2 zincir içi (GpG) çapraz bağlanma bölgeleri ile HMGB-1 "A domaini" arasındaki etkileşimler gösterilmiştir. Bu bağlanmanın artmasındaki en önemli neden domainin 37. pozisyonda içerdiği fenilalanin artığıdır. İki platinle modifiye olmuş guanin bazının karşısına denk gelen minör oyukta bulunan hidrofobik grup içine fenilalaninin fenil halkasının oturması ile gerçekleştiği bilinmektedir (144). HMGB-1'in bu şekilde, DNA üzerinde platinlenmiş

alanları kapatarak nükleotid eksizyon tamiri (NET)'ni engellediği bildirilmiştir (137). Sisplatinin bağlanması sonucu DNA'da oluşan hasarın tamirinde HMGB-1'in etkisinin incelendiği bir *in vitro* çalışmada, HMGB-1'in NET üzerine etkisinin erken saatlerde başladığı ve 36. saatten sonra hücrenin bu etkiyi kompanse edebildiği gösterilmiştir (145). Ayrıca özellikle DNA'nın hücre içinde kromatinlerde paketlenmiş olması, tamir mekanizmalarını da içeren birçok hücrenel olayı doğrudan etkilediğinden; *in vivo* ortamı daha iyi yansıtacak şekilde nükleozomlar üzerinde yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (146).

Sonuç olarak HMGB-1'in sisplatin modifiye DNA'ya bağlanmasının tamir proteinlerinin hasarlı alanı tanınmasına engel olduğu, dolayısıyla da sitotoksik etkiyi ve duyarlılığı arttırdığı düşünülebilir.

Li et al. (147), düşük doz sisplatinin (100 µg/kg rat ağırlığı) hem *in vivo* hem *in vitro* koşullarda HMGB-1 salınımını engelleyerek enflamasyonun baskılanmasını sağladığını bu sayede de akut karaciğer hasarını iyileştirmede etkili olduğunu göstermişlerdir. HMGB-1'in, sisplatinin konsantrasyonuna bağlı olarak gerektiğinde bir regülatör gibi fonksiyon yaptığını ve bu fonksiyonun HMGB-1'in sisplatinin DNA üzerindeki bağlanma bölgelerine yüksek affinitesi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

NET dışında başka mekanizmalar da HMGB-1 aracılı doku hasarına katkıda bulunabilir. Ekstraselüler ortamda farklı reseptörleri olduğu bilinen HMGB-1'in, NF-κB bağımlı transkripsiyon yolağının aktivasyonuna dolayısıyla proenflamatuvar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin salınımına neden olduğu gösterilmiştir (148). Ayrıca HMGB-1'in stimülasyonu ile NF-κB ve NOX aktivasyonu sonucu nötrofillerin SOR üretmek üzere stimüle edildiği bilinmektedir. Bu durumun HMGB-1 aracılı doku hasarının primer nedeni olduğu kabul edilmektedir (23).

Sepsis hastalarında HMGB-1'in yüksek düzeylerinin mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (23). Dahası HMGB-1'in geç dönemlerde salınım kinetiği nedeniyle enflamatuvar durumun ciddiyetini gösteren uygun bir belirteç olarak kullanılmasını sağlayabileceği öne sürülmüştür (149).

Organizmada redoks sensörü olarak da görev yapan HMGB-1'in, redoks sensitif özelliği 23. ve 45. pozisyonlarda taşıdığı sistein artıklarından kaynaklanır. Bu iki sistein artığı düşük okside edici koşullarda bile kolaylıkla disülfid oluşumuna katılır.

Dolayısıyla HMGB-1 fizyolojik koşullarda bile çoğunlukla okside formda bulunur (26, 135) ancak glutasyon ve tiyoredoksin sistemleri ile redükte halde kalması sağlanmaktadır (26).

Ekstraselüler ortamda organizmanın oksidasyon/redüksiyon durumuna göre HMGB-1'in farklı fonksiyonları öne çıkmaktadır (91, 135, 137). Redükte veya disülfid (sadece 23. ve 45. sistein artıklarının disülfid bağına katılması) HMGB-1, çeşitli kemokinlere bağlanarak lökosit aktivasyonunu stimüle ederken; tamamen okside formda bulunan HMGB-1 ise sitokin veya kemokin aktivitelerinden yoksun olduğu gösterilmiştir (137, 135). Bununla birlikte ekzojen redükte HMGB-1'in hücre canlılığını koruyucu yönde etki gösterirken; okside durumda apoptozu indüklediği (150) ve apoptotik hücrelerin immün tolerans geliştirme özelliği yerine immün modülatör özelliğinin ortaya çıkmasına neden olduğu (26) rapor edilmiştir. Bu durumda HMGB-1'in etkilerinin tanımlanmasında redükte ve okside formda olmasının önemli rol oynadığı düşünülebilir.

Bu çalışmada her ne kadar NOX aracılı SOR artışı gösterilememiş olsa da, sisplatinin mitokondriyal solunum zinciri enzimlerine etkisi ile SOR oluşumunu tetikleyerek oksidatif stresi artırdığının belirtilmiş olması (1) göz önüne alındığında HMGB-1'nin okside formda olma olasılığının daha yüksek olduğu söylenebilir.

Bununla birlikte, Wang et al. (151) sistein tiyollerinin oksidasyonu sonucu HMGB-1'in sisplatin ile hasarlanan DNA molekülüne bağlanma oranlarının azaldığını böylece sisplatine karşı ortaya çıkan HMGB-1 cevabının da hücrenin redoks durumu ile değişebileceğini öne sürmüşlerdir.

Sülfonil HMGB-1 fraksiyonunun artması sisplatin ile hasarlanan DNA'ya daha az oranda ve/veya daha zayıf bağlanmaya neden olacağından; hücrelerde, NET gibi DNA tamir mekanizmalarına karşı HMGB-1 tarafından sağlanan blokajın azalacağı düşünülebilir. Bu durum tümör hücrelerinde sisplatin direncinde artmaya neden olurken, diğer hücrelerde toksik etkilerde azalmaya yol açacaktır.

Sisplatinle uyarılan HMGB-1 salınımının, poli ADP-ribozilasyon ile çeşitli proteinlerin fonksiyonlarını ve bir transkripsiyon kofaktörü olarak gen ekspresyonlarını düzenleyen önemli bir nükleer enzim olan poli ADP-riboz polimeraz-1 (PARP-1) aracılı nekroz ile doğrudan ilişkili olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (114, 152, 153).

Park et al. (114), yüksek doz sisplatin uygulamasının ardından böbrek proksimal tübül hücrelerinde oksidatif strese bağlı olarak HMGB-1 salınımının arttığını; ancak uygulamadan 2 saat sonra ortama eklenen PARP-1 inhibitörünün (PJ34) bu salınımı doza bağımlı olmak üzere azalttığını göstermişlerdir. Sonuç olarak böbrek proksimal tübül hücrelerinden PARP-1 bağımlı HMGB-1 salınmasının sisplatin kaynaklı enflamasyona katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir.

Sisplatinin nefrotoksik etkilerinin anlaşılmasından sonra birçok önleyici farmakolojik, moleküler ve genetik yaklaşım denenmiştir. Bu yaklaşımlar primer hedefler esas alınarak gruplandırıldığında sisplatinin renal hücreler tarafından alımı, renal metabolizması ve biyoaktivasyonu, hücre ölüm yolları, gen regülasyonu, oksidatif stres ve enflamasyon şeklinde sıralanabilir (7).

Nefrotoksisite açısından değerlendirildiğinde, yetişkinlerde proksimal tübül hücreleri bölünmeyen hücreler olduğundan sisplatin DNA bağlanmaları toksisite mekanizmasında anahtar bir olay olarak düşünülmemelidir. Nükleer ve mitokondriyal DNA'nın yanısıra sisplatin RNA, protein, fosfolipit gibi diğer hücresel bileşenleri de hedef alır ve birçok farklı mekanizma sağlıklı renal hücrelere sisplatin toksisitesi ile ilişkilidir. Oksidatif stres ve enflamasyon diğer hücresel bileşenler üzerine sisplatinin etkisini açıklayabilir ve nefrotoksisite ile doğrudan ilişkili olabilir (3).

Sisplatin kaynaklı oksidatif hasar rat böbrek dokularında özellikle non-enzimatik (GSH, NADPH) ve enzimatik (SOD, KAT, GPx, Glutasyon redüktaz ve GST) antioksidan savunma sisteminin gerilemesi ile ilişkilendirilmiştir (3) ve sisplatinle indüklenen oksidatif stres ve enflamatuvar cevabın, antioksidanlar gibi çeşitli kimyasal ve doğal bileşenlerle kısmen de olsa önlenildiği gösterilmiştir (80, 81, 89, 94, 118, 154). Yapılan bir klinik çalışmada antioksidan ajanlar olarak rol oynayan selenyum ve vitamin E'nin, kemoterapinin 3. seansı sonrası ve terapiden 1 ay sonra uygulandığında sisplatinin oksidatif toksisitesini azaltmada etkili olduğunu göstermişlerdir (154). Sisplatin organizmada güçlü elektrofilik ara ürünlere dönüşerek, nükleofilik yer değiştirme reaksiyonları ile DNA çapraz bağlanmalarına neden olduğu bilinmektedir. Aynı özellik, sülfidril grubu içeren enzimlerin inaktivasyonuna ve protein sülfidril bağlanmalarına da neden olarak sisplatin yan etkilerinin ortaya çıkmasına yol açabilir (3).

Bu çalışmada, nefrotoksisite oksidatif stres ve enflamasyonun bir arada katıldığı düşünülen yollar üzerinden değerlendirildi ve bu nedenle deneyde kullanılacak nefroprotektif ajan olarak da bu yolları hedef aldığı gösterilen (155), klinikte de sıklıkla ve gerektiğinde yüksek dozlarda uygulanabilen NAC'ın kullanılması tercih edildi.

Doğrudan serbest radikal yakalama özelliği *in vitro* koşullarda daha belirgin olan NAC'ın *in vivo* başlıca etkisinin GSH prekürsörü oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir (55). Hücre içi GSH havuzu replasmanının, oksidatif hasar durumunda yararlı olduğu genel olarak kabul edilmektedir (53). Ayrıca literatürde renal GSH düzeylerinin sispaltinle azaldığı da gösterilmiştir (82, 121). Muldoon et al. (156), hücrel GSH inhibitörü olan bütionin sülfoksimin uygulaması yapılan tümör ve normal hücrelerde sispaltin kaynaklı toksisitenin arttığını göstermişlerdir. Ancak, GSH'nın doğrudan uygulanmasının, GSH'nın bağırsak ve hepatik γ -glutamiltransferaz ile hidrolizinden dolayı dolaşım GSH düzeyini önemli ölçüde arttırması pek olası değildir. Dolayısıyla, GSH sentezinin metabolik öncüllerinin uygulanmasının, GSH düzeylerini arttırmak için olası bir strateji olduğu düşünülmektedir (53). Ayrıca sispaltinin sitotoksik etkisinin önlenmesinde sodyum tiyosülfat, NAC ve glutatyon etil ester uygulamasının etkinliği gösterilmiş ve bu ajanlar içinde en etkili olanın NAC olduğu bildirilmiştir (156).

Jiang et al. (157), SOR türevlerinin özellikle de hidroksil radikalının sispaltin aracılı apoptozda rol oynayan p53 aktivasyonuna katıldığını ve bu aktivasyonun NAC ve DMTU gibi radikal yakalayıcılar ile azaltılabileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte spesifik olarak doğrudan hidroksil radikal yakalayıcısı olarak görev yapan DMTU'nun NAC'dan daha az efektif olduğunu göstermişler ve bu sonuçlara dayanarak NAC'ın farklı radikal türlerini de inhibe edebileceğini rapor etmişlerdir.

NAC'ın koruyucu etkisi sispaltin ile indüklenen nefrotoksitenin yanısıra ototoksisite (98, 158), hepatotoksisite (159) ve kardiyotoksisite (160) açısından da gösterilmiştir.

Buna karşılık sülfidril bileşikleri güçlü nükleofildir ve bu sayede elektrofilik ara ürünlere kovalent olarak bağlanarak, sispaltinin istenmeyen toksik etkilerinin yanısıra antitümör etkinliğini de azaltabilirler (3). Amifostin, teofilin, NAC, GSH gibi bir çok sülfür içeren bileşiğin çeşitli kanser tiplerinde sispaltinin antitümör etkinliğini azaltmaksızın veya inhibe etmeksizin nefrotoksik etkilerini azalttığı (94, 99)

gösterilmesine karşın aksini iddia eden klinik ve deneysel çalışmalar da mevcuttur (61, 94, 161).

Böbrek dokularında sisplatin konsantrasyonunun NAC uygulaması ile anlamlı olarak azalmasında, sisplatin-NAC kompleksinin azalmış renal tübüler reabsorpsiyonu ve bunun sonucunda sisplatinin artmış üriner sekresyonunun etkili olduğu öne sürülmüştür. Hatta aynı etkinin enjeksiyon öncesi birarada çözülen NAC ve sisplatin uygulamaları sonucunda da ortaya çıkacağı iddia edilmiştir (162).

Sisplatinin klinik etkinliğine rağmen, hücrel ilaç direncinin hastaların tedaviye cevabında uzun dönemde önemli bir engel olduğu bilinmektedir. Sisplatin direncinde ilacın azalmış hücre içi birikimi, artmış DNA tamiri ve artmış hücrel GSH ve metalotiyonein içeriği gibi çeşitli potansiyel ve moleküler mekanizmalar tanımlanmıştır (163).

Ishikawa and Ali-Osman (164), sisplatinin nükleofilik atakla GSH'ya kovalent olarak bağlandığını ve bu kompleksin ATP bağımlı bir pompa ile hücre dışına taşındığı göstermişlerdir. Buna ek olarak, sisplatin kemoterapisine duyarlı olduğu bilinen testis tümörlerinde GSH seviyelerinin, sisplatine dirençli olduğu bilinen mesane tümörlerine oranla daha düşük olduğu; tamamında olmasa da bazı hücre hatlarında GSH inhibisyonunun sisplatine duyarlılığı artırdığı da gösterilmiştir (165). Ayrıca GSH ile sisplatinin konjugasyonunun daha ileri reaksiyonlarla reaktif tiyollere dönüştüğü ve bu bileşiklerin toksisiteye katkı yaptığı da bilinmektedir (14).

Appenroth et al. (166) tarafından, asetilsistein uygulaması sonrası erişkin ve genç ratlarda birinci saatte böbrek GSH konsantrasyonlarında yaklaşık %50 oranında artış göstermişlerdir. Dolayısıyla sisplatin uygulama zamanı ile NAC uygulama zamanı arasında verilen sürenin sisplatin DNA bağlanmaları için geçen süreden erken olmaması gerektiği söylenebilir. Bu veriler değerlendirildiğinde NAC ve sisplatinin uygulanma yolundan ziyade uygulama zamanının farklı olması gerektiği düşünülebilir. Sonuçta NAC uygulaması ile intraselüler GSH düzeylerinin artmasından önce, antitümöral etkinlik için sisplatin DNA bağlanmalarının oluşumu için yeterli bir süre geçmesini beklemek daha doğru bir yaklaşım gibi görünmektedir. Bu çalışmada iki ajan arası verilen 4 saatlik sürenin, her ne kadar bu çalışmada gösterilmese de antitümöral etkinlik için gerekli olduğu söylenebilir.

Literatürde NAC'ın sisplatin ile ortaya çıkan renal toksisite üzerine olan etkileri farklı yollar üzerinden değerlendirilmiştir. Sisplatin uygulaması sonucu gösterilen kilo kaybı (58, 61, 98, 101), apoptoz indüklenmesi ve kaspaz aktivasyonu (96, 155), oksidatif stres (65, 85, 111, 155) ve enflamasyon (111, 155) gibi parametrelerin ve renal kan akımı, kan basıncı gibi renal hemodinamik değişikliklerin (58) NAC ile düzeltilebildiği gösterilmiştir.

Bu çalışmada sisplatin uygulaması ile birlikte görülen aşırı kilo kaybının CP+NAC grubunda gözlenen değerlere yakın olması nedeniyle, NAC'ın, sisplatinin kilo kaybına neden olduğu düşünülen, gastrointestinal toksisitesini önleyemediği söylenebilir.

Bununla birlikte literatürde farklı dozlarda sisplatin verilen ratlara uygulanan farklı doz ve sürelerde NAC ile kilo kaybının önlenebildiğini gösteren çalışmalara da rastlanılmıştır (58, 61, 98, 101). Dickey et al. (98) her iki ajan da tek doz olmak üzere, *ip* 10 mg/kg rat ağırlığı dozunda sisplatin ve *iv* 400 mg/kg rat ağırlığı NAC uyguladıkları ratlarda NAC'ın kilo kaybını önleyici etkisini göstermişlerdir. Abdel-Wahab et al. (101), *ip* 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin verdikten 3 gün sonra başlayıp 4 hafta boyunca haftada 3 gün *ip* 50 mg/kg rat ağırlığı NAC uyguladıklarında, vücut ağırlığındaki azalmanın düzeldiğini rapor etmişlerdir. Abdelrahman et al. (58), *ip* 5 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uyguladıkları hayvanlarda sisplatinden önce 4 gün boyunca ve sonrasında ardışık 5 gün daha *ip* 500 mg/kg rat ağırlığı NAC uyguladıklarında sisplatinin kilo kaybını artırıcı etkisini ortadan kaldırdığını göstermişlerdir.

Bu çalışmalar değerlendirildiğinde NAC'ın *iv* uygulandığı (61, 98) ya da *ip* olan NAC uygulamasının bu çalışmaya göre oldukça uzun süre devam ettiği (58, 101) görülmüştür. Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan NAC dozu ve/veya süresinin, akut gelişen gastrointestinal toksisiteyi önlemekte yetersiz kaldığı düşünülebilir.

Bununla birlikte bu çalışmada poliürik etkinin de NAC ile düzeltilememesi yine kilo kaybındaki olumsuz sonuçların nedenlerinden biri olarak gösterilebilir. Sisplatinle birlikte NAC uygulanan grupta, kontrole göre anlamlı artış olması NAC'ın ortaya çıkan poliüriyi düzeltmede de etkisiz olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada doğrudan tek başına NAC'ın poliürik etkisi olmadığı gösterilmiş olsa da ilginç bir şekilde CP+NAC grubunda, CP grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarla karşılaştırıldığında 24 saatlik idrar hacmi açısından bir artış saptanmıştır. Benzer olarak sisplatin ve NAC'ı birlikte uygulayan Abdelrahman et al. (58) sisplatinle birlikte NAC

uygulanan grupta istatistiksel açıdan anlamlı olmasa da sayısal olarak sisplatin grubuna göre önemli bir artış göstermişlerdir.

Sisplatin kaynaklı proteinürinin, 6 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uygulamasından 3 gün sonra başlanan ve haftada 3 kez olmak üzere ardışık 4 hafta devam edilen NAC ve taurin (her ikisi de 50 mg/kg rat ağırlığı) kombinasyonu ile daha belirgin olsa da; aynı süre ve dozda tek başına uygulanan NAC ile de anlamlı derecede düzeltilebildiği gösterilmiştir (101). Bunun aksine bu çalışmada her ne kadar istatistiksel olarak farklı olmasa da sayısal olarak, CP+NAC grubunda hala oldukça yüksek mikroalbüminüri düzeyleri görülmektedir. Diğer bir ifade ile NAC ilavesi, sisplatin kaynaklı proteinüriyi önlemede yetersiz kalmıştır. Sonuçlardaki bu farklılık, bu çalışmada her ne kadar çok daha yüksek doz olsa da, NAC uygulama süresinin kısa olmasından kaynaklanabileceği gibi, mikroalbümin düzeylerinin ölçümünün idrar protein ölçümüne göre daha hassas oluşundan da kaynaklanabilir.

Bu çalışma ile uyumlu olarak, farklı doz ve sürelerde sisplatin uygulayan çalışmalarda yine farklı doz ve sürelerde NAC uygulaması ile serum/plazma BUN ve kreatinin değerlerinde azalma sağlanabildiği (58, 85, 97, 98, 101, 111) ileri sürülmüştür. Bununla birlikte fonksiyonel olarak gösterilen düzelmelerin yanısıra histopatolojik iyileşme de bu çalışmada ve literatürde farklı çalışmalarla (58, 85, 98, 111) gösterilmiştir. Her ne kadar bu çalışmalarda kullanılan rat türleri, uygulanan sisplatin ve NAC dozu, uygulama şekli ve süresi farklı olsa da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Abdelrahman et al. (58), NAC (500 mg/kg rat ağırlığı, 9 gün) uygulaması ile apoptoz ve nekrozu büyük oranda azalttıklarını, çok az alanda vakualizasyon ve şişme gözlendiğini göstermişlerdir. Shalby et al. (111), sisplatin uygulaması ile ortaya çıkan proteinöz silendir oluşumu, konjeste glomerül ve interstisyel hemorajide de NAC'ın olumlu etkilerini göstermişler; özellikle proksimal tübüllerde gösterdikleri tübüler nekrozun NAC ile anlamlı derecede azalmasını, NAC'ın özellikle böbreklerde platin birikimini önlemesi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Ayrıca *ip* 7.5 mg/kg rat ağırlığı sisplatin uygulamasından 15 dk. önce *iv* 500 mg/kg rat ağırlığı NAC uygulanan Wistar ratların böbrek dokusu TNF alfa içeriğinin azalmasını, sisplatin uygulaması sonucu yaygın olarak görülen nekrotik hücre ölümünde azalmaya katkı sağladığı ileri sürülmüştür (85).

Bu çalışmada NAC ile histopatolojik açıdan CP grubuna göre anlamlı bir düzelme gösterilmekle beraber, NAC'ın tübül epitel hücre hasarına ve hemorajiye etkisinin ise nekroz kadar belirgin olmadığı gözlenmiştir. Bu bulguları destekleyecek şekilde oksidatif stresin apoptozdan ziyade özellikle nekrotik hücre ölümüne katıldığı ve bu etkinin NAC ile düzeltilebildiğini gösteren çalışmalar vardır (112, 167). Yano et al. (112), yüksek doz kısa süreli sisplatin uygulanan renal epitel hücrelerine sisplatin ile birlikte NAC uygulandığında hücrelerin canlılık oranının yalnızca sisplatin uygulanan hücrelere kıyasla arttığı; ancak uzun süreli düşük dozlarda sisplatin uygulandığında NAC'ın etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

Literatürde sisplatin ile birlikte NAC uygulamasının nötrofil aktivasyonuna ve/veya MPO düzeylerine etkisini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte doğal bir antioksidan olan ve GSH düzeylerini yükselttiği gösterilen fisetin ile birlikte sisplatin uygulanan ratlarda böbrek dokularında MPO, NADPH oksidaz ve NF- κ B p65 subünit aktivitesinin tek başına sisplatin uygulanan hayvanlara göre azaldığı gösterilmiştir (104). Bu çalışmada gerek tek başına gerek NAC ile kombine uygulanan sisplatin ile plazma ve doku MPO değerlerinde KONT grubuna göre her hangi bir anlamlı değişiklik elde edilememiştir.

NAC uygulamasının tek başına MPO düzeylerine olan etkisini gösteren çalışmalara genel olarak bakıldığında doğrudan etkili olmadığı gösterilse de (168), bu çalışmada NAC uygulaması sonucu doku MPO değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmada ayrıca sisplatin uygulaması ile baskılandığı düşünülen nötrofil aktivasyonu, dolayısıyla doku MPO düzeylerinin de NAC ile değişmediği de izlenmiştir.

Her ne kadar literatürde deneysel sisplatin modeli üzerinde NAC'ın MPO düzeylerine etkisini inceleyen her hangi bir çalışmaya rastlanılamasa da; antienflamatuvar özellikleri olduğu da bilinen NAC'ın NF- κ B düzeylerini dolayısıyla enflamasyonu azaltabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (112, 155, 169).

Luo et al. (155), 5 mg/kg rat ağırlığı *iv* sisplatin uygulamasından 2 gün önce başlanan ve toplam 7 gün boyunca 250 mg/kg rat ağırlığı *ip* uygulanan NAC'ın yanısıra, NF- κ B inhibitörü olan pirrolidin ditiyokarbamat ve melatoninin; oksidatif stres, p38 MAPK, NF- κ B p105 subünit ve TNF alfa'yı içeren oksidatif stres ilişkili parametreler üzerine etkisini ayrı ayrı incelemiş ve diğer iki ajanın aksine NAC'ın oksidatif stresi, p38 MAPK fosforilasyonunu, kaspaz-3 yarılmamasını, doku hasarını ve apoptozu önlemede

daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgularından yola çıkarak sisplatin kaynaklı akut renal hasarın özellikle oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ve artmış NF- κ B aktivitesi ve TNF alfa mRNA miktarının daha kısıtlı etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir.

Ancak NF- κ B inhibisyonu ile sisplatin nefrotoksitesinin azaltılabildiğinin öne süren çalışmaların (85, 155) aksine, over kanser hücre hattında NF- κ B inhibitörü olan JSH-23'ün sisplatin sitotoksitesini artırdığı da rapor edilmiştir (133). NF- κ B'nin, hücrelerin sisplatin duyarlılığına olan etkisinin farklı çalışmalarda farklı bulunması, hücre tipinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Bu çalışmada, gruplar arasında farklılık göstermeyen plazma NF- κ B değerlerinin aksine, renal doku NF- κ B değerlerinin NAC-250 grubunda kontrole göre sayısal olarak arttığı; CP ve CP+NAC grubunda ise NAC-250 grubuna göre anlamlı olarak kontrole göre ise sayısal olarak azaldığı izlenmiştir.

NAC'ın NF- κ B'nin DNA bağlanma aktivitesi üzerine olan etkilerini çeşitli hücre hatlarında inceleyen Liu et al. (170), farklı hücre hatlarında NAC'ın doza bağımlı olarak sitoplazmada IKK ve fosfatidil inositol 3 kinaz aracılı, p65 subünit fosforilasyonu ile NF- κ B'nin aktivasyonunu indüklediğini ancak nükleer translokasyonunu etkilemediğini göstermişlerdir. Aynı sonuca C vitamini, tetrametiltiyooüre gibi farklı antioksidanlarla ulaşamadıklarından, bu sonucun NAC'ın antioksidan özelliğinden bağımsız olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu bulgulara göre tek başına NAC uygulanan ratlarda artan NF- κ B seviyelerinin, NAC aracılı NF- κ B aktivasyonundan kaynaklandığını söylemek mümkündür.

Bu çalışmada NAC-250 grubunda gösterilen doku MPO düzeyleri artışının, NAC ile aktive olabildiği öne sürülen (170) NF- κ B'nin daha önce sözü edilen NOX-2 aktivasyonunu tetiklemesi (30) ile olduğu da düşünülebilir.

Bunun aksine NAC ile NF- κ B inhibe olabildiği ve bu durumda sisplatin kemoterapisinin etkinliğinin artırılabilirliği gösterilmiştir. Böylece NF- κ B aktivasyonunun kemoterapi direncini indükleyebildiği öne sürülmüştür (171). Sonuçta literatürde NAC ile NF- κ B ilişkisi üzerine, birbirine zıt görüşler mevcuttur.

NAC, quersetin, etil piruvat, yeşil çay gibi sadece antioksidan değil antiinflamatuvar özellikleri de bilinen ajanların sistemik HMGB-1 birikimini azaltarak; çeşitli deneysel enflamasyon durumlarında koruyucu rol oynadıkları gösterilmiştir (26).

Enflamatuvar etkinliği olduğu bilinen HMGB-1'in, NAC gibi antioksidan bileşiklerle azaltılmasının hayvan çalışmalarında enflamasyonla ilişkili hastalıklara karşı koruyucu etkisi gösterilmiş olmasına rağmen; klinik çalışmalarda bunun tam tersi sonuçlar ortaya konulmuştur. Bu farklılığın en olası nedeninin SOR reaktivitesinin çok hızlı ve yarı ömürlerinin çok kısa olması ve antioksidan koruma için insanlarda çok dar bir terapötik pencereye sahip olması olabileceği öne sürülmüştür (145).

Ayrıca akut sitokin cevabı oluştuktan sonra uygulanan antioksidan terapilerin etkili olmadığı da bilinmektedir. Buna alternatif olarak, SOD ve KAT gibi hücre içi enzimatik antioksidanları destekleyerek HMGB-1 üretimini veya salımını ve dolayısıyla enflamatuvar yanıtı azaltmanın/engellenmenin uygun bir strateji olabileceği de öne sürülmüştür (145).

Literatürde HMGB-1 artışının oksidatif stres aracılı olduğunu destekleyecek şekilde, NAC ile ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (172, 173). Yang et al. (173), insan proksimal tübül epitel hücre hattında yüksek glukoz konsantrasyonları ile indüklenen SOR'un neden olduğu HMGB-1 artışının NAC ile azaltılabildiğini göstermişlerdir. Bununla birlikte Wu et al. (172), HMGB-1 ekspresyonunun oksidatif stresle artmasının yanısıra, diyabetle indüklenen endotel progenitör hücrelerde HMGB-1'in doğrudan oksidatif stresi indüklediğini de rapor etmişlerdir. Diğer bir ifade ile HMGB-1 ile oksidatif stres arasında döngüsel bir neden sonuç ilişkisi olduğu söylenebilir. Hatta bu nedenle hangisinin neden, hangisinin sonuç olduğunu belirlemenin oldukça güç olduğu da öne sürülebilir.

Ancak literatürde sisplatin uygulaması ile değişen HMGB-1 düzeylerine karşı NAC'ın etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada değişiklik göstermeyen plazma HMGB-1 konsantrasyonunun, böbrek dokusunda sadece NAC uygulanan grupta kontrole göre artmış olduğu; sisplatin uygulanan gruplarda ise (CP ve CP+NAC) NAC-250 grubuna göre anlamlı, kontrole göre sadece sayısal olarak azaldığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; literatürde sisplatin uygulamasının, MPO ve HMGB-1 düzeylerine olan etkileri farklı çalışmalarla gösterilmiş olsa da sisplatin ile birlikte NAC uygulamasının bu parametrelere etkisini gerek ayrı ayrı gerek birarada gösteren bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca her ne kadar ayrı ayrı gösterilmiş olsa da, bu çalışma sisplatin nefrotoksitesini açısından MPO, NF- κ B ve HMGB-1'in birlikte değerlendirilerek oksidatif stres ve enflamasyonun birarada ortaya konulduğu ilk çalışmadır.

Bu çalışmada her ne kadar NAC ile ölçülen kan/doku biyokimyasal parametrelerinde anlamlı bir düzelme elde edilemese de; gerek histopatolojik gerek böbrek fonksiyon testleri ile gösterilen NAC kaynaklı düzelmeler göz önüne alındığında; sisplatin nefrotoksitesini önlemede NAC gibi hem antioksidan hem de antiinflamatuvar özelliklere sahip bir ajanın kullanılması makul bir yaklaşım olarak kabul edilebilir.

Ayrıca farklı kanser hücre hatlarında hem apoptotik, hem antiapoptotik, hem sisplatin direnci oluşturmak hem de sisplatin duyarlılığını artırmak gibi çok yönlü ve birbirine oldukça zıt olabilen özellikler gösterebilen NF- κ B ve HMGB-1'in seviyelerini etkilemeksizin böbrek fonksiyonlarını iyileştirebilen NAC'ın; tüm kanser tiplerinde, kemoterapi etkinliğini değiştirmeksizin sisplatin yan etkilerinin azaltılmasında güvenle kullanılabilmesi öne sürülebilir.

6. KAYNAKLAR

- 1 Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol* 2017. doi:10.1007/s40620-017-0392-z.
- 2 Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)* 2010; 2: (11): 2490–2518.
- 3 dos Santos NAG, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1233–1250.
- 4 Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 307–320.
- 5 Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334: 115–124.
- 6 Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291–295.
- 7 Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73: 994–1007.
- 8 Elseweidy MM, Zaghloul MS, Younis NN. 10-DHGD ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 83: 241–246.
- 9 Elbini Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, et al. A minireview on N-acetylcysteine: An old drug with new approaches. *Life Sci* 2016; 151: 359–363.
- 10 Florea A-M, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 2011; 3: 1351–1371.
- 11 Barabas K, Milner R, Lurie D, Adin C. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol* 2008; 6: 1–18.

- 12 Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740: 364–378.
- 13 Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ. Antineoplastic agents. In :Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (eds). *The pharmacological basis of therapeutics* 11 th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York, 2005: p 1333-1334
- 14 Oh GS, Kim HJ, Shen A, et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment Strategies. *Electrolyte Blood Press* 2014; 12: 55–65.
- 15 Foltinová V, Švihálková-Šindlerová L, Horváth V, et al. Mechanisms of effects of platinum (II) and (IV) complexes. Comparison of cisplatin and oxaliplatin with satraplatin and LA-12. New Pt (IV)- based drugs. A minireview. *Scripta Medica* 2008; 81: 105–116.
- 16 Sánchez-González PD, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Morales AI. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2011; 41: 803–821.
- 17 Kesikli SA, Dicle G. Steril inflamasyon ve inflamazom. *ANKEM Derg* 2011;25(Ek 2):102-109.
- 18 Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 826–837.
- 19 Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol* 2015; 6: 422.
- 20 Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38: 14–19.
- 21 Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13: 170–178.
- 22 Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 2001; 26: 152–153.
- 23 Naglova H, Bucova M. HMGB1 and its physiological and pathological roles. *Bratisl Lek Listy* 2012; 113: 163–171.
- 24 Yang H, Wang H, Chavan SS, Andersson U. High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The prototypical endogenous danger molecule. *Mol Med* 2015; 21: 6–12.

- 25 Tsung A, Tohme S, Billiar TR. High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *J Intern Med* 2014; 276: 425–443.
- 26 Tang D, Kang R, Zeh HJ, Lotze MT. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14: 1315–1335.
- 27 Siomek A. NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochim Pol* 2012; 59: 323–331.
- 28 Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 2004; 82: 434–448.
- 29 Xia Y, Shen S, Verma IM. NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014; 2 (9): 823-30.
- 30 Morgan MJ, Liu Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011; 21: 103–115.
- 31 Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int* 2014; 2014: 967826.
- 32 Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015; 97: 55–74.
- 33 Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem* 2015; 30: 11–26.
- 34 Saeidnia S, Abdollahi M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 271: 49–63.
- 35 Ye ZW, Zhang J, Townsend DM, Tew KD. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1850: 1607–1621.
- 36 Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* 2003; 57: 395–418.
- 37 Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res* 2015; 64: 53–66.
- 38 Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; 9: 169–176.
- 39 Cai Z, Yan L-J. Protein oxidative modifications: Beneficial roles in disease and health. *J Biochem Pharmacol Res* 2013; 1: 15–26.

- 40 Dahl JU, Gray MJ, Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions. *J Mol Biol* 2015; 10; 427(7): 1549-63.
- 41 Breusing N, Grune T. Biomarkers of protein oxidation from a chemical, biological and medical point of view. *Exp Gerontol* 2010; 45: 733–737.
- 42 Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313–20316.
- 43 Anatoliotakis N, Deftereos S, Bouras G, et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. *Curr Top Med Chem* 2013; 13: 115–138.
- 44 Khan AA, Rahmani AH, Aldebasi YH, Aly SM. Biochemical and pathological studies on peroxidases -an updated review. *Glob J Health Sci* 2014; 6: 87–98.
- 45 Prokopowicz Z, Marcinkiewicz J, Katz DR, Chain BM. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2012; 60: 43–54.
- 46 Kusic B, Miric D, Dragojevic I, Rasic J, Popovic L. Role of Myeloperoxidase in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1069743.
- 47 Okamura DM, Pennathur S. The balance of powers: Redox regulation of fibrogenic pathways in kidney injury. *Redox Biol* 2015; 6: 495–504.
- 48 Halliwell B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49 (10): 1341-1348.
- 49 Gutteridge JMC, Halliwell B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 561–564.
- 50 Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Journal of Clinical & Cellular Immunology* 2012; 1: 413.
- 51 Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15: 4405–4409.
- 52 Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3: 114–127.
- 53 de Andrade KQ, Moura FA, dos Santos JM, et al. Oxidative stress and inflammation in hepatic diseases: therapeutic possibilities of N-Acetylcysteine. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 30269–30308.

- 54 Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2013; 1830: 4117–4129.
- 55 Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine -a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 355–359.
- 56 Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2003; 60 (1): 6-20.
- 57 Moslemi F, Nematbakhsh M, Eshraghi-Jazi F, et al. Inhibition of nitric oxide synthase by L-name promotes cisplatin-induced nephrotoxicity in male rats. *ISRN Toxicol* 2013; 2013. doi:10.1155/2013/242345.
- 58 Abdelrahman AM, Al Salam S, Al Mahruqi AS, et al. N-acetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity. *J Appl Toxicol* 2010; 30: 15–21.
- 59 Palipoch S, Punsawad C. Biochemical and histological study of rat liver and kidney injury induced by cisplatin. *J Toxicol Pathol* 2013; 26: 293–299.
- 60 Lowry HO, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265–275.
- 61 Muldoon LL, Wu YJ, Pagel MA, Neuwelt EA. N-acetylcysteine chemoprotection without decreased cisplatin antitumor efficacy in pediatric tumor models. *J Neurooncol* 2015; 121: 433–440.
- 62 Uozumi J, Ueda T, Yasumasu T, et al. Platinum accumulation in the kidney and changes in creatinine clearance following chemotherapy with cisplatin in humans. *Urol Int* 1993; 51: 57–61.
- 63 Urakami Y, Nakamura N, Takahashi K, et al. Gender differences in expression of organic cation transporter OCT2 in rat kidney. *FEBS Lett* 1999; 461: 339–342.
- 64 Rostami B, Nematbakhsh M, Pezeshki Z, et al. Effect of testosterone on Cisplatin-induced nephrotoxicity in surgically castrated rats. *Nephrourol Mon* 2014; 6: e21546.

- 65 Nematbakhsh M, Pezeshki Z. Sex-related difference in nitric oxide metabolites levels after nephroprotectant supplementation administration against cisplatin-induced nephrotoxicity in wistar rat model: the role of vitamin e, erythropoietin, or n-acetylcysteine. *ISRN Nephrol* 2013; 2013. doi:10.5402/2013/612675.
- 66 Nematbakhsh M, Pezeshki Z, Eshraghi Jazi F, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity; protective supplements and gender differences. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18: 295–314.
- 67 Pezeshki Z, Nematbakhsh M, Nasri H, et al. Evidence against protective role of sex hormone estrogen in Cisplatin-induced nephrotoxicity in ovariectomized rat model. *Toxicol Int* 2013; 20: 43–47.
- 68 Jongejan HT, Provoost AP, Wolff ED, Molenaar JC. Nephrotoxicity of cisplatin comparing young and adult rats. *Pediatr Res* 1986; 20: 9–14.
- 69 Espandiari P, Rosenzweig B, Zhang A, et al. Age-related differences in susceptibility to cisplatin-induced renal toxicity. *J Appl Toxicol* 2010; 30 (2): 172–182.
- 70 Abdel Moneim AE. *Azadirachta indica* attenuates cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Indian J Pharmacol* 2014; 46: 316–321.
- 71 Chtourou Y, Aouey B, Aroui S, Kebieche M, Fetoui H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chem Biol Interact* 2016; 243 (5): 1-9.
- 72 Francescato HDC, Coimbra TM, Costa RS, Bianchi M de LP. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. *Kidney Blood Press Res* 2004; 27: 148–158.
- 73 Hagar H, Medany AE, Salam R, Medany GE, Nayal OA. Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015; 67: 133–141.
- 74 Karakoc HTE, Altintas R, Parlakpınar H, et al. Protective effects of molsidomine against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Adv Clin Exp Med* 2015; 24: 585–593.

- 75 Ashrafi F, Nematbakhsh M, Safari T, et al. A combination of vitamin C and losartan for cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Iran J Kidney Dis* 2012; 6: 361–365.
- 76 Sherif IO, Al-Mutabagani LA, Alnakhli AM, Sobh MA, Mohammed HE. Renoprotective effects of angiotensin receptor blocker and stem cells in acute kidney injury: Involvement of inflammatory and apoptotic markers. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; 240: 1572–1579.
- 77 Katsuda H, Yamashita M, Katsura H, et al. Protecting cisplatin-induced nephrotoxicity with cimetidine does not affect antitumor activity. *Biol Pharm Bull* 2010; 33: 1867–1871.
- 78 Kaltalioglu K, Coskun-Cevher S. Potential of morin and hesperidin in the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 2016; 38: 1291–1299.
- 79 Mahmoud MF, El Shazly SM. Pioglitazone protects against cisplatin induced nephrotoxicity in rats and potentiates its anticancer activity against human renal adenocarcinoma cell lines. *Food Chem Toxicol* 2013; 51: 114–122.
- 80 Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2010; 87: 240–245.
- 81 Sherif IO. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by triterpenoid saponin of *Terminalia arjuna*. *Clin Exp Nephrol* 2015; 19: 591–597.
- 82 Abdel-Wahab WM, Moussa FI, Saad NA. Synergistic protective effect of N-acetylcysteine and taurine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 901–908.
- 83 Elberry AA, Refaie SM, Kamel M, et al. Oxytocin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in Wistar rats. *Ann Saudi Med* 2013; 33: 57–62.
- 84 Jamdade VS, Mundhe NA, Kumar P, Tadla V, Lahkar M. Raloxifene inhibits NF- κ B pathway and potentiates anti-tumour activity of cisplatin with simultaneous reduction in its nephrotoxicity. *Pathol Oncol Res* 2016; 22: 145–153.
- 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 Prabhu VV, Kannan N, Guruvayoorappan C. 1,2-Diazole prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental rats. *Pharmacol Rep* 2013; 65: 980–990.
- 87 Radwan RR, Abdel Fattah SM. Mechanisms involved in the possible nephroprotective effect of rutin and low dose γ irradiation against cisplatin-induced nephropathy in rats. *J Photochem Photobiol B, Biol* 2017; 169: 56–62.
- 88 Rashed LA, Hashem RM, Soliman HM. Oxytocin inhibits NADPH oxidase and P38 MAPK in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2011; 65: 474–480.
- 89 Sahu BD, Rentam KKR, Putcha UK, et al. Carnosic acid attenuates renal injury in an experimental model of rat cisplatin-induced nephrotoxicity. *Food and Chemical Toxicology* 2011; 49: 3090–3097.
- 90 Sahu BD, Kuncha M, Putcha UK, Sistla R. Effect of metformin against cisplatin induced acute renal injury in rats: a biochemical and histoarchitectural evaluation. *Exp Toxicol Pathol* 2013; 65: 933–940.
- 91 Topcu-Tarladacalisir Y, Sapmaz-Metin M, Karaca T. Curcumin counteracts cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing renal tubular cell apoptosis. *Ren Fail* 2016; 38: 1741–1748.
- 92 Sener MT, Sener E, Tok A, et al. Biochemical and histologic study of lethal cisplatin nephrotoxicity prevention by mirtazapine. *Pharmacol Rep* 2012; 64: 594–602.
- 93 Appenroth D, Winnefeld K, Schröter H, Rost M. Beneficial effect of acetylcysteine on cisplatin nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 1993; 13: 189–192.
- 94 Hayati F, Hossainzadeh M, Shayanpour S, Abedi-Gheshlaghi Z, Beladi Mousavi SS. Prevention of cisplatin nephrotoxicity. *J Nephroarmacol* 2016; 5: 57–60.
- 95 Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1: a001651.
- 96 Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 424–431.

- 97 Dickey DT, Muldoon LL, Doolittle ND, et al. Effect of N-acetylcysteine route of administration on chemoprotection against cisplatin-induced toxicity in rat models. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; 62: 235–241.
- 98 Dickey DT, Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1052–1058.
- 99 Jones MM, Basinger MA, Holscher MA. Relative effectiveness of some compounds for the control of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1991; 68: 227–247.
- 100 Stojanovska V, Sakkal S, Nurgali K. Platinum-based chemotherapy: gastrointestinal immunomodulation and enteric nervous system toxicity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308: G223–232.
- 101 Abdel-Wahab WM, Moussa FI, Saad NA. Synergistic protective effect of N-acetylcysteine and taurine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 901-908.
- 102 Bhat SG, Mishra S, Mei Y, et al. Cisplatin up-regulates the adenosine A(1) receptor in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 2002; 442: 251–264.
- 103 Kishore BK, Krane CM, Di Iulio D, Menon AG, Cacini W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int* 2000; 58: 701–711.
- 104 Sahu BD, Kalvala AK, Koneru M, et al. Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF- κ B activation and antioxidant defence. *PLoS ONE* 2014; 9: e105070.
- 105 Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 1998; 131: 518–526.
- 106 Hamdi T, Latta S, Jallad B, et al. Cisplatin-induced renal salt wasting syndrome. *South Med J* 2010; 103: 793–799.
- 107 Hye Khan MA, Sattar MA, Abdullah NA, Johns EJ. Influence of combined hypertension and renal failure on functional alpha(1)-adrenoceptor subtypes in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 1232–1241.

- 108 Işeri S, Ercan F, Gedik N, Yüksel M, Alican I. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology* 2007; 230: 256–264.
- 109 Gulec M, Iraz M, Yilmaz HR, Ozyurt H, Temel I. The effects of ginkgo biloba extract on tissue adenosine deaminase, xanthine oxidase, myeloperoxidase, malondialdehyde, and nitric oxide in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Ind Health* 2006; 22: 125–130.
- 110 Ekor M, Emerole GO, Farombi EO. Phenolic extract of soybean (*Glycine max*) attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 1005–1012.
- 111 Shalby AB, Assaf N, Ahmed HH. Possible mechanisms for N-acetyl cysteine and taurine in ameliorating acute renal failure induced by cisplatin in rats. *Toxicol Mech Methods* 2011; 21: 538–546.
- 112 Yano T, Itoh Y, Matsuo M, et al. Involvement of both tumor necrosis factor- α -induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. *Apoptosis* 2007; 12: 1901–1909.
- 113 Ravindra P, Bhiwgade DA, Kulkarni S, Rataboli PV, Dhume CY. Cisplatin induced histological changes in renal tissue of rat. *Journal of Cell and Animal Biology* 2010; 4(7): 108-111
- 114 Park S, Yoon SP, Kim J. Cisplatin induces primary necrosis through poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation in kidney proximal tubular cells. *Anat Cell Biol* 2015; 48: 66–74.
- 115 Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77 (5): 598-625.
- 116 Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 1998; 54 (5): 1562-1569.
- 117 Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB, Williams WW, Bonventre JV. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int* 1999; 56: 922–931.
- 118 Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. *Phytomedicine* 2013; 20: 453–460.

- 119 Bami E, Ozakpınar OB, Ozdemir-Kumral ZN, et al. Protective effect of ferulic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017; 54: 105–111.
- 120 Beytur A, Köse E, Sarihan ME, et al. Beneficial effects of montelukast against cisplatin-induced acute renal damage in rats. *Ren Fail* 2012; 34: 343–349.
- 121 Ansari MA. Sinapic acid modulates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 646–653.
- 122 Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 8–15.
- 123 Ueta E, Osaki T. Suppression by anticancer agents of reactive oxygen generation from polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Res* 1996; 24: 39–53.
- 124 Brzóška K, Sochanowicz B, Siomek A, Oliński R, Kruszewski M. Alterations in the expression of genes related to NF- κ B signaling in liver and kidney of CuZnSOD-deficient mice. *Mol Cell Biochem* 2011; 353 (1-2): 151-157.
- 125 Ma X, Yan L, Zhu Q, Shao F. Puerarin attenuates cisplatin-induced rat nephrotoxicity: The involvement of TLR4/NF- κ B signaling pathway. *PLoS ONE* 2017; 12: e0171612.
- 126 El-Garhy AM, Abd El-Raouf OM, El-Sayeh BM, Fawzy HM, Abdallah DM. Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2014; 28 (10): 472-479.
- 127 El-Sherbeeny NA, Attia GM. The protective effect of trimetazidine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *An J Physiol Pharmacol* 2016; 94 (7): 745-751.
- 128 Morais C, Gobe G, Johnson DW, Healy H. Inhibition of nuclear factor kappa B transcription activity drives a synergistic effect of pyrrolidine dithiocarbamate and cisplatin for treatment of renal cell carcinoma. *Apoptosis* 2010; 15: 412–425.
- 129 Kim JS, Lee JM, Chwae YJ, et al. Cisplatin-induced apoptosis in Hep3B cells: mitochondria-dependent and -independent pathways. *Biochem Pharmacol*

- 2004;67(8):1459-1468.
- 130 Chiao P J, Miyamoto S, Verma IM. Autoregulation of I κ B α activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 28–32.
- 131 Strozyk E, Pöppelmann B, Schwarz T, Kulms D. Differential effects of NF-kappaB on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome. *Oncogene* 2006; 25: 6239–6251.
- 132 Song JM, Lee RH, Jung JS. Roles of NF-kappaB and bcl-2 in two differential modes of cell death of Mouse cortical collecting duct cells. *Kidney Blood Press Res* 2005; 28 (2): 101-10.
- 133 Kasparikova J, Thibault T, Kostrhunova H, et al. Different affinity of nuclear factor-kappa B proteins to DNA modified by antitumor cisplatin and its clinically ineffective trans isomer. *FEBS J* 2014; 281: 1393–1408.
- 134 Chen Q, Guan X, Zuo X, Wang J, Yin W. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta Pharm Sin B* 2016; 3: 183-188.
- 135 Antoine DJ, Harris HE, Andersson U, Tracey KJ, Bianchi ME. A Systematic nomenclature for the redox states of High Mobility Group Box (HMGB) proteins. *Mol Med* 2014; 20: 135–137.
- 136 Lu B, Wang C, Wang M, et al. Molecular mechanism and therapeutic modulation of high mobility group box 1 release and action: an updated review. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10: 713–727.
- 137 Park S, Lippard SJ. Redox state-dependent interaction of HMGB1 and cisplatin-modified DNA. *Biochemistry* 2011; 50: 2567–2574.
- 138 Wei M, Burenkova O, Lippard SJ. Cisplatin sensitivity in Hmbg1 $^{-/-}$ and Hmbg1 $^{+/+}$ mouse cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 1769–1773.
- 139 Zamble DB, Mikata Y, Eng CH, Sandman KE, Lippard SJ. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 2002; 91: 451–462.
- 140 He Q, Liang CH, Lippard SJ. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5768–5772.
- 141 Huang J, Ni J, Liu K, et al. HMGB1 promotes drug resistance in

- osteosarcoma. *Cancer Res* 2012; 72: 230–238.
- 142 Jung Y, Lippard SJ. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* 2007; 107: 1387–1407.
- 143 Sharma A, Ramanjaneyulu A, Ray R, Rajeswari MR. Involvement of high mobility group B proteins in cisplatin-induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of skin. *DNA Cell Biol* 2009; 28: 311–318.
- 144 Ohndorf UM, Rould MA, He Q, Pabo CO, Lippard SJ. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature* 1999; 399: 708–712.
- 145 Yusein-Myashkova S, Ugrinova I, Pasheva E. Non-histone protein HMGB1 inhibits the repair of damaged DNA by cisplatin in NIH-3T3 murine fibroblasts. *BMB Rep* 2016; 49: 99–104.
- 146 Ugrinova I, Zlateva S, Pashev IG, Pasheva EA. Native HMGB1 protein inhibits repair of cisplatin-damaged nucleosomes in vitro. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1556–1562.
- 147 Li X, Wang L-K, Wang L-W, et al. Cisplatin protects against acute liver failure by inhibiting nuclear HMGB1 release. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 11224–11237.
- 148 Park JS, Arcaroli J, Yum HK, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *J Physiol Cell Physiol* 2003; 284 (4): C870-879.
- 149 Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248–251.
- 150 Tang D, Kang R, Cheh C-W, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene* 2010; 29: 5299–5310.
- 151 Wang J, Tochio N, Takeuchi A, et al. Redox-sensitive structural change in the A-domain of HMGB1 and its implication for the binding to cisplatin modified DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441: 701–706.
- 152 Kim J, Long KE, Tang K, Padanilam BJ. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 activation is required for cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 2012; 82: 193–203.
- 153 Kim J. Poly(ADP-ribose) polymerase activation induces high mobility group box 1 release from proximal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity.

- Physiol Res 2016; 65: 333–340.
- 154 Nematbakhsh M, Nasri H. The effects of vitamin E and selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: A randomized, placebo-controlled study. *J Res Med Sci* 2013; 18: 626–627.
- 155 Luo J, Tsuji T, Yasuda H, et al. The molecular mechanisms of the attenuation of cisplatin-induced acute renal failure by N-acetylcysteine in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2198–2205.
- 156 Muldoon LL, Walker-Rosenfeld SL, Hale C, et al. Rescue from enhanced alkylator-induced cell death with low molecular weight sulfur-containing hemoprotectants. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296 (3): 797-805.
- 157 Jiang M, Wei Q, Pabla N, et al. Effects of hydroxyl radical scavenging on cisplatin-induced p53 activation, tubular cell apoptosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* 2007; 73 (9): 1499-510.
- 158 Thomas Dickey D, Muldoon LL, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res* 2004; 193: 25–30.
- 159 Custódio JBA, Cardoso CMP, Santos MS, et al. Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology* 2009; 259: 18–24.
- 160 Rosic G, Selakovic D, Joksimovic J, et al. The effects of N-acetylcysteine on cisplatin-induced changes of cardiodynamic parameters within coronary autoregulation range in isolated rat hearts. *Toxicol Lett* 2016; 242: 34–46.
- 161 Mousavi SSB, Zadeh MH, Shahbazian H, et al. The protective effect of theophylline in cisplatin nephrotoxicity. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2014; 25: 333–337.
- 162 Hosseini H, Moghaddas A, Khalili H. N-acetylcysteine for the prevention of non-contrast media agent-induced kidney injury: from preclinical data to clinical evidence. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69: 1375–1390.
- 164 Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993; 268: 20116–20125.

- 165 Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 2001; 478 (1-2): 23-43.
- 166 Appenroth D, Winnefeld K. Role of glutathione for cisplatin nephrotoxicity in young and adult rats. *Ren Fail* 1993; 15 (2): 135-139.
- 167 Shino Y, Itoh Y, Kubota T, et al. Role of poly(ADP-ribose)polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 966–977.
- 168 Özşahin EA. Ratlarda karbon tetraklorür toksisitesi üzerine N-asetilsistein ve taurinin etkisi, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2013: 94
- 169 Ma X, Dang C, Kang H, et al. Saikosaponin-D reduces cisplatin-induced nephrotoxicity by repressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signalling pathways. *Int Immunopharmacol* 2015; 28: 399–408.
- 170 Liu J, Yoshida Y, Yamashita U. DNA-binding activity of NF-kappaB and phosphorylation of p65 are induced by N-acetylcysteine through phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. *Mol Immunol* 2008; 45: 3984–3989.
- 171 Tozawa K, Okamoto T, Hayashi Y, et al. N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells. *Urol Res* 2002; 30: 53–58.
- 172 Wu H, Li R, Wei Z-H, et al. Diabetes-induced oxidative stress in endothelial progenitor cells may be sustained by a positive feedback loop involving high mobility group box-1. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 1943918.
- 173 Yang WS, Kim JS, Han NJ, Lee MJ, Park SK. Toll-like receptor 4/spleen tyrosine kinase complex in high glucose signal transduction of proximal tubular epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35(6): 2309-2319.

Ek Tablo 1. Ratların fiziksel bulguları ve rutin analiz sonuçları

	Grup	VÜCUT AĞIRLIĞI (mg)		İDRAR HACMİ mL/24 saat		İDRAR ÜRE AZOTU (mg/dL)		İDRAR KREATİNİN (mg/dL)		PLAZMA BUN (mg/dL)	PLAZMA KREATİNİN (mg/dL)	MİKROALBÜMİN (mg/dL)	
		Öncesi	Sonrası	Öncesi	Sonrası	Öncesi	Sonrası	Öncesi	Sonrası			Öncesi	Sonrası
1	KONT	445	428	5,3	16,8	3007	3484	94,3	81,4	18,5	0,43	5,47	3,57
2	KONT	382	370	9,6	9,6	3537	3712	112,6	118,48	20,8	0,61	0,35	0,74
3	KONT	423	405	6,6	9,3	3638	3630	145	114,35	21,3	0,52	5,31	2,64
4	KONT	397	390	6	9,6	4273	3634	148,7	118,53	17,4	0,44	4,28	4,29
5	KONT	370	354	5,7	11,6	3832	3290	143,2	97,06	15,7	0,37	5,26	6,02
6	KONT	280	279	2,9	7,5	5060	4474	250	121,7	17,8	0,35	1,31	5,74
7	KONT	316	310	8,3	7,9	4426	4349	117	130,47	20,3	0,41	4,28	6
8	KONT	292	292	5	6,8	4038	4409	150,9	148	18,4	0,41	1,46	1,41
9	NAC-250	337	334	8,8	7	4460	4487,3	116,6	125,9	19,8	0,33	4,56	8,2
10	NAC-250	329	327	11,8	8,3	3454	3580,1	84,9	104,8	14,8	0,4	2,02	4,14
11	NAC-250	341	342	9,5	8,9	3339	4018,2	98,5	121,41	15,3	0,42	3,65	5,53
12	NAC-250	363	357	9,3	6,1	3365	3336,7	127,7	120,85	13,4	0,33	5,11	6,72
13	NAC-250	402	387	7,4	6,5	4128	4130,6	152,5	150,94	15,3	0,39	0,42	1,08
14	NAC-250	362	353	7,3	9	4438	3841,9	127	108,37	16,2	0,34	4,27	3,89
15	NAC-250	331	322	4,9	5,9	4829	4309,2	179,7	136,35	18,6	0,43	1,21	8,32
16	NAC-250	364	362	6,9	7,3	4336	4349,9	141,4	144,1	15,3	0,42	2,56	2,11
17	CP	334	290	11,1	20,7	3452	542,6	86,3	20,84	132	3,4	0,64	11,04
18	CP	377	335	6	8,2	4034	1299	137,2	102,2	92	2,25	4,75	1,92
19	CP	350	300	8,8	18,2	3839	865,9	115,6	36,47	108,5	2,62	1,97	7,83
20	CP	405	341	6	20,5	4201	738,5	185,3	29,54	114	3,44	3,34	8,89
21	CP	310	286	2,7	6	5316	1378,8	163,2	48,25	192	5,6	2,39	11,57
22	CP	359	321	4,6	15	4455	633	189,8	20,5	174,7	4,16	0,84	5,11
23	CP	359	308	5,1	14,1	3942	589	184,1	30,9	133,8	3,53	0,79	1,12
24	CP	366	291	10	12	2709	653	94,6	29,6	149,7	3,76	0,24	0,3
25	CP+NAC	432	374	7,3	34,4	3366	1369,7	104,1	42,5	99,7	1,89	5,5	9,86
26	CP+NAC	409	345	8	23,6	3923	1356,5	154	45,3	98,1	1,77	4,77	7,4
27	CP+NAC	313	268	6,7	16,8	4077	1223,6	114	52,23	103,1	1,71	2,41	7,5
28	CP+NAC	328	278	7,9	12,2	4411	1293,5	125,8	69,87	99	1,67	1,93	7,54
29	CP+NAC	373	326	5,3	14,5	4048	1243,1	143,5	49,7	109,3	1,9	0,34	8,76
30	CP+NAC	299	257	3,9	21,2	3965,25	506	128,3	22,6	108	2,22	2,88	1,32
31	CP+NAC	416	344	5,2	18,9	4008,35	405	127,55	20,5	105	2,11	2,95	1,91
32	CP+NAC	395	348	8,9	22,2	3885,2	519	130,55	28,5	97	1,68	3,01	0,43

Ek Tablo 2. Ratların biyokimyasal ve histolojik analiz sonuçları

	Grup	MPO		HMGB-1		NF- κ B		Hemoraji	Tubül Epitel İflicre Hasarı	Nekroz
		Plazma (ng/mL)	Doku (ng/mg protein)	Plazma (ng/mL)	Doku (ng/mg protein)	Plazma (ng/mL)	Doku (ng/mg protein)			
1	KONT	8,152	0,99	7,62	0,48	7,05	0,54	1	0	0
2	KONT	10,885	0,79	4,195	0,4	4,31	0,45	0	0	0
3	KONT	9,538	0,84	2,958	0,43	4,03	0,47	0	0	0
4	KONT	4,919	1,18	2,428	0,67	2,99	0,42	1	1	0
5	KONT	9,361	1,05	4,366	0,6	4,00	0,43	1	2	0
6	KONT	9,115	1,22	4,701	0,51	5,36	0,44	0	1	0
7	KONT	6,912	1,71	5,125	0,9	5,69	0,52	0	0	0
8	KONT	8,854	1,19	4,623	0,66	4,74	0,4	0	0	0
9	NAC-250	9,974	1,82	5,787	0,6	5,13	0,69	0	1	1
10	NAC-250	10,188	1,72	4,86	0,9	3,89	0,57	0	0	0
11	NAC-250	8,48	1,65	3,939	0,85	3,96	0,63	1	1	1
12	NAC-250	8,751	1,4	4,415	0,73	4,39	0,37	1	1	0
13	NAC-250	9,107	1,46	4,477	0,73	4,54	0,55	1	1	1
14	NAC-250	6,953	1,07	4,415	0,57	5,36	0,54	1	1	0
15	NAC-250	10,731	1,99	5,179	1,12	5,06	0,53	0	1	0
16	NAC-250	9,165	2,02	4,941	1,06	4,43	0,61	0	0	0
17	CP	6,953	0,74	2,885	0,34	3,84	0,32	3	2	2
18	CP	8,778	1,1	3,628	0,59	3,93	0,31	2	2	2
19	CP	9,258	0,94	4,913	0,52	4,15	0,45	3	2	2
20	CP	7,415	0,54	3,094	0,38	3,84	0,35	3	3	3
21	CP	8,826	0,63	3,12	0,32	3,06	0,33	3	3	2
22	CP	7,17	1,06	2,813	0,58	2,7	0,27	2	3	3
23	CP	8,216	0,79	3,773	0,38	3,79	0,39	3	3	2
24	CP	8,574	0,78	2,616	0,42	3,74	0,36	3	3	2
25	CP+NAC	5,735	0,78	2,077	0,42	2,27	0,38	2	2	1
26	CP+NAC	9,919	0,61	3,985	0,46	3,78	0,2	2	3	0
27	CP+NAC	8,262	1,12	3,218	0,49	3,75	0,67	0	2	0
28	CP+NAC	8,959	1,1	4,121	0,52	4,38	0,38	1	1	1
29	CP+NAC	9,136	0,83	4,687	0,58	4,2	0,36	2	2	0
30	CP+NAC	6,75	0,76	2,384	0,49	3,29	0,47	0	2	1
31	CP+NAC	8,608	0,84	3,5	0,42	4,43	0,29	2	2	0
32	CP+NAC	10,681	0,66	3,344	0,4	4,21	0,47	0	2	0

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE

ETİK KURULUN ADI: Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ: Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEKAM)

Tarih: 11.12.2013

Toplantı Sayısı: 12

Karar No:13/150

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu **11.12.2013** tarihinde **Prof. Dr. Harun ÜLGER**'in başkanlığında toplanmıştır.

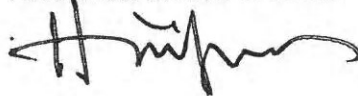
Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANÖZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	Katılmadı
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	
Gökçen DİNÇ	Yrd. Doç. Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNDAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Katılmadı
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Der. Başk.	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesinden **Doç. Dr. Cevat YAZICI** tarafından sunulan “**DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNE KARŞI N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ**” adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi

Tarih : 11.12.2013

Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmzası



DENEYSEL SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNE KARŞI N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**4**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	sagens.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	www.ankemdernegi.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	www.firattipdergisi.com İnternet Kaynağı	<%1
4	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
6	www.hasanunal.net İnternet Kaynağı	<%1
7	basholm.de İnternet Kaynağı	<%1
8	www.readbag.com İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: İnayet GÜNTÜRK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 13.09.1982 /KAYSERİ

Medeni Durumu: Evli

Email: inayetgunturk@hotmail.com

İletişim Adresi: Konaklar Mah. Avanos Cad. Koru Sit. Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Hacettepe Üniv. Fen Fak. Biyoloji	2004
Lise	Özel İstikbal Lisesi	2000

YABANCI DİL: İngilizce