



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİMDALI

**FARELERDE ANJİYOTENSİN 2 RESEPTÖR BLOKÖRÜ
LOSARTANIN SİSPLATİNE BAĞLI NEFROTOKSİSİTEDEN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DR. SELÇUK TEKE
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ELVAN ÇAĞLAR ÇITAK**

MERSİN 2018



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİMDALI

**FARELERDE ANJİYOTENSİN 2 RESEPTÖR BLOKÖRÜ
LOSARTANIN SİSPLATİNE BAĞLI NEFROTOKSİSİTEDEN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DR. SELÇUK TEKE
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ELVAN ÇAĞLAR ÇITAK**

**Bu tez, BAP-2016-2TP3-1947 kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.**

MERSİN 2018

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim, tezimin oluşumu ve çalıŐmalarımın yürütölmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Elvan ağlar ÇITAK'a; eğitim süresince yetiŐmemde emeği olan ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Necdet KUYUCU ve tüm anabilim dalı öğretim üyelerine; tezimin hazırlanma sürecinde yardım ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ali DELİBAŐ'a, Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Őakir Nejat YILMAZ ve ekibine, Uzm. Dr. Erdem AK'a en içten teşekkürlerimi sunar; eğitim sürecimin her döneminde bana güç ve destek veren sevgili aileme ve eşime tüm kalbimle ve içtenlikle minnet ve sevgilerimi sunarım.

Dr. SELÇUK TEKE

ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi

Mersin 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
SUMMARY.....	7
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	9
2.GENEL BİLGİLER.....	11
2.1 Sisplatin	11
2.1.1 Sisplatinin Moleküler Yapısı ve Özellikleri	13
2.1.2 Sisplatinin Farmakokinetiği.....	14
2.1.3 Sisplatinin Hücre İçine Alınışı	15
2.1.4 Sisplatinin Etki Mekanizması	16
2.1.5 Sisplatin Toksisitesi	16
2.1.6 Sisplatin Nefrotoksisitesi.....	18
2.1.6.1 Sisplatin Nefrotoksisite Patogenezi.....	18
Sisplatin Nefrotoksisitesinde DNA Sentezinin Bozulması	18
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Sisplatinin Redükte Glutasyon İle Konjugasyonu	18
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stres.....	19
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Nitrik Oksit Radikalleri	21
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Apoptozis	21
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Histopatolojik Değişiklikler.....	21
Sisplatin Nefrotoksisitesinde Renal Fizyoloji Değişiklikleri.....	22

2.2 Renin Anjiotensin Aldesteron Sistemi.....	23
2.3. Losartan.....	26
2.3.1 Losartanın Moleküler Yapısı ve Özellikleri.....	26
2.3.2 Losartanın Farmakokinetiği	27
2.3.3 Losartanın Antioksidan Etkisi	27
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Deney Hayvanları	28
3.2. Deney Hayvanları Grupları	28
3.3. Çalışmanın Yürütülmesi.....	28
3.4 Histolojik İnceleme.....	29
3.4.1 Dokuların Elde Edilişi ve Doku Takibi.....	29
3.4.2 Işık Mikroskopik İncelemeler	32
3.4.2.1 Hematoksilen-Eozin Boyaması	32
3.4.2.2 İmmünohistokimyasal İşaretlemeler.....	34
3.5 İstatistik Analiz.....	35
4.BULGULAR	36
4.1 Işık Mikroskopik Değerlendirmeler.....	36
4.1.1 Hematoksilen-Eozin ile Boyanmış Kesitlerin Değerlendirilmesi.....	36
4.1.2 Aktif Kaspaz-3 ile İşaretlenmiş Kesitlerin Değerlendirilmesi	37
4.1.3 Anti-BrdU ile İşaretlenmiş Kesitlerin Değerlendirilmesi.....	41
5.TARTIŞMA.....	46
KAYNAKLAR.....	53
SİMGELER VE KISALTMALAR	59

ŞEKİLLER.....	61
RESİMLER.....	62
TABLolar	63



ÖZET

FARELERDE ANJİYOTENSİN 2 RESEPTÖR BLOKÖRÜ LOSARTANIN SİSPLATİNE BAĞLI NEFROTOKSİTEDEN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda sisplatine bağlı gelişen nefrotoksisitede anjiyotensin 2 reseptör blokörü losartanın histolojik düzeydeki koruyucu etkisi ve bu etkinin apoptotik yolak ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sağlıklı 15 adet BALB-C cinsi dişi fare ile yapıldı. Fareler üç gruba ayrıldı. Birinci gruba intraperitoneal 5 cc % 0,9'luk steril serum fizyolojik solüsyonu enjekte edildi. İkinci gruba intraperitoneal tek doz sisplatin (12,7 mg/kg/doz) verildi. Üçüncü gruba tek doz sisplatin (12,7 mg/kg/doz) verildi ve sisplatin enjeksiyonundan dört gün önce losartan (10 mg/kg/gün) po başlandı ve dokuz gün boyunca verildi. Sisplatin verildikten sonra beşinci günde tüm denekler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmeden dört saat önce tübüler proliferasyonu değerlendirmek amacı ile 5-bromo 2'deoxyuridine (200 mg/kg) intraperitoneal enjekte edildi. Hayvanların karın bölgesi açılarak böbrekleri çıkarıldı. Histolojik inceleme amacıyla sol ve sağ böbrek %10'luk formaldehit içerisine alındı.

Sisplatin grubu kesitleri incelendiğinde birçok tübülde kast oluşumu, tübüler tiroidizasyon, tübül epitel hücrelerinde nüklear fragmantasyon, tübüler dilatasyon izlendi. Ayrıca interstisyumda inflamatuvar hücreler görüldü. Yer yer dejenere tübüller bulunmaktaydı ve bazı tübül epitel hücreleri lümene dökülmüştü. Glomerüllerde ve damarlarda konjestif değişiklikler izlendi. Bazı glomerüller atrofik özelliklere sahipti. Sisplatin+Losartan grubu kesitleri incelendiğinde ise patolojik bulguların azaldığı izlendi. Aktif kaspaz-3 işaretlemesi yapılan kesitler incelendiğinde, kontrol grubunda çok az sayıda pozitif hücre bulunmaktaydı. Bu sayı sisplatin grubunda belirgin şekilde artmıştı ($p<0,001$). Sisplatin+Losartan grubundaki pozitif hücre sayısı sisplatin grubuna göre azalmıştı ($p<0,05$). Anti-5-bromo 2'deoxyuridine işaretlemesi yapılan kontrol grubu kesitleri incelendiğinde pozitif boyanmış hücrelere rastlandı. Bu sayı sisplatin grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştı ($p<0,001$).

Sisplatin+losartan grubuna bakıldığında ise pozitif boyanmış hücre sayısında diğer iki gruba oranla anlamlı bir artış görüldü ($p<0,001$).

Bu çalışmada sisplatine bağlı nefrotoksisite oluşturulan farelerde losartan kullanımının böbreği koruyucu, apoptozisi önleyici ve proliferasyonu artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: apoptozis, losartan, nefrotoksisite, sisplatin



SUMMARY

ASSESSMENT OF PROTECTIVE EFFECT OF THE LOSARTAN WHICH IS ANGIOTENSIN 2 RECEPTOR BLOCKER AGAINST CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN MICE

In our study, it was aimed to investigate the protective effect of angiotensin 2 receptor blocker losartan against cisplatin-induced nephrotoxicity in histologic level and its association with the apoptotic pathway.

The study was conducted with 15 healthy BALB-C female mice. The mice were divided into three groups. The first group was injected by intraperitoneal 5 cc 0.9% sterile serum solution. The second group received intraperitoneal single dose cisplatin (12.7 mg / kg / dose). The third group received a single dose of cisplatin (12.7 mg / kg / dose). Four days prior to cisplatin injection, losartan (10 mg / kg / day) po was administered and given for nine days for third group. All subjects were sacrificed by cervical dislocation on the 5th day after cisplatin administration. Four hours prior to sacrifice, intraperitoneal at 5-bromo 2 deoxyuridine (200 mg / kg) was injected to evaluate tubular proliferation. The abdomens of animals were opened and their kidneys removed. The left and right kidneys were taken into 10% formaldehyde for histological examination.

When the cisplatin group cut view was examined, it was observed that there were cast formation in many tubules, tubular thyroidisation, nuclear fragmentation in tubule epithelial cells and tubular dilatation. In addition, inflammatory cells were seen in the interstitium. There were degenerate tubules locally and some tubular epithelial cells fell into lumen. Congestive changes were observed in glomerulus and veins. Some glomerulus had the atrophic properties. When the cut views of the cisplatin + losartan group were examined, it was observed that the pathological findings decreased. When the cut views which were marked with active caspase-3 were examined, there were very few positive cells in the control group. This number increased significantly in the cisplatin group ($p < 0.001$). The number of positive cells in the cisplatin + losartan group was lower than the cisplatin group ($p < 0.05$). When the cut views of control group for anti-5-bromo 2'oxyuridine markers were examined, positive

stained cells were found in the control group. This number decreased significantly in the cisplatin group ($p < 0.001$). When the cisplatin + losartan group was examined, a significant increase was observed in the number of positive stained cells compared to the other two groups ($p < 0.001$).

In this study, it was shown the effect of losartan administration to mice in the state of cisplatin-induced nephrotoxicity for preserving kidney, inhibiting apoptosis and enhancing proliferation.

Key words: apoptosis, losartan, nephrotoxicity, cisplatin



1.GİRİŞ ve AMAÇ

Çocuklarda ve adolesanlarda kanser tedavilerinin gelişmesi ile yaşam süreleri artmış ancak geç dönem yan etkiler önem kazanmıştır. Bu nedenle kemoterapiye bağlı uzun dönem organ hasarlarının incelenmesi önemli hale gelmiştir¹.

Çocukluk çağında kemoterapi alan hastalarda uzun dönemde endokrinolojik, nörolojik, kardiyak, hepatobilyer ve nefrolojik yan etkiler görülebilmektedir. Ayrıca kemoterapiye ikincil immün yetmezlik, kemoterapiye ikincil malignite gelişimi, kemik dokuya ait yan etkiler ve infertilite de uzun dönem kemoterapi komplikasyonları arasında yer alır. Endokrinolojik yan etkiler arasında büyüme hormonu eksikliği, büyüme geriliği, tiroid disfonksiyonları, üreme disfonksiyonları, puberte prekoks ve gebelik problemleri görülebilmektedir. Periferik nöropati ve inme uzun dönem nörolojik komplikasyonların başında gelir. Özellikle vinkristinin kullanılan hastalarda nöropati, L-asparajinaz kullanılan hastalarda koagülasyon faktörlerindeki değişiklikler ile oluşan trombofili veya kanamaya eğilim sonucunda inme riski artmıştır. Doksorubisin ve daunorubisin başta olmak üzere kemoterapi ile ilişkili kardiyotoksisite hem erken hem de geç dönemde görülebilmektedir. Antrasiklinlere bağlı aritmi, kalp yetmezliği ve ani ölüm gelişme riski mevcuttur. Kemoterapi bitiminden sonraki altı ay-bir yıllık süreçte hücresel ve humoral immün sistem bozuklukları görülebilmektedir. Bu bozukluk kemoterapinin hafıza B hücreleri ve plazma hücrelerinde sayı ve fonksiyon bozukluğu yapması ile açıklanmaktadır. Kemik dokuda ise metotreksat ve siklofosfamid kullanımı sonucu kemik demineralizasyonu ve osteopeni, kortikosteroid kullanımı sonucu avasküler nekroz görülebilir. Metotreksat ve 6-merkaptopürin ile oluşabilen hepatotoksisite diğer bir uzun dönem yan etki olarak gözlenebilmektedir. Siklofosfamid başta olmak üzere kemoterapi ilişkili gonadotoksisite sonucu infertilite görülebilmektedir².

Kemoterapiye bağlı uzun dönem yan etkiler içerisinde nefrotoksisite ve renal fonksiyon kaybı önemli yer tutar. Nefrotoksik ajanların başında ise sisplatin gelir.

Sisplatin nörotoksik, ototoksik, hepatotoksik, nefrotoksik, kardiyotoksik, myelosupresif bir ajandır. Uzun dönemde organ ve dokularda fonksiyon kayıplarına neden olabilmektedir. Sisplatin kullanımı sonrasında renal

yetmezlik, ikincil akut lenfoblastik lösemi (ALL), sensörinörol işitme kaybı, infertilite gibi ciddi sonuçlar görülebilmektedir^{3,4}. Sisplatin günümüzde yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardan biridir. Ancak nefrotoksik olması klinik kullanımda en önemli doz kısıtlayıcı faktördür. Sisplatine benzer şekilde, karboplatin, metotreksat ve ifosfamid başta olmak üzere birçok antineoplastik ajan nefrotoksik özellik gösterebilmektedir. Nefrotoksisiteyi önleme konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Hem hayvan deneylerinde hem de insanlarda yapılan çalışmalarda sisplatin nefrotoksisitesinin doza bağımlı olduğu gösterilmiştir^{5,6,7}.

Sisplatin nefrotoksisite fizyopatolojisinde apoptozis, nekroz, oksidatif stres, inflamasyon, fibrozis, hipoksi, mitokondriyal hasar önemli rol oynar. Sisplatin hücre içine girdikten sonra birçok sinyal ileti yolağını aktive eder ve hücre apoptoza ve nekroza gider^{8,9}. Sisplatin nefrotoksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda sisplatinin serbest radikal oluşumu ile oksidatif hasar yaptığına dair kanıtlar bulunmaktadır¹⁰. Bu yüzden çeşitli antioksidan maddelerin (α - tokoferol [E vitamini], C vitamini, Selenyum, Curcumin, Glutamin, L-Karnitin, Taurin, N-Asetil-Sistein) deney hayvanlarında sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede önleyici rolleri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda vitamin E, vitamin C, selenyum, curcumin, glutamin, L-karnitin, taurin, N-asetil-sistein'nin sisplatin nefrotoksisitesinde koruyucu etkinliğinin bulunduğu hayvan deneyleri ile gösterilmiştir^{11,12,13,14,15,16}. Anjiyotensin 2 reseptör (ATR) blokörü losartanın renin anjiyotensin aldosteron sistemini (RAAS) inhibe ederek anti oksidan etki gösterdiği bilinmektedir¹⁷. Losartanın bu antioksidan etkinlik aracılığı ile sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde sisplatin nefrotoksisitesinde ATR blokörü losartanın koruyucu etkinliği hakkında farklı sonuçlar bulunmaktadır^{12,18,19,20,21}. Çalışmamızda sisplatine bağlı gelişen nefrotoksisitede anjiyotensin reseptör blokörü losartanın histolojik düzeydeki koruyucu etkisi ve bu etkinin apoptotik yolak ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Antineoplastik ilaçlar, kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı çoğalmakta olan hücreler başta olmak üzere normal hücrelere de toksik etki gösterirler. Çoğu kanser ilacının kemik iliği gibi hızlı çoğalan hücreleri içeren dokular üzerine toksik etkileri daha belirgin gözlenir. Böbrek hücreleri; bölünme hızları yüksek olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller intersitisyumda toksinleri konsantre etme özelliği ve tübüler epitelde özgül taşıyıcılara sahip olması nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır. Kemoterapotik ajanlar böbrekte proksimal tübül, distal tübül ve glomerül olmak üzere nefronun her üç bölümünde de hasara ve fonksiyon kaybına neden olurlar. Distal tübüler fonksiyon bozukluğunda idrar pH'sı ve ozmolalitesi artar. Proksimal tübüler fonksiyon bozukluğuna bağlı ise idrar sodyumunda artma; serum sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum ve fosfat seviyesinde azalma izlenir. Glomerüler fonksiyon bozukluğuna bağlı glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma, serum kreatinin (Cr) ve idrar protein/Cr oranında artma görülür.^{22,23,24}

Birçok kemoteropatik ilaç, hafif GFR azalmasından, geri dönüşümsüz böbrek fonksiyon kaybına kadar geniş bir çerçevede nefrotoksisite yapabilir. Alkilleyici ajanlar (sisplatin, karboplatin, oksaliplatin, ifosfamid, siklofosfamid) ve antimetabolitler (metotreksat, pemetreksat, gemstabin) en sık nefrotoksisiteye neden olan ajanların başında gelir. Sisplatin ise en sık kullanılan ve nefrotoksik etkisi en iyi bilinen ilaçlardandır. Sisplatin kullanımına bağlı nefrotoksisite farklı klinik tablolar ile karşımıza çıkabilmektedir. Bunlardan bazıları; akut böbrek yetmezliği, fanconi benzeri sendrom, hipomagnezemi, distal renal tübüler asidoz, hipokalsemi, hiperürisemi, geçici proteinüri, renal konsantrasyon defektleri, kronik böbrek yetmezliğidir²⁴.

2.1 Sisplatin

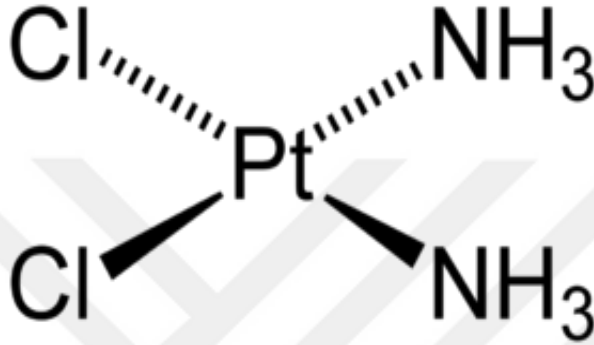
Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II) =CDDP) günümüzde oldukça yaygın kullanıma sahip olan antineoplastik bir ajandır. Erişkin dönemde baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom, testis, over, mesane, prostat, serviks tümörleri ve küçük hücreli olmayan akciğer karsinomları gibi pek çok malign hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca çocukluk çağında nöroblastom,

hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom tedavisinde kullanılmaktadır.

Sisplatin 1960'lı yıllarda biyofizikçi Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Rosenberg elektromanyetik radyasyonun bakteri hücreleri üzerine etkisini araştırırken yaptığı deneylerde platin elektrotları kullanmaktaydı. Büyüme alanında bakterilerin normalden daha uzun filamanlara sahip olduğunu gözlemledi. Bu etkinin, platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinin bakterinin hücre bölünmesini engellemesi ancak diğer büyüme yapılarını engellememesinden kaynaklandığını gösterdi. Bu biyolojik etkiye yol açan bileşenin 1845 yılında Peyron tarafından tanımlanan ve Peyron kloridi olarak da bilinen, sonradan sisplatin adını alan platinin nötral bir sis izomeri olduğu bilinmektedir. Sisplatin 1971 yılında kanser hastalarında kullanılmaya başlandı ve 1978'de Amerikan Gıda ve İlaç Uygulamaları Kurumu'ndan onay aldı⁶.

2.1.1 Sisplatinin Moleküler Yapısı ve Özellikleri

Sisplatin cis yapılanmasında iki klorlu “yer değiştiren grup” içeren nötral bir molekdr (şekil 1). Sisplatinin deoksiribonükleik asite (DNA) bağlanması platin molekülündeki ‘-trans’ yerine ‘-cis’ bulunması nedeniyle olmaktadır. Bu nedenle cis yapılanmasının etkisi nemlidir²⁵. Sisplatinin kimyasal zellikleri Tablo 1’de belirtilmektedir.



şekil 1: Sisplatinin Moleküler Yapısı

Tablo 1: Sisplatinin Kimyasal zellikleri:

Sistemik ad: Cis-diamminodikloroplatinum
Moleküler formül: C ₁₂ H ₆ N ₂ Pt
Moleküler ağırlık: 300.1
Renk: Koyu sarı (kristal katı) ve berrak (zelti)
Yapı: Tetragonal (kare) düzlemsel
Erime noktası: 270 C

Sisplatin plazma gibi klorür içeriği yüksek olan ortamlarda stabil bir yapıda kalabilmektedir. Hücre içi klorür yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda, klorür atomlarını kaybederek, DNA ve diğer büyük moleküllerle kovalent olarak bağlanır ve reaktif elektrofillerini verir. DNA ile oluşturulan bu çapraz bağlar sayesinde, DNA sentez ve replikasyonunda bozulma ve bunun sonucunda çeşitli sinyal iletim yollarının aktive edilerek sitotoksik etkilerinin ortaya çıkması sağlanmış olur²⁶. Sisplatin ayrıca hücre mitokondrisine de zarar verir, hücre döngüsünü duraklatır, adenozintrifosfaz (ATPaz) aktivitesini engeller, transport sistemlerini değiştirir ve sonuç olarak apoptozis, inflamasyon, nekroz ve hücre ölümüne sebep olur⁶.

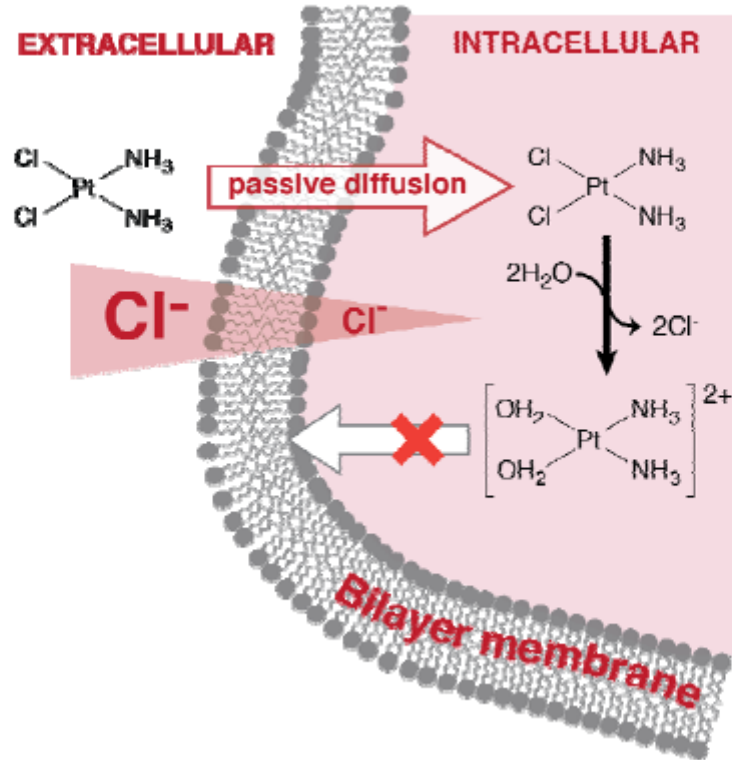
2.1.2 Sisplatinin Farmakokinetiği

Sisplatinin gastrointestinal kanaldan emilimi yoktur, bu nedenle sadece intravenöz yoldan kullanılabilir. Sisplatin stabil olmayan bir bileşiktir. Plazma gibi klorid yoğunluğunun daha yüksek olduğu ortamlarda doğal yapısını korur ve hücre membranını geçebilir. Hücre içerisinde ise klorid yoğunluğu düşüktür ve klorid grupları hidroksil grupları ile ya da su ile yer değiştirir. Bu durumda DNA ile reaksiyona giren daha reaktif pozitif yüklü ürünlerin oluşmasına neden olur. Sisplatin, klorid yoğunluğu düşük solüsyonlarla hazırlandığında daha toksik olabilmektedir. Bu nedenle klorür konsantrasyonu yüksek olan serum fizyolojik ile hazırlanmalıdır²⁷. İntravenöz uygulamayı takiben, hızlı bir şekilde vücuda dağılır; böbrek ve karaciğer dokusunda yüksek yoğunlukta bulunurken, kaslar, mesane, pankreas, testis ve dalakta daha düşük, barsak, akciğer adrenal, kalp, beyin ve beyincikte en düşük yoğunluklarda bulunur. Sisplatin kullanımından sonra dört ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir. Eliminasyon ömrü altmış saat olup, uygulamadan iki saat sonra plazma sisplatininin %90'dan fazlası irreversibl bir şekilde proteinlere bağlanır. Non-enzimatik bir reaksiyonla metabolitlerine dönüşür. 50-100mg/m² sisplatinin intravenöz bolus şeklinde enjeksiyonundan sonra, plazma eliminasyonu bifaziktir. İnsanlarda sisplatin yarılanma ömrü yaklaşık iki-beş gündür^{28,29}. Sisplatinin temel atılım yeri böbrekler olup fekal atılımı ise çok azdır. Böbreklerde en fazla sisplatin atılımı intravenöz infüzyondan sonraki bir saat içinde görülür. Sisplatin plazma proteinlerine bağlanarak taşınır ve böbreklerden değişim göstermeden atılırlar. Bu nedenle böbrekteki sisplatin miktarı diğer organlara göre çok fazladır.

Böbreklerdeki sisplatin birikim miktarı oksijen kullanımına bağlı olarak değişiklik gösterir. Böbreklerin korteks tabakasındaki hücrelerin sitoplazmasında birikim gösterir. Azalmış böbrek fonksiyonu ile plazma yarı ömrü artar³⁰.

2.1.3 Sisplatinin Hücre İçine Alınışı

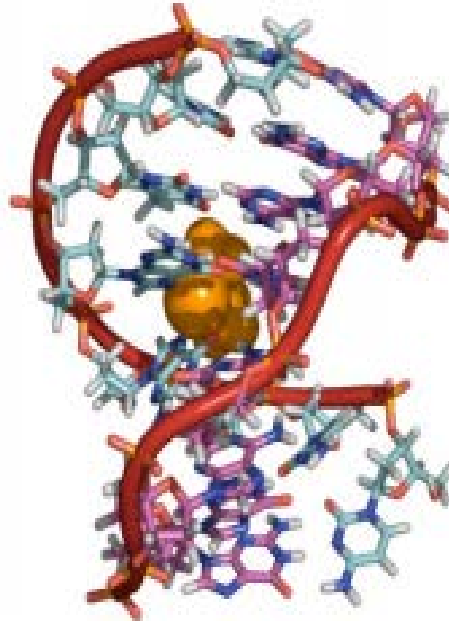
Farklı tür hayvanlar üzerinde yapılan birçok çalışmada hücre dışı klorid konsantrasyonun yaklaşık 120mM; hücre içi klorid konsantrasyonun ortalama 4mM olduğu gösterilmiştir. Klorid yoğunluğunun hücre dışı gibi >100mM olduğu ortamlarda sisplatin stabildir. $[PtCl_2(NH_3)_2]$ Bu yapıdaki sisplatin hücre lipid membranını pasif difüzyon ile geçer. Ancak hücre içine girdikten sonra düşük klorid konsantrasyonu nedeniyle stabilitesini kaybederek pozitif yüklü aktif formlarına dönüşür. $[PtCl(NH_3)_2(OH_2)]$ ve $[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}$. Yapılan çalışmalarda bu aktif komplekslerin sisplatine oranla çok daha yavaş difüzyon yaptığı gösterilmiştir. Böylece sisplatin aktif metabolitlerinin hücre dışına çıkışı yavaş seyretmekte ve hücre içi konsantrasyonları artmaktadır³¹. Sisplatinin hücre sitoplazmasında birikim mekanizması Şekil 2'de şematize edilmiştir.



Şekil 2: Sisplatinin Hücre Sitoplazmasında Birikim Mekanizması

2.1.4 Sisplatinin Etki Mekanizması

Siplatin, DNA çift-zincirinde sarmal içi çapraz bağlar oluşturur (Şekil 3). Böylece hücrede DNA sentezini inhibe ederek antineoplastik aktivite gösterir. Sisplatinin sitotoksik etkisi, nükleer DNA'ya bağlanması sonucunda transkripsiyon ve replikasyon mekanizmalarını engellemesi ile açıklanmaktadır. Sisplatin çeşitli mekanizmalar ile mitokondriyal geçirgenliği artırarak apoptozisi tetiklemektedir. Ancak aynı apoptotik etki sisplatin toksisitesinden de sorumludur. Sisplatinin etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzer. Sadece sis izomeri sitotoksiktir. Döneme özgü olmayan bir ilaç olup hücreleri her dönemde etkileyebilir³².



Şekil 3: DNA-Sisplatin Bağlanması

2.1.5 Sisplatin Toksikitesi

Sisplatinin nefrotoksikite, hepatotoksikite miyelosupresyon ve nörotoksikite gibi doz bağımlı yan etkileri mevcuttur. Bu yan etkileri sisplatinin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Sisplatin ile kanser tedavisinde hastanın yan etkilere karşı korunması klinik açıdan önemlidir³². Sisplatinin istenmeyen etkileri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Sisplatinin İstenmeyen Etkileri³³

Nörolojik	İşitme kaybı, tinnitus, vertigo Otonomik nöropati Nöbet Arka kolon nöropatisi Hıçkırık Periferik nöropati Optik nörit, görme bulanıklığı Akut ensefalopati
Kardiyovasküler	Bradikardi Sol dal bloğu Hipertansiyon Serebral arterit
Hematolojik	Miyelosüpresyon Anemi, hemolitik anemi Trombositik mikroanjyopati
Neoplastik	İkincil tümör (akut lösemi)
Hepatik	Karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme Bilirubin yüksekliği
Renal/metabolik	Toksik nefropati Hipomagnezemi, hipokalsemi Hipokalemi, hiponatremi Hipofosfatemi Hiperürisemi Uyumsuz ADH sendromu
Hipersensitivite	Tip 1 (anafilaktik) Tip 2 (hemolitik anemi)
Gastrointestinal	Bulantı, kusma, diyare İştahsızlık, kilo kaybı Tad duyusunda bozukluk
Reprodüktif	İnfertilite

2.1.6 Sisplatin Nefrotoksitesisi

Sisplatin, yüksek dozlarda böbrek fonksiyonlarını tamamen bozabilecek bir antineoplastik ajandır. Sisplatin uygulanan hastalarda böbrek fonksiyonlarında bozulma görülmüştür. Tedavi öncesinde yapılan hidrasyon, nefrotoksiteden önemli ölçüde koruyucudur ve ilacın daha yüksek dozlarda kullanımına imkân sağlar³⁴.

2.1.6.1 Sisplatin Nefrotoksitesite Patogenezi

Sisplatin nefrotoksitesisi, kan üre azotu düzeyinde artış, GFR'de azalma, özgül olmayan tübüler nekroz, özgül olarak potasyum ve magnezyum kaybının yanı sıra proksimal tübülde histopatolojik olarak dejeneratif ve nekrotik lezyonların oluşumuyla karakterizedir. Ayrıca distal tübül ve toplayıcı kanallarda akut tübüler nekroz ve dilatasyon gelişmektedir³².

Sisplatin Nefrotoksitesisinde DNA Sentezinin Bozulması

Sisplatinin toksik etki mekanizmaları henüz net olarak açıklanamamış olmakla birlikte; renal tübüler enerji metabolizması ve DNA sentezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Renal mitokondriyal metabolizma ve membran sodyum-potasyum ATPaz (Na-K ATPaz) mekanizmasındaki bozulma sisplatin nefrotoksitesinde temel rolü oynamaktadır³⁵. Sisplatin DNA'ya iki noktada bağlanır, birinci nokta inter-intra arası diğeri ise poretin cross-link bölgesidir. Bu bağlanma ile sisplatin hücre içinde DNA sentezini kalıcı olarak inhibe eder. Bu etki sadece tümör hücrelerinde değil aynı zamanda böbrek hücrelerinde de gözlenir. DNA sentezindeki azalma nefrotoksitede önemli rol oynar³⁶.

Sisplatin Nefrotoksitesisinde Sisplatinin Redükte Glutatyon İle Konjugasyonu

Sisplatin böbreklerde toksik etkisini siplatin-glutatyon konjugasyon sistemine bağlı olarak da gösterir. Sisplatin ile redükte glutatyonun (GSH) konjugasyonu sonucu oluşan reaktif tiyoller, renal dokuda toksik etki gösterirler.

γ -glutamil transpeptidase (GGT) enzimi, proksimal tübüllerin luminal yüzünden sekrete edilir ve hücre dışındaki GSH'ı glutamik asit ve sisteinil glisin olarak ayırır. Sisteinil glisin de diaminopeptidaz ile glisin ve sisteine parçalanır. Bu aminoasitlerin bir kısmı tekrar hücre içine girerek tekrar GSH sentezinde

kullanılır. Sisplatin varlığında ise glutatyon-S- transferaz ile sisplatin-GSH bileşiği oluşur. Sisplatin-GSH, GGT aktivitesi sonucu sistenil-glisin-sisplatin bileşiğine parçalanır. Açığa çıkan sistenil-glisin-sisplatin reaktif thiol birleşimidir ve nefrotoksikdir. Sisplatinin GSH ile konjugasyonunun inhibe edilmesi veya GSH sentezinin azaltılması sisplatin nefrotoksitesini azaltmıştır^{32,37}.

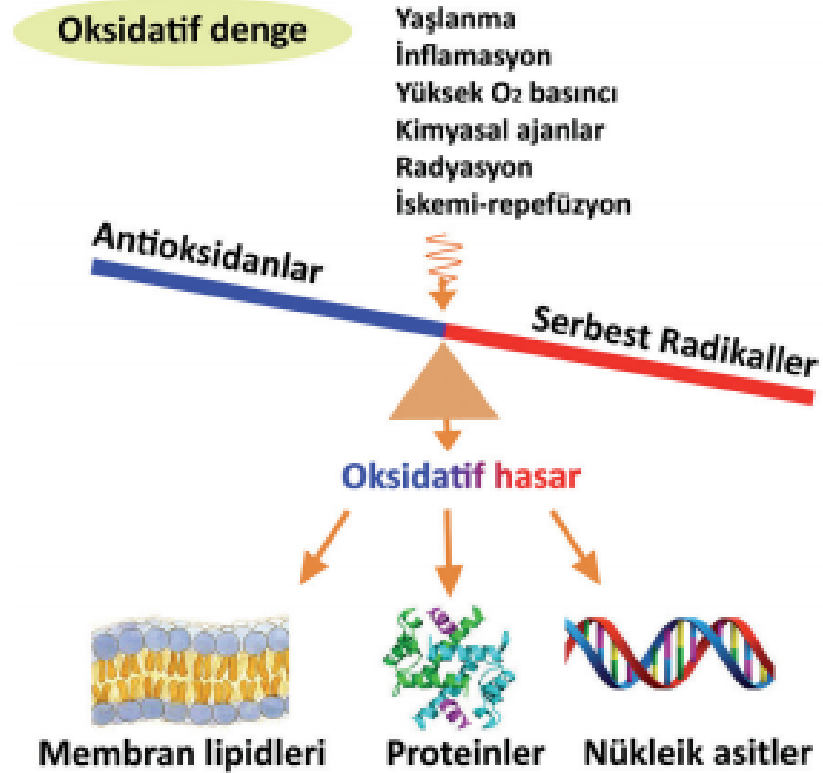
Sisplatin Nefrotoksitesinde Oksidatif Stres

Serbest radikaller; paylaşılmamış en az bir elektrona sahip moleküller olup, paylaşılmayan elektronun üzerinde olduğu oksijen molekülleridirler. Kovalent bağların parçalanması ile açığa çıkan paylaşılmamış elektronlar serbest radikal oluşumuna neden olur. Bir diğer radikal oluşturma yöntemi olan redoks reaksiyonlarında bir elektronun kaybı veya kazanılması söz konusudur. Her oksidasyon bir redüksiyon ile birlikte. Böylece oksidatif strese her iki reaksiyon da yer alır. Serbest radikallerin aktiviteleri farklılık gösterebilir. Hidroksil (HO⁻) gibi bazı radikaller yüksek aktiviteye sahipken, E vitamininin oksidasyon ürünü olan tokoferoksil gibi bazı bileşikler oldukça düşük bir aktiviteye sahiptirler. Oksijen radikalleri içinde, süperoksit anyonu (O₂⁻), oksijenin bir elektron almasıyla oluşan ilk ürün olup, en kolay ve en fazla oluşan serbest radikaldir. Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle dengesizdir. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir (redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler (oksidasyon). Bu durumda radikal olmayan yapılar, radikal şekle dönüştürebilirler. Canlılarda diğer radikallerin oluşumu sıklıkla O²⁻'nin birikimine bağlıdır. O²⁻ radikalının ana kaynağı ise moleküler oksijenin metabolize edildiği, mitokondriyal elektron transport zinciridir^{38,39}.

Sağlıklı bir insanda metabolizma sırasında serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Bu nedenle serbest oksijen radikallerinin varlığı her zaman patolojik bir durum değildir. Oksidatif hasarı önlemeye yönelik olarak endojen birçok enzimatik (Süperoksit dismutaz, Fosfolipid Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz, Glutatyon S- Transferaz, Glutatyon redüktaz, Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz, Katalaz gibi) ve non-enzimatik (E vitamini, β-karoten ve C vitamini) mekanizmalar mevcuttur. Ayrıca eksojen olarak gıdalarla alınan doğal veya farmakolojik amaçlarla kullanılan birçok antioksidan madde bulunmaktadır. Oksidatif hasar oluşmasında serbest oksijen radikalleri üretiminde artış ve/veya

antioksidan sistem yetersizliği söz konusudur. Hiperoksi, iskemi, radyasyon, inflamasyon gibi bazı hücrel metabolik bozukluk durumlarında serbest oksijen radikalleri üretimi artar. Serbest oksijen radikallerinde bu artış sonucunda membranlar, enzimler, nükleik asitler ve polisakkaritler üzerine toksik etkiler görülmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif zedelenme ile apoptozise neden olarak doku hasarı gelişimine katkı sağlarlar. Oksidatif denge Şekil 4'te şematize edilmiştir⁴⁰.

Sisplatin aracılığı ile süperoksit anyonu ve hidroksil radikalini de içeren serbest radikaller oluşması, nefrotoksisiteyi açıklayan mekanizmalardan biridir. Sisplatin kaynaklı oksidatif stres, önemli antioksidan moleküllerin düzeyini azaltır ve böbrek dokusunda nefrotoksisiteye yol açar⁴¹.



Şekil 4: Oksidatif denge

Sisplatin Nefrotoksisitesinde Nitrik Oksit Radikalleri

Nitrik oksit (NO) endotelyumdan salınan, yarı ömrü çok kısa olan, hem hücre içinde hem de hücre dışında görev alan lipofilik bir moleküldür. Vasküler endotelde nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile L-argininden üretilir. Hücre membranında serbest olarak hareket edebilir ve komşu hücrelerde etkinliklerini gösterir. Nörotransmisyon, kan basıncının düzenlenmesi, düz kasların gevşemesi ve immün regülasyon gibi birçok biyolojik fonksiyonun regülasyonunda aktif rol oynar⁴² NO süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitriti oluşturur. Oluşan peroksinitrit, hücre membranındaki sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca DNA ile reaksiyona girerek sitotoksisiteye neden olur. Yapılan çalışmalarda sisplatinin NO oluşumunu artırdığı gösterilmiştir. Sisplatin uygulanan sıçanlarda indüklenebilir NOS aktivitesinin böbrekte ve karaciğerde önemli düzeyde arttığı ve bunun da NO oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir^{43,44}.

Sisplatin Nefrotoksisitesinde Apoptozis

Sisplatin çeşitli mekanizmalar ile mitokondriyal geçirgenliği artırarak apoptozu tetiklemektedir. Bu apoptotik etki sisplatin toksisitesinden de sorumlu tutulmaktadır²¹. Apoptozis normal ve patolojik süreçlerde hücre ölümünün önemli bir yoludur. Sisplatin nefrotoksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarında yüksek dozlarda tübül hücrelerinde nekroza yol açarken daha düşük dozlarda apoptoza yol açtıkları gösterilmiştir⁴⁵. Hücre ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrinsik yolak, mitokondri üzerinden işleyen intrinsik yolak ve endoplazmik retikülüm- stres yolağı apoptozdaki başlıca yolaklardır. Kaspaz 8 ekstrinsik yolağın aktivasyonu ile apoptoza neden olurken; sisplatin nefrotoksisitesinde esas apoptotik yol olan intrinsik ya da mitokondriyal yolağın aktivasyonu ile sitokrom c salınımı olur ve bir dizi etkileşim sonucu kaspaz 9 aktive hale gelir. Kaspaz 8 ve 9 renal tübüler apoptozda kritik bir role sahip olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptoza neden olur⁸.

Sisplatin Nefrotoksisitesinde Histopatolojik Değişiklikler

Sisplatin nefrotoksisitesi öncelikle tübülointersitisyel lezyonlara neden olur. Böbreklerdeki ana zedelenme yeri proximal tübüllerdir. Sisplatin özellikle proximal tübül segment 3'te zedelenmeye yol açar⁹. Proksimal tübül

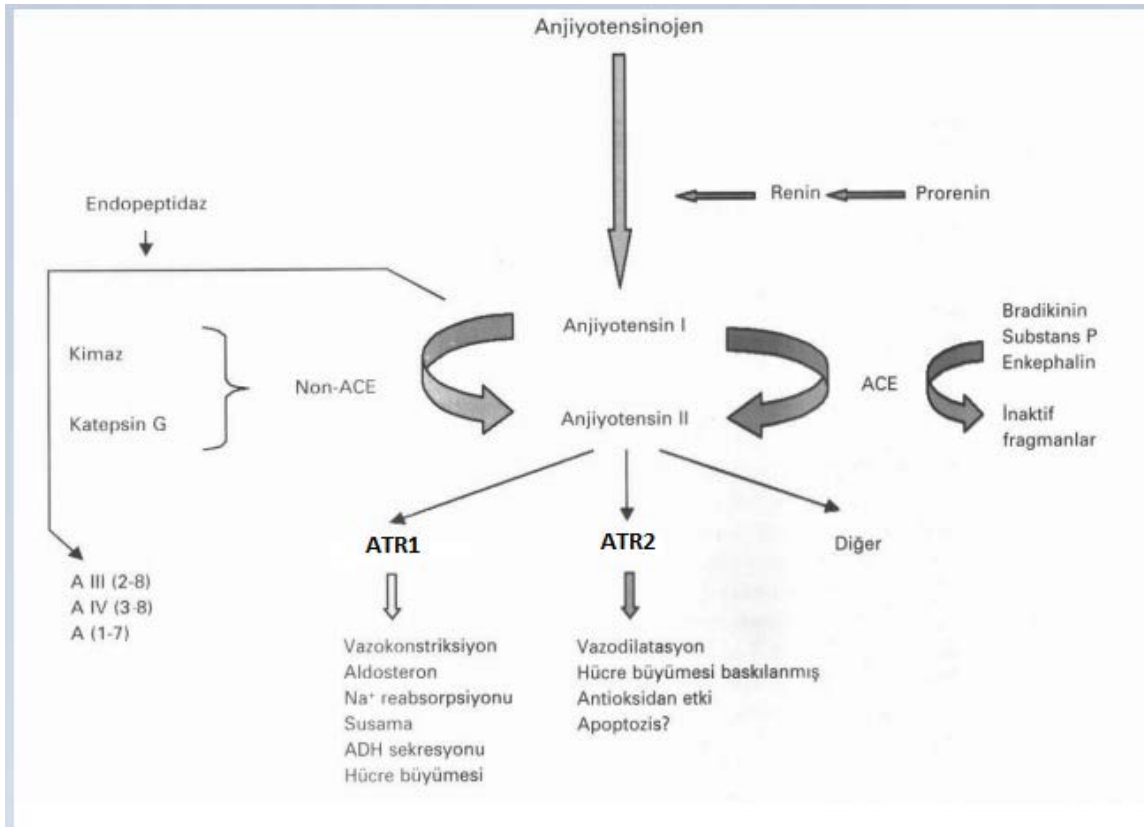
hücrelerinde nekroz, apoptozis, sitoplazmik vaküolizasyon, lizozomlarda değişiklikler, karyopiknozis ve tübüllerde silendirler izlenmiştir. Aynı zamanda bazı proksimal tübül hücrelerinde apikal hücre membranında fırçamsı kenar mikrovillus hasarı saptanmıştır. Distal tübüllerde de sitoplazmik vaküolizasyon, apoptozis, mitokondriyal şişme ve nükleer solukluk meydana geldiği gösterilmiştir^{46,47}. Deneysel çalışmalar bu değişikliklerin akut tübüller nekroz paternine benzediğini göstermektedir⁴⁸.

Sisplatin Nefrotoksitesinde Renal Fizyoloji Değişiklikleri

Sisplatinle bağlı ilk olarak hemodinamik değişiklikler gözlenir ve takibinde tübüler zedelenme meydana gelir. Sisplatin kullanımından sonra ilk 3 saat içinde böbrek kan akımı azalabilmektedir. Buna bağlı olarak glomerüler filtrasyon hızında azalma gözlenir. Renal kan akımının azalmasına ve GFR'nin düşmesine neden olan araçlar henüz belirlenememiştir^{9,49}. Sisplatin uygulaması sonrasında sıklıkla poliüri görülebilmektedir⁵⁰. Sisplatin uygulamasından 48-72 saat sonra proksimal ve distal tübüler reabsorpsiyonda bozulma görülür. Sisplatin uygulaması tübüler reabsorpsiyonda bozulmaya ve idrar konsantrasyonunda azalmaya neden olur. Proksimal tübülde sodyum reabsorpsiyonu, distal tübülde de sodyum ve su reabsorpsiyonunun azalması ile su ve sodyum atılımı artmıştır. İlacın uygulanmasından 24-48 saat sonra idrar ozmolalitesi azalır ancak GFR'de değişiklik gözlenmez. Bu fazın prostoglandin aracılığı ile olduğu düşünülmektedir ve poliüri kendiliğinden düzelir. İlaç uygulamasından 72-96 saat sonra ise GFR'de azalma görülür. Bu dönemde medüller tonisitede azalma ve proksimal tübül ve Henle kulpunun çıkan kolunda sodyum klorür transportunda bozulma görülür. Birçok hasta idrarla sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyum kaybeder⁹.

2.2 Renin Anjiotensin Aldesteron Sistemi

Renin anjiotensin aldesteron sistemi, AT2 oluşumu ile sonuçlanan enzimatik bir yoldur (Şekil 5). RAAS'nin temel mediyatörü olan AT2, birçok dokuda farklı reseptörleri bulunan, bu reseptörler aracılığıyla farklı fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alan bir peptiddir. AT2, kan basıncı ve su-tuz dengesi başta olmak üzere hücre büyümesi, hücre çoğalması gibi birçok mekanizmada rol oynar. RAAS'nde AT2 nin oluşumunda renin ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) görev alır. Ancak ACE dışında başka yollarla da AT2 üretimi gerçekleşebilir.



Şekil 4: RAAS'nin Enzimatik Yolağı Ve Etkin Mediyatörleri

(ATR1: Anjiotensin 2 Reseptörü Tip 1; ATR2 : Anjiotensin 2 Reseptörü Tip 2; ACE: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim; AIII: Anjiotensin 3 ; AIV : Anjiotensin 4; ADH: Antidiüretik Hormon)

AT2 başlıca iki tip reseptör üzerinden etkilerini gösterir. Dokularda en fazla bulunan ve AT2'nin etkilerinin neredeyse tamamından sorumlu olan reseptör, anjiotensin 2 reseptörü tip 1 (ATR1) reseptörüdür⁵¹. ATR1 kalp, böbrek, vasküler düz kas hücreleri, beyin, adrenal bez, trombosit, yağ dokusu ve plasentada bulunur. ATR1 moleküler klonlama yöntemiyle tayin edilmiş 7-transmembran domain reseptörleri olup, G protein ailesine bağlıdır. AT2'nin ATR1 reseptörüne bağlanması, reseptör molekülünde yapısal değişikliklere yol açar ve çeşitli membran sinyal sistemlerini etkiler. Bunlar arasında fosfolipaz C, fosfolipaz D, fosfolipaz A2 gibi enzimler, adenil siklaz ve voltaj duyarlı Ca⁺² iyon kanalları sayılabilir⁵².

AT2, ATR1'e bağlanarak vasokonstrüksiyon, aldosteron sekresyonu, sodyum tutulumu, su iştahının artışı, antidiüretik hormon (ADH) sekresyonu ve hücre büyümesinin uyarılması gibi etkilerini gerçekleştirir. AT2, ATR1 reseptörlerine göre daha az sunulan ATR2 reseptörlerine bağlanarak da işlev gösterir. AT2'nin ATR1 ve ATR2 üzerinden göstermiş olduğu fizyolojik etkileri Tablo 3'te gösterilmiştir. Bazı hastalık durumlarında ya da kronik ATR1 blokajı uygulandığında ATR2 reseptör sunusu artarak, vasodilatasyon, hücre büyümesi ve fibrozisin baskılanması, antioksidan etki ortaya çıkmaktadır.

AT2'nin mesengial hücre kültürlerinde ATR1 reseptörleri üzerinden hipertrofiyi ve proliferasyonu uyardığı; süperoksit anyon oluşumunu doz bağımlı olarak artırdığı gösterilmiştir. AT2 böbrekte glomerüler kapiller basıncı artırarak glomeruloskleroz gelişiminde de rol oynar. Transforming growth factor-beta1 (TGF-β1) mesengial hücre hipertrofisi ve ekstraselüler matriks artışına yol açarak glomerulosklerozun progresyonunda kritik rol oynar.

Tablo 3: AT2'nin Fizyolojik Etkileri:

AT1 reseptörler	AT2 reseptörler
Büyümenin uyarılması	Apoptozis ?
ECM yapım artışı-yıkım azalması	Proliferasyonun baskılanması
Süperoksid anyon oluşumunda artış	NO ve bradikinin salgılanması
NO salgılanmasının baskılanması	Vasodilatasyon
Bazı hücrelerin apoptozisi	
Vasokonstrüksiyon	
Kan basıncı artışı	
Aldosteron sentez ve salgılanması	
Tübüler transport	
GFR düzenlenmesi	

(AT1: Anjiyotensin 2 Reseptör Tip 1; AT2: Anjiyotensin 2 Reseptör Tip 2; ECM: Ekstraselüler Matriks; NO: Nitrik Oksit; GFR: Glomerüler Filtrasyon Hızı)

Son dönemde AT2'nin hemodinamik olmayan etkilerinin ve büyüme faktörleri ile olan ilişkisinin anlaşılması ile RAAS'nin renal hasardaki rolü daha iyi açıklanmaktadır. AT2'nin inflamatuvar hücreler üzerindeki proinflamatuvar ve protrombotik etkileri renal hasarın oluşumunda ve progresyonunda anahtar rol oynamaktadır⁵¹.

2.3. Losartan

1898'de fizyolog Robert Tigerstedt ve arkadaşları AT2 antagonistlerini tavşan böbrek ekstraları üzerine uygulamışlar ve "Renin" adını verdikleri böbreklerde üretilen bir proteinin kan basıncında yükselmeye sebep olduğu sonucuna varmışlardır. 1930 yılında, reninin direkt olarak kan basıncında yükselmeye neden olmadığı bu etkiyi Anjiyotensin I (AT1) ve AT2 isimli maddelerin oluşumunu uyararak sağladığı gösterilmiştir⁵³. Yetmişli yıllarda plazma renin aktivitesi yüksek olan bireylerde miyokardiyal enfarktüs ve inme riskinin yüksek olduğu ortaya koyulmuştur. AT2'nin kalp ve böbreklere zarar verdiği gösterilmiştir⁵⁴. Takip eden süreçte, ACE'nin keşfiyle birlikte AT2 antagonistlerinin kan basıncı regülasyonunda, elektrolit ve sıvı dengelerinin belirlenmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir⁵⁵. Seksenli yılların başında bir seri imidazol-5-asetik asit ile farelerde kan basıncı azaldığı görülmüştür. S-8307 ve S-8308 olarak adlandırılan iki farklı non-peptid AT2 antagonist bileşiği bulunmuş ve AT2 reseptörlerine daha uyumlu hale getirilmiştir. Sonuçta oral olarak aktif, güçlü ve seçici non-peptid AT2 blokörü olan "Losartan" geliştirilmiştir. Losartan 1995 yılında klinik kullanım için onay almıştır⁵⁶.

2.3.1 Losartanın Moleküler Yapısı ve Özellikleri

Losartanın kimyasal özellikleri Tablo 4'te; moleküler yapısı Şekil 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4: Losartanın Kimyasal Özellikleri⁵⁷

Moleküler formül: C₂₂H₂₃ClKN₆O

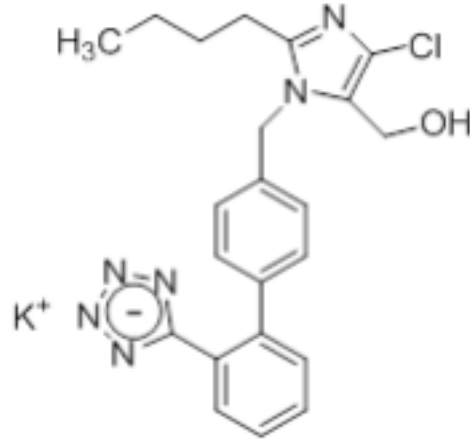
Moleküler ağırlık: 461.00 g/mol

Renk: beyaz veya kirli beyaz-grimsi

Yapı: kristal

Erime noktası: 183.5 – 184.5°C

Ph: 7.0 – 8.5



Şekil 5: Losartanın Moleküler Yapısı

2.3.2 Losartanın Farmakokinetiği

Losartan gastrointestinal sistemden kolayca emilir ve alınan dozun %14'ü sitokrom P-450 sistemi aracılığı ile aktif metaboliti EXP3174'e dönüştürülür. Losartanın emilimi gıdalar tarafından etkilenmez. Maksimum konsantrasyona ulaşma süresi bir saattir. Ortalama eliminasyon yarı ömrü ise iki saattir. Safra kesesi yoluyla ve %4'lük kısmı değişime uğramadan idrar yoluyla vücuttan atılır⁵⁶.

2.3.3 Losartanın Antioksidan Etkisi

AT2, ATR1 üzerinden nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimini aktive etmektedir. NADPH oksidaz, reaktif oksijen türevlerinin ana kaynağıdır. Reaktif oksijen türevleri, NO aktivitesini azaltıp, inflamasyon ve oksidatif hasara neden olabilen birçok süreci başlatmaktadır⁵⁸. AT2'nin mesengial hücre kültüründe ATR1 üzerinden hücre hipertrofisini artırdığı ve hücre proliferasyonunu uyardığı, süperoksit anyon oluşumunu doz bağımlı olarak artırdığı gösterilmiştir. AT2 böbrekte glomerüler kapiller basıncı artırarak glomerüloskleroz gelişiminde de rol oynar. TGF-β1, glomerülosklerozun progresyonunda mesengial hücre hipertrofisi ve ekstraselüler matris artışını uyarak kritik rol oynar. Kronik ATR1 reseptör blokajı uygulandığında ATR2 sunusu artarak, vasodilatasyon, hücre büyümesi ve fibrozisin baskılanması, antioksidan etki ortaya çıkmaktadır⁵¹. Losartan RAAS sistemini inhibe ederek antioksidan etkinlik gösterir¹⁷.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyi Yerel Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra Mersin Üniversitesi Hayvan Laboratuvarından temin edilen 26-33 gram ağırlığındaki sağlıklı iki aylık 15 adet BALB-C cinsi dişi fare üzerinde gerçekleştirildi. Hayvanlar oniki saat aydınlık oniki saat karanlık ortamda, 23-25°C oda sıcaklığında hayvan laboratuvarında, uygun kafesler içinde barındırılarak serbestçe beslenmeleri ve su içmeleri sağlandı. Deney hayvanları çelik kafesler içinde barındırılarak herhangi bir besin kısıtlaması içermeyen taze yemle beslendi.

3.2. Deney Hayvanları Grupları

Fareler rastgele seçilerek her biri 5 adet BALB-C cinsi dişi fare içeren üç grup oluşturuldu.

Grup 1 (n:5) : Serum fizyolojik uygulanan fare grubu (kontrol grubu)

Grup 2 (n:5) : Sisplatin uygulanan fare grubu

Grup 3 (n:5) : Losartan+sisplatin uygulanan fare grubu

3.3. Çalışmanın Yürütülmesi

1.gruba intraperitoneal (i.p.) 5 cc % 0,9 luk steril SF solüsyonu enjekte edildi.

2.gruba i.p. tek doz sisplatin 12,7 mg/kg/gün (Cisplatin-teva 10 mg 1 flakon, MED-İLAÇ San. ve Tic. A.Ş, İstanbul) verildi. Sisplatin verildikten bir saat sonra i.p. 5 cc % 0,9 luk steril SF solüsyonu enjekte edildi.

3.gruba tek doz sisplatin 12,7 mg/kg/gün (Cisplatin-teva 10 mg 1 flakon, MED-İLAÇ San. ve Tic. A.Ş, İstanbul) verildi. Sisplatin enjeksiyonundan dört gün önce 10 mg/kg dozdan losartan (Losartil 50 mg 28 Tablet Drogan İlaç) enteral yoldan başlandı ve dokuz gün boyunca verildi.

Deney hayvan grupları ve uygulamaları Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: Deney Hayvanları Grupları ve Uygulamalar

GRUPLAR	1-4. GÜN	5.GÜN	6-9.GÜN
Grup 1 (KONTROL)	-	SF	-
Grup 2 (SİSPLATİN)	-	Sisplatin+SF	-
GRUP 3 (LOSARTAN+SİSPLATİN)	Losartan	Losartan+Sisplatin+SF	Losartan

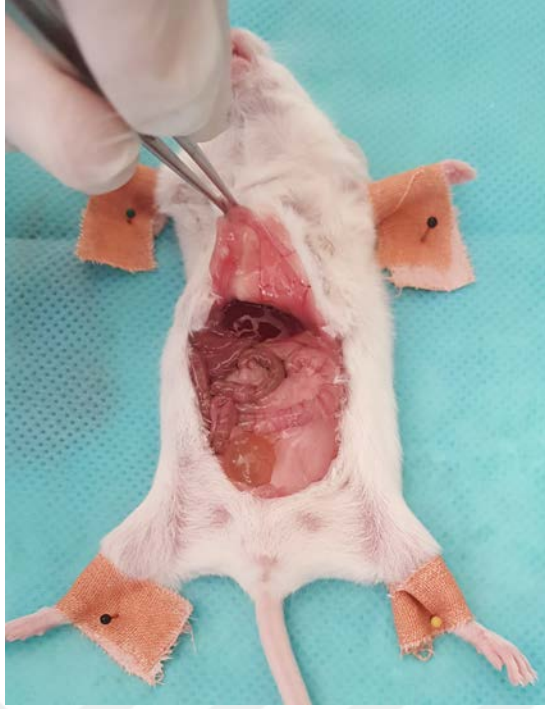
(SF: Serum fizyolojik)

3.4 Histolojik İnceleme

3.4.1 Dokuların Elde Edilişi ve Doku Takibi

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı.

Sisplatin verildikten sonra 5. günde, tübüller proliferasyonu değerlendirmek amacı ile 200 mg/kg 5-bromo 2'deoxyuridine (BrdU) i.p. enjekte edildi. Fareler, bu işlemde 4 saat sonra ketamin (90 mg/kg) + ksilazin - hidroklorür (10 mg/kg) i.p. olarak verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Hayvanların karın bölgesi açılarak böbrekleri çıkarıldı (Resim 1-4).



Resim 1: Batın eksplorasyonu



Resim 2: Sol böbreğin anatomik yerleşimi



Resim 3: Sol böbreğin çıkartılması



Resim 4: Sağ böbreğin çıkartılması

Sol ve sağ böbrek %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alınarak 48 saat bekletildi. Tespit edilen dokular akarsuda yıkandı ve daha sonra aşağıdaki doku takip protokolüne göre takip edildi.

1. Etil Alkol (%70)	45 dakika
2. Etil Alkol (%80)	45 dakika
3. Etil Alkol (%90)	45 dakika
4. Etil Alkol (%96)	45 dakika
5. Etil Alkol (%96)	45 dakika
6. Etil Alkol (%96)	45 dakika
7. Etil Alkol (%96)	45 dakika
8. Ksilol	15 dakika
9. Ksilol	15 dakika
10. Ksilol/Parafin(1/1)	1 saat
11. Parafin	1 saat
12. Parafin	2 saat
13. Bloklama	

3.4.2 Işık Mikroskopik İncelemeler

3.4.2.1 Hematoksilen-Eozin Boyaması

Blok haline getirilen dokulardan, rotary mikrotom (Leica, 2125RT) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere 58°C'lik etüvde 1 saat fiziksel deparafinizasyon işlemi uygulandı ve boyama protokollerine geçildi. Işık mikroskopik değerlendirmeler için alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) boyları ile aşağıdaki protokole göre boyandı.

H&E Boyama Protokolü;

- 1) Ksilen 15 dakika
- 2) Ksilen 15 dakika
- 3) % 96' lık alkol 10 dakika
- 4) % 80' lik alkol 10 dakika
- 5) % 70' lik alkol 10 dakika
- 6) Distile su 2-3 dakika
- 7) Hematoksilen 2 dakika
- 8) Akar suda yıkama
- 9) Asit alkol 3 saniye
- 10) Distile su 1 dakika
- 11) Amonyaklı su 3 saniye
- 12) Distile su 1 dakika
- 13) Eozin 30 saniye
- 14) Distile su 1 dakika
- 15) % 70' lik alkol 5 dakika
- 16) % 80' lik alkol 5 dakika
- 17) % 96' lık alkol 5 dakika
- 18) Ksilen 15 dakika
- 19) Ksilen 15 dakika
- 20) Entellan ile kapatma.

H&E ile boyanan kesitlerde glomerüller ve tübüller morfolojik olarak incelenerek herhangi bir hasarın olup olmadığına bakıldı.

3.4.2.2 İmmünohistokimyasal İşaretlemeler

İmmünohistokimyasal incelemeler için adeziv lamlara alınan kesitler 58°C'lik etüvde 1 saat fiziksel deparafinizasyon işleminden sonra ksilene alındı. Deparafinize olan kesitler giderek azalan alkol serilerinden geçirildi ve sonra distile suya alınarak rehidrate edildi. Antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak amacıyla kesitler, Anti-BrdU işaretlemesi için 30 dakika (dk) oda ısısında tripsin ile inkübe edildi; aktif kaspaz-3 işaretlemesi için ise Tris-EDTA solüsyonunda mikrodalgada kaynatıldı. Fosfat buffered salin (PBS) ile yıkanan kesitler daha sonra hidrojen peroksit (H₂O₂) içinde 10 dk bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi. Anti-BrdU işaretlemesi için endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesinden sonra kesitler PBS ile yıkandı ve 2 normal hidroklorik asit (HCl) solüsyonunda 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Asitin etkisini nötralize etmek için kesitler 0,1 molar di-sodyum tetraborat solüsyonunda 10 dk bekletildi ve sonra çeşme suyunda yıkandı. Aktif kaspaz-3 işaretlemesi için HCl ve di-sodyum tetraborat aşamaları atlandı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler pappen ile çevrildi ve normal keçi serumu damlatılarak 8 dakika bekletildi. Daha sonra Anti-BrdU (1/20, Novocastra) veya Aktif kaspaz-3 (1/100, Cell Signaling) antikoları damlatılarak +4°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kesitlere Anti-BrdU için anti-fare, Aktif kaspaz-3 için anti-tavşan sekonder antikor damlatıldı ve 10 dakika beklendi. Ardından horseradish peroksidaz (HRP) damlatılarak 10 dakika daha beklendi ve 3,3'-diaminobenzidine (DAB) ile inkübasyon sağlandı. Distile su ile yıkanan kesitler zıt boyama için hematoksilende 2 dakika bekletildi ve daha sonra entellan ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler için Anti-BrdU işaretlemesinde bütün kesit alanı X20 büyütmede taranarak pozitif boyanmış hücreler sayıldı, aktif kaspaz-3 işaretlemesi için ise X40 büyütmede 5 farklı alan taranarak pozitif boyanmış hücreler sayıldı.

Bütün ışık mikroskopik incelemeler kamera ataçmanlı Olympos BX50 marka ışık mikroskopu ile yapıldı ve fotoğraflar çekildi.

3.5 İstatistik Analiz

Morigi M 2008, Morigi M 2004, Morigi M 2010 daki üç çalışma referans alınarak histolojik değişiklikler, apoptozis ve prolatif değişiklik sonuçlarının, istatistiksel olarak anlamlı bulunabilmesi için yapılacak 3 gruplu çalışmada % 90 güç ve %5 tip 1 hata ile her grupta en az dört, en fazla altı hayvanla çalışması uygun bulunmuştur. Bu nedenle her grupta 5 hayvan alınmıştır.

Verilerin istatistiksel analizi STATISTICA Version 13.3 programı ile yapıldı. Kaspaz-3 ve anti-BrdU hücre sayıları için tanımlayıcı istatistiklerden ortalama±standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanıldı. Normal dağılım kontrolü Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Kontrol, sisplatin ve sisplatin+losartan gruplarının kaspaz-3 ve anti-BrdU hücre sayılarının ortalama karşılaştırmaları için parametrik testlerden Tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanıldı. Farklılığa sebep olan grup ya da grupların tespiti için çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanıldı. Tüm karşılaştırmalar için istatistik anlamlılık seviyesi (p) 0,05 olarak alındı.

4.BULGULAR

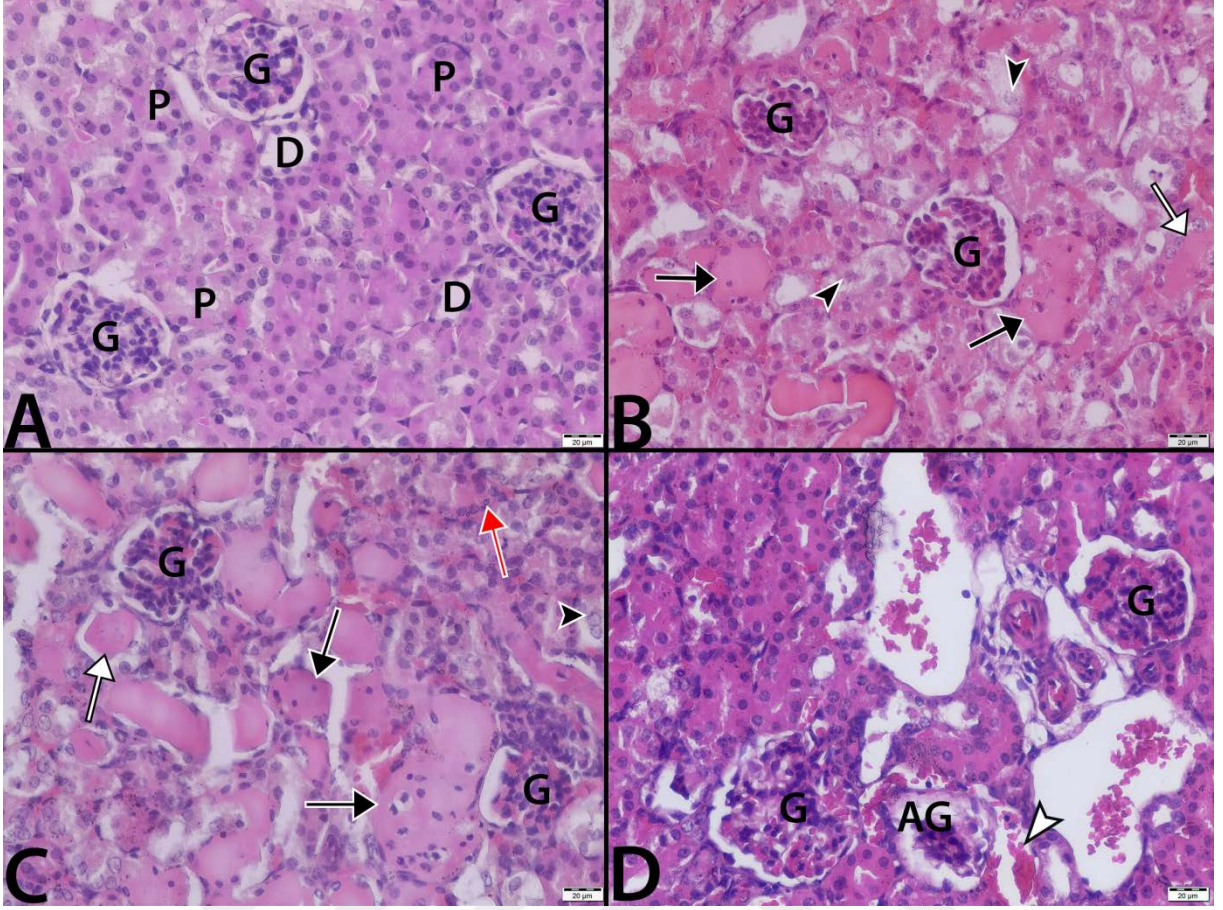
4.1 Işık Mikroskopik Değerlendirmeler

4.1.1 Hematoksilen-Eozin ile Boyanmış Kesitlerin Değerlendirilmesi

H&E ile boyanmış kontrol grubuna ait kesitlerde glomerüller ve tübüller normal morfolojiye sahipti (Resim 5A).

Sisplatin grubu kesitleri incelendiğinde birçok tübülde kast oluşumu, tübüler tiroidizasyon, tübül epitel hücrelerinde nüklear fragmantasyon, tübüler dilatasyon izlendi. Ayrıca interstisyumda inflamatuvar hücreler görüldü. Yer yer dejeneren tübüller bulunmaktaydı ve bazı tübül epitel hücreleri lümene dökülmüştü. Glomerüllerde ve damarlarda konjestif değişiklikler izlendi. Bazı glomerüller atrofik özelliklere sahipti (Resim 5C-D).

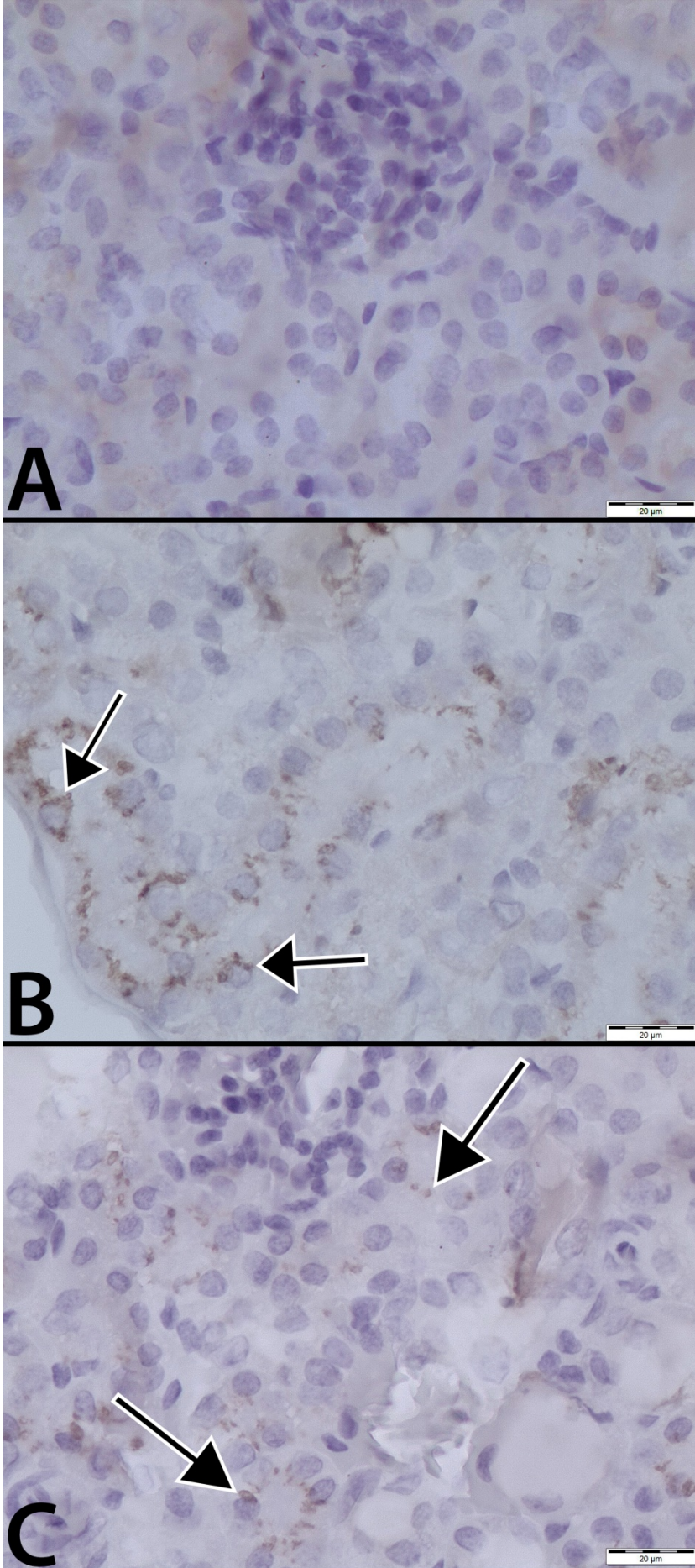
Sisplatin+Losartan grubu kesitleri incelendiğinde sisplatin grubuna benzer morfolojik özelliklere sahip olduğu ancak patolojik bulguların azaldığı izlendi (Resim 5B).



Resim 5. H&E boyamasına ait mikrofotograf X200. (A) kontrol grubunda normal yapıya sahip glomerüller (G), distal (D) ve proksimal (P) tübüller, (B) Sisplatin+ Losartan grubu ile (C) ve (D) Sisplatin grubunda kast oluşumu (siyah ok), tiroidizasyon (beyaz ok), tübül lümenine dökülmüş tübül epitel hücreleri (siyah ok başı), nüklear fragmentasyonlar (kırmızı ok), konjestif değişiklikler (beyaz ok başı), atrofik glomerül (AG).

4.1.2 Aktif Kaspaz-3 ile İşaretlenmiş Kesitlerin Değerlendirilmesi

Aktif kaspaz-3 işaretlemesi yapılan kesitler incelendiğinde, kontrol grubunda çok az sayıda pozitif hücre bulunmaktaydı (Resim 6A). Bu sayı sisplatin grubunda belirgin şekilde artmıştı (Resim 6B). Sisplatin+Losartan grubundaki pozitif hücre sayısı sisplatin grubuna göre azalmıştı (Resim 6C).



Resim 6. Aktif kaspaz-3 işaretleme (A) kontrol grubu, (B) sislpatin grubu, (C) Sislpatin + Losartan grubu, siyah ok pozitif boyanan hücreler, X400.

Kontrol grubu, sisplatin grubu ve sisplatin+losartan grubundaki her bir denekten alınan iki farklı kesitten beşer alanda aktif kaspaz-3 ile boyanan hücreler sayılmıştır. Pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 6-8’de gösterilmiştir.

Tablo 6: Kontrol grubu Kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	1. Alan	2. Alan	3. Alan	4. Alan	5. Alan	Ortalama
1	1	2	0	0	1	0	0,5
	2	1	1	0	0	0	
2	1	1	0	0	1	0	1.1
	2	1	0	3	4	2	
3	1	1	0	0	2	1	0.6
	2	0	0	1	0	1	
4	1	1	1	0	1	1	0.8
	2	1	0	0	2	1	
5	1	1	0	1	1	0	0.7
	2	0	0	1	1	2	

Tablo 7: Sisplatin grubu kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	1. Alan	2. Alan	3. Alan	4. Alan	5. Alan	Ortalama
1	1	26	23	22	24	21	24.7
	2	28	26	16	22	19	
2	1	18	22	24	23	26	21.9
	2	20	22	21	20	23	
3	1	22	20	19	18	23	20.6
	2	25	17	23	19	20	
4	1	23	18	20	22	19	21
	2	21	23	22	22	20	
5	1	20	19	18	22	23	20.2
	2	19	21	22	20	18	

Tablo 8: Sisplatin+Losartan grubu kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	1. Alan	2. Alan	3. Alan	4. Alan	5. Alan	Ortalama
1	1	14	15	16	18	17	14.7
	2	12	13	13	15	15	
2	1	15	17	20	19	20	19.6
	2	20	22	21	23	19	
3	1	20	22	19	20	21	20.2
	2	20	22	19	18	21	
4	1	20	22	19	16	18	20
	2	22	23	20	21	19	
5	1	14	15	15	19	20	18.1
	2	19	20	20	18	21	

Kaspaz-3 hücre sayılarının ortalama± standart sapması kontrol grubunda 0,74±0,23; sisplatin grubunda 21,68±1,80; sisplatin+losartan grubunda 18,54±2,25 olarak saptanmıştır. Kaspaz-3 hücre sayılarının karşılaştırılması Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo 9: Kaspaz-3 hücre sayılarının karşılaştırılması

	Grup	N	Ortalama± standart sapma	Minimum-Maximum
Kaspaz-3 Hücre Sayısı	Kontrol	5	0,74±0,23	0,50-1,10
	Sisplatin	5	21,68±1,80	20,20-24,70
	Sisplatin+Losartan	5	18,54±2,25	14,80-20,20

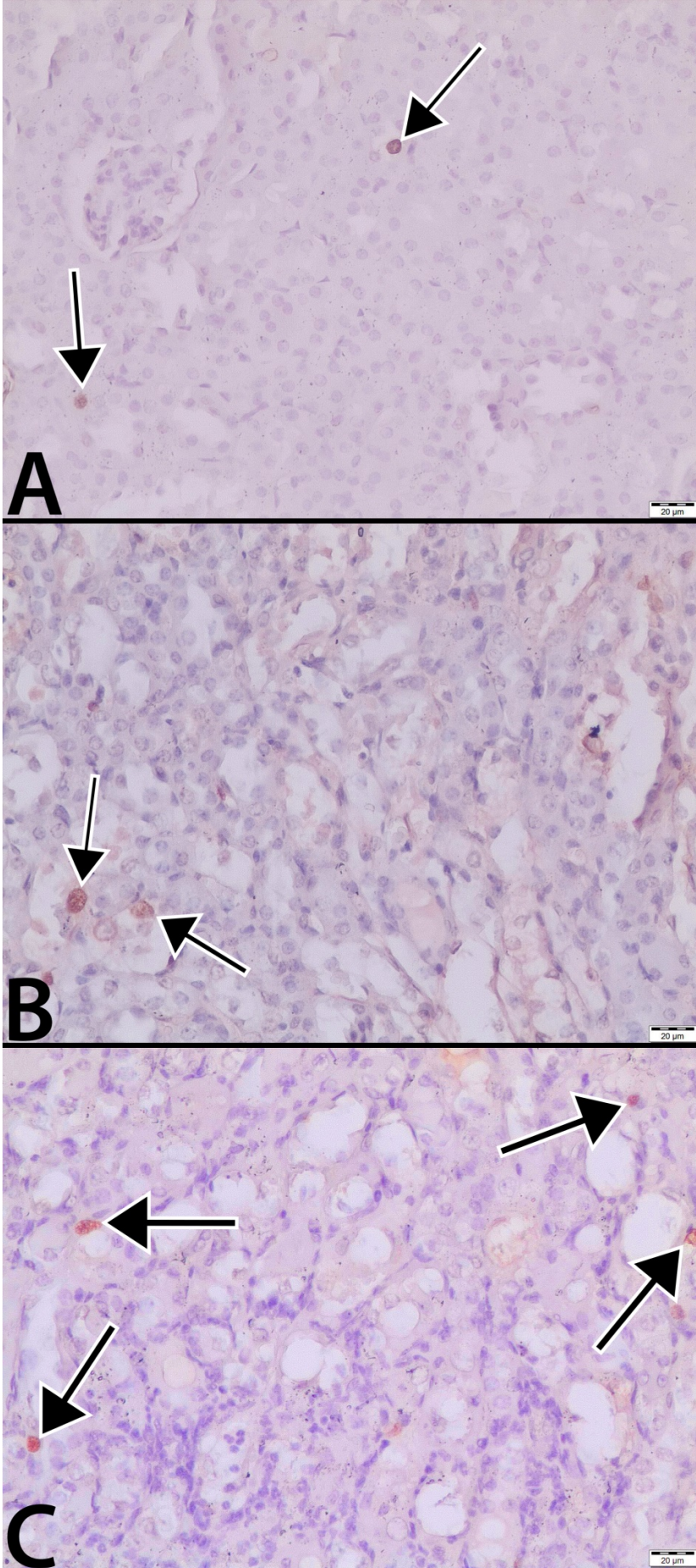
Kontrol grubuyla sisplatin grubunun ($p<0,001$) ve kontrol grubuyla sisplatin+losartan grubunun ($p<0,001$) kaspaz-3 pozitif hücre sayısı ortalaması arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır.

Sisplatin ile sisplatin+losartan grubunun kaspaz-3 pozitif hücre sayısı ortalaması arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. ($p=0,029$)

4.1.3 Anti-BrdU ile İşaretlenmiş Kesitlerin Değerlendirilmesi

Anti-BrdU işaretlemesi için kontrol grubu kesitleri incelendiğinde pozitif boyanmış hücrelere rastlandı (Resim 7A). Bu sayı sisplatin grubunda anlamlı bir şekilde azalmıştı (Resim 7B). Sisplatin+losartan grubuna bakıldığında ise pozitif boyanmış hücre sayısında diğer iki gruba oranla anlamlı bir artış görüldü (Resim 7C).





Resim 7. Anti-BrdU işaretlemesi (A) kontrol grubu, (B) sisplatin grubu, (C) Sisplatin + Losartan grubu, siyah ok pozitif boyanan hücreler, X400.

Kontrol grubu, sisplatin grubu ve sisplatin+losartan grubundaki her bir denekten alınan iki farklı kesitteki tüm alanlarda Anti-BrdU ile boyanan hücreler sayılmıştır. Pozitif boyanan hücre sayıları Tablo 10-12'de gösterilmiştir.

Tablo 10: Kontrol grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	Pozitif Hücre Sayısı
1	1	37
	2	35
2	1	33
	2	32
3	1	30
	2	29
4	1	22
	2	25
5	1	23
	2	26

Tablo 11: Sisplatin grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	Pozitif Hücre Sayısı
1	1	12
	2	10
2	1	15
	2	13
3	1	9
	2	11
4	1	12
	2	16
5	1	10
	2	13

Tablo 12: Sisplatin+losartan grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları

Denek	Kesit	Pozitif Hücre Sayısı
1	1	63
	2	60
2	1	56
	2	55
3	1	58
	2	61
4	1	52
	2	48
5	1	58
	2	63

Anti-BrdU hücre sayılarının ortalama± standart sapması kontrol grubunda 29,20±5,29; sisplatin grubunda 12,20±1,75; sisplatin+losartan grubunda 57,40±4,72 olarak saptanmıştır. Anti-BrdU hücre sayılarının karşılaştırılması Tablo 13’de gösterilmiştir.

Tablo 13: Anti-BrdU hücre sayılarının karşılaştırılması

	Grup	N	Ortalama± standart sapma	Minimum-Maximum
Anti-BrdU hücre sayısı	Kontrol	5	29,20±5,29	23,5-36,0
	Sisplatin	5	12,20±1,75	10,0-14,0
	Sisplatin+Losartan	5	57,40±4,72	50,0-61,5

Kontrol grubuyla sisplatin grubunun ($p<0,001$) ve kontrol grubuyla sisplatin+losartan grubunun ($p<0,001$) anti-BrdU hücre sayısı ortalaması arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı. Sisplatin ile sisplatin+losartan grubunun anti-brdu hücre sayısı ortalaması arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,001$) Anti-BrdU hücre sayısı ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılması Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14: Anti-BrdU hücre sayısı ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılması

Grup	P değeri
Kontrol & Sisplatin	$p<0,001$
Kontrol & Sisplatin+Losartan	$p<0,001$
Sisplatin & Sisplatin+Losartan	$p<0,05$

5.TARTIŞMA

Sisplatin yaygın olarak kullanılan antineoplastik ajanlardan biridir. Doz ilişkili olarak nefrotoksisiteye neden olması, klinik kullanımda en önemli doz kısıtlayıcı faktördür. Bu nedenle sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu tedavilerin keşfedilmesi ve bu tedavilerin kemoterapi protokollerine eşlik etmesi son derece önemlidir.

Sisplatin nefrotoksik olmakla birlikte nörotoksik, ototoksik, hepatotoksik, kardiyotoksik, myelosupresif bir ajandır. Uzun dönemde organ ve dokularda fonksiyon kayıplarına neden olabilmektedir^{3,4}.

Sisplatin nefrotoksisite fizyopatolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak patogeneizde apoptozis, nekroz, oksidatif stres, inflamasyon, fibrozis ve mitokondriyal hasarın önemli rol aldığı düşünülmektedir^{8,9}. Sisplatin nefrotoksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda sisplatinin serbest radikal oluşumu ile oksidatif hasar yaptığına dair kanıtlar gösterilmiştir¹⁰. Patogeneizde oksidatif hasar önemli bir rol oynadığından bunu önlemeye yönelik çok sayıda antioksidan ajan çalışılmıştır¹¹⁻¹⁶.

Losartan bir ATR1 blokörüdür. RAAS'ı inhibe ederek antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir¹⁷. Bu çalışmada sisplatinin böbrek yapısı üzerindeki etkileri çalışılmış ve antioksidan etkinliği bilinen losartanın sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu rolü araştırılmıştır.

Bu araştırmada kontrol grubuna ait kesitlerde H&E ile boyanmış preoperatlar incelendiğinde glomerüller ve tübüllerin normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. Buna karşın sisplatin grubu kesitleri incelendiğinde ise birçok tübülde kast oluşumu, tübüler tiroidizasyon, tübül epitel hücrelerinde nüklear fragmantasyon, tübüler dilatasyon izlendi. Ayrıca interstisyumda inflamatuvar hücreler görüldü. Yer yer dejenere tübüller bulunmaktaydı ve bazı tübül epitel hücreleri lümene dökülmüştü. Glomerüllerde ve damarlarda konjestif değişiklikler izlendi. Bazı glomerüller atrofik özelliklere sahipti. Bu bulgular çalışmamızda kullandığımız yüksek doz verilen sisplatinin, yaygın tübüler hasarın yanı sıra glomerüler hasara da yol açtığını göstermektedir.

Sisplatin+Losartan grubu kesitleri incelendiğinde sisplatin grubuna göre patolojik bulguların azaldığı izlenmiştir. Tüm bu bulgular histopatolojik düzeyde

losartanın sisplatine bağlı böbrek hasarını azaltıcı etkisi olduğunu göstermekte olup literatürde bu konuda ışık mikroskobi ile yapılmış çalışmalarla uyum sağlamaktadır^{12,18}. Literatürde sisplatin nefrotoksisitesinde losartanın etkilerini araştıran çalışmalar incelendiğinde farklı sonuçlara rastlanmıştır.

Farzaneh ve arkadaşlarının¹² 2012 yılında yaptığı bir sıçan çalışmasında; deneklere dört gün süre ile 10mg/kg/gün dozunda losartan i.p. verilmiş. Çalışmanın nc gününde tek doz 6mg/kg sisplatin i.p. verilmiş. Denekler yedinci günde kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilmiş. Çalışmanın sonucunda gruplar arasında kan BUN ve Cr düzeyleri arasında farklılık saptanmamıştır ancak histopatolojik incelemede losartan+sisplatin alan grupta sisplatin alan gruba göre patolojik bulguların azaldığı gösterilmiştir (p<0,05).

Samira ve arkadaşlarının¹⁸ 2009 yılında yaptığı bir sıçan çalışmasında; bir gruba 10mg/kg/gün dozunda altı gün süre ile diğer gruba tek doz 60mg/kg losartan i.p verilmiş. Çalışmanın birinci gününde losartandan 1 saat sonra tek doz 7mg/kg/gün sisplatin i.p verilmiş. Denekler altıncı günün sonunda kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilmiş. Çalışmanın sonucunda sisplatin alan gruplarda BUN ve Cr değerleri yaklaşık 2-3 kat artmış bulunurken losartan+sisplatin alan her iki grupta da bu değerler normal saptanmış (p<0,05). İki farklı losartan uygulaması arasında ise BUN ve Cr değerleri açısından fark saptanmamış. Histopatolojik incelemede ise losartan+sisplatin alan her iki grupta sisplatin alan gruba göre istatikselsel değerlendirmeye rastlanamamakla beraber patolojik bulguların azaldığı gösterilmiştir.

Maryam ve arkadaşlarının²¹ 2012 yılında yaptığı bir sıçan çalışmasında; denekler dişi ve erkek olarak farklı gruplara ayrılmış. Deneklere dokuz gün süre ile 10mg/kg/gün dozunda losartan i.p verilmiş. Çalışmanın nc gününde tek doz 7mg/kg sisplatin i.p verilmiş. Denekler dokuzuncu günde kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilmiş. Çalışmanın sonucunda sisplatin+losartan alan dişi grupta BUN ve Cr düzeyleri sisplatin alan dişi gruba göre daha yüksek bulunmuş(p<0,05). Erkek deneklerde ise sisplatin+losartan alan grupta BUN ve Cr düzeyleri daha düşük bulunmuş ancak istatikselsel fark saptanmamış. Histopatolojik değerlendirmede ise sisplatin+losartan alan dişi grupta sisplatin alan dişi gruba göre böbrek hasar skorlaması açısından fark saptanmamıştır.

Roya ve arkadaşlarının¹⁹ 2014 yılında yaptığı bir sıçan çalışmasında; deneklere on gün süre ile bir gruba 10mg/kg/gün dozunda diğer gruba 20mg/kg/gün losartan i.p verilmiş. Çalışmanın üçüncü gününden itibaren 7 gün süre ile 2,5mg/kg/gün dozunda sisplatin i.p verilmiş. Denekler onuncu günde kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilmiş. Çalışmanın sonucunda sadece losartan alan (10-20mg/kg/gün) gruplarda BUN ve Cr değerleri sisplatin alan gruba göre düşük bulunmuş ($p<0,05$). Sisplatin alan gruba göre BUN ve Cr düzeyleri için sisplatin+losartan (10mg/kg/gün) alan grupta farklılık saptanmamış; sisplatin+losartan (20mg/kg/gün) alan grupta daha yüksek saptanmış ($p<0,05$). Histopatolojik değerlendirmede ise Sisplatin+losartan alan gruplarda tübüler hasar skorlaması sisplatin alan gruba göre daha yüksek saptanmış. Sisplatin+losartan (20mg/kg/gün) alan grupta ise bu artış istatistiksel olarak anlamlı saptanmış($p<0,05$).

Deegan ve arkadaşlarının⁵⁹ 1995 yılında yaptıkları çalışmada, birinci gruba 10mg/kg ve ikinci gruba 30mg/kg dozdan losartan i.p. uyguladıktan 2 saat sonra sisplatin (5mg/kg/doz) tek doz i.p. uygulanmış. Üçüncü gruba da birinci grup ile aynı işlemler uygulandıktan sonra takip eden 6 gün boyunca 10mg/kg/gün dozdan losartan i.p. uygulanmış. Denekler yedinci günde kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edilmiş. Çalışmanın sonucunda losartan+sisplatin alan gruplar ile sisplatin grubu arasında BUN ve Cr değerleri arasında fark saptanmamış.

Yapılan benzer hayvan deneylerinde sisplatinin 5-20mg/kg dozlarında kullanımı nefrotoksisiteye neden olduğu gösterilmiştir^{60,61,62,63,64,65}. Çalışmamızda sisplatin dozu literatür ile uyumlu olarak 12,7 mg/kg dozdan uygulandı.

Konu ile ilgili yapılan benzer çalışmalar ve sonuçları gözden geçirildiğinde, yapılan farklı çalışmalarda farklı protokoller uygulanmakla beraber sisplatin verilme zamanı genellikle losartanın ilk dozundan 1saat ile 3 gün sonrası olarak tercih edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise losartan başladıktan 5 gün sonra sisplatin uygulanmış ve çalışmamızda sisplatine bağlı nefrotoksisitede losartan kullanımının böbreği koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bilinmektedir ki kronik ATR1 reseptör blokajı uygulandığında ATR2 sunusu artarak, vasodilatasyon, hücre büyümesi ve

fibrozisin baskılanması, antioksidan etki ortaya çıkmaktadır⁵¹. Bu veriler doğrultusunda gelecekte yapılacak çalışmalar, losartanın daha erken başlanmasının sisplatine bağlı nefrotoksisiteden koruyucu özelliğini artırıp artmayacağı konusunu aydınlatacaktır.

Losartan tedavisinin toplam uygulama süresi açısından mevcut çalışmalar incelendiğinde tek doz veya 4-10 gün verildiği görülmektedir. 4 gün ve 6 gün ile yapılan iki çalışmada sonuçlar olumlu iken; tek doz, 6 gün ve 10 gün ile yapılan 4 çalışmada losartanın etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda losartan tedavisi toplamda 9 gün sürdürüldü. Losartan tedavi süresi ile ilgili mevcut bilgiler yetersiz olup etkin tedavilerin oluşturulabilmesi amacıyla daha fazla çalışmaya gerek duyulmaktadır.

Literatürdeki çalışmalarda losartan tedavisinin uygulanma yolu olarak i.p. tedavi tercih edilmiştir. Biz çalışmamızda losartan tedavisini gavaj aracılığıyla enteral yoldan uyguladık. Losartanın enteral yoldan uygulanmasının etkinliğini artırmış olabileceği düşünüldü. Bu hipotezin ilerde yapılacak çalışmalar ile desteklenmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, losartanın bazı çalışmalarda BUN ve Cr değerlerini etkilemezken histopatolojik iyileşme sağladığı, bazı çalışmalarda BUN ve Cr değerleri azaltırken histopatolojik olarak etkisiz olduğu, bazı çalışmalarda ise BUN ve Cr değerlerinin daha yüksek veya histopatolojik bulgularda kötüleşme olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise sisplatin+losartan alan grupta sisplatin grubuna göre patolojik bulguların azaldığı izlenmiştir.

Losartanın farklı patolojik durumlarla ilgili hayvan çalışmalarında koruyucu etkisinin apoptozisi önleyerek gerçekleştirdiğine ilişkin veriler bulunmaktadır. 2017 yılında yapılan bir çalışmada serebral iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda losartan kullanımının kaspaz 3 inaktivasyonu yaparak apoptozisi azalttığı gösterilmiştir⁶⁶. Başka bir hayvan deneyinde deniz suyu ile oluşturulmuş akciğer hasarında losartan kullanımının antiapoptotik etkinlik gösterdiği bunu da apoptozis ilişkili proteinlerden sitokrom c, bcl2 ve caspase 3 düzeylerini azaltarak gerçekleştirdiği saptanmıştır⁶⁷. Sisplatinin çeşitli mekanizmalar ile mitokondriyal geçirgenliği artırarak apoptozisi tetiklediği

bilinmektedir. Bu apoptotik etki sisplatin toksisitesinden de sorumlu tutulmaktadır²¹. Çalışmamızda apoptotik hücreleri gözlemleyebilmek için aktif kaspaz-3 ile immünohistokimyasal boyama kullanıldı. Aktif kaspaz-3 işaretlemesi yapılan kesitler incelendiğinde, kontrol grubunda çok az sayıda pozitif hücre bulunmaktaydı. Bu sayı sisplatin ve sisplatin+losartan grubunda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,001$). Sisplatin+Losartan grubundaki pozitif hücre sayısı sisplatin grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$). Tüm bu bulgular ile sisplatine maruz kalan renal dokuda yoğun şekilde apoptotik hücre oluştuğunu ve losartanın sisplatin nefrotoksitesinde apoptozise giden hücre sayısını anlamlı derecede azalttığını göstermektedir. Verilerimiz doğrultusunda losartanın sisplatine bağlı nefrotoksitenin önlenmesinde antiapoptotik etkisinin önemli bir katkıda bulunduğunu ve bu bulguların klinik olarak da kanıtlanmasının faydalı olabileceği düşünmekteyiz.

DNA sentezi ve DNA replikasyonu hücrel çöğalmanın bir göstergesidir. Çalışmamızda da DNA sentezi sırasında BrdU'nun DNA'ya bağlanmasından faydalanarak tübüller proliferasyonu değerlendirmek amacı ile literatürde belirtildiği gibi BrdU (200mg/kg) kullanılmıştır^{68,69}. Sisplatin verildikten sonra 5. günde, denekler sakrifiye edilmeden 4 saat önce BrdU i.p. enjekte edildi. Deneklerden hazırlanan kesitlere Anti-BrdU ile isaretleme yapıldı. Anti-BrdU işaretlemesi için kontrol grubu kesitleri incelendiğinde pozitif boyanmış hücrelere rastlandı. Bu sayı sisplatin grubunda anlamlı bir şekilde düşüktü ($p<0,001$). Bu bulgular sisplatin alan grupta DNA sentezinin baskılandığını göstermektedir. Sisplatin+losartan alan gruba bakıldığında ise pozitif boyanmış hücre sayısında diğer iki gruba oranla anlamlı bir artış görüldü ($p<0,001$). Bu bulgular losartanın, sisplatin nefrotoksitesini özlemede tübüler proliferasyonu artırarak etki gösterdiğini destekler niteliktedir.

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında; BUN ve Cr düzeylerinin teknik nedenlerden dolayı ölçülememiş olması ve losartanın apoptozisi azalttığı gösterilmekle beraber mekanizması üzerine araştırma yapılmamış olması yer almaktadır.

Sonuç olarak; sisplatine bağlı nefrotoksite oluşturulan farelerde losartan kullanımının böbreği koruyucu, apoptozu önleyici ve proliferasyonu artırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak daha çok sayıda hayvan deneyi ile bu

koruyucu etkinin gösterilmesi ve fayda sağlıyor ise klinik çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.



6.SONUÇLAR:

1- H&E ile boyanmış kontrol grubuna ait kesitlerde glomerüller ve tübüller normal morfolojiye sahipti.

2- Kontrol grubunda aktif kaspaz-3 işaretlemesi yapılan kesitlerde çok az sayıda pozitif hücre bulunmaktaydı.

3- Sisplatin grubunda birçok tübülde kast oluşumu, tübüller tiroidizasyon, tübül epitel hücrelerinde nükleer fragmantasyon, tübüller dilatasyon izlendi.

4- Sisplatin grubunda interstisyumda inflamatuvar hücreler görüldü. Yer yer dejenere tübüller bulunmaktaydı ve bazı tübül epitel hücreleri lümene dökülmüştü.

5- Sisplatin grubunda glomerüllerde ve damarlarda konjestif değişiklikler izlendi. Bazı glomerüller atrofik özelliklere sahipti.

6- Sisplatin+Losartan grubunda sisplatin grubuna göre patolojik bulguları daha az sayıda izlendi.

7- Kaspaz 3 aktivitesi sisplatin+losartan grubunda sisplatin grubuna göre daha düşük bulundu ($p<0,05$).

8- BrdU/Anti-BrdU işaretlemesi ile pozitif boyanan hücre sayısı sisplatin+losartan grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,001$).

KAYNAKLAR

1. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, et al. Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1572–1582.
2. Akyay A, Olcay L. Çocuklarda Akut Lenfoblastik Lösemi Tedavisinin Erken ve Geç Yan Etkileri. *Türkiye Çocuk Hast Derg* 2014; 1:46-54.
3. Dasari S, Tchounwou PB. Review Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; 740:364-378.
4. Yasui N, Adachi N, Kato M, et al. Cisplatin-induced Hearing Loss: The Need for a Long-term Evaluating System. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014;36:241–245.
5. Sobrego A, Guglielmi A, Aschele C, Rosso R. Current strategies to reduce cisplatin toxicity. *J Chemother* 1990; 2:3-7.
6. Kelland L. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:573-584.
7. Sharbaf FG, Farhangi H, Assadi F. Prevention of Chemotherapy-Induced Nephrotoxicity in Children with Cancer. *Int J Prev Med* 2017. 8:76-85
8. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73: 994-1007.
9. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334: 115-124.
10. Nigam S, Lieberthal W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair 2000. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 3-11.
11. Aksoy A, Karaoglu A, Akpolat N, Naziroglu M, Karagoz ZK. Protective Role of Selenium and High Dose Vitamin E against Cisplatin - Induced Nephrotoxicity in Rats. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:6877-6882.
12. Ashrafi F, Nematbakhsh M, Safari T, et al. Kidney Diseases A Combination of Vitamin C and Losartan for Cisplatin- induced

- Nephrotoxicity in Rats. *Iran J Kidney Dis* 2012;6:361-365.
13. Ugur S, Ulu R, Dogukan A, et al. The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail* 2015;37:332-336.
 14. Kim HJ, Park DJ, Kim JH, et al. Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *J Pharmacol Sci* 2015;127:117-126.
 15. Uzunoglu S, Karagol H, Ozpuyan F, et al. Protective effect of l-carnitine versus amifostine against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Med Oncol* 2011;28:690-696.
 16. 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.
 17. Goncalves AR, Fujihara CK, Mattar AL, et al. Renal expression of COX-2, ANG II, and AT1 receptor in remnant kidney: Strong renoprotection by therapy with losartan and a nonsteroidal anti-inflammatory. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286: 945–954.
 18. Saleh S, Ain-Shoka AA, El-Demerdash E, Khalef MM. Protective effects of the angiotensin II receptor blocker losartan on cisplatin-induced kidney injury. *Chemotherapy* 2009;55:399-406.
 19. Rastghalam R, Nematbakhsh M, Bahadorani M, et al. Angiotensin Type-1 Receptor Blockade May Not Protect Kidney against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *ISRN Nephrol* 2014;2014:1-7.
 20. Nematbakhsh M, Ashrafi F, Safari T, et al. Administration of vitamin E and losartan as prophylaxes in cisplatin-induced nephrotoxicity model in rats. *J Nephrol* 2012;25:410-417.
 21. Haghighi M, Nematbakhsh M, Talebi A, et al. The role of angiotensin II receptor 1 (AT1) blockade in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Gender-related differences. *Ren Fail* 2012;34:1046-1051.
 22. Goldstein, RS and Mayor GH. The nephrotoxicity of cisplatin. *Life Sci* 1983; 32:685-690.
 23. Lamieire NH, Flombaum CD, Moreau D, et al. Acute renal failure in cancer patients. *Ann of Med* 2005; 37: 13–25.
 24. Eren E, Ata A, Arican A. Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Nefrotoksisite. *Deü Tıp Fak Derg* 2012; 26:229-235.

25. Rosenberg B, VanCamp, Trosko J, Mansour V. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222: 385–386.
26. Scovell WM, Muirhead N, Kroos LR. cis-Diamminedichloroplatinum (II) selectively cross-links high mobility group proteins 1 and 2 to DNA micrococcal nuclease accessible regions of chromatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 826–835.
27. Canal P. Platinum compounds: pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Grochow LB, Ames MM (eds). *A Clinician's Guide to Chemotherapy Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Baltimore Williams & Wilkins, 1998: 345-373.
28. Emmerson BT. *Oxford Textbook of Medicine*. Wearherall, DJ, Ledingham, JGG, Warrell DA (Eds) Toxic Nephropathy Oxford. 3rd ed. New York: Tokyo, Oxford University Press, 1996:3258-3267.
29. Links M, Lewis C: Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 1999;57: 293-308.
30. Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984; 25:753–758.
31. Eljack ND, Ma HY, Drucker J, et al. Mechanisms of cell uptake and toxicity of the anticancer drug Cisplatin. *Metallomics* 2014;6:2126-2133.
32. S. Sabuncuoglu, H. Özgüneş. Sisplatin toksisitesi: Oksidatif stresin önemi ve antioksidanların etkisi. *İst tıp fak derg* 2010; 73:3.
33. <https://www.cancercareontario.ca/en/drugformulary/drugs/CISplatin>.
Erişim tarihi: 07.06.2018
34. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003; 1:47-61.
35. Winston J, Safirstein R, Moel D, Dikman S, Guttenplan J Cisplatin nephrotoxicity insights into mechanism. *Int J Androl* 1987; 10:325–346.
36. Fraval HNA, Rawlings CJ, Roberts JJ. Increased sensitivity of UV repair deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus leuteus*. *Mutat Res* 1978 51:121–132.
37. Pinzani V, Bressolle F, Haug IJ, Galtier M, Blayac JP: Cisplatin induced renal toxicity and toxicity-modulating strategies: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1994; 35:1–9.

38. Saugstad O. Neonatal oxygen radical disease. *Rec Adv Ped* 1992; 6: 173-187.
39. Diplock AT, Chaleux JL, Crozier-Willi G, et al. Functional food sciences and defenses against reactive oxygen species. *Br J Nutr* 1998; 80: 77-112.
40. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Investig* 2015; 6:331-336.
41. Greggi-Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effect of vitamin C against cisplatin induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: A dose dependent study. *Pharmacol Res* 2000; 41:405- 411.
42. Goligorsky MS, Brodsky AV and Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002; 61: 855-861.
43. Liochev SI, Fridovich I. The role of O⁻ in the production of HO: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 29–33.
44. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol Part C* 2002; 132:123-128.
45. Lierberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; 270: 700- 708.
46. Dobyán DC, Levi I, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 21:551-556.
47. Fenoglio C, Boicelli CA, Ottone M, Addario C, Chiari P, Viale M. Protective effect of procaine hydrochloride on cisplatin-induced alterations in rat kidney. *Anticancer Drugs* 2002;13:1043-1054.
48. Higby PJ, Wallace HJ, Albert DJ, Holland JF. Cis-Diamminedichloroplatinum (NSC-119875): a phase I study. *Cancer Chemother Rep* 1975; 59:647-663
49. Daugaard G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Dan Med Bull* 1990; 37:1-12.
50. Hutchinson FN, Perez EA, Gandara DR, Lawrence HJ, Kaysen G. Renal

- salt-wasting in patients treated with cisplatin. *Ann Intern Med* 1988; 108:21–25.
51. Ertürk Ş, Böbrek Hastalıklarının Fizyolojisinde RAAS, *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Derg* 2004;13:1-7.
 52. Gavras H, Brunner HR, Vaughan ED Jr, et al. Angiotensin-sodium interaction in blood pressure maintenance of renal hypertensive and normotensive rats. *Science* 1973; 180: 1369-1372.
 53. Van Epps HL. Harry Goldblatt and the discovery of renin. *The Journal Of Experimental Medicine* 2005; 201: 1351-1351.
 54. Burnier M, Brunner H. Angiotensin II receptor antagonists. *The Lancet*, 2000, 355: 637-645.
 55. Nicolai E, Cure G, Goyard J, et al. Synthesis and angiotensin II receptor antagonist activity of C-linked pyrimidine derivatives. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 1995, 30:4806-4820.
 56. Lo MW, Goldberg MR, McCrea JB, Lu H, Furtek CI, Bjornsson TD. Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1995; 58: 641-649.
 57. Beevers G, Lip GYH, O'Brien E. The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal* 2001; 322: 912-916.
 58. Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, et al. Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: 736-742.
 59. Deegan PM, Nolan C, Ryan MP, Basinger MA, Jones MM, Hande KR. The role of the renin-angiotensin system in cisplatin nephrotoxicity. *Ren Fail* 1995;17:665-674.
 60. Zou P, Song J, Jiang B, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects against cisplatin nephrotoxicity by inhibiting the apoptosis in mouse. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7:4607-4616.
 61. Sen S, De B, Devanna N, Chakraborty R. Cisplatin- induced nephrotoxicity in mice: protective role of *Leea asiatica* leaves. *Ren Fail* 2013; 35:1412-1417.
 62. Chen MF, Yang CM, Su CM, Hu ML. Vitamin C protects against cisplatin-induced nephrotoxicity and damage without reducing its effectiveness in

- C57BL/6 mice xenografted with Lewis lung carcinoma. *Nutr Cancer* 2014; 66:1085-1091.
63. Yoshida T, Kumagai H, Kohsaka T, Ikegaya N. Protective effects of relaxin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Exp Nephrol* 2014; 128:9-20.
 64. Ali BH, Al-Salam S, Al Hussein IS, et al. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity by emodin in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2013; 27:192-200.
 65. Trujillo J, Molina-Jijón E, Medina-Campos ON, et al. Renal tight junction proteins are decreased in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Toxicol Mech M* 2014; 24:520-528.
 66. Chen L, Ren Z, Wei X, et al. Losartan protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced apoptosis through β -arrestin1-mediated phosphorylation of Akt. *Eur J Pharmacol* 2017; 815:98-108.
 67. Li C, Bo L, Li P, et al. Losartan, a selective antagonist of AT1 receptor, attenuates seawater inhalation induced lung injury via modulating JAK2/STATs and apoptosis in rat. *Pulm Pharmacol Ther* 2017; 45:69-79.
 68. Leonard I, Zanen J, Nonclercq D, et al. Modification of immunoreactive EGF and EGF receptor after acute tubular necrosis induced by tobramycin or cisplatin. *Ren Fail* 1994;16:583-608.
 69. Abdel-Daim MM, El-Sayed YS, Eldaim MA, Ibrahim A. Nephroprotective efficacy of ceftriaxone against cisplatin-induced subchronic renal fibrosis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2017; 390:301-309.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
ADH	: Antidiüretik Hormon
AIII	: Anjiotensin 3
AIV	: Anjiotensin 4
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
Anti- BrdU	: Anti 5-bromo 2'deoxyuridine
ATP	: Adenozintrifosfat
ATPaz	: Adenozintrifosfataz
AT1	: Anjiyotensin 1
AT2	: Anjiyotensin 2
ATR	: Anjiotensin 2 Reseptörü
ATR1	: Anjiotensin 2 Reseptörü Tip 1
ATR2	: Anjiotensin 2 Reseptörü Tip 2
BrdU	:5-bromo 2'deoxyuridine
Cr	: Kreatinin
DAB	: 3,3'-diaminobenzidin
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı

GSH	: Redükte Glutatyon
GGT	: γ -glutamil transpeptidase
HCl	: Hidroklorik asit
HRP	: Horseradish peroksidaz
HO ⁻	: Hidroksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
H&E	: Hematoksilen-Eozin
iv	: Intravenöz
i.p.	: Intraperitoneal
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
Na-K ATPaz	: Sodyum-Potasyum Adenozintrifosfataz
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyonu
PBS	: Fosfat buffered salin
RNA	: Ribonükleikasit
SF	: Serum fizyolojik
TGF- β 1	: Transforming Growth Factor-Beta1

ŞEKİLLER

Şekil 1: Sisplatinin Moleküler Yapısı.....	13
Şekil 2: Sisplatinin Hücre Sitoplazmasında Birikim Mekanizması.....	15
Şekil 3: DNA-Sisplatin Bağlanması.....	16
Şekil 4: Oksidatif denge.....	20
Şekil 5: RAAS'nin Enzimatik Yolağı Ve Etkin Mediyatörleri.....	23
Şekil 6: Losartanın Moleküler Yapısı.....	27

RESİMLER

Resim 1: Batın eksplorasyonu.....	30
Resim 2: Sol böbreğin anatomik yerleşimi.....	30
Resim 3: Sol böbreğin çıkartılması.....	31
Resim 4: Sağ böbreğin çıkartılması.....	31
Resim 5. H&E boyamasına ait mikrofotograf.....	37
Resim 6. Aktif kaspaz-3 işaretlemesi.....	38
Resim 7. Anti-BrdU işaretlemesi.....	42

TABLolar

Tablo 1: Sisplatinin Kimyasal Özellikleri.....	13
Tablo 2: Sisplatinin İstenmeyen Etkileri.....	17
Tablo 3: AT2'nin Fizyolojik Etkileri.....	25
Tablo 4: Losartanın Kimyasal Özellikleri.....	26
Tablo 5: Deney Hayvanları Grupları.....	29
Tablo 6: Kontrol grubu kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	39
Tablo 7: Sisplatin grubu kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	39
Tablo 8: Sisplatin+Losartan grubu kaspaz-3 ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	40
Tablo 9: Kaspaz-3 hücre sayılarının karşılaştırılması.....	40
Tablo 10: Kontrol grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	43
Tablo 11: Sisplatin grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	43
Tablo 12: Sisplatin+losartan grubu anti-BrdU ile pozitif boyanan hücre sayıları.....	44
Tablo 13: Anti-BrdU hücre sayılarının karşılaştırılması.....	44
Tablo 14: Anti-BrdU hücre sayısı ortalamalarının istatistiksel karşılaştırılması....	45