

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
SİSPLATİN NEFROTOKSİTESİNDE
KEFİRİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Murat DEMİR

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından “1304-TU-06” proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA

2008

ÖNSÖZ

Dört yıllık uzmanlık eğitimim süresince, bilimsel açıdan eğitimime ve insani değerler açısından kişiliğime kattığı değerler açısından minnet ve şükran duyduğum tez danışmanım ve hocam Prof. Dr. Mehmet Tuğrul SEZER başta olmak üzere değerli hocalarım Prof. Dr. Mehmet Numan TAMER'e, Prof. Dr. Mehmet İŞLER'e, Prof. Dr. Ülkü SARITAŞ'a, Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR'e, Doç. Dr. Şevket Ercan TUNÇ'a, Doç. Dr. Hasan Şenol COŞKUN'a, Doç. Dr. Muhammed Cem KOÇKAR'a, Doç. Dr. Mehmet ŞAHİN'e, Yrd. Doç. Dr. Emine Güçhan ALANOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Zeynep Dilek AYDIN'a, Yrd. Doç. Dr. Altuğ ŞENOL'a, Yrd. Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Şeref YÜKSEL'e, Uzman Dr. İbrahim GÖREN'e, laboratuvar imkânlarını kullandıran Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Namık DELİBAŞ'a, yardımlarını esirgemeyen Dr. Medine Cumhuriyet CÜRE'ye, laboratuvar imkânlarını kullandıran Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Metin CİRİŞ'e, beraber çalışmaktan büyük şeref ve gurur duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, eğitimim süresince desteklerini daima hissettiğim hemodiyaliz ve periton diyalizi hemşire ve personeline, projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine, bu vesileyle sevgisiyle ve desteğiyle hep yanımda olan anneme, babama, sevgili eşim ve hayat arkadaşım Ayten DEMİR'e, neşe kaynağım çocuklarım H. Taha, M. Enes ve Kerem'e en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Uzm. Dr. Murat DEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Sisplatin	2
2.1.1. Sisplatin Nefrotoksisitesi	3
2.1.2. Patogenez	3
2.1.2.1. Sisplatinin hücreye alınması	3
2.1.2.2. Sisplatin metabolizması	4
2.1.2.3. Böbrek tübül hücresinde sisplatin sonrası oluşan biyokimyasal değişiklikler	4
2.1.2.4. Oksidatif hasar	5
2.1.2.5. Hipoksi ve mitokondrial hasar	5
2.1.2.6. Apoptoz	6
2.1.2.7. Sitokinler	6
2.2. Probiyotikler	9
2.2.1. Bir probiyotik olarak kefir	10
2.3. Oksidatif hasar belirteçleri ve antioksidan enzimler	12
3. MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15

3.1.1. Deney Hayvanları	15
3.1.2. Kefirin hazırlanması	15
3.2. Metod	16
3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması	16
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.2.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar	16
3.2.4. Doku ve kan örneklerinin alınması	17
3.2.5. Böbreklerin çıkarılması	17
3.2.6. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması	17
3.2.7. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler	17
3.2.8. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması	18
3.2.9. Dokularda Biyokimyasal Analizler	18
3.2.10. Histopatolojik Analiz Yöntemleri	18
4. BULGULAR	20
4.1. Ratların ağırlıkları ve grupların biyokimyasal parametreleri	20
4.2. Korelasyonlar	22
5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ	30
7. ÖZET	31
8. SUMMARY	32
9. KAYNAKLAR	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
OH [·]	Hidroksil iyonu
CAPE	Kafeik asit fenetil ester
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
GPX	Glutasyon peroksidaz
i.p.	İntraperitoneal
A.D.	Anlamı değil
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
Cl	Klor
OKT	Organik katyon transporter
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ERK	Ekstraselüler regulated kinase
JNK/SAPK	Jun N-terminal kinase/stres-activated protein kinaz
TNF- α	Tümör necrosis factor- α
AGE	İleri glikolizasyon ürünleri
F2-ISOP	F2 izoprostoglandin alfa
Ox-LDL	Okside LDL kolesterol
Ox-DNA	Okside DNA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sisplatin onkoloji pratiğinde solid organ kanserlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan antineoplastik bir ajandır (1). En önemli doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir (2). Sisplatine bağlı akut böbrek yetmezliği sıklığı ilk doz kullanımından sonra %25-42 arasında gelişmektedir (3). Sıklıkla non-oligürik akut böbrek yetmezliğine neden olsa da kalıcı böbrek hasarı da gelişebilmektedir. Bu nedenle sisplatin kullanılacak hastalarda nefrotoksisiteyi azaltacak ilaç ve/veya yöntemler oldukça önemlidir.

Sisplatin nefrotoksisitesinin gelişiminde çeşitli patofizyolojik mekanizmalar söz konusudur. Fakat özellikle oksidatif hasarın rolü oldukça belirgindir. Çeşitli anti-oksidanların sisplatin nefrotoksisitesinde koruyucu olduğu bildirilmiştir (4-6). Ayrıca sisplatin uygulaması sonucu böbrek dokusunda anti-oksidan olarak bilinen enzimlerden katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPX) düzeylerinde azalma gözlenirken, lipit peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) düzeyinin arttığı bildirilmiştir (5,6). Histolojik olarak yapılan değerlendirmelerde ise tübüllerde belirgin hasar oluşturduğu rapor edilmiştir (7,8).

Kefir hayvanlarda anti-tümör, immun-stimulan etkileri ve lipit peroksidasyonunu azaltan anti-oksidan aktivitesi olduğu bilinen bir maddedir (9,10). Bununla birlikte çoğu laktik asit bakterlerinin oksijen radikallerini ortamda hidrolize eden güçlü anti-oksidan sistemlerinin olduğu bildirilmiştir. Bu sistemlerin en önemlisi ise SOD'dur (11,12). Kefirin bildirilen anti-oksidan aktivitesine rağmen sisplatin nefrotoksisitesi üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, anti-oksidan özelliği olduğu bilinmesine rağmen sisplatin nefrotoksisitesi üzerindeki etkisi bilinmeyen kefirin, sıçanlarda oluşturulan sisplatin nefrotoksisitesi üzerindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır. Kefirin etkinliğini değerlendirmek için böbrek dokusundaki anti-oksidan enzimlerin aktiviteleri ve histopatolojik olarak tübüler hasarın şiddetinin kullanılması planlanmıştır. Böylece kefirin sisplatin nefrotoksisitesindeki etkinliği değerlendirilecek ve kefirin bir tedavi şekli olup olmayacağı hakkında soru işaretleri aydınlanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sisplatin

Sisplatin (cis-dichlorodiammineplatinum II) platin kompleksi içeren, geniş spektrumlu ve döneme özgü olmayan platin türevi organik bir kemoterapötik ajandır (Şekil 1). Santraldeki platin atomunun *cis* pozisyonunda klor ve amonyum molekülü bulunmaktadır (1,2). Testis, over, mesane, baş ve boyun kanserleri gibi çeşitli solid kanser tedavilerinde kullanılmaktadır (13). Sadece *cis* izomeri sitotoksiktir (14). Gastrointestinal sistemden emilmediği için sadece intravenöz olarak kullanılabilir. Plazma proteinlerine yaklaşık %90 oranında bağlanabilmektedir ve kullanımından 4 ay sonra bile böbrek dokusunda platine rastlandığı bildirilmiştir (15).

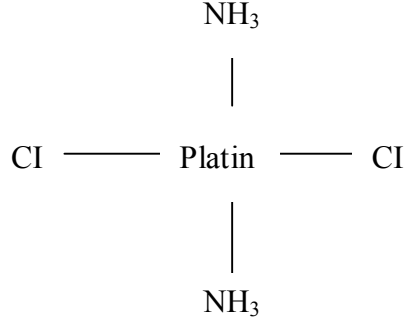
Sisplatin pürinlerin N7 pozisyonu ile kolayca reaksiyona girer. Terapötik etkisini de DNA çift zincirler arasında ve zincir içinde çapraz bağlar yaparak gösterir. Sisplatin-DNA etkileşimi ile d(GpG)Pt, d(ApG)Pt ve d(GpNpG)pt zincir içi bağlantılar oluşur (16). Bu etki hücrel toksisite için oldukça önemlidir. Sisplatinin gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem ve periferik sinir sistemi üzerine yan etkileri vardır. Fakat doz sınırlayıcı başlıca yan etkileri ototoksisite ve nefrotoksisitedir (2).

Nefrotoksisite, sisplatin tedavisinin en sık ve doz sınırlayıcı yan etkisidir (17). Sisplatin böbrekteki başlıca toksisitesini, özellikle dış medullada bulunan ve proksimal tübülüslerin düz kesiminin (pars recta) son kısmını oluşturan S₃ segmentinde göstermektedir (18). Oluşan tübüler hasar; histolojik olarak hücre nekrozu, mikrovili kaybı, lizozomlarda sayı ve şekil değişiklikleri ve mitokondrial vakuolizasyonun şiddeti ile ilişkilidir (19).

Sisplatinin onkoloji pratiğinde yaygın kullanımı sonucunda sisplatin nefrotoksisitesi ve buna bağlı akut böbrek yetmezlikli olgu sayısı artmaktadır. İlk kür sisplatin kullanımı sonrası görülen akut böbrek yetmezliği insidansı yaklaşık %25'tir ve sıklık tekrarlayan dozlarda artmaktadır. Etkilenen hastalarda sıklıkla non-oligürik akut böbrek yetmezliği gelişir. Ayrıca izosteinüri, hipomagnezemi ve hipokalsemi görülebilir (2,3).

Böbrek yetmezlikli hastalarda kullanılacak sisplatin tedavisine yaklaşım ise net değildir. Sisplatin kullanılacak hastalarda serum kreatinin düzeyinin 2mg/dl'den az olması veya glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 60ml/dak.'dan yüksek olması istenmektedir (20). Buna karşın, böbrek yetmezlikli hastalarda (GFR 46-60ml/dak olanlarda %25, GFR 31-45ml/dak olanlarda %50 doz azaltımı ile) doz azaltılarak sisplatin kullanımını öneren çalışma

(21) olduğu gibi, ileri derecede böbrek yetmezliği olanlarda da sisplatinin kullanıldığı çalışma vardır (22).



Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı. Cl; klor, NH₃; amonyum

2.1.1. Sisplatin Nefrotoksitesisi

Böbrek; kanlanmasının fazla olması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre edebilmesi ve tübüler epitelin spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle nefrotoksik hasarlanmaya oldukça duyarlıdır. Sisplatin ise oldukça güçlü bir tübüler toksindir ve özellikle düşük klor içerikli ortamlarda toksitesisi daha belirgindir. Düşük klor içerikli ortamda sisplatinin *cis* pozisyonundaki klor molekülleri su ile yer değiştirmektedir. Böylece hücre içine geçiş kolay olmaktadır (23).

Sisplatin nefrotoksitesinde oluşan tübüler hücresel hasar uzun yıllar araştırmalara konu olmuştur. Hücresel toksitede inflamasyon, oksidatif hasar ve apoptoz sorumlu tutulmuştur (24-26). Sorumlu mekanizmaların anlaşılması klinisyenlerin sisplatin nefrotoksitesinden korunmada yapılabilecekler konusunda yardımcı olacaktır.

2.1.2. Patogenez

2.1.2.1. Sisplatinin hücreye alınması

Sisplatinin hücreye alınması başlıca aktif transport aracılığıyla olmaktadır. Bununla birlikte pasif difüzyonun da katkısı vardır (27). Sisplatinin atılımı başlıca glomerüler filtrasyon ile olur. Az bir kısmı ise sekresyon ile atılırken, tübüler reabsorpsiyonu yoktur. Sisplatin böbrekten atıldığı için böbrekte diğer organlardan daha fazla birikmektedir. Hatta

proksimal tübül hücre konsantrasyonu serum konsantrasyonunun beş katına ulaşabilmektedir (28). Böbrek dokusunda biriken bu aşırı sisplatin nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Sisplatin proksimal tübülün S₃ segmentinde en fazla oranda birikmektedir. Bunu sırasıyla distal toplayıcı tübül ve proksimal tübülün S₁ segmenti izlemektedir (29).

Sisplatinin hücre içine transportunda başlıca sorumlu mekanizmalar organlara göre değişiklik gösterebilmektedir. Organik katyon transporter-2 (OKT-2) sisplatinin hücre içine geçişinde önemli bir organik transport mekanizmasıdır. Bu transport mekanizması elektriksel, voltaj bağımlı, çift yönlü, pH ve sodyumdan bağımsız bir mekanizmadır (30). OKT'nin 3 tipi vardır. OKT-1 karaciğerde, OKT-2 böbrekte ve OKT-3 plasentada bulunur. OKT-1 sisplatin transportu yapmaz ve bu durum sisplatinin organa spesifik toksisitesini izah edebilir. Diğer sisplatin analogları karboplatin ve oksaliplatin OKT-2 ile taşınmaz ve bu da bu ajanların daha az nefrotoksik olmasını izah edebilir (30). OKT-2 için sisplatinin kompetitif antagonisti olan simetidinin sisplatine bağlı proksimal tübül hücre apoptozunu azalttığı da gösterilmiştir (31)

2.1.2.2. Sisplatin metabolizması

Sisplatin hücrede en fazla sitozolde, mitokondride, nükleusta ve mikrozomlarda bulunur. (27). Hücresel hasar için sisplatinin proksimal tübül hücresinde nefrotoksik bir moleküle dönüşmesi gerekmektedir (32). Sisplatin glutatyona konjuge edilir ve daha sonra γ -glutamil transpeptidaz ile metabolize olur. Daha sonra ise *sistein S-konjugat β -lyase* bağımlı yolak ile potent bir nefrotoksin olan reaktif tiyole çevrilir. Her iki enzimin inhibisyonu sisplatinin hücreye geçişini etkilemez iken nefrotoksisiteyi azaltır (32).

Sisplatin ayrıca hidrolitik reaksiyonlar sonucunda monohidrat kompleksleri oluşturur. Oluşan monohidrat kompleksleri hücreye sisplatinden daha toksik etki yapar ancak toksisite böbreğe spesifik değildir. Düşük intraselüler klor konsantrasyonu bu formların oluşumunu kolaylaştırır. Sisplatin nefrotoksisitesinde de kullanılan hipertonic tuz solusyonları monohidrat komplekslerin oluşumunu azaltarak toksisiteyi azaltıyor olabilir (33).

2.1.2.3. Böbrek tübül hücresinde sisplatin sonrası oluşan biyokimyasal değişiklikler

Sisplatin nefrotoksisitesinde diğer bir yolda intraselüler “*mitogen-activated protein kinase*” (MAPK) sinyal yoludur. Bu yolak hücre proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve sağkalım süresini belirler. Başlıca 3 MAPK yolağı vardır ve bu yolaklar 1; “*ekstraselüler*

regulated kinase” (ERK), 2; p38 ve 3; “*Jun N-terminal kinase/stres-activated protein kinaz*” (JNK/SAPK) enzimlerinde sonlanır. Sisplatinin böbrekte her üç yolağı da aktive ettiği *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (34). P38 ve JNK/SAPK yollarını inflamasyon, hiperosmolalite, oksidatif stres, hidroksil radikalleri ve sitokinler aktive edebilir. ERK (35) ve p38 (36) “*tumor necrosis factor- α* ” (TNF- α)’yı aktive eder. ERK ise kaspase 3’ü aktive ederek tübüler apoptozu tetikler.

2.1.2.4. Oksidatif hasar

Oksidatif stres sisplatin nefrotoksisite patogeneğinde önemli bir mekanizmadır. Reaktif oksijen ürünleri hücre komponentleri olan lipidler, proteinler ve DNA üzerine toksik etkilidir ve yapısal değişikliklere neden olmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri ksantin-ksantin oksidaz, mitokondri ve NADPH oksidaz ile oluşmaktadır. Sisplatin her üç yolla reaktif oksijen ürünleri oluşumuna neden olmaktadır (37). Bununla birlikte sisplatin glukoz-6 fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz aktivitesini artırarak serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Ayrıca anti-oksidan üretimini azaltmaktadır (38).

Sisplatin uygulaması böbrek tübül hücresinde intraselüler kalsiyum miktarını artırmaktadır. Bu ise mitokondri hasarına neden olarak reaktif oksijen radikal üretimini tetiklemekte ve NADPH oksidaz sistemini aktive etmektedir (36). Sisplatin sonrası böbrekte superoksit anyonu (O_2^-) (39), hidrojen peroksit (H_2O_2) (40) ve hidroksil radikalleri (OH^-) (41) artmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller ise hücre membranının lipidlerini peroksidasyon ile, proteinlerin ise yapısını bozarak hücre hasara neden olmaktadır. Ayrıca serbest radikaller mitokondri disfonksiyonuna neden olmaktadır (38).

Sisplatinin hücre anti-oksidan aktiviteyi azalttığı gösterilmiştir ve böbrek dokusunda SOD, GPX ve katalaz enzimlerinde azalmaya neden olmaktadır (42,43). Bununla birlikte anti-oksidan olarak bilinen melatonin (44), vitamin C (40) ve vitamin E’nin (45) akut sisplatin nefrotoksisitesinde olumlu etkileri bildirilmiştir.

2.1.2.5. Hipoksi ve mitokondrial hasar

Hipoksi sisplatin nefrotoksisitesinde önemli bir mekanizmadır. Zira nefrotoksisitenin başlangıcında gelişen böbrek kan akımındaki azalma hipoksiye neden olmaktadır. Hipoksi ise “*hipoksi inducible factor-1*”(HIF-1)’in aktivasyonuna neden olmaktadır. HIF-1 ise böbrek tübül hücresinde apoptoz mekanizmalarını tetiklemektedir (46).

2.1.2.6. Apoptoz

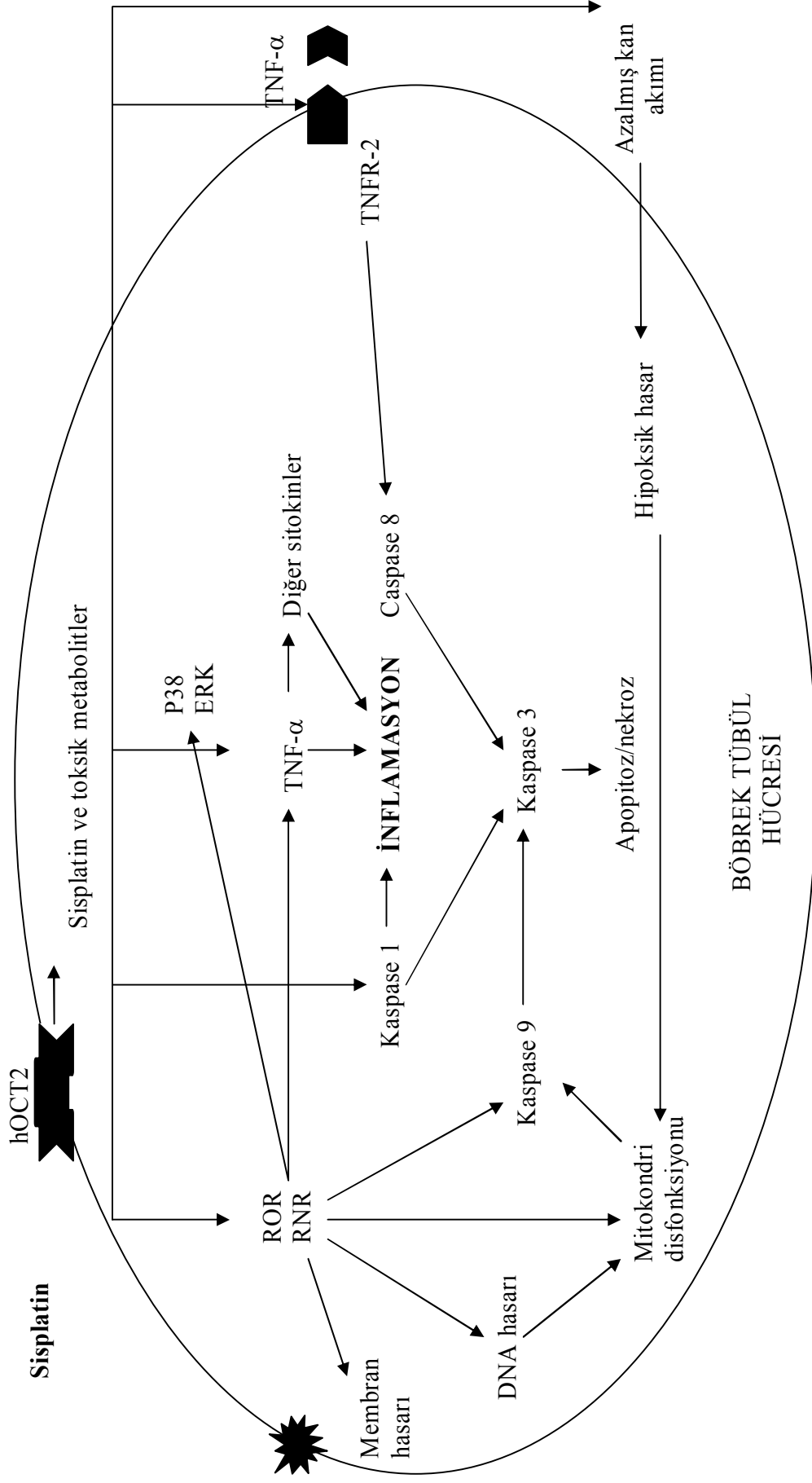
Apoptoz normal şartlarda ve patolojik durumlarda görülen hücre ölüm şeklidir. Kaspase 1, 8 ve 9, kaspase 3 aktivasyonuna neden olarak böbrek tübül hücre apoptozunu tetiklemektedir. Bu süreç iki yol ile gerçekleşmektedir. Birincisi hücresel ekstraselüler yüzey reseptör yolunun aktivasyonu, ikincisi ise intraselüler mitokondriyal yoldur. Birinci yolda TNF- α ile reseptör aktivasyonu olmakta ve kaspase 8 üzerinden apoptoz uyarılmaktadır (41). İkinci yolda ise DNA hasarı ve oksidatif stres mitokondriyal yolu tetiklemekte ve kaspase 9 üzerinden apoptoz uyarılmaktadır (47) (Şekil 2).

2.1.2.7. Sitokinler

Sitokinlerin de sisplatin nefrotoksisitesinde rolü olduğu bilinmektedir. Sitokinlerden özellikle TNF- α 'nın rolü gösterilmiştir. Sıçan modelinde oluşturulan sisplatin nefrotoksisitesinde TNF- α blokörü olan pentoksifilin kullanımının böbrek disfonksiyonunda ve histolojik değerlendirmede yapısal hasarda azalma sağladığı gösterilmiştir (48). Ayrıca TNF- α “*knock-out*” farelerin sisplatin toksisitesine dirençli olduğu bildirilmiştir (49).

Tüm bunlara rağmen sisplatin nefrotoksisite mekanizmaları tümüyle aydınlatılabilmemiş değildir ve halen araştırmacıların ilgisini çeken güncel bir konudur. Şekil 2’de başlıca toksisite mekanizmaları şematize edilmiştir (4).

Sisplatin sonrası oluşan böbrek hasarının histopatolojik değerlendirilmesinde Ecelbarger ve ark. tanımladığı semikantitatif bir metot kullanılmaktadır (8). Bu metotta sıfırdan dörde kadar değişen şiddette tübül epitel hücresindeki şişme, vakuolar dejenerasyon, nekroz ve deskuamasyonun değerlendirildiği bir skala vardır (Tablo 1).



Şekil 2. Sisplatinin neden olduğu böbrek tübül hasarı. ERK; extraselüler regulated kinaz, hOCT2; human organik katyon transporter-2, RNS; reaktif nitrojen ürünleri, ROS; reaktif oksijen ürünleri, TNF- α ; tumor necrosis faktor alpha, TNFR-2; tumor necrosis faktor reseptör-2.

Tablo 1. Sisplatin nefrotoksitesinin değerlendirilmesinde esas alınan değerlendirme

Evre 0	Normal
Evre 1	Tübüler epitel hücrelerinde; şişme, vakualizasyon ve nekroz Kortikal tübüllerin % 25'inden azında deskuamasyon
Evre 2	Tübüler epitel hücrelerinde; şişme, vakualizasyon ve nekroz Kortikal tübüllerin % 25-50'sinde deskuamasyon
Evre 3	Tübüler epitel hücrelerinde; şişme, vakualizasyon ve nekroz Kortikal tübüllerin % 50-75'inde deskuamasyon
Evre 4	Tübüler epitel hücrelerinde; şişme, vakualizasyon ve nekroz Kortikal tübüllerin % 75'inden fazlasında deskuamasyon

2.2. Probiyotikler

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında mikrobiyologlar sağlıklı bireylerin gastrointestinal sistem florasında hastalıklı bireylerden farklı bir mikroflora tanımlamışlardır. Gastrointestinal sistemde bulunan bu yararlı mikroflora probiyotik olarak adlandırılmıştır. Probiyotik kelime anlamı olarak “*for life*” “yaşam için” manasına gelmektedir (50).

İlk olarak 1908 yılında Nobel ödülünü de kazanan Elie Metchnikoff Bulgar köylülerinin uzun yaşamasının nedeninin bu insanların fazla miktarda fermente süt ürünlerini tüketmeleri ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (51). Özellikle son iki dekatta probiyotikler oldukça popüler olmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda probiyotik kullanımının insan sağlığına olumlu etkileri olduğu, beslenme ve tedavi amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir (52-54). Daha sonra ise çeşitli mikroorganizma içeren probiyotikler hastalıklardan korunma veya kür sağlama amacıyla kullanılmıştır.

1974 yılında Mann ve Spoering yaptıkları çalışmada (55) *Lactobacillus sp.* ile fermente edilmiş yoğurt tüketen kişilerin serum kolesterol düzeyinin daha düşük olduğunu göstermesi, probiyotiklerin etkilerini araştıran çalışmaların önünü açmıştır. Bu çalışma ile probiyotiklerin insan sağlığı üzerine yararlı etkileri olduğunun bildirilmesinden sonra özellikle son iki dekatta probiyotikler üzerine klinik çalışmalar yapılmıştır. 1994 yılında ise Dünya Sağlık Örgütü probiyotiklerin bağışıklık sistemine yaptığı olumlu etkiyi resmen bildirmiştir (56). Probiyotik kullanımı ile gözlenen bu olumlu etkilerin içerdikleri laktik asit bakterilerine bağlı olduğu bildirilmiştir (54,57). Halen günümüzde probiyotik preparatları toz, tablet, kapsül, granül ve pelet şeklinde kullanılabilir.

Tablo 2’de probiyotik hazırlamada kullanılan başlıca laktik asit bakterileri gösterilmiştir (58).

Tablo 2. Probiyotik hazırlamada sıklıkla kullanılan bakteri türleri

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. Faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp.</i>	<i>B. animals</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

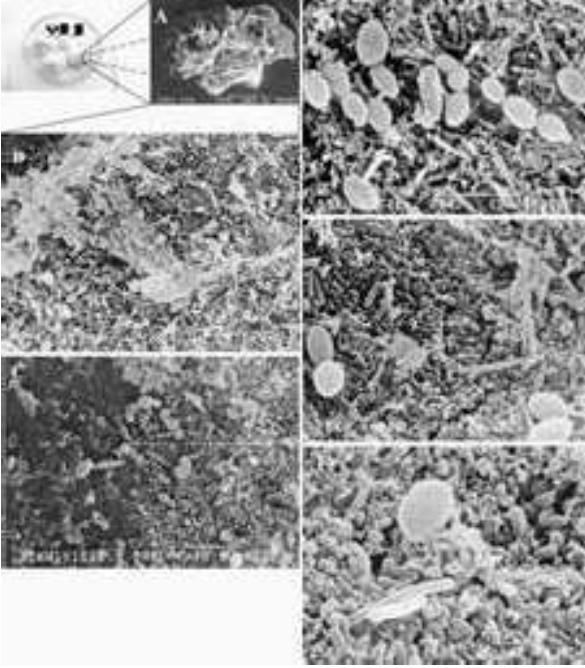
2.2.1. Bir probiyotik olarak kefir

Kefir; kefir taneleri, kefir kültürü ya da kefir starter kültürü kullanılarak sütün fermente edilmesi ile elde edilen hafif asitli, alkollü ve köpüklü bir fermente süt içeceğidir. Mayalanan süttten kefir tanelerinin süzülerek uzaklaştırılması ile elde edilen kısım ifade eder. Orijini Kafkasya'dır ve yaklaşık 2000 yıllık bir geçmişi vardır. Kefir diğer geleneksel süt ürünleri olan yoğurt ve fermente süttten farklıdır. Zira üretimi için kefir tanelerinin süte eklenmesi ile oluşan fermentasyon sonucu kefir oluşmaktadır. Kefirde alkol ve laktik asit fermentasyonu birlikte gerçekleşmektedir. Kefirde bulunan maya ve laktik asit bakterilerinin metabolik aktiviteleri sonucu süt asidi, etil alkol ve karbondioksit oluşur (59,60).

Kefir taneleri karnıbahar çiçeğinin minyatür şekline benzeyen küçük, düzensiz şekilli, sarımsı beyaz renkte, kıvrımlı ve pürüzlü yüzeyle, elastik ve yarı sert yapıya sahiptir (Şekil 3 ve 4). Kefir tanesi ağ benzeri lifsi uzantılar ve levhamsı yapıların sıkı birleşiminden ibarettir. Tanenin merkezinde mayaları ve bakterileri birlikte bulunduran ağın mayalar tarafından üretildiği, tanenin merkezden uzak bölgelerinin lifsi yapısının daha basit olduğu ve mikroorganizmaların taneden süte geçişini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (61,62).



Şekil 3. Kefir taneleri (62'den alınmıştır).



Şekil 4. Kefir tanesinin çoklu mikroflorası (62'den alınmıştır).

Kefir taneleri kompleks bir mikrofloraya sahiptir. Kefir mikroflorasında, tanenin aslına bağlı olarak laktozu fermente eden ve etmeyen mayalar ile homofermentatif ve heterofermentatif laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri bulunur. Bu flora, laktozun mikrobiyal metabolizması sonucu oluşan glukoz ve galaktoz zincirlerini içeren kefiran adındaki polisakkarit yapı (kefir tanesi) içerisinde simbiyotik yaşam sürer. Kefir tanesinde laktik asit bakterileri laktobasiller, laktokoklar, leukonostoklar, asetik asit bakterileri ve mayalar simbiyotik olarak yaşam sürer. Bu flora ek olarak kefirin vizkositesini ve kıvamını

artıran *Acetobacter aceti* ve *Acetobacter rasanens*'in önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (63,64). Orijinine bağlı olmak üzere kefir tanesindeki yerleşik mikroorganizmaların sayısı, cinsi ve türü değişebilir.

Kefirde bulunan mikroorganizmaların temel fonksiyonu laktik asit, antibiyotik ve antibakterisit üretimidir. Daha önce yapılan çalışmalarda kefirin hayvanlarda antibakteriyel, immunolojik ve anti-tümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir (60,65,66). Kefirin kendisi ve kefirde elde edilen sifingomyelin'in *in vivo* ve *in vitro* immun stimulan etkisi rapor edilmiştir (67,68).

Kefirin çeşitli biyolojik aktiviteleri rapor edilmiştir. Kefir mikroflorasındaki mayalar ve asetik asit bakterileri barsak mikroorganizmalarına karşı antibiyotik aktivitesine sahiptir. Ayrıca kefirin çok tüketildiği bölgelerde tüberküloz ve sindirim bozukluğu gibi hastalıkların daha az görüldüğü bildirilmiştir. Bunlarla birlikte kefirin hayvanlarda antitümör, immunstimulan etkileri ve lipit peroksidasyonunu azaltan anti-oksidan aktivitesi, antidiyabetik, antibakteriyel ve antifungal etkilerinin olduğu bildirilmiştir (69).

Çoğu laktik asit bakterilerinin oksijen radikallerini metabolize eden sistemleri vardır. Stecchini 2003 (70) ve arkadaşları bu anti-oksidan sistemin en önemlisinin SOD ve yüksek magnezyum +2 içeriği olduğunu bildirmiştir. Knauf ve ark. 1992 (71) bazı laktobasili türlerinin yüksek oranda heme bağımlı katalaz sentezlediği ve serbest peroksi radikallerinin oluşumunu önlediğini göstermiştir.

2.3. Oksidatif hasar belirteçleri ve antioksidan enzimler

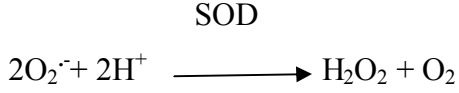
Oksidatif stres vücuttaki oksidan ürün oluşumu ile anti-oksidan sistem aktiviteleri arasındaki dengenin kaybı olarak tanımlanır. Ateroskleroz, kanser ve yaşlanma gibi birçok olay ile ilişkilidir (73-76). Çeşitli durumlar oksidatif stresi artırabilmektedir. Bunlardan bir tanesi de sispalin kullanımınıdır.

Aşırı oksidan üretimi ve/veya anti-oksidan sistem aktivitesinde azalma serbest radikallerde artışa neden olmaktadır. Oluşan serbest radikaller ise hücre yapıtaşları ile kolaylıkla tepkimeye girebilmektedir. Hücre membranında bulunan fosfolipidler, glikolipidler, doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller ile kolaylıkla tepkimeye girebilmektedir. Ayrıca DNA, lipidler, karbonhidratlar ve proteinler de serbest radikallerin hedefidir (77-79).

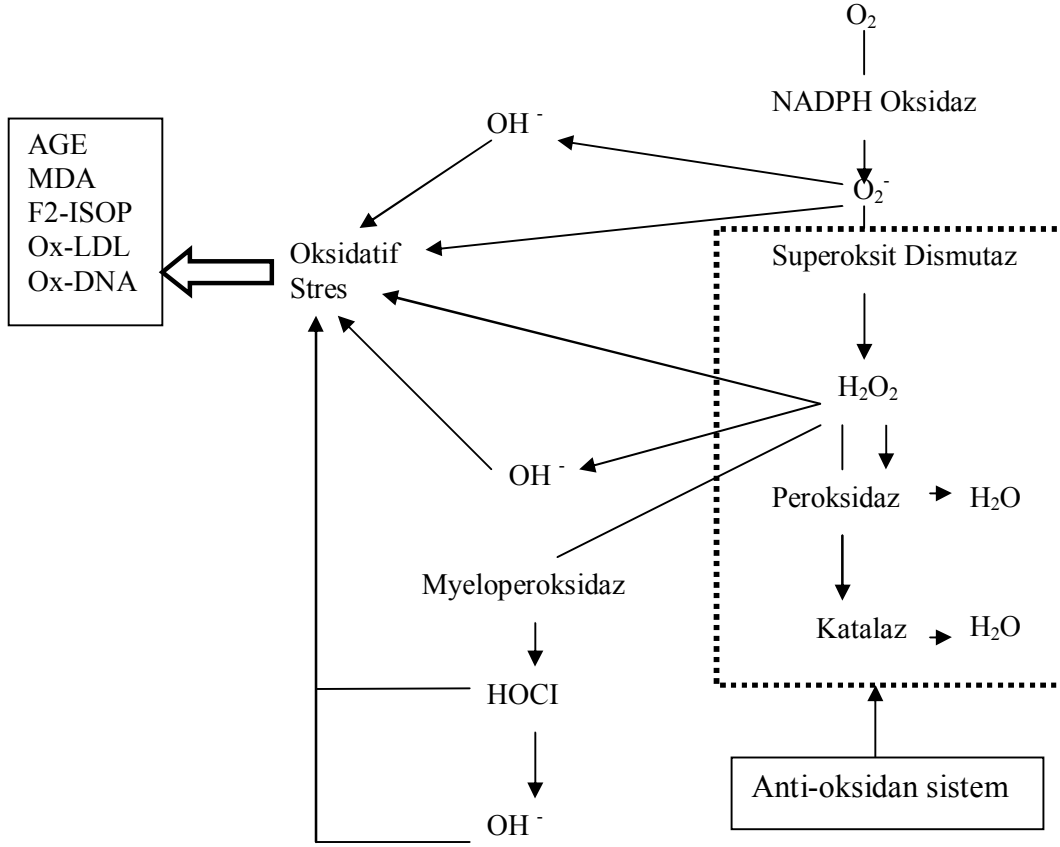
Oksidatif stresin değerlendirilmesinde çeşitli parametreler kullanılmaktadır. Bunların başlıcaları oksidatif stresle artan lipit peroksidasyon son ürünleridir. Bunlardan sıklıkla

kullanılanı ise MDA (73) ve F2-ISOP'dur (80). Non enzimatik anti-oksidan olarak ise sıklıkla kullanılanlar albumin, alfa-tocopherol (vitamin E), beta carotene (vitamin A), ascorbik asit (vitamin C), ve glutatyon'dur. Enzimatik anti-oksidan sistemde kullanılanlar ise SOD, GPX, katalaz ve nitroz oksittir.

Glutatyon peroksidaz selenyum metali içeren metalloenzim grubundan bir anti-oksidan enzimdir. Redükte glutatyonu okside glutatyonu çevirirken hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya indirger (81). Katalaz ise glikoprotein yapısında anti-oksidan enzimdir. Dokulardaki anti-oksidan aktivitesi farklılık göstermekle birlikte en yüksek aktivite böbrek dokusundadır. Katalaz aktivitesi özellikle ortamda H_2O_2 çok arttığı durumlarda artmaktadır. Düşük H_2O_2 olan ortamda ise H_2O_2 başlıca glutatyon peroksidaz tarafından kullanılır (82). Süperoksit dismutaz ise $O_2^{\cdot-}$ 'in, H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen enzimdir. Katalizlediği tepkime aşağıda verilmiştir:



Spontan olarak bu tepkime oluşabilmektedir. Radikallere karşı hücreyi koruyan savunma mekanizmaları arasında SOD enzimi başlıca görevi üstlenir. SOD enzimi ile katalizlenen tepkime sonucu oluşan ürünlerin birikmesi katalaz enzimi tarafından bertaraf edilmektedir (77). Şekil 5'te oksidatif ürünler ile anti-oksidan sistemler arası denge şematize edilmiştir (83).



Şekil 5. Anti-oksidan enzimler ve oksidatif hasar göstergeleri. AGE; ileri glikolizasyon ürünleri, MDA; malondialdehit, F2-ISOP; F2 izoprostoglandin alfa, Ox-LDL; okside LDL kolesterol, Ox-DNA; okside DNA, OH^- ; hidroksil radikali, O_2^- ; süperoksid radikali ve H_2O_2 ; hidrojen peroksit.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan laboratuvarı, Biyokimya Anabilim Dalı ve Patoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TU-1304 proje numarası ile desteklenmiştir. Çalışma, deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak etik kurul kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Projede ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen toplam 36 adet erkek Wistar-albino cinsi sıçan kullanıldı. Deneyde kullanılan sıçanlar, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarından temin edildi. Çalışma süresince sıçanlar, standart ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C)'da yeteri kadar su ve yem (yem kurumu standart sıçan yemi) ile toplam 1 hafta süreyle beslendiler. Çalışmanın başında ve sonunda ağırlıkları kaydedildi.

Sıçanlar rastgele örnekleme metoduyla iki adet sekizli ve iki adet onlu gruba ayrıldı. Grup I kontrol grubu (n=8), Grup II kefir kontrol grubu (n=8), Grup III sisplatin grubu (n=10) ve Grup IV sisplatin + kefir grubu (n=10), olmak üzere toplam dört grup oluşturuldu. Sıçanlar çalışma süresince özel olarak hazırlanmış kafeslerde dörderli gruplar halinde tutuldular.

3.1.2. Kefirin hazırlanması

Kefir için 2 litre süt Isparta süt ürünleri fabrikasından temin edildi ve cam kavanoza kondu. Aynı gün süt ısı 25 C⁰ olacak şekilde ısıtıldı ve içine hazır starter kefir kültüründen (kefir DC1 seri; 05223B 10001, Danisca Biolacta Sp. Poland) % 3 oranında eklenerek kavanozun ağzı kapatıldı. Daha sonra otoklavda 37 C⁰'de 24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra ürün filtreden süzülerek plastik kaba kondu ve + 4 C⁰'de çalışma süresince kullanılmak üzere saklandı. Kefir çalışma süresince kullanımdan önce her defasında homojenize edildi.

3.2. Metod

3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneyin Yapılması

Çalışmada dört grup kullanılmıştır.

1. Grup (*Kontrol, n=8*): 7 gün 2x1.5 cc orogastrik serum fizyolojik (SF) aldı. 2. gün intraperitoneal (i.p.) 1 cc %0.9 NaCl enjekte edildi. İntraperitoneal enjeksiyondan 5 gün sonra sıçanlar öldürülerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.
2. Grup (*Kefir Kontrol, n=8*): 7 gün 2x1.5 cc orogastrik kefir aldı. 2. gün i.p. 1 cc %0.9 NaCl enjekte edildi. İntraperitoneal enjeksiyondan 5 gün sonra sıçanlar öldürülerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.
3. Grup (*Sisplatin grubu, n=10*): 7 gün 2x1.5 cc orogastrik SF aldı. 2. gün i.p. sisplatin 7 mg/kg (0.5 mg/ml Cisplatinum Ebewe) enjekte edildi. İntraperitoneal sisplatin enjeksiyondan 5 gün sonra sıçanlar öldürülerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.
4. Grup (*Sisplatin+kefir grubu, n=10*): 7 gün 2x1.5 cc orogastrik kefir aldı. 2. gün i.p. sisplatin 7 mg/kg (0.5 mg/ml Cisplatinum Ebewe) enjekte edildi. İntraperitoneal sisplatin enjeksiyondan 5 gün sonra sıçanlar öldürülerek kan ve böbrek dokusu örnekleri alındı.

3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Biyokimyasal ölçümler için kullanılan kimyasal maddeler; Folin & Ciocalteus's Phenol Reagent (2N), kloroform, n-Butanol, etanol Merck firmasının; glutathione redüktaz, glutathione-reduced form (GSH C₁₀H₁₇N₃O₆S), glycine (amino asetic acid; glycocoll) (C₂H₅N₂O₂), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form NADPH; C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂), nitroblue tetrazolium (NBT C₄₀H₃₀C₁₂N₁₀O₆), Xanthine (C₅H₄N₄O₂), Xanthine Oxidase, Sigma firmasının üretimidir.

3.2.3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Deneyde kullanılan cihazlar tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. Deneyde kullanılan cihazlar

1	Soğutmalı santrifüj	Eppendorf MR 5415 (Almanya)
2	Derin dondurucu	Facis (Fransa)
3	Hassas terazi	Scaltec (İsviçre)
4	Vortex (karıştırıcı)	Nüve NM 100 (Türkiye)
5	Otomatik pipetler	Gilson (Fransa) \ Eppendorf (Almanya)
6	UV spektrofotometre	Shimadzu UV 1601 (Japonya)
7	Homojenizatör	Ultra Turrax T25 (Almanya)
8	Abbott Aeroset cihazı	IL, (Amerika Birleşik Devletleri)

3.2.4. Doku ve kan örneklerinin alınması

Sakrifikasyon yapılan günün sabahı sıçanlar i.p. ketamin (Alfamin, Alfasan IBV) 80 mg/kg + ksilazin (Alfamin, Alfasan IBV) 10 mg/kg ile anesteziye edildi. Daha sonra orta hat insizyonu ile batınları açıldı. Vena porta'dan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000Xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum üre ve kreatinin ölçümleri Abbott Aeroset cihazı ile uygun ticari ELISA kitleri ile çalışıldı.

3.2.5. Böbreklerin çıkarılması

Steril şartlarda sıçanların böbrekleri çıkarıldı. Çıkarılan böbrekler serum fizyolojik ile yıkandı. Daha sonra böbrekler otolizden korunmak için vertikal olarak ikiye ayrıldı. Sol böbrek histopatolojik incelemeler, sağ böbrek biyokimyasal analizler için kullanıldı. Sol böbrek yeteri kadar %10'luk formol eklenmiş eppendorf tüplerine konarak mikroskopik değerlendirme yapılmaya kadar muhafaza edildi. Sağ böbrek ise önceden hazırlanmış içi 50 mM fosfat tamponu dolu eppendorf tüplerine konuldu ve analizin yapıldığı tarihe kadar -80 C⁰'de muhafaza edildi.

3.2.6. Örneklerin Homojenizasyonu ve Deney için hazırlanması

3.2.7. Homojenizasyonda Kullanılan Reaktifler

Böbrek dokusunun homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH: 7,5, 0,2 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı (84).

3.2.8. Homojenizasyonda Yapılan İşlemler ve Numunelerin Hazırlanması

Böbrek dokusunun yaş ağırlıkları tartıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe kondu. Dokuların üzerine 2 ml Trifosfat-HCl tamponu eklendi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 2,5 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek miktarları kaydedildi. Dokular tekrar homojenize edilerek süre 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatın ısı arttırılmadan ependorf tüplerine kondu. Tüpler numaralandırıldı. Dokuların yaş ağırlıkları ve eklenen tampon miktarı kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan MDA seviyesi ve homojenat protein tayini yapıldı.

Homojenatlar, 5000 devir/dakika hızında 30 dakika süreyle +4 °C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant sağlandı. Ayrılan süpernatantlardan GPX, katalaz enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı. Süpernatant 1/1 (v/v) oranında kloroform/etanol (3/5, v/v) ile vortekslenip cam tüpte 3200 devir/dakika hızında 40 dakika süreyle +4 °C’ de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından protein ve SOD enzimi aktivite tayini yapıldı.

3.2.9. Dokularda Biyokimyasal Analizler

Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle MDA seviyeleri ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz enzim aktiviteleri ve nitroz oksit düzeyi ölçüldü. MDA düzeyini tayin için Draper ve Hadley çift ısıtma yöntemi kullanıldı (85). Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre (86), katalaz enzim aktivitesi Aebi metoduna göre (87), GPX enzim aktivitesi Paglia metoduna göre çalışıldı (88). Nitroz oksit ise Cortas’ın 1990’da tanımladığı gibi çalışıldı (89).

3.2.10. Histopatolojik Analiz Yöntemleri

Böbrek: Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan böbrek örnekleri %10’luk formolde fikse edildi. Doku takip işleminden sonra parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, hematoxilen eozin (HE) ile boyandı. Daha sonra tübüler hasarın şiddeti evrelendirildi.

Değerlendirme Safirstein (7) ve Ecelbarger'in (8) tanımladığı yöntem referans alınarak yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizi bilgisayar ortamında SPSS 11.0 istatistik programında yapıldı. Analizde; ölçüm verileri aritmetik ortalama \pm standart sapma, gruplar arası farklılaşmanın öneminin tespiti için Tek Yönlü ANOVA testi kullanıldı. Grupların karşılaştırılması *Post Hoc* testlerden LSD (Least significant difference) ile yapıldı. $P < 0.05$ istatistiki olarak anlamlı kabul edildi. Serum kreatinin düzeyi ve anti-oksidan enzimler arasındaki korelasyon ilişkisi *Pearson* korelasyon testi ile yapıldı. Histolojik evreleme ile anti-oksidan enzimler arasındaki korelasyon ilişkisi ise *Spearman* korelasyon testi ile yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ratların ağırlıkları ve grupların biyokimyasal parametreleri

Çalışmada kullanılan sıçanlardan çalışma protokolü süresince kayıp olmamıştır. Çalışma başlangıcına kıyasla çalışma sonunda sıçanların ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik olmamıştır (Tablo 4). Serum BUN ve kreatinin değerleri tablo 5’te gösterilmiştir. Tablo 6’da ise biyokimyasal parametrelerin sonuçları gösterilmiştir. Tablo 7’de ise grupların histolojik dereceleri gösterilmiştir.

Tablo 4. Grupların ağırlıkları

	Başlangıç ağırlık (g)	Son ağırlık (g)	P
Grup I	240±30	245±29	AD
Grup II	238±23	240±25	AD
Grup III	241±22	238±25	AD
Grup IV	241±18	242±15	AD

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. AD; Anlamlı değil

Tablo 5. Grupların BUN ve kreatinin değerleri.

Gruplar	BUN (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)
Grup I	19.25±1.48	0.51±0.06
Grup II	19.50±2.32	0.48±0.03
Grup III	53.70±29.54	1.28±0.49
Grup IV	78.10±43.02	2.08±1.46
	P değeri	
1-2	AD	0.50
1-3	0.02	0.006
1-4	0.006	0.004
2-3	0.02	0.002
2-4	0.006	0.02
3-4	AD	AD

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. AD; Anlamlı değil

Tablo 6. Grupların böbrek dokusundaki enzim ve MDA düzeyleri

Gruplar	Katalaz (k/g protein)	SOD (U/g protein)	GPX (U/g protein)	MDA (nmol/g protein)	NO (umol/g)
Grup I	153.2±168.9	424.5±163.6	112.7±9.7	5.1±1.1	20.9±12.8
Grup II	21.0±10.2	293.8±86.7	103.1±13.0	4.4±1.1	9.7±5.1
Grup III	17.4±10.1	287.1±112.0	101.3±9.7	4.4±1.5	12.1±3.5
Grup IV	37.5±72.3	251.6±40.0	98.9±12.7	3.55±0.62	14.6±4.7
P değeri					
1-2	0.015	0.065	AD	AD	0.050
1-3	0.004	AD	0.021	AD	0.034
1-4	0.021	0.034	0.021	0.009	AD
2-3	AD	AD	AD	AD	AD
2-4	AD	AD	AD	AD	AD
3-4	AD	AD	AD	AD	AD

Veriler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. AD Anlamlı değil

Tablo 7. Grupların histoljik değerlendirmesi *

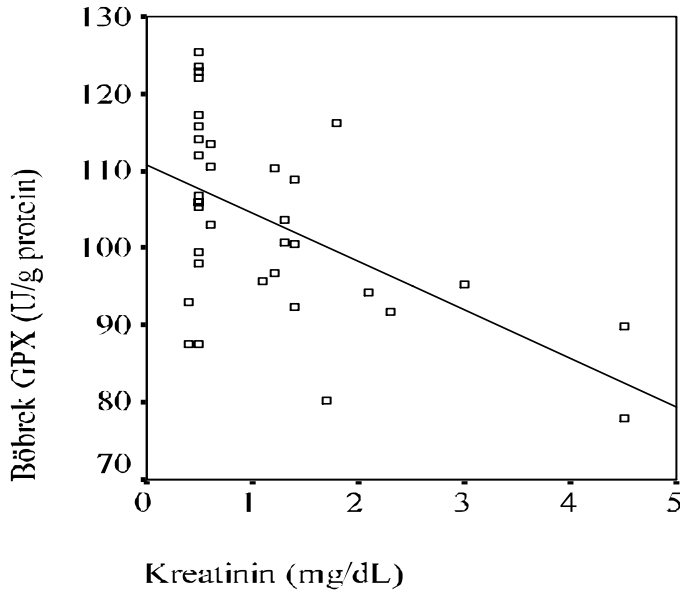
	Evre 0	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
Grup I	8	-	-	-	-
Grup II	7	1	-	-	-
Grup III	-	1	3	5	1
Grup IV	-	1	4	4	1

* Grup 3 ve 4 arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (P>0.05)

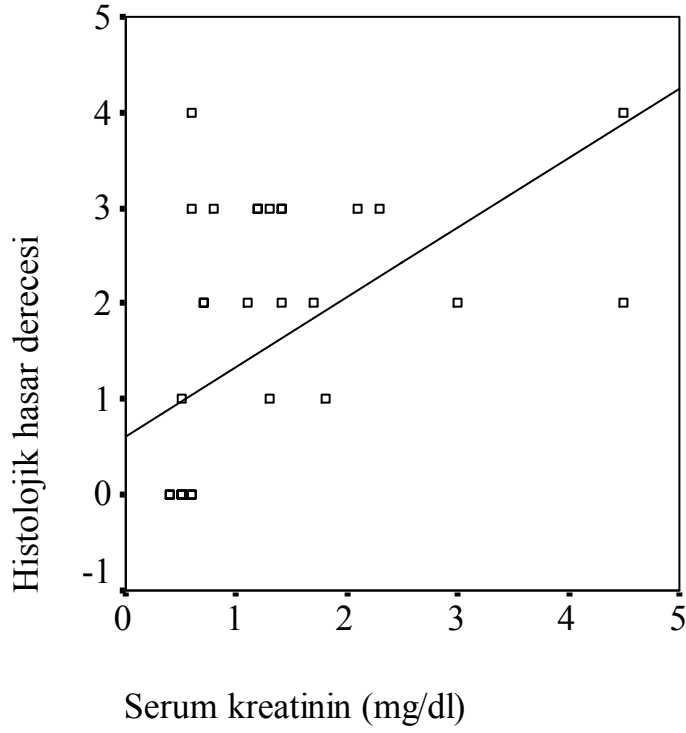
4.2. Korelasyonlar

Serum kreatinin düzeyi ile doku GPX düzeyi arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edildi ($r = -0.53$, $P=0.001$) (Şekil 6). Ayrıca böbrek dokusundaki histolojik evreleme ile serum kreatinin düzeyi arasında pozitif ($r=0.53$, $P=0.001$) korelasyon mevcut idi (Şekil 7).

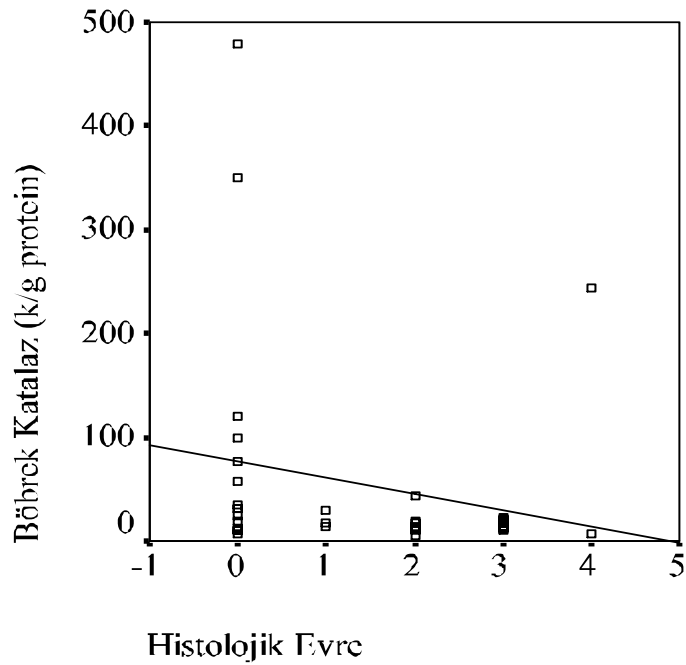
Doku düzeyinde tespit edilen tüm anti-oksidan enzimler ile histolojik evreleme arasında negatif korelasyon mevcut idi [sırasıyla (katalaz $r = -0.32$, $P=0.05$) (Şekil 8), (SOD $r = -0.31$ $P=0.03$) (Şekil 9) ve GPX ($r = -0.36$ $P=0.02$) (Şekil 10).



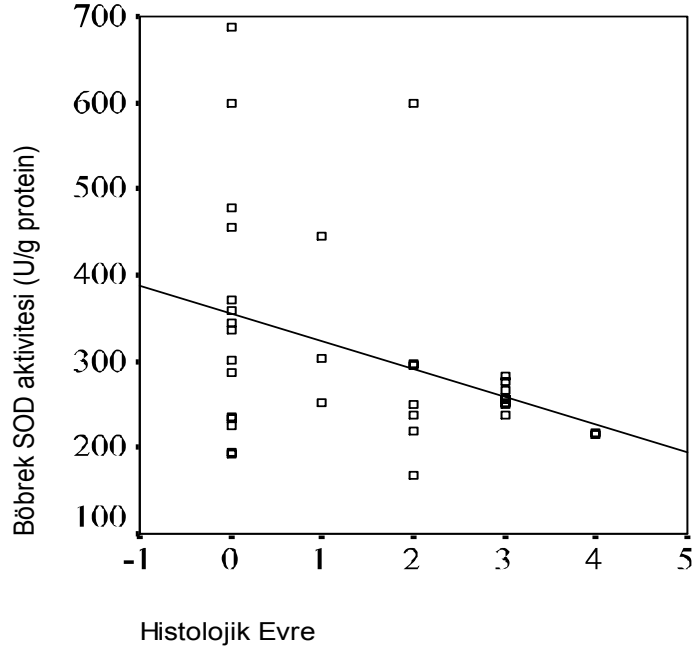
Şekil 6. Serum kreatinin düzeyi ile böbrek dokusundaki GPX arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r = -0.53$, $P=0.001$). Pearson korelasyon testi ile bakılmıştır.



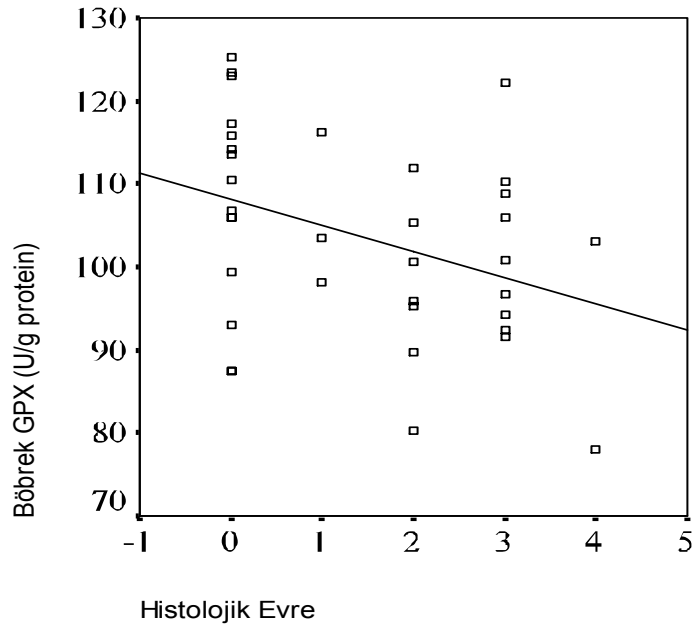
Şekil 7. Böbrek histolojik hasar derecesi ile serum kreatinin düzeyi arasında pozitif ($r=0.53$, $P=0.001$) korelasyon mevcut idi. Spearman korelasyon testi ile bakılmıştır.



Şekil 8. Histolojik evre ile böbrek dokusundaki katalaz arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r= - 0.32$, $P=0.05$). Spearman korelasyon testi ile bakılmıştır.



Şekil 9. Histolojik evre ile böbrek dokusundaki SOD aktivitesi arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r = -0.31$ $P=0.03$). Spearman korelasyon testi ile bakılmıştır.



Şekil 10. Histolojik evre ile böbrek dokusundaki GPX aktivitesi arasında negatif korelasyon tespit edildi ($r = -0.36$ $P=0.02$). Spearman korelasyon testi ile bakılmıştır.

5. TARTIŞMA

“Sıçanlarda oluşturulan sisplatin nefrotoksitesinde kefirin etkinliğinin değerlendirilmesi” isimli bu çalışmamızda, i.p. sisplatin uygulamasının sıçanlarda serum BUN ve kreatinin düzeylerini yükselttiğini tespit ettik. Sisplatin sonrası anti-oksidan enzimlerden olan katalaz ve GPX aktivitelerinin ve NO miktarının böbrek dokusunda azaldığı görüldü. Bununla birlikte sisplatinin sıçanların böbreklerinde belirgin tübüler hasara neden olduğunu bulduk. Oluşan tübüler hasarın şiddeti ile böbrek dokusundaki katalaz, SOD ve GPX enzimlerinin aktiviteleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu. Bununla birlikte anti-oksidan özelliği bilinen kefir uygulamasının sisplatin nefrotoksitesinden koruyucu bir etkisinin olmadığı tespit edildi.

Deneyisel sisplatin nefrotoksitesini oluşturmak için bu çalışmada 1999 yılında Zhang ve ark. (90) tanımladığı standart yöntem kullanılmıştır. Sisplatin nefrotoksitesini için standart bir protokol olmasına rağmen, sıçanlarda kefir kullanımına ait standart bir protokol bilinmemektedir. Bu çalışmada kullanılan sisplatin dozu ile sisplatin nefrotoksitesinin olduğu biyokimyasal ve histopatolojik olarak gösterilmiştir. Bununla birlikte kefir eklenmesinin biyokimyasal parametreler ve histopatolojik değişikliklerde anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir.

Kefirin anti-oksidan aktivitesi daha önce Lin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (91). Bu çalışmada; *in vitro* olarak intestinal hücre kültüründe *Bifidobacterium longum* ve *Lactobasillus acidophilus*'un anti-oksidan aktiviteleri tiyobarbitürik asit metoduyla değerlendirilmiştir. Sonuçta her iki bakterinin de lipit peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Gözlenen bu etkinin kefir tanelerinin direkt etkisine bağlı olduğu bildirilmiştir. Çenesiz ve ark. (92) ise yaptıkları diğer bir çalışmada, altı hafta süre ile kefir kullanımının sıçanlarda “azoksimetan” ile uyarılan doku hasarından koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir. Bu etkinin göstergesi olarak ise karaciğer, dalak ve kolon dokusunda kefir kullanımı sonucunda kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde belirgin artış olmaması ile göstermişlerdir. Oluşan bu olumlu etki kefirin kendisinin direkt etkisi ile oluşmuştur. Ancak oragastrik verilen kefirin karaciğer ve dalakta gösterdiği sistemik etkinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada ise kefirin belirgin anti-oksidan etkinin görülmemesinin çeşitli nedenleri olabilir. İlk olarak; kefirin kullanım süresi kısa olabilir. İkinci olarak; uygulanan kefir miktarı az olabilir. Üçüncü olarak; ise kefir tanesinin içeriğindeki laktobasillerin anti-oksidan etkinliği daha önce gösterilen bakteri türlerini içerip

İçermediği bilinmemektedir. Ancak yine de bu çalışma kefirin deneysel nefrotoksisitedeki etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Sisplatin kullanılan kanser hastalarının yaklaşık üçte birinde gözlenen en önemli yan etki akut böbrek yetmezliği gelişmesidir. Uygulanan hidrasyon tedavisi her zaman nefrotoksisite gelişimini önleyememektedir ve tedavinin kesilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle sisplatinin nefrotoksisitesini azaltmaya ve/veya ortadan kaldırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Özellikle son on yılda yapılan çalışmalar oksidatif stresin sisplatin nefrotoksisitesinde önemli bir rolünün olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle çeşitli anti-oksidanların sisplatin nefrotoksisitesindeki koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Vitamin E (45), kafeik asit fenetil ester (CAPE) (6) ve erdostein (5) gibi anti-oksidan özelliği olan maddelerin sisplatin nefrotoksisitesindeki olumlu etkilerinin gösterilmesi diğer anti-oksidanların da etkinliğinin araştırılacağı çalışmaların önünü açmıştır.

Serbest oksijen radikalleri aracılığıyla gelişen peroksidasyon, sisplatine bağlı toksisitede sorumlu bir mekanizma olarak bildirilmiştir. Serbest oksijen radikalleri ortama salındığında lipit peroksidasyonuna neden olarak hücre zarının akışkanlığında ve geçirgenliğinde değişikliklere neden olmaktadır (93). Bunun bir göstergesi olarak ise lipit peroksidasyon ürünleri artmaktadır. Bu amaçla doku MDA düzeyi sıklıkla kullanılmıştır. Sisplatin sonrası doku MDA düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar olduğu gibi (85,94-96) anlamlı bir artışın olmadığını bildiren çalışma da mevcuttur (6). Bu çalışmamızda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sisplatin uygulanan grupta anlamlı bir artışın olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç Özen S (6) ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonucuyla benzerdir. Beklenen MDA artışının olmamasının birkaç nedeni olabilir. İlk olarak ortamdaki MDA'nın mitokondrial hasar sonucu ortaya çıkan aldehit dehidrogenaz tarafından hızla metabolize edilmesi olabilir. İkinci olarak ise sisplatinin aldehit dehidrogenaz ekspresyonunda artışa neden olması olabilir. Zira, Townsend ve arkadaşları (97) üç tip mitokondrial aldehit dehidrogenaz tanımlamışlar ve tip III'ün ekspresyon artışının aldehit aracılı lipit peroksidasyonundan koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Kefir ve sisplatinin beraber kullanıldığı grupta böbrek dokusundaki MDA düzeyi diğer üç gruptan da düşük bulunmuştur. Özellikle kontrol grubuna göre istatistiksel bir azalma söz konusudur. Bu olası çelişki birkaç mekanizma ile izah edilebilir. Birincisi; kefir kontrol grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı olmasa da MDA'nın düşük olması, kefirin lipit peroksidasyonunu azalttığını düşündürülebilir. Ancak kefir kontrol grubu ve sisplatin kontrol grubu arasında MDA yönünden benzerlik, kefir kontrol grubunda kefirin etkisine ve sisplatin

kontrol grubunda mitokondrial hasar sonucu ortaya çıkan aldehit dehidrogenaz enzimine bağılı olabilir. Bu nedenle kefir + sisplatin grubunda; kefir ve sisplatinin neden olduğu aldehit dehidrogenaz enzim salınımının aditif etkisi ile bu grupta en düşük MDA düzeyi elde edilmiş olabilir.

Deneysel çalışmalarda sisplatin kullanımı sonrası serum kreatinin düzeyinde üçüncü günden itibaren artış olduğu tespit edilmiştir. Maksimum kreatinin artışının ise beşinci günde gerçekleştiği bildirilmiştir (5,98). Çalışmamızda da beşinci gün sakrifiye edilen sıçanlardan sisplatin uygulanan gruplarda belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Ancak kefir ve sisplatinin beraber kullanıldığı grupta sadece sisplatin uygulanan grup ile karşılaştırıldığında serum BUN ve kreatinin düzeylerini istatistiki bir fark olmamasına rağmen daha yüksek olduğunu tespit ettik. Kullanılan kefirin proteinden zengin olması, kefir alan grupta serum BUN değerinin daha yüksek tespit edilmesini açıklayabilir. Bunun ile ilişkili olarak yüksek BUN değerleri, üremik semptomlara neden olarak prerenal azoteminin gelişimini de tetiklemiş olabilir.

Oksidatif stres oksidan ürünler ile anti-oksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan ürünlerin artışı ve/veya anti oksidan sistemlerin azalması yönünde bozulmasıdır. Oksidatif hasar sisplatin nefrotoksitesinde önemli bir mekanizmadır ve anti-oksidanlar ile yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Serbest oksijen radikalleri hücredeki ksantin-ksantin oksidaz, mitokondri ve NADPH oksidaz sistemi tarafından üretilmektedir (4). Sisplatin sonrası her üç yolla da serbest oksijen radikali oluşmaktadır (37). Oluşan radikaller hücrenin yapı taşları protein, lipid ve DNA ile etkileşerek yapısal hasara neden olmaktadır. Bunlardan başka, sisplatin heksokinaz aktivitesini artırarak ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimini uyararak serbest radikal oluşumunu artırırken anti-oksidan üretimini de azaltmaktadır (38). Sisplatin sonrası böbrek dokusunda O_2^- anyonu (39), H_2O_2 (40) ve OH^- arttığı bildirilmiştir (41). Bunun bir yansıması olarak anti-oksidan enzimlerin azaldığı rapor edilmiştir. Bu enzimlerden sıklıkla bildirilenler SOD, GPX ve katalazdır (43,44). Bu çalışmamızda da sisplatin sonrası kontrol grubuna göre GPX ve katalaz enzim düzeylerinde anlamlı şekilde azalma tespit ettik. Bu bulgumuz daha önce bildirilen çalışmalar ile uyumlu idi. Ancak SOD seviyesinde anlamlı bir azalma tespit edemedik. Bunun bir nedeni hidrojen peroksit'in katalaz ve GPX için ortak substrat olmasına bağılı olabilir.

Sisplatin uygulaması sonrası görülen anti-oksidan enzimlerdeki azalma nefrotoksitenin sebebinden çok sonucu gibi görünmektedir. Bununla birlikte sisplatinin SOD gen “*downregulasyonu*”na da neden olduğu bildirilmiştir (4). Bu çalışmada serum kreatinin düzeyi ile glutasyon peroksidaz aktivitesi arasında anlamlı bir negatif korelasyon

tespit edildi. Daha önceki çalışmalarda böyle bir ilişki bildirilmediğinden, bu ilişki ilk kez bu çalışmada tespit edilmiştir. Glutasyon peroksidaz enzimi katalaz enzimi ile aynı substratı kullanmasına rağmen katalaz enziminden farklı olarak selenyum içeren bir enzimdir (99). Bu enzimin sisplatin nefrotoksitesinde azaldığı daha önce bildirilmiştir. Katalaz enziminden farklı olarak sadece GPX enzimi ile serum kreatinin düzeyi arasında negatif bir ilişki olmasının nedeni bilinmemektedir. Ancak glomeruler filtrasyon hızında azalma selenyum metabolizmasını etkileyerek direkt olmasa da indirekt yolla (ör; GPX enziminde selenyum kullanımını azaltarak) GPX enzim aktivitesini azaltıyor olabilir. Zira Naziroğlu ve ark. yaptıkları bir çalışmada (99) selenyum verilmesinin GPX enzim aktivitesini artırdığını ve selenyum verilmesinin sisplatin nefrotoksitesinde koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir (99).

Sisplatin nefrotoksitesi başlıca tübülointerstisyel lezyonlara neden olmaktadır. Hayvan modellerinde sisplatin proksimal tübüllerde ve özellikle dış medulladaki S₃ segmentinde hasara neden olmaktadır. Ancak glomerüler hasar olmamaktadır (100). İnsandaki sisplatin toksitesinde gözlenen histolojik değerlendirmelerle ilgili çalışmalar sınırlıdır (101,102). Sisplatin başlıca proksimal tübülü etkilese de, distal tübülde de hasara neden olmaktadır (103). Oluşan nekrozun şiddeti doz bağımlıdır (25). Biz de bu çalışmada sisplatin sonrası benzer histopatolojik değişiklikler geliştiğini tespit ettik. Ayrıca oluşan histopatolojik değişiklikler ile anti-oksidan enzimler olan SOD, GPX ve katalaz arasında anlamlı bir negatif korelasyon tespit ettik. Bu durum iki şekilde izah edilebilmektedir. İlk olarak sisplatin kullanımını sonrası artan serbest oksijen radikallerinin mitokondrial hasar yolu ile (38) ve/veya direkt olarak anti-oksidan enzim inhibisyonuna neden olması ile izah edilebilir (42,43). İkinci olarak ise oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin tetiklediği apoptoz mekanizmasında anti-oksidan enzimlerin tüketiminin bir sonucu olarak enzim aktivitesi düşmüş olabilir. Bu sonuç ise sisplatin nefrotoksitesinde gözlenen hücresel nekroz ve/veya apoptozda, oksidatif stresin önemli rolünün olduğunu göstermektedir.

Hücre ölümü, hücrede gelişen yapısal değişikliklere göre apoptoz ve nekroz olarak sınıflandırılmaktadır (104). Sisplatin nefrotoksitesinde böbrek tübül hücrelerinde nekroz geliştiği gösterilmiştir (105). Apoptozun da *in vivo* ve *in vitro* olarak sisplatin toksitesinde hücre ölümünde önemli bir mekanizma olduğu gösterilmiştir (106-108). Sisplatin düşük dozda (50µmol/L) uygulandığında böbrek tübül hücresinde nekroza neden olurken, yüksek dozda (2mmol/L) apoptozu neden olduğu bildirilmiştir (109).

Apoptoz sisplatin toksitesinde önemli bir mekanizmadır. Apoptozda etkin moleküller Kaspase'lardır. Kaspase 1, 8 ve 9, kaspase 3 aktivasyonuna neden olarak böbrek

tübül hücrelerinde apoptozu tetiklemektedir (110). Sisplatin kendisi direkt olarak kaspase 1 aktivasyonuna neden olarak apoptoza neden olabilmektedir (47). Yapılan deneysel çalışmada kaspase 1 “*knockout*” sıçanlarda sisplatinin neden olduğu apoptozun daha az olduğu gösterilmiştir (111). Sisplatinin neden olduğu oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri de mitokondrial hasar ve kaspase 9 üzerinden apoptozu tetiklemektedir (4). Baek ve ark. tavşanlarda yaptıkları çalışmada superoksit temizleyicisi olan “*tiron*” kullanımının tübül epitelyum hücrelerinin nekroz ve apoptozdan koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (109). Bu çalışmada histolojik evre ile her üç anti-oksidan enzim arasında tespit edilen güçlü negatif korelasyon oksidatif hasarın nekroz ve apoptozda ne kadar etkili olduğunu göstermektedir. Baek ve ark. da yaptıkları çalışmada katalazın hücre nekrozundan koruyucu etkisi olduğunu bildirmiştir (109). Kefir eklenmesi ile anti-oksidan enzimlerde anlamlı bir değişiklik olmadığının tespit edilmesi, kefirin sisplatin aracılı tübül hücre hasarına olumlu bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Özetle sisplatin kullanımının artması beraberinde sisplatin nefrotoksisitesine bağlı akut böbrek yetmezliği olan hasta sayısının giderek artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle nefrotoksisiteyi azaltacak ve/veya tümüyle kaldıracak tedavi yaklaşımları önümüzdeki yıllarda da güncel araştırma konusu olacaktır.

6. SONUÇ

Bu çalışmada i.p. olarak sisplatin uygulamasının sıçanlarda serum BUN ve kreatinin düzeylerini yükselttiği gösterilmiştir. Uygulanan sisplatinin böbrek dokusundaki anti-oksidan enzimlerden katalaz ve GPX aktivitelerinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Ayrıca böbrek dokusunda NO miktarının da azaldığı tespit edilmiştir. Sisplatinin uygulanmasından sonra sıçanların böbreklerinde belirgin tübüler hasar meydana geldiği tespit edilmiştir. Oluşan tübüler hasarın şiddeti ile böbrek dokusundaki katalaz, SOD ve GPX enzimlerinin aktiviteleri arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir Bununla birlikte anti-oksidan özelliği bilinen kefir uygulamasının sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu bir etkisinin olmadığı ortaya konmuştur.

7. ÖZET

SIÇANLARDA OLUŞTURULAN SİSPLATİN NEFROTOKSİTESİNDE KEFİRİN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan sisplatin nefrotoksisitesinde kefirin etkinliği araştırıldı. Çalışmaya toplam 36 Wistar-albino sıçan alınarak iki adet sekizli ve iki adet onlu toplam dört grup oluşturuldu. Kontrol grubu günde iki kez 1.5cc serum fizyolojik aldı, Kefir kontrol grubu günde 2 kez 1.5cc kefir aldı, Sisplatin grubu i.p. 7 mg/kg (0.5 mg/ml Cisplatinum Ebewe) ve günde iki kez 1.5cc serum fizyolojik aldı, Sisplatin+kefir grubuna ise i.p. 7 mg/kg (0.5 mg/ml Cisplatinum Ebewe) ve günde 2 kez 1.5cc kefir aldı. Serum fizyolojik ve kefir uygulamaları toplam yedi gün yapıldı. Sisplatin enjeksiyonundan 5 gün sonra tüm sıçanların yaşamına son verilerek kan örnekleri ve böbrekleri alındı. Sağ böbrek biyokimyasal işlemler için, sol böbrek ise histopatolojik inceleme için kullanıldı. Biyokimyasal analiz olarak serumda BUN ve kreatinin, böbrek dokusunda ise anti-oksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GPX) enzim aktiviteleri ve nitroz oksit miktarı ölçüldü. Ayrıca böbrek dokusundaki malondialdehit seviyeleri ölçüldü. Histopatolojik değerlendirme için tübüler hasarın şiddeti değerlendirildi.

İ.p. sisplatin uygulamasının sıçanlarda serum BUN ve kreatinin düzeylerini yükselttiğini tespit ettik. Sisplatin sonrası anti-oksidan enzimlerden olan katalaz ve GPX aktivitelerinin ve NO miktarının böbrek dokusunda azaldığı görüldü. Bununla birlikte sisplatinin sıçanların böbreklerinde belirgin tübüler hasara neden olduğunu bulduk. Oluşan tübüler hasarın şiddeti ile böbrek dokusundaki katalaz, SOD ve GPX enzimlerinin aktiviteleri arasında anlamlı negatif korelasyon bulundu.

Bununla birlikte anti-oksidan özelliği bilinen kefir uygulamasının sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu bir etkisinin olmadığı tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Kefir, oksidatif stres, sisplatin nefrotoksisitesi.

8. SUMMARY

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF KEFIR ON CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

In this study, the effect of kefir on cisplatin-induced nephrotoxicity was assessed. A total of thirty-six rats were included to the study and randomly divided into four groups (two groups with eight rats, two groups with ten rats). Control group received 1.5cc serum physiologic 2x1/day; Kefir-control group received 1.5cc kefir 2x1/day; Cisplatin group received i.p. 7mg/kg (0.5mg/ml Cisplatinum Ebewe) and 1.5cc serum physiologic 2x1/day; Cisplatin+kefir group received i.p. 7mg/kg (0.5mg/ml Cisplatinum Ebewe) and 1.5cc kefir 2x1/day. Serum physiologic and kefir administrations were performed for seven days. All animals were sacrificed five days after i.p. injection and blood samples with kidneys were taken for analysis. Right kidney was used for biochemical analysis and left kidney was used for histological examination. Biochemical analysis was as follows; serum bun and creatinine levels, kidney tissue anti-oxidant enzyme activities superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase (GPX) with nitrous oxide level. Moreover, kidney tissue malonyldialdehyde (MDA) level was measured. Renal tubular injury was assessed for histological examination.

We found that i.p. cisplatin administration increased serum bun and creatinine levels. Both catalase and GPX enzymes activities and nitrous oxide level decreased in renal tissue. Furthermore, we found that cisplatin administration caused tubular injury in rats. There was a negative correlation between the severity of tubular injury and catalase, GPX and SOD enzyme activities.

According to our findings, there was no beneficial effect of kefir administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats.

Key words: Cisplatin-induced nephrotoxicity, kefir, oxidative stress

9. KAYNAKLAR

1. Lebowitz D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer*. 1998;34:1522-34.
2. Safirstein R, Winston J, Goldstein M, Moel D, Dikman S, Guttenplan J. Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis*. 1986;8:356-67
3. Van Geelen CM, DE Vries EG, Le TK, Van Weeghel RP, De Jong S. Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer*. 2003;89:363-73.
4. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007;334:115-24.
5. Yildirim Z, Sogut S, Odacı E, Iraz M, Ozyurt H, Kötük M, Akyol O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res*. 2003;47:149-56.
6. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, Odacı E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol*. 2004;24:27-35.
7. Safirstein R, Winston J, Moel D, Dikman S, Guttenplan J. Cisplatin nephrotoxicity: insights into mechanism. *Int J Androl*. 1987;10:325-46.
8. Ecelbarger CA, Sands JM, Doran JJ, Cacini W, Kishore BK. Expression of salt and urea transporters in rat kidney during cisplatin-induced polyuria. *Kidney Int*. 2001;60:2274-82.
9. Micheli L, Uccelletti D, Palleschi C, Crescenzi V. Isolation and characterisation of a roopy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;53:69-74.
10. Kaizu H, Sasaki M, Nakajima H, Suzuki Y. Effect of antioxidative lactic acid bacteria on rats fed a diet deficient in vitamin E. *J Dairy Sci*. 1993;76:2493-9.
11. Korpela R, Moilanen E, Saxelin M, Vapaatalo H. Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) and platelet aggregation in vitro. *Int J Food Microbiol*. 1997;37:83-6.
12. Lin MY, Yen CL. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *J Agric Food Chem*. 1999;47:1460-6.
13. Bodenner DL, Dedon PC, Keng PC, Katz JC, Borch RF. Selective protection against cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced toxicity in kidney, gut, and bone marrow by diethyldithiocarbamate. *Cancer Res*. 1986;46:2751-5.

14. Singh G, Koropatnick J. Differential toxicity of cis and trans isomers of dichlorodiammineplatinum. *J Biochem Toxicol.* 1988;3:223-33.
15. Cooley ME, Davis LE, Destefano M, Abrahm J. Cisplatin: a clinical review. Part I-- Current uses of cisplatin and administration guidelines. *Cancer Nurs.* 1994;17:173-84.
16. O'dwyer PJ, Johnson SW, Hamilton TC. Cisplatin and its analogues. In: Devita V, Helmann S, Rosenberg S eds. *Cancer. Principles and practice of oncology*, 5th ed, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York 1997; pp 418-32.
17. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int.* 1998;53:394-401.
18. Razzaque MS, Koji T, Kumatori A, Taguchi T. Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem Cell Biol.* 1999;111:359-65.
19. Kuhlmann MK, Horsch E, Burkhardt G, Wagner M, Köhler H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. *Arch Toxicol.* 1998;72:536-40.
20. Raj GV, Iasonos, A, Herr, H, Donat, SM. Formulas calculating creatinine clearance are inadequate for determining eligibility for Cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24:3095.
21. Kintzel, PE, Dorr, RT. Anticancer drug renal toxicity and elimination: dosing guidelines for altered renal function. *Cancer Treat Rev* 1995; 21:33.
22. Aronoff, GM, Berns, JS, Brier, ME. *Drug Prescribing in Renal Failure: Dosing Guidelines for Adults*, 4th Edition. American College of Physicians, Palm version 2002.
23. Ozols RF, Corden BJ, Jacob J, Wesley MN, Ostchega Y, Young RC. High-dose cisplatin in hypertonic saline. *Ann Intern Med.* 1984;100:19-24.
24. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334:1448-60.
25. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest.* 2004;114:5-14.
26. Merouani A, Shpall EJ, Jones RB, Archer PG, Schrier RW. Renal function in high dose chemotherapy and autologous hematopoietic cell support treatment for breast cancer. *Kidney Int.* 1996;50:1026-31.

27. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer*. 1993;67:1171-6.
28. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997;12:2478-80.
29. Kröning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;45:43-9.
30. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol*. 2005;167:1477-84.
31. Ludwig T, Riethmüller C, Gekle M, Schwerdt G, Oberleithner H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int*. 2004;66:196-202.
32. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:1-10.
33. Ekborn A, Lindberg A, Laurell G, Wallin I, Eksborg S, Ehrsson H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003;51:36-42
34. Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM, Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;287:543-9
35. Jo SK, Cho WY, Sung SA, Kim HK, Won NH. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int*. 2005;67:458-66.
36. Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:166-74.
37. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci*. 2006;100:65-72.
38. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2004;50:287-90.

39. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:2683-90.
40. Kadıkoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol.* 2004;23:29-34.
41. Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:966-77.
42. Badary OA, Abdel-maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 2005;76:2125-35.
43. Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol.* 2002;25:1-8.
44. Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, Keyer-UYSA M. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol.* 2000;14:553-60.
45. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, Hopman GD, Wipkink-bakker A, Zwinderman AH, Cleton FJ, Osanto S. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer.* 2004;40:1713-23.
46. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M. Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289:1123-33.
47. Dimanche-Boitrel MT, Meurette O, Rebillard A, Lacour S. Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updat.* 2005;8:5-14.
48. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110:835.
49. Zhou H, Kato A, Miyaji T. Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:616.
50. Marteau P. Living drugs for gastrointestinal diseases: the case for probiotics. *Dig Dis.* 2006;24:137-47.

51. Metchnikoff E. The prolongation of life. New York & London. Putnam's Sons.
52. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci.* 1998;81:2336-40.
53. Lee YK, Nomoto K, Salminen S and Gorbach SL. Handbook of probiotics. New York, NY: John Wiley & Sons.
54. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J.* 2004;80:516-26.
55. Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr.* 1974;27:464-9.
56. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol.* 2000;78:80-8.
57. Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:506-12.
58. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol.* 2006;100:1171-85.
59. Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth ER. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. *Syst Appl Microbiol.* 2006;29:59-68.
60. Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C. Immunomodulating capacity of kefir. *J Dairy Res.* 2005;72:195-202.
61. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J Dairy Res.* 2001;68:639-52.
62. Lopitz-otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23:67-74.
63. Liu JR, Chen MJ, Lin CW. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* 2005;53:2467-74.
64. Libudzisz Z and Piatkiewicz A. Kefir production in Poland. *Dairy Ind. Inter.* 1990; 55;31-3
65. Zacconi C, Parisi MG, Sara PG, Dallavalle P, Bottazzi V. Competitive exclusion of salmonella kedougou in kefir fed chicks. *Microbiol Alim Nutr* 1995;12:387-90

66. Furukawa N, Matsuoka A, Takahashi T, Yamanaka Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1990;43:450–3.
67. Furukawa N, Matsuoka A, Takahashi T, Yamanaka Y. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A. *Anim Sci Technol* 1991;62:579–85.
68. Osada K, Nagira K, Teruya K, Tachibana H, Shirahata S, Murakami H. Enhancement of interferon- β production with sphingomyelin from fermented milk. *Biotherapy* 1994;7:115–23.
69. Farnworth ER, Mainville I. 2003. Kefir: A fermented milk product. Handbook of fermented functional foods. 2003; 77-111. ER Farnworth ed. CRC Pres, Boca Raton, FL.
70. Stecchini ML, Del Torre and Munari M. Determination of peroxy radical-scavenging of lactic acid bacteria. *Int J Microbiol.* 2000; 64: 183-88.
71. Knauf HJ, Vogel RF, Hammes WP. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sake* LTH677. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:832-9.
72. Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, Vihalemm T, Annuk H, Kairane C, Kilk A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol.* 2002;72:215-24.
73. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47–95.
74. Durak I, Kacmaz M, Cimen MY. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. *Int. J. Cardiol.* 2001; 77: 293–7.
75. Cerutti PA, Trump BF. Inflammation and oxidative stress in carcinogenesis. *Cancer Cells* 1991; 3: 1–7.
76. Bankson DD, Kestin M, Rifai N. Role of free radicals in cancer and atherosclerosis. *Clin. Lab. Med.* 1993; 13: 463–80.
77. Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, 2002.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; 1: 1396-1397.
79. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.

80. Sezer MT, Akin H, Demir M, Erturk J, Aydin ZD, Savik E, Tunc N. The effect of serum albumin level on iron-induced oxidative stress in chronic renal failure patients. *J Nephrol.* 2007;20:196-203.
81. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003;189: 41-54.
82. Dat J, Vandenamee S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 779-795.
83. Floccari F, Aloisi C, Crascì E, Sofi T, Campo S, Tripodo D, Criseo M, Frisina N, Buemi M. Oxidative stress and uremia. *Med Res Rev.* 2005;25:473-86.
84. Akkuş I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya.1995
85. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990;186: 421-431
86. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
87. Aebi H. Catalase In: Bergmeyer U, ed. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, 1974; 673-677.
88. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158-169.
89. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem.* 1990;36:1440-3.
90. Zhang JG, Viale M, Esposito M, Lindup WE. Tiopronin protects against the nephrotoxicity of cisplatin in the rat. *Hum Exp Toxicol.* 1999;18:713-7.
91. Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci.* 2000; 45:1617-22.
92. Cenesiz S, Devrim AK, Kamber U, Sozmen M. The effect of kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2008; 115: 15-9.

93. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*. 1990;21:1086-90.
94. Saad SY, Arafah MM, Najjar TA. Effects of mycophenolate mofetil on cisplatin-induced renal dysfunction in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007; 59: 455-60
95. ShimedA Y, Hirotani Y, Akimoto Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T, Tanaka K. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28: 1635-8.
96. Sayed-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA, Mostafa N, Calvani M, Osman AM. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Chemotherapy*. 2004; 50:162-70
97. Townsend AJ, Leone-Kabler S, Haynes RL, Wu Y, Szweda L, Bunting KD. Selective protection by stably transfected human ALDH3A1 (but not human ALDH1A1) against toxicity of aliphatic aldehydes in V79 cells. *Chem Biol Interact*. 2001;130:261-73.
98. Francescato HD, Costa RS, Rodrigues Camargo SM, Zanetti MA, Lavrador MA, Bianchi MD. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res*. 2001;43:77-82.
99. Nazıroglu M, Karaoğlu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*. 2004;195:221-30.
100. Meyer KB, Madıas NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab*. 1994;20:201-13.
101. Vickers AE, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Toxicol Pathol*. 2004;32:577-90.
102. Tanaka H, Ishikawa E, Teshima S, Shimizu E. Histopathological study of human cisplatin nephropathy. *Toxicol Pathol*. 1986;14:247-57.
103. Cornelison TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol Oncol*. 1993;50:147-58.
104. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol*. 1992;10:267-93.

105. Dobyas DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;213:551-6
106. Kröning R, Katz D, Lichtenstein AK, Nagami GT. Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *Br J Cancer.* 1999;79:293-9.
107. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 1996;270:700-8.
108. Takeda M, Fukuoka K, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis in mouse proximal tubular cell line. *Contrib Nephrol.* 1996;118:24-8.
109. Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med.* 2003;142:178-86.
110. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation of Caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2001;60:1726-36.
111. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int.* 2004;66:2202-13.