



T.C  
İSTANBUL MEDENİYET  
ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Sisplatin ile Oluşturulan Deneysel Toksikite Modelinde Astaksantin Olası Koruyucu  
ve Antioksidan Rolü**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
SANİYE ADA**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. MUSTAFA BAKİ ÇEKMEN**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMAN  
DOÇ. DR. MERAL YÜKSEL**

**EYLÜL -2018**

**Proje No:1061 (Bu tez İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi birimi tarafından desteklenmiştir.)**

## I. BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt ederim.

Öğrencinin adı soyadı:

Saniye ADA



Danışmanlığını yaptığım bu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı taahhüt ederim.

Danışmanın adı soyadı:

Prof.Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN



## II. İMZA SAYFASI

Saniye ADA tarafından hazırlanan "Sisplatin ile Oluşturulan Deneysel Toksikite Modelinde Astaksantin Olası Koruyucu ve Antioksidan Rolü" başlıklı bu Yüksek Lisans tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

### JÜRİ ÜYELERİ

#### **Tez Danışmanı:**

Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç.Dr. Meral YÜKSEL

Kurumu: Marmara Üniversitesi

(İkinci Tez Danışmanı)

#### **Üyeler:**

Doç.Dr. Ferruh K. İŞMAN

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Fatma Ceyla ERALDEMİR

Kurumu: Kocaeli Üniversitesi

Dr.Öğr. Üyesi Hayriye ERMAN

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

İMZA

**Tez Savunma Tarihi:** 07/ 09/ 2018

### III. TEŞEKKÜR

Çalışmanın ortaya konuluş safhasında anlayışıyla ve hoşgörüsüyle daima bana destek olan Hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN'e teşekkürü borç bilirim.

Tez konusunun belirlenmesi, olgunlaşması ve deney aşamaları sırasında yardımlarını esirgemeyen bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ikinci tez danışman Hocam Sayın Doç.Dr. Meral YÜKSEL'e çok teşekkür ederim.

Tezimin histopatolojik verilerin elde edilmesinde bana yardımcı olan Sayın Hocam Prof.Dr. Canan HÜRDAĞ'a teşekkür ederim.

Hayvan deneylerimde ve diğer laboratuvar çalışmalarında yanımda olan, bana her zaman bilgi ve tecrübesinin yanı sıra pozitif enerjisi ile neşe veren sürekli akıl aldığım Hocam Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZBEYLI'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Fakültede çok yoğun olduğum zamanlarda bana destek olan asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni hep destekleyen, dualarını esirgemeyen fedakâr annem Nadiye KOÇ'a, ondan çaldığım zaman ve ilgi için kızım Elen Güneş ADA'ya ve eşim Serdar ADA'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Saniye ADA

## IV. ÖZET

### SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSSEL TOKSİSİTE MODELİNDE ASTAKSANTİNİN OLASI KORUYUCU VE ANTIOKSİDAN ROLÜ

ADA Saniye,

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

İkinci Tez Danışmanı: Doç.Dr. Meral YÜKSEL

Eylül 2018, 87 sayfa

Sisplatin (Sis), solid tümörlerin tedavisinde kullanılan, birçok yan etkiye sahip güçlü kemoterapötik ilaçlardan biridir. Bu çalışmada sıçanlarda sisplatin kaynaklı toksisitenin önlenmesinde astaksantin (Ast) olası koruyucu ve antioksidan etkisini araştırmayı amaçladık.

Sprague-Dawley sıçanları rastgele 4 gruba ayrıldı (n=32). Sis, üç gün süreyle ardışık (8 mg /kg/ gün *ip.*) olarak verildi. Ast, 10 gün süreyle (Sis+Ast grubu) 100 mg/kg/gün oral olarak verildi. Kontrol grubu ve Ast grubu aynı dozda sırasıyla zeytinyağı ve Ast aldı. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra malondialdehit (MDA), glutasyon (GSH), myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, kemiluminesans (CL) seviyeleri gibi oksidatif stres parametreleri ile histopatolojik analizlerin belirlenmesi için karaciğer, kalp ve böbrek dokuları alındı. Kan örnekleri biyokimyasal değerlendirme için toplandı.

MDA düzeyleri, kontrol grubuna göre Sis grubunda karaciğer ve kalp dokularında anlamlı olarak daha yüksekti, fakat böbrek MDA seviyeleri anlamlı değildi. Diğer taraftan, böbrek dokularındaki GSH seviyeleri, Sis grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p<0.001$ ), inflamasyonu gösteren MPO aktivitesi, Sis uygulanan sıçanların tüm dokularında önemli ölçüde artmıştır. Ast tedavisi, MPO aktivitesini azaltarak Sis'in etkisini tersine çevirdi. Karaciğer, kalp ve böbrek dokularında CL seviyeleri, Sis grubunda anlamlı olarak daha yüksekti. Ast tedavisi, karaciğer ve böbrek dokularında CL seviyelerini azaltarak Sis'in etkilerini azalttı. Histolojik ve serum biyokimyasal bulgular doku oksidatif stres parametreleri ile uyumlu bulundu.

Bulgularımız, Sis uygulamasının karaciğer, kalp ve böbrek dokularında hasara neden olduğunu gösterdi. İnflamasyon, Ast tedavisi ile azaltılabilecek ana mekanizma olarak görüldü. Oksidatif stres parametrelerinin sonuçları, Sis uygulamasının böbrek dokusunda GSH seviyelerini arttırdığını ve "Sisplatin direncine" yol açtığını gösterdi.

**Anahtar Sözcükler:** Sisplatin; Astaksantin; Toksikite; Oksidatif Stres; Antioksidan

## V. ABSTRACT

### THE POTENTIAL PROTECTIVE AND ANTIOXIDANT ROLE OF ASTAXANTHIN AGAINST CISPLATIN-INDUCED EXPERIMENTAL TOXICITY MODEL

ADA Saniye

Master Thesis in Department of Biochemistry, School of Medicine

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

Second Supervisor: Doç.Dr. Meral YÜKSEL

Eylül 2018, 87 pages

Cisplatin (Cis) is one of the most potent chemotherapeutic drugs used in the treatment of solid tumors, but has several side effects. In this study, we aimed to investigate the possible protective and antioxidant effects of astaxanthin (Ast) by the prevention of cisplatin-induced toxicity in rats.

Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups (n=32). Cis was given *i.p.* at a dose of 8 mg/kg/day for three consecutive days. Ast was given orally 100 mg/kg/day for 10 days (Cis+Ast group). Control received olive oil and Ast group received only Ast at the same dose. After animals were sacrificed, liver, heart and kidney tissue were obtained for determination of oxidative stress parameters such as malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels, myeloperoxidase (MPO) activity, chemiluminescence (CL) analyses and histopathological examination. Blood samples also were collected for biochemical evaluation.

MDA levels were significantly higher in liver and heart tissues in Cis induced group with respect to the control group, but kidney MDA levels were not significant different. On the other hand, GSH levels in kidney tissues were significantly different higher in Cis treated group ( $p<0.001$ ). MPO activity, which shows inflammation, is significantly increased in all tissues of Cis treated rats. Ast treatment reverses the effects of Cis via reducing MPO activity. CL levels in liver, heart and kidney were significantly higher in Cis treated group. Ast treatment decrease the effects of Cis via reducing CL levels in liver and kidney tissues. Histological and serum biochemical findings are compatible with our tissue oxidative stress parameters.

Our findings showed that Cis administration caused damage to the liver, heart and kidney tissues. Inflammation is the main mechanism that can be reduced by Ast treatment. The results of oxidative stress parameters have shown that Cis administration increases GSH levels in kidney tissue, leading to "Cisplatin resistance".

**Key Words:** Cisplatin; Astaxanthin; Toxicity; Oxidative Stress; Antioxidant

## VI. İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| <b>BİLDİRİM</b> .....   | i    |
| <b>JÜRİ ÜYELERİNİN İMZA SAYFASI</b> .....                           | ii   |
| <b>TEŞEKKÜR</b> .....   | iii  |
| <b>ÖZET</b> .....   | iv   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | v    |
| <b>İÇİNDEKİLER</b> .....  | vi   |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....                         | viii |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....  | x    |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b> .....  | xii  |
| <b>1. GİRİŞ</b> .....   | 1    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....                                      | 2    |
| 2.1. Sisplatin.....   | 2    |
| 2.1.1. Sisplatin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı.....         | 3    |
| 2.1.2. Sisplatinin Etki Mekanizmaları.....                          | 6    |
| 2.1.3. Sisplatin Toksisitesi.....                                   | 18   |
| 2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres.....                     | 19   |
| 2.3. Antioksidanlar.....  | 26   |
| 2.4. Astaksantin.....   | 31   |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....                                     | 34   |
| 3.1. DeneYlerde Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar.....         | 34   |
| 3.2. Hayvan Deneyi.....   | 36   |
| 3.3. Doku Lipit Peroksidasyonu (LPO) ve Glutatyon (GSH) Ölçümü..... | 37   |
| 3.4. Doku Myeloperoksidaz (MPO) Düzeylerinin Ölçümü.....            | 37   |
| 3.5. Doku Kemilüminesans (KL) Ölçümü.....                           | 38   |
| 3.6. Sitokinlerin Tayini.....                                       | 38   |
| 3.6.1. IL-6 ölçümü.....   | 38   |
| 3.6.2. TNF- $\alpha$ ölçümü.....                                    | 39   |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.7. Serum Örneklerinde Analiz Edilen Biyokimyasal Parametreler..... | 40        |
| 3.7.1. BUN Ölçüm Test Prensipleri .....                              | 41        |
| 3.7.2. Kreatinin Ölçüm Test Prensipleri.....                         | 41        |
| 3.7.3. ALT Ölçüm Test Prensipleri.....                               | 41        |
| 3.7.4. AST Ölçüm Test Prensipleri.....                               | 42        |
| 3.7.5. Total Antioksidan Seviye (TAS).....                           | 42        |
| 3.7.6. Total Oksidan Seviye (TOS).....                               | 43        |
| 3.7.7. Total protein ölçümü.....                                     | 43        |
| 3.7.8. Yüksek Duyarlılıklı Kardiyak Troponin I (HstnI).....          | 43        |
| 3.8. Histokimyasal Değerlendirme.....                                | 44        |
| 3.9. İstatistiksel Analiz.....                                       | 44        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>   | <b>46</b> |
| 4.1. Karaciğer MDA, GSH, MPO ve Kemilüminesans Ölçümleri.....        | 46        |
| 4.2. Kalp MDA, GSH, MPO ve Kemilüminesans Ölçümleri.....             | 50        |
| 4.3. Böbrek MDA, GSH, MPO ve Kemilüminesans Ölçümleri.....           | 54        |
| 4.4 Serum Örneklerinde Analiz Edilen Biyokimyasal Parametreler.....  | 58        |
| 4.5. Histolojik Sonuçlar.....  | 60        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                     | <b>75</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>  | <b>76</b> |
| <b>EKLER</b>   |           |
| <b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>  | <b>85</b> |
| <b>EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU.....</b>                              | <b>87</b> |



## VII. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| <b>8-OhdG</b>                     | 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin            |
| <b>ABC</b>                        | ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı ailesi     |
| <b>AIF</b>                        | Apoptosis İndükleyici faktör            |
| <b>ALT</b>                        | Alanin Aminotransferaz                  |
| <b>APAF-1</b>                     | Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1 |
| <b>APN</b>                        | Aminotransferaz N                       |
| <b>AST</b>                        | Aspartat Aminotransferaz                |
| <b>ASTX</b>                       | Astaksantin                             |
| <b>CAT</b>                        | Katalaz                                 |
| <b>CCBL</b>                       | Sistein-S-konjugat beta-liyaz           |
| <b>CDDP</b>                       | Sisplatin                               |
| <b>CTR</b>                        | Cu taşıyıcıları                         |
| <b>CYP450</b>                     | Sitokrom P450 Enzimleri                 |
| <b>DAMP</b>                       | Hasarla İlişkili moleküler patern       |
| <b>DISC</b>                       | Death inducing signaling complex        |
| <b>DR</b>                         | Ölüm Reseptörleri                       |
| <b>DTNB</b>                       | 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)     |
| <b>ELISA</b>                      | Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay      |
| <b>FAD:</b>                       | Flavin Adenin Dinükleotid               |
| <b>GLD</b>                        | Glutamat dehidrojenaz                   |
| <b>GGT</b>                        | Gama-Glutamil Transpeptidaz             |
| <b>GPx</b>                        | Glutasyon Peroksidaz                    |
| <b>GSH</b>                        | Glutasyon                               |
| <b>GSTP</b>                       | Glutasyon-S-transferaz Pi               |
| <b>HETAB</b>                      | Hekzadesiltrimetil Amonyum Bromid       |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Hidrojen Peroksit                       |
| <b>HsTnI</b>                      | Yüksek Duyarlılıklı Kardiyak Troponin I |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>IL-6</b>                       | İnterlökin-6   |
| <b>KL</b>                         | Kemilüminesans   |
| <b>LOOH</b>                       | Lipit Hidroperoksitleri                                |
| <b>LPO</b>                        | Doku Lipit Peroksidasyonu                              |
| <b>MAPK</b>                       | Mitojenler Tarafından aktive edilen protein kinazların |
| <b>MDA</b>                        | Malondialdehit   |
| <b>MPTP</b>                       | Mitochondrial Permeability Transition Pore             |
| <b>MPO</b>                        | Miyeloperoksidaz                                       |
| <b>MT</b>                         | Metalotiyonin  |
| <b>NAD</b>                        | Nikotinamid Adenin Dinükleotide                        |
| <b>NER</b>                        | Nükleotid Eksizyon Onarımı                             |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b>    | Nükleer Faktör Kappa B'nin                             |
| <b>NO</b>                         | Nitrik oksit   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b> | Süperoksit Radikali                                    |
| <b>O<sub>2</sub></b>              | Moleküler Oksijene                                     |
| <b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>  | Singlet Oksijen  |
| <b><sup>-</sup>OH</b>             | Hidroksil radikali                                     |
| <b>OCT</b>                        | Organik Katyon Taşıyıcıları                            |
| <b>PBS</b>                        | Fosfat tamponu   |
| <b>ROS</b>                        | Reaktif Oksijen Türleri                                |
| <b>RNS</b>                        | Reaktif Nitrojen Türleri                               |
| <b>SLC</b>                        | Çözünebilen Taşıyıcılar                                |
| <b>SOD</b>                        | Süperoksit Dismutaz                                    |
| <b>TAS</b>                        | Total Antioksidan                                      |
| <b>TBA</b>                        | Tiyobarbütirik Asit                                    |
| <b>TLR4</b>                       | Toll Benzeri Reseptör 4                                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>    | Tümör Nekroz Faktörü alfa                              |
| <b>TOS</b>                        | Total Oksidan Seviye                                   |

## VIII. ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1. Sisplatinin Kimyasal Yapısı.....   | 3  |
| Şekil 2. Platinin <i>cis</i> ve <i>trans</i> Formu.....                             | 4  |
| Şekil 3. Seçilmiş Platinyum İçerikli İlaçların Kimyasal Yapısı.....                 | 5  |
| Şekil 4. Sisplatin Hücreye Girişinin Şematik Gösterimi-DNA Etkileşimi.....          | 8  |
| Şekil 5. Sisplatin Kaynaklı Hücre Hasarının Ana Yollarının zeti.....               | 14 |
| Şekil 6. Sisplatinin Hücresel Kaderi.....   | 15 |
| Şekil 7. Nükleotid Eksizyon Onarımı Şeması (NER).....                               | 17 |
| Şekil 8. Kararlı Molekül ve Serbest Radikal.....                                    | 20 |
| Şekil 9. Süperoksit Anyonu ve Oksijenin Kimyasal Yapısı.....                        | 22 |
| Şekil 10. Süperoksit Radikalinden Diğer Radikallerin Oksidasyonu.....               | 22 |
| Şekil 11. Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu.....                                     | 23 |
| Şekil 12. Lipit Peroksidasyon rnleri.....   | 25 |
| Şekil 13. Biyolojik Sistemle ilgili Başlıca Prooksidan-Antioksidan Reaksiyonlar.... | 30 |
| Şekil 14. Astaksantinin Kimyasal Yapısı.....  | 31 |
| Şekil 15. Hücre Zarında Astaksantinin stten Görünümü.....                          | 32 |
| Şekil 16. IL-6 Standart Grafiği.....  | 39 |
| Şekil 17. TNF- Standart Grafiği.....   | 40 |
| Şekil 18. Karaciğer MDA Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....            | 46 |
| Şekil 19. Karaciğer GSH Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....            | 47 |
| Şekil 20. Karaciğer MPO Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....            | 48 |
| Şekil 21. Kalp MDA Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....                 | 50 |
| Şekil 22. Kalp GSH Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....                 | 51 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 23.</b> Kalp MPO Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....   | 52 |
| <b>Şekil 24.</b> Böbrek MDA Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....   | 54 |
| <b>Şekil 25.</b> Böbrek GSH Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....   | 55 |
| <b>Şekil 26.</b> Böbrek MPO Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....   | 56 |
| <b>Şekil 27.</b> Karaciğer Dokusu Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubu (C-D),<br>Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık<br>Mikroskobu İnceleme Görüntüleri..... | 62 |
| <b>Şekil 28.</b> Kalp Dokusu Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubu (C-D),<br>Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık<br>Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....      | 63 |
| <b>Şekil 29.</b> Böbrek Dokusu Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubu (C-D),<br>Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık<br>Mikroskobu İnceleme Görüntüleri.....    | 64 |

## IX. TABLOLAR DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| <b>Tablo 1.</b> Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri.....               | 23 |
| <b>Tablo 2.</b> Antioksidanların Sınıflandırılması.....                | 27 |
| <b>Tablo 3.</b> Karaciğer Dokusu KL Ölçüm Sonuçları .....              | 49 |
| <b>Tablo 4.</b> Kalp Dokusu KL Ölçüm Sonuçları.....                    | 53 |
| <b>Tablo 5.</b> Böbrek Dokusu KL Ölçüm Sonuçları .....                 | 57 |
| <b>Tablo 6.</b> Serum Örneklerinde Biyokimyasal Analiz Sonuçları ..... | 59 |



## 1.GİRİŞ

Sisplatin, platinyum içeren kematerapötik bir ajandır. Etki mekanizması, içeriğindeki platinyum kompleksleri ile DNA bağlarında kırılmalara neden olarak, kanserli hücrelerde apoptozisi tetikleyip, kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamak şeklindedir (1, 2). Sisplatin klinikte solid kanserlerde, sarkomalarda, bazı karsinomlarda (küçük hücre tipli akciğer kanserleri, over kanserleri), lenfomalarda, serviks kanseri gibi çeşitli kanser tedavilerinde kullanılmaktadır. Sisplatinin testis kanserlerinde %10 ile %85 arasında tedavi başarısı bulunmaktadır. Sisplatin yaygın klinik kullanımına karşın sitotoksik bir ajandır.

Güçlü anti-tümör etkisine rağmen, klinik kullanımını sınırlayan nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite gibi önemli toksik yan etkileri vardır. Ek olarak, hepatotoksisite de metabolitlerinin birikmesinden dolayı gelişir. Bu yan etkilerinde oksidatif stres majör bir rol oynarken, apoptozun da önemli bir yeri vardır. Sisplatinin serbest oksijen radikalleri oluşumunu artırmak suretiyle yani oksidatif stres aracılığı ile hasar oluşturduğu bildirilmiştir (3). Çalışmamızda bu temel düşünceden yola çıkarak sisplatin kullanımının meydana getirdiği hasarın antioksidan özellikleri olduğu bilinen astaksantin ile önenebileceği ihtimalini araştırmayı amaçladık.

Astaksantin bazı eklembacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Astaksantin özellikle kabuklu deniz ürünlerinde, somon balığı ve alglerde bol miktarda bulunur. Bu canlılar arasında astaksantini en fazla miktarda vücudunda bulunduran *Haematococcus pluvialis*'den (*Chlorophyceae*) ticari üretimi yapılmaktadır. Astaksantin, terpenler olarak bilinen geniş bir kimyasal gruba dâhildir. Karotenoidlerin çoğu gibi renkli, yağda çözünür bir pigmenttir. Diğer bazı karotenodilerden farklı olarak insan vücudunda A vitaminine dönüşmez. A vitamini, insanda yüksek dozlarda toksik olmasına karşın, astaksantin toksik etki göstermez (4).

Bu sebeplerden dolayı güçlü bir antioksidan olan aynı zamanda antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri de bilinen astaksantini sisplatinin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak veya azaltmak için uygulamayı hedefledik.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sisplatin

Sisplatin, (cis-diamminediachloroplatinum [II], CDDP) çeşitli insan malignitelerini tedavi etmek için kullanılan güçlü bir antikanser ajandır (2). Sisplatin ilk olarak 1844 yılında M.Peyronein tarafından sentezlendi ve kimyasal yapısı ilk olarak 1893'te Alfred Wernerin tarafından aydınlatıldı. Bununla birlikte, 1960'lı yıllara kadar, bileşik ile ilgili bilimsel araştırmalar elde edilmedi. Michigan Eyalet Üniversitesi'ndeki Rosenberg ve arkadaşları tarafından (1965) gerçekleşen ilk gözlemlerde, *Escherichia coli*'deki hücre bölünmesini inhibe ettiği gösterilmiş, bu nedenle kanser kemoterapisinde kullanılmasına dair büyük bir heyecan yaratmıştır. 1969 yılına kadar, sisplatinin antikanser özelliği hayvan modellerinde gösterilmiştir. 1960'larda sitotoksik özelliklere sahip olduğu keşfedildi ve 1970'lerin sonunda, germ hücre kanserlerinin sistemik tedavisinde anahtar bileşen olarak bir yer kazandı (5). Sisplatinin keşfinden bu yana, baş, boyun, özofagus, akciğer, mesane, yumurtalık, serviks, meme, testis, penis, endometriyum, mezotelyum dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, testis kanserinde, vinblastin ve ifosfamid veya bleomisin ve etoposidin gibi sinerjik iki ilacın sisplatin ile kombinasyonu kemoterapide daha az toksisiteye ve daha yüksek bir tedavi etme oranına sahip olduğu gösterilmiştir (2, 5).

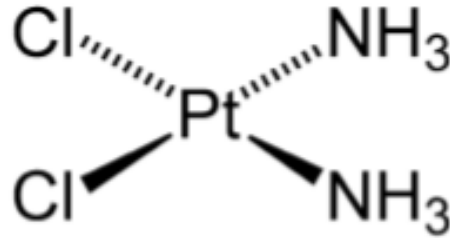
Kanser için yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacı arasında, sisplatin en güçlü olanlardan biridir. Kanser tedavisi için 1978'te Amerika Gıda ve İlaç Kurumu (FDA-U.S. Food and Drug Administration) onayı alan ilk platin bileşiktir. Sisplatin, sarkomalar, yumuşak doku kanserleri, kemikler, kaslar ve kan damarları dahil olmak üzere farklı kanser türleri ile mücadele ettiği klinik olarak kanıtlanmış önemli bir bileşiktir. Bu tür kanserler kısa sürede daha iyi prognoza ve daha az hayati tehlikeye sahip olsa da, tedavileriyle ilgili önemli zorluklar devam etmektedir. Ayrıca, ilaç direnci ve önemli yan etkiler nedeniyle, sisplatinin diğer kanser ilaçlarıyla kombinasyon tedavisi, birçok kanser türü için yeni terapötik stratejiler olarak uygulanmıştır (5). Bununla birlikte; sisplatin uygulaması, terapi için, ek ilaç gerektirmesi ve doza bağımlı nefrotoksisite, kümülatif periferik duyuşal nöropati, Corti organındaki kıl hücrelerinin geri

dönüşümsüz hasarına bağlı ototoksisite, bulantı ve kusma gibi ciddi yan etkilerle birlikte seyreder. Bazen sisplatin direnci tedavinin başarısı için büyük bir engel teşkil etmektedir. Birçok tümör, platinyum içeren ilaca karşı dirençlidir. Dahası, çoğu hassas tümör, ilk yanıtta sonra yavaş yavaş direnç geliştirir (6).

### 2.1.1. Sisplatinin Genel Özellikleri ve Moleküler Yapısı

Sisplatin, cis-diamminedichloroplatinum(II) olarak da adlandırılan sisplatinyum, kare düzlemsel bir geometriye sahip metalik (platin) koordinasyon bileşiğidir. Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı ile sarı-turuncu kristal tozudur. Suda az çözünür, dimetilprimamid ve N,N-dimetilformamid içinde çözünür. Sisplatin normal sıcaklık ve basınç altında stabildir, ancak zamanla trans-izomere yavaşça dönüşebilir. Sisplatinin moleküler ağırlığı 301,1 g/mol, yoğunluğu 3.74 g/cm<sup>3</sup>, erime noktası 270<sup>0</sup>C ve suda çözünürlüğü 25<sup>0</sup>C'de 2.53 g/L'dir (5).

Sisplatin, merkezinde platinyum (Pt) atomu, çevresinde *cis* pozisyonunda iki klor (Cl) iyon ligandı ve iki amonyak (NH<sub>3</sub>) ligandı mevcuttur. Sisplatinin kimyasal yapısı, Şekil 1'de gösterilmiştir (7).

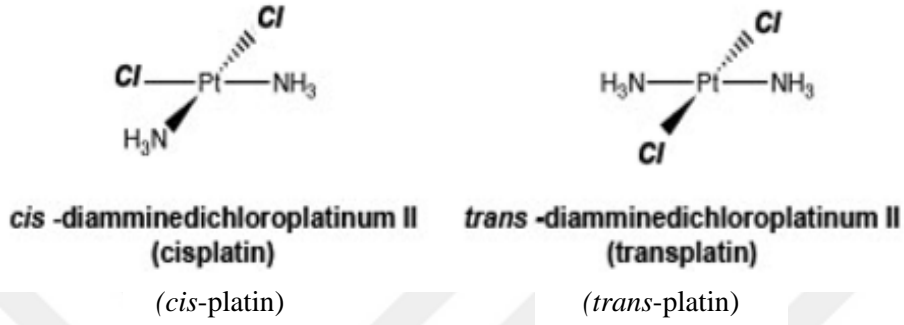


Şekil 1. Sisplatinin Kimyasal Yapısı (7)

Metal komplekslerinde Pt, 2<sup>+</sup> veya 4<sup>+</sup> okside formda bulunabilir. Amin grupları, taşıyıcı ligandları temsil ederken, klor iyonları ayrılan gruplardır. Sisplatin içinde klorürler yan yanadır. Sisplatinlerin biyolojik aktivitesi için ayrılan grupların varlığı önemlidir. Hücrenin içinde, sisplatinin iki klorür iyonu gevşek bağlanmış su molekülleri ile yer değiştirir, böylece platin çekirdekte DNA molekülü ile etkileşime geçebilir. Transplatin, karşılıklı klorür iyonları olan bir izomerdir ve kanser hücrelerinde sisplatinden farklı olarak yapısal değişikliklere neden olur.



Transplatin tarafından tek atom değişmesi ile oluşturulan ürünler, DNA molekülünün yapısını ve stabilitesini önemli ölçüde değiştirmez (8). Platinin *cis* ve *trans* formu Şekil 2'de gösterilmiştir.

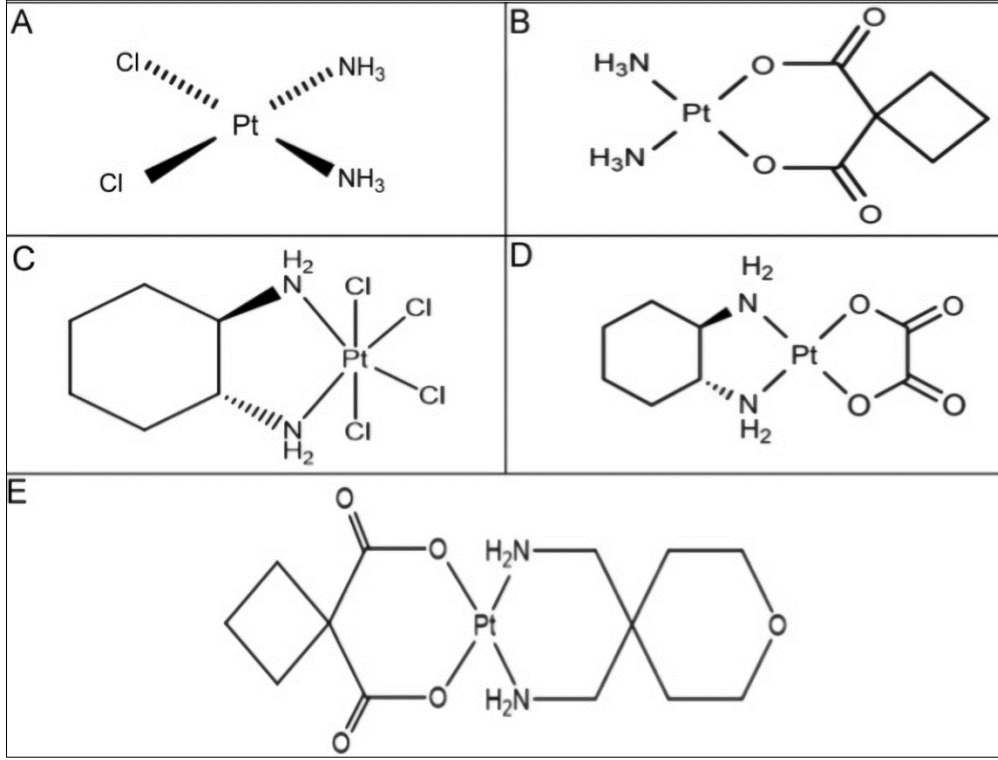


**Şekil 2.** Platinin *cis* ve *trans* Formu (8)

Preklinik ve klinik erken dönem çalışmalardan beri sisplatinin birkaç bin analogu sentezlenmiş ve terapötik indeksini arttıracak özellikler için test edilmiştir. Bu analogların 13'ü klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Ancak sadece bir tanesi (karboplatin) sisplatin üzerinde kesin avantaj sağlamıştır ve Dünya çapında onaylanmıştır. Şu anda Dünya'da dokuz platin analogu ormaplatin (tetraplatin), oksaliplatin, DWA2114R, enloplatin, lobaplatin, CI-973 (NK-121), 254-S, JM-216 ve lipozom-bağlanmış cis-bis-neodekanoato -trans-R, R-1,2-diaminosikloheksan platin (II) (LNDDP) üzerinde klinik çalışmalar devam etmektedir.

Moleküler perspektiften sisplatin, kimyasal yapıdaki küçük bir değişimin hedef hücrede biyolojik aktiviteyi önemli ölçüde nasıl etkileyebileceğinin mükemmel bir örneğini temsil eder. Karboplatinin sisplatine olan üstünlüğü, özellikle nefrotoksik etkileri ortadan kaldırması ve azalmış yan etkileridir. Karboplatinin dezavantajı ise vücuttaki kemik iliğinin kan hücresi ve trombosit üretimini oldukça dramatik bir şekilde azalmasına neden olan miyeloid baskılayıcı etkisidir. Karboplatin, sisplatinden daha az etkilidir; kanserin türüne bağlı olarak, karboplatinin etkisi sisplatinin 1/8 ile 1/45'i olabilir. Karboplatin dozunun klinik standardı, sisplatin ile kıyaslandığında genellikle 4:1 oranındadır; yani, aynı

etkinliğe ulaşmak için dört kat daha fazla karboplatin gerekir. Seçilmiş platinyum içerikli ilaçların kimyasal yapısı Şekil 3’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.** Seçilmiş Platinyum İçerikli İlaçların Kimyasal Yapısı: A. Sisplatin B. Karboplatin C. Oksaliplatin D. Ormaplatin E. Enloplatin (5)

Sisplatinin diğer kanser ilaçlarıyla kombine tedavisi; sisplatin kombinasyon kemoterapisi birçok kanser tedavisinin temelidir. Platin tepkisi yüksek olmakla birlikte, pek çok kanser hastasında sisplatin-direnci görülmesi hastalığın nüksü ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, sisplatin tedavisi alan çoğu hastada ilaç direnci gözlenmiştir. Sisplatin direncinin önerilen mekanizmaları arasında, sisplatinin karaciğerde artan biyotransformasyon ve detoksifikasyonu, DNA onarımı ve anti-apoptotik mekanizmalarındaki artışı, hücresel alınımı ve akışındaki değişiklikleri içerir. Direncin üstesinden gelmek için, sisplatin, yumurtalık kanseri, safra yolu kanseri, akciğer kanseri (diffüz malign plevral mezotelyoma), mide kanseri, tükürük bezi kökenli karsinoma, meme, kolon, akciğer, prostat, melanoma ve pankreatik kanser hücre dizileri, erkek genetik kanalının skuamöz hücreli

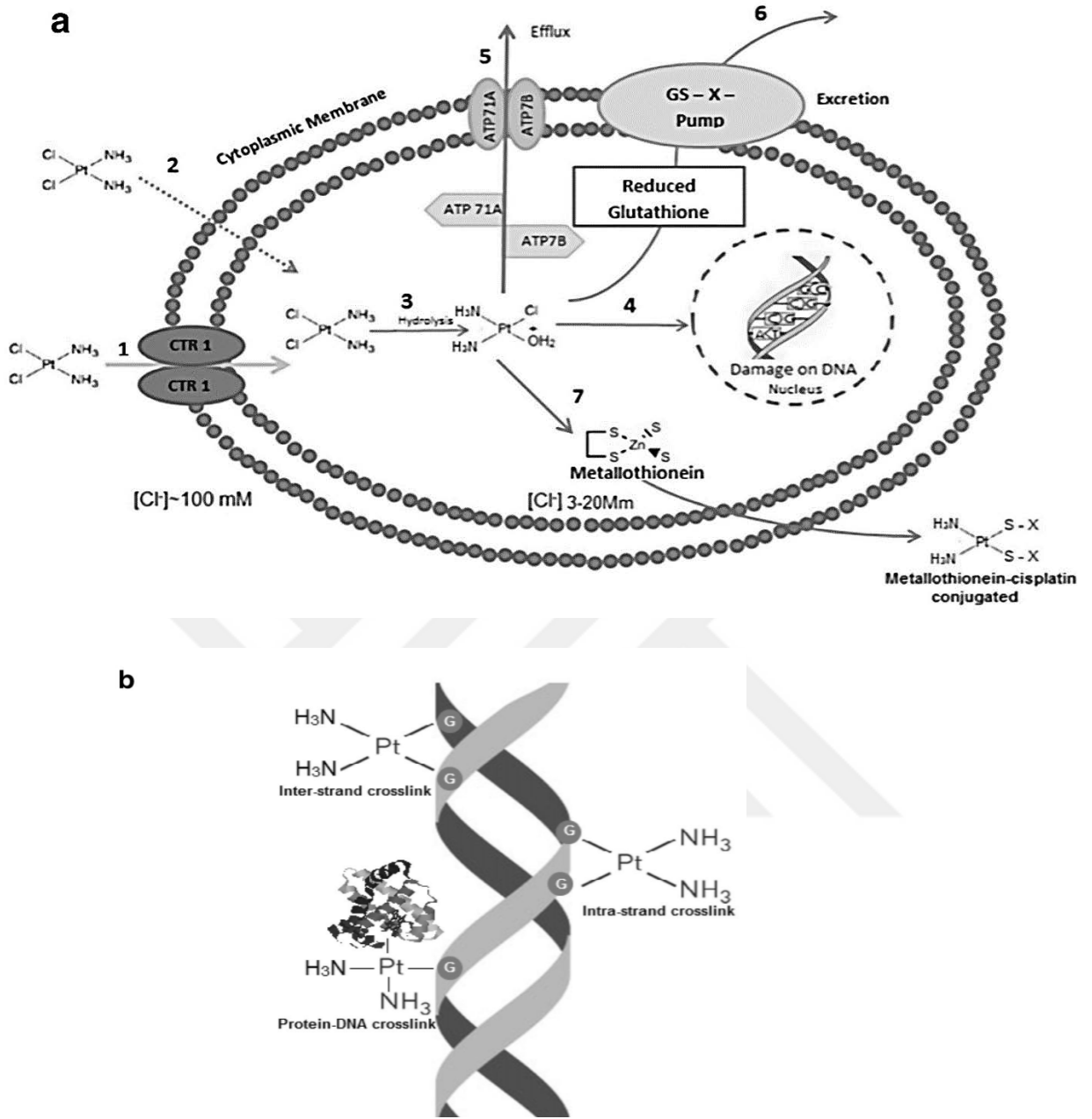
karsinomu, ürotelyal mesane kanseri ile rahim ağzı kanseri tedavisinde kullanılan bazı diğer ilaçlarla birlikte kullanılır. Yumurtalık karsinom tedavisinde, sisplatin ve paklitaksel kombinasyonu daha cesaret verici bir yanıt oranı yaratmıştır (% 73). 5-FU intravenöz enjeksiyonu yerine sisplatin ve oral UFT uygulamasını kullanan bir Faz II çalışmasında, ileri evre küçük olmayan akciğer karsinom olan 31 hastada % 35'lik bir yanıt oranı ve ortalama bir sağkalım süresi elde edilmiştir. Sisplatinin, bir dizi farklı tümör tipinde gemsitabin ile kombinasyon halinde sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (5).

### **2.1.2. Sisplatinin Etki Mekanizmaları**

Sisplatinin oral absorpsiyonu olmadığından intravenöz olarak uygulanmaktadır. Dolaşımında % 90 plazma proteinlerine bağlı olarak taşınır ve hızlı bir şekilde dokulara diffüze olur. Metabolize olan miktarın % 90'ından fazlası idrar ile atılır (9). Kan serumundaki yüksek klorür konsantrasyonu ( $\approx 100$  mM), sisplatinin klorür gruplarının su molekülleri ile yer değiştirmesini engeller, böylece kandaki sisplatinin akuatik formları çok düşük miktardadır. Bu nedenle sisplatin, hücrelerin dış yüzeyine esas olarak nötr bir molekül olarak ulaşır (10). Başlangıçta, ilaç alımı ve dağılımında rol oynayan baskın sürecin pasif diffüzyon olduğu kabul edilmiştir. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalarda sisplatin hücre içine taşınımında taşıyıcı aracılı aktif transport gösterilmiştir. Hall ve arkadaşlarının yürüttüğü deneysel çalışmalar, sisplatinin hücreye iki yoldan girdiği sonucuna yol açmıştır: (a) pasif diffüzyon ve (b) transport proteinler ile kolaylaştırılmış ve aktif taşınım. Burger ve ark. tarafından, bakır (Cu) taşıyıcıları (CTR), organik katyon taşıyıcıları (OCT), çözünebilen taşıyıcılar (SLC) ve ATP bağlayıcı kaset (ABC) multi ilaç taşıyıcısı gibi aktif Pt alımı ve akışını belirleyen membran taşıyıcıları yakın zamanda klinik önemleri ile birlikte gösterilmiştir. Diğer bazı çalışmalar da platin bileşiklerinin genel biyolojik aktivitelerinde  $\text{Na}^+$ -bağımlı glikoz transportu ve  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPaz tarafından düzenlenen diğer ATP'ye bağlı prosesler de dahil olmak üzere, farklı taşıma mekanizmalarının da olduğunu işaret etmektedir (11).

Hücre içinde (sitoplazma) klorür iyonlarının konsantrasyonu çok düşük olduğu (3–20 mM) için sisplatin hidroliz olur ve klor atomlarını kaybedip su molekülü bağlar. Bu akuatik formu sisplatinin hücre içindeki diğer nükleofilik moleküller

(DNA, RNA, proteinler) ile etkileşebilir duruma gelmesini sağlar. Su ile reaksiyondan sonra oluşan reaktif kompleks, DNA ile etkileşime girer: (a) DNA ile kovalent bağların oluşumu; özellikle guanin ve adenin N7 pozisyonunda, (b) DNA'nın 2 farklı bölgesi ile reaksiyon; zincir içi (>% 90) veya zincirler arası (<% 5) bağların oluşumu, (c) DNA sentezini ve transkripsiyonu inhibe etmekten sorumlu olan platin-DNA komplekslerinin oluşumu ve sonuç olarak, tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesi ile sonuçlanır. Sisplatin ayrıca nükleer ve sitoplazmik proteinlere bağlanabilir ve sitotoksik etkilere neden olabilir. Sisplatin-DNA bağından, replikasyon ve transkripsiyonu bloke eden ve hücre ölümünü indükleyen çok çeşitli DNA-platin kompleksi formları oluşur. DNA-platin kompleksi formlarının doğası, bir dizi transdüksiyon yolunu etkiler ve tümör hücrelerinde apoptoz veya nekrozu tetikler (7). Sisplatin hücresel mekanizmasının bir özeti Şekil 4'de gösterilmektedir.



**Şekil 4.** Sisplatin Hücreye Girişinin Şematik Gösterimi (7)

(a) 1. Bakır transporter CTR1, 2. pasif diffüzyon, 3. sisplatinin hidrolizi, 4. sisplatin ve DNA etkileşimi, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar, 5. sisplatinin ATP7A ve ATP7B gibi bakır transporter ile hücre dışına atılımı, 6 GS-X pompası olarak isimlendirilen ATP bağımlı glutatyon S-konjugat pompası, 7. sisplatin metallothioneinler ile etkileşime girmesi ve sisplatin-metallothionein kompleksinin hücreden atılması

(b) Sisplatinin DNA ile etkileşimi

Sisplatin, sitokrom P450 enzimleri (CYP450) tarafından biyotransforme edilmez. Sisplatin ve analogları, sitoplazmik glutatyon (GSH), metalotiyoninler (MT'ler) ve kükürtün platin ile koordine olma eğilimine bağlı olarak tiyol grubunu içeren diğer biyomoleküllere bağlanabilir. Glutatyon-S-transferaz enzimi (GST) ile katalize edilen platin-glutatyon konjüгатının oluşumu, hücrede inaktivasyon ve sisplatinin eliminasyonunda önemli bir adımdır. Sisplatin de MT'lere bağlanarak inaktive edilir. Klinik ve *in vitro* çalışmalar, sisplatine karşı bazı direnç mekanizmalarında MT'lerin yüksek konsantrasyonlarda mevcut olabileceğini göstermektedir. ATP-bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailesinin yanı sıra ATP7A ve ATP7B olarak bilinen bakır taşıma proteinleri de sisplatinin hücreden dışarı atılımına katılırlar. Böbrekler sisplatin eliminasyonu için birincil yerdir ve sisplatinin yarı ömrü 16 ila 53 saat arasındadır. Ultra-filtrelenebilir platinin idrarla atılması, 6 saatlik bir infüzyondan sonra, 15 dakikalık bir enjeksiyon sonrasına göre daha fazladır. Ultra-filtre edilmiş platin, protein içermeyen metabolitlerden oluşurken, toplam platin proteine bağlı ya da bağlı olmayan tüm platin türlerinden oluşur. Bununla birlikte, toplam platin genellikle ölçülür. Bu nedenle, proksimal tübüler epitelyal hücrelerdeki sisplatin konsantrasyonu, serumda bulunan konsantrasyondan yaklaşık 5 kat fazladır (7).

Sisplatin kaynaklı toksisitenin mekanizması karmaşıktır ve tamamen anlaşılammıştır. Bununla birlikte, çeşitli deneysel çalışmalardan elde edilen veriler, sisplatin kaynaklı toksisitenin altında yatan moleküler mekanizmaların; (i) zar taşıyıcılarının rolü, (ii) sisplatinin toksik metabolitlere dönüşümü, (iii) nükleer ve mitokondriyal DNA hasarının indüksiyonu; (iv) iyonik homeostazın bozulması, (v) oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun rolü, (vi) inflamasyonun indüksiyonu; ve (vii) apoptotik mekanizmaların aktivasyonunu içeren bir seri ardışık hasar yolları olarak gösterir.

*i.Membran taşıyıcıların rolü;* Son çalışmalar, sisplatin taşıyabilen iki farklı membran taşıyıcısını belirlemiştir. Böbrekte; sisplatin, kolaylaştırılmış diffüzyon ile böbrek tübüler hücrelerine taşınarak orantısız sisplatin birikmesine ve sonuçta böbreklerde toksisiteye yol açar. Bazı araştırmacılar proksimal tübüler epitelyal hücrelere sisplatin alımı ile ilişkili bir bazolateral organik katyon taşıyıcısını

(OCT) tanımlamışlardır. Şimdiye kadar, insanlarda üç OCT (OCT1, OCT2 ve OCT3) izoformu tanımlanmıştır. Bununla birlikte, OCT2, hem hayvanlarda hem de insanlarda sisplatin alımı ve proksimal tübüllerde sitotoksosite ile ilişkili başlıca organik taşıyıcıdır. İlginç olarak, insan kalp dokusunda OCT2 eksprese edilmemesine rağmen, insan ve hayvan çalışmalarında kardiyak ilaç alımında başka OCT'ler tanımlanmıştır. Ancak kardiyomiyositler tarafından sisplatin alımında bu OCT'lerin rolünü açıklayan hiçbir çalışma yoktur. OCT2'den farklı olarak, yüksek afiniteli bir bakır taşıyıcısı olan CTR1, daha az ölçüde olsa da, memeli hücrelerine sisplatin alımına aracılık ettiği tespit edilmiştir. Sadece renal tübüler hücrelerde eksprese edilen OCT2'den farklı olarak, CTR1 kardiyak dokuda olduğu gibi yetişkin böbreğin proksimal tübüler hücrelerinde de eksprese edilir. Sisplatin kaynaklı toksisitede CTR1'in spesifik rolüne ilişkin *in vivo* bir rapor bulunmamasına rağmen, *in vitro* çalışmalar, CTR1'in down regülasyonunun CTR1'in sisplatin alımında ve sitotoksitenin azalmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir

ii. *Sisplatinin toksik metabolitlere biyotransformasyonu;* Hayvan çalışmaları, sisplatinin renal tübüler epitelyal hücrelere taşındığında meydana gelen metabolik transformasyonla daha güçlü bir toksine dönüştüğünü göstermektedir. Sisplatinin metabolik transformasyonu, renal tübüler hücrelerde doğal olarak oluşan bir antioksidan olan GSH (glutamilsisteinilglisin)'a bağlandığında başlar ve glutatyon-S-transferaz Pi (GSTP) enziminin kataliz ettiği reaksiyon ile GS-konjugatları oluşur. Bu konjugatlar, tübüler hücrelerden geçer ve plazma membrana yüzeyinde bol miktarda bulunan gama-glutamil transpeptidaz (GGT) ve aminotransferaz N (APN)'ler ile sırasıyla sisteinil-glisin-konjugatları ve sistein konjugatlarına ayrışırlar. Sistein-konjugatları, sistein-S-konjugat beta-liyaz (CCBL) tarafından yüksek oranda reaktif sistein tiyollerine dönüşürler. Reaktif sistein tiyollerinin esansiyel proteinlere bağlanması toksisiteye sebep olur. GGT tarafından sisplatinin metabolik toksisitesinin oluşumu kalpte çalışılmamış olsa da, insan kalp dokusunda GGT ekspresyonu saptanmadığından, bu yolun sisplatinin kardiyotoksitesinde bir rol oynaması olası değildir.

iii. *Nükleer ve mitokondriyal DNA hasarı indüksiyonu;* Sisplatin, DNA iplikçikleri ile zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Oluşan DNA-platin kompleks formları mitokondriyal ve nükleer DNA hasarı ve hücre ölümüyle

sonuçlanan bir seri hücresele olaylar zincirini tetikler. Ayrıca, DNA sentezini, hücre döngüsünü ve replikasyonunu engelleyip hücreleri apoptoza sürükler. Bazı çalışmalar mitokondriyal DNA veya diğer mitokondriyal kompetentlerin zayıf tamir yetenekleri nedeniyle sisplatin için en yaygın bağlanma hedefi olduğunu iddia ederler. Farklı çalışmalar da nükleer ve mitokondriyal DNA'nın yanı sıra, sisplatinin RNA, protein ve fosfolipidler üzerindeki etkisini gösterir. Özetle, sisplatin uygulaması, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarına yol açması ile sisplatin etkili bir antineoplastik ajan yapar.

*iv. İyonik homeostazın bozulması;* Nefronun dış medulla bölgesinde Aquaporin 1 ve 2'nin yanı sıra  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  kotransporter ve tip III  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  iyon kanalının sisplatin tedavisinin ardından ekspresyonu azalmaktadır. Hem *in vitro* hem de *in vivo* sisplatin renal toksisite modellerinde, sisplatin uygulamasını takiben fırçamsı kenarda böbrek tübuler disfonksiyonuna neden olan  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPaz (a-subunit) aktivitesinin azaldığını gösterilmiştir.

*v. Oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonun rolü;* Sisplatin, hücrelerdeki redoks dengesini, konjugasyonla antioksidan GSH'nin tükenmesi sonucu ortamdaki aşırı ROS'un neden olduğu mitokondriyal solunumun bozulmasıyla değiştirebilir. Aşırı ROS varlığında oluşan lipid peroksidasyonu oksidatif stresi yansıtır ve sisplatin kaynaklı renal toksisite ile ilişkilidir. Oksidatif stres, sisplatin kaynaklı kardiyak toksisitenin de altında yatan temel mekanizmadır. Mitokondriyal oksidatif stres, sırayla, mitokondriyal disfonksiyona ve sinyal moleküllerinin aktivasyonuna ve proapoptotik genlerin transkripsiyonuna ve sonuçta hücre ölümüne yol açan bir olaylar dizisini indükler. Mitokondri hücrenin enerji santrali olduğundan, sisplatinin neden olduğu mitokondriyal disfonksiyon ATP'nin yokluğuna bağlı hücresele enerji üretiminin azalmasına neden olur. Sisplatin, hücreler için ana enerji kaynağı olan yağ asidi oksidasyonunun güçlü bir inhibitörüdür. Böylece, sisplatin birikimi mitokondriyal disfonksiyona neden olur, hücre içi enerji seviyelerini tüketir, hücre hasarına ve hücre ölümüne yol açar.

*vi. İnflamasyon indüksiyonu;* Toksikite nedeniyle hücre veya doku hasarından sonra ikincil olarak inflamatuvar bir yanıt, ortaya çıkan kaçınılmaz bir olaydır. Sisplatin, tümör nekroz faktörü alfa ( $\text{TNF-}\alpha$  / sisplatin kaynaklı inflamasyonda aktif olarak rol oynayan bir pro-inflamatuvar sitokin) üretimine neden olan redoks-duyarlı transkripsiyon faktörü nükleer faktör kapp B'nin ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) sitozolden



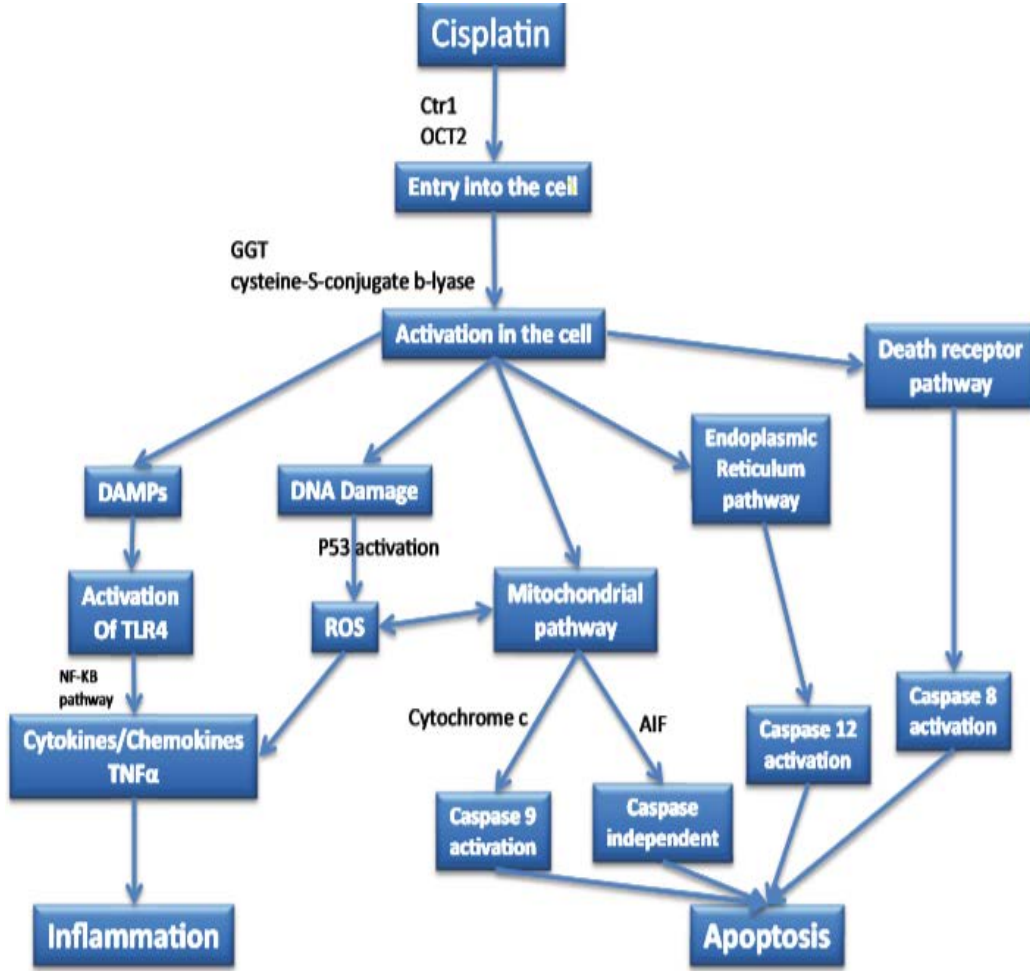
nükleusa translokasyonu da dahil olmak üzere pek çok inflamatuvar sitokin ve kemokini indükler. Örneğin, böbrekte renal tübüler epitelyal hücrelerdeki sisplatin, hasarla ilişkili moleküler patern moleküllerin (DAMPs) salınmasına ve bu da toll benzeri reseptör 4'ün (TLR4) aktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda hem immün hem de immün olmayan hücreler tarafından TNF- $\alpha$  üretimi olur. Renal tübüler epitelyal hücrelerde sisplatin birikimi, bu epitelyal hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen TNF- $\alpha$ 'nın reseptörlerine (TNFR1 ve TNFR2) bağlanmasını uyarır. Bu, inflamatuvar faktörlerin uyarılması, nötrofil ve makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerini aktiveleştirir ve hasarlı bölgeye göçüne yol açar. Bağışıklık sistemi hücreleri tarafından üretilen ROS'un yanı sıra sitokinler ve kemokinler de sisplatinin sitotoksik etkisini artırır ve sonuçta böbrek fonksiyon kaybına neden olur. Ek olarak, başka bir anahtar inflamatuvar sinyal yolu olan mitojenler tarafından aktive edilen protein kinazların (MAPK) farmakolojik inhibisyonu, renal tübüler hücrelerde TNF- $\alpha$  üretiminin bastırılması yoluyla renal koruma sağlar. Sisplatin kardiyak inflamasyonu detaylı bir şekilde tarif edilmese de, sisplatin tedavisinin neden olduğu miyokart inflamasyonu böbreklerde görülen benzer moleküler mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Sisplatin kaynaklı böbrek ve kardiyak toksisiteler inflamasyon ve müteakip hücre hasarını tetikleyen proinflamatuvar faktörleri aktive eder.

*vii. Apoptotik mekanizmaların aktivasyonu;* Apoptoz mekanizmasının birden fazla yolu vardır. Mitokondrinin de dahil olduğu intrensek yolak ana yoldur. Sisplatin, Bax ve Bak'1 (Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik proteinleri) aktive ederek, mitokondriyal geçirgenlik geçiş porlarının (MPTP'ler) açılmasına neden olur. Sitokrom c, endonükleaz G ve apoptozis indükleyici faktör (AIF) gibi pro-apoptotik faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya salınmasına yol açar ve hücre sel strese neden olur. Sitokrom c, kaspaz 9'u aktive eder, diğer kaspazların aktivasyonuna yol açar ve kaspaz bağımlı apoptozu indükler. Diğer taraftan, endonükleaz G ve AIF translokasyonu ve mitokondriden salımından sonra çekirdekte birikerek kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptozise yol açar (5).

Özet olarak, sisplatin hücre içine girdikten sonra hidroliz ile aktive olur. Klorür iyonları, su molekülleri ile yer değiştirir. Pürin kalıntılarındaki azot gibi bir nükleofille kovalent olarak bağlanabilen güçlü bir pozitif elektrofil formuna dönüşür. Sisplatin, p53 (tümör baskılayıcı gen) aktivasyonuna yol açarak DNA'da

hasara neden olur. Bu arada, hasarlı DNA p21 aracılı hücre döngüsü durdurulması ile tamir edilmeye başlanır. Hasar görmüş DNA tamir edilemediğinde, p53, Bcl2'nin inhibisyonu üzerinde kaspaz aktivasyonu ile apoptozu indükler. Sisplatin kaynaklı kanser hücresi ölümünün ana mekanizması apoptozdur. Apoptoz, programlanmış hücre ölümü sürecidir ve genellikle hücredeki farklı morfolojik değişikliklerle, örneğin hücre büzülmesi, kromatin kondensasyonu, plazma membranında “tomurcuklanma”, hücre yüzeyinde fosfatidil serin maruziyeti ve kaspaz aktivasyonu ile ortaya çıkar. Kaspazlar olarak bilinen sistein ailesinin uyarılması, apoptozun başlangıç safhalarında kritik adımdır. Kaspazlar, hücre ölüm mekanizmasının başlatıcıları veya yürütücüleri olarak karakterize edilir. Kaspazların aktivasyonu, örneğin kaspaz-3 ve 7 (yürütücüler) aktivasyonu ile sonuçlanan plazma membranı ölüm reseptörleri (DR) tarafından kaspaz-8'in (başlatıcı) ve mitokondriyal kollaps ile ilişkili kaspaz-9'un (başlatıcı) aktive edilmesi gibi çeşitli uyaranlara bağlıdır. Yürütücü kaspazlar, apoptozisin indüksiyonuna katkıda bulunan birçok biyokimyasal aktiviteden sorumludur. Bu, DNA fragmantasyonuna yol açan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) bölünmesini ve aktivasyonunu içerir. Apoptoz, ekstrinsik ve instrinsik yollar olarak bilinen iki ana yolla gerçekleşir (2). Ekstrinsik yol, ligandlar, TNF- $\alpha$  reseptör ailesine bağlandığında adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (*Death inducing signaling complex*) denilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'den aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder, ya da Bid'i keserek dolaylı olarak instrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra, kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktive olan kaspaz-3, yine kaspaz aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna neden olur (16). Bununla birlikte, instrinsik yol, DNA hasarı gibi strese maruz kaldığında başlar, daha sonra, mitokondriyal sitokrom c salınımına ve apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (APAF-1) ile etkileşime neden olur. Böylece aktif bir apoptozom yapısını oluşturur ve prokaspaz 9'u aktive eder. Yanıt olarak ve apoptoz tarafından indüklenen DNA hasarını düzenlemek için, Bcl-2 ailesi proteinleri regüle edilir ve sitokromun c'nin serbest kalmasını kontrol edilmesi yolu ile çeşitli modülasyonlar meydana gelir. Bu nedenle, sisplatin tarafından indüklenen genotoksik stres, çeşitli sinyal iletim

yollarını aktive ederek apoptozun indüksiyonuna katkıda bulunur (12). Şekil 5’de sislpatin kaynaklı hücre hasarının ana yollarının özeti verilmiştir.

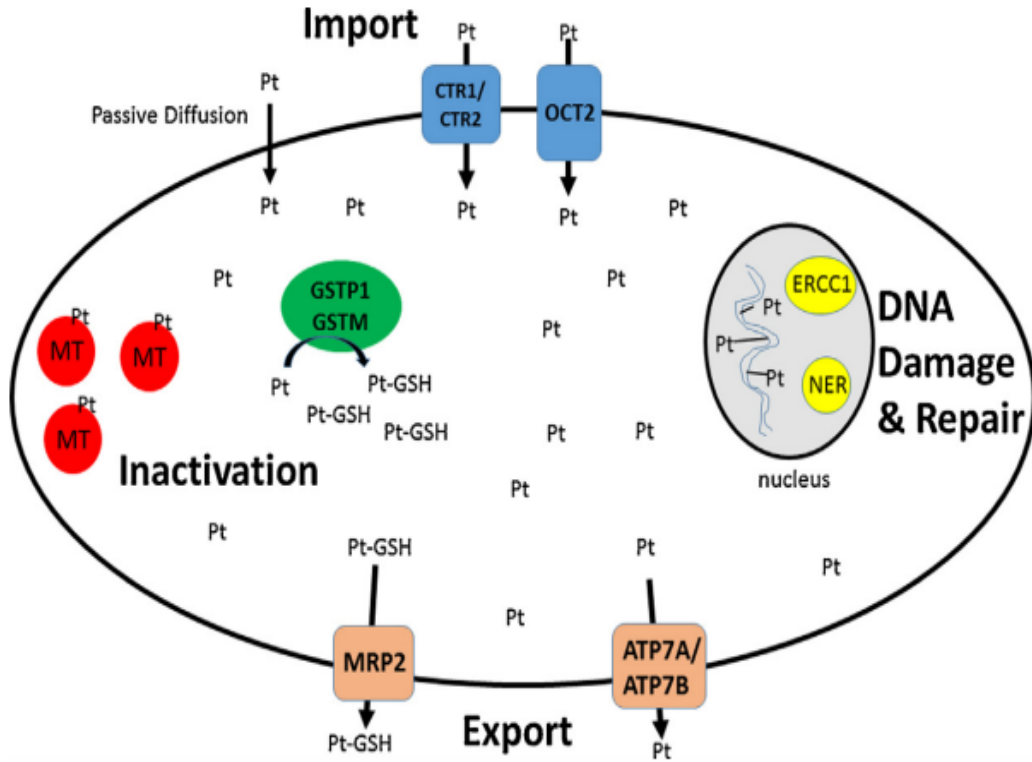


**Şekil 5.** Sislpatin Kaynaklı Hücre Hasarının Ana Yollarının Özeti (13)

Ctr1-bakır taşıyıcı 1, OCT2-organik katyon taşıyıcı 2, GGT g-glutamil transpeptidaz, DAMP hasar- ilişkili moleküler model moleküller, TLR toll-benzeri reseptör, TNF- $\alpha$  tümör nekroz faktörü alfa, ROS reaktif oksijen türleri, AIF apoptozis indükleyici faktör

Sislpatin hücrenin içine taşındığında, birkaç akıbeti vardır. İlki, sislpatin bir transmembran taşıyıcı sistemi kullanılarak hücreden dışarı atılabilir. İkincisi, sislpatin, GSH veya MT’ler gibi proteinlerdeki sülfidril gruplarının bağlanmasıyla

kimyasal olarak nötralize edilebilir. Sonucunda ise, sislpatin, çeşitli alt-hücre bileşenleriyle spesifik olarak reaksiyona girer: proteinler, RNA ve DNA gibi. RNA, sislpatin ile reaksiyona en duyarlı olanıdır, ardından DNA ve daha sonra proteinler gelir. Sislpatin için birincil ve yaygın olarak kabul edilen etki mekanizması, DNA-platinyum formlarının oluşması ile sonuçlanan, sislpatinin hücresel DNA'ya bağlanmasıdır. Hasar onarılan kadar DNA replikasyonu durdurulur. Hücre DNA'yı tamir edemezse veya hasar çok ağırsa, hücre ölür. Sislpatinin çeşitli alt-hücre bileşenleri ile reaksiyona girme mekanizmasından yukarıda bahsedildi. Diğer mekanizmalar sislpatine direnç olarak tanımlanır ve şu moleküler mekanizmalarla oluşur: değiştirilmiş DNA onarımı, ilacın hücresel birikiminin değiştirilmesi ve ilacın sitozolik inaktivasyonu (14)



Şekil 6. Sislpatin Hücresel Kaderi (14)

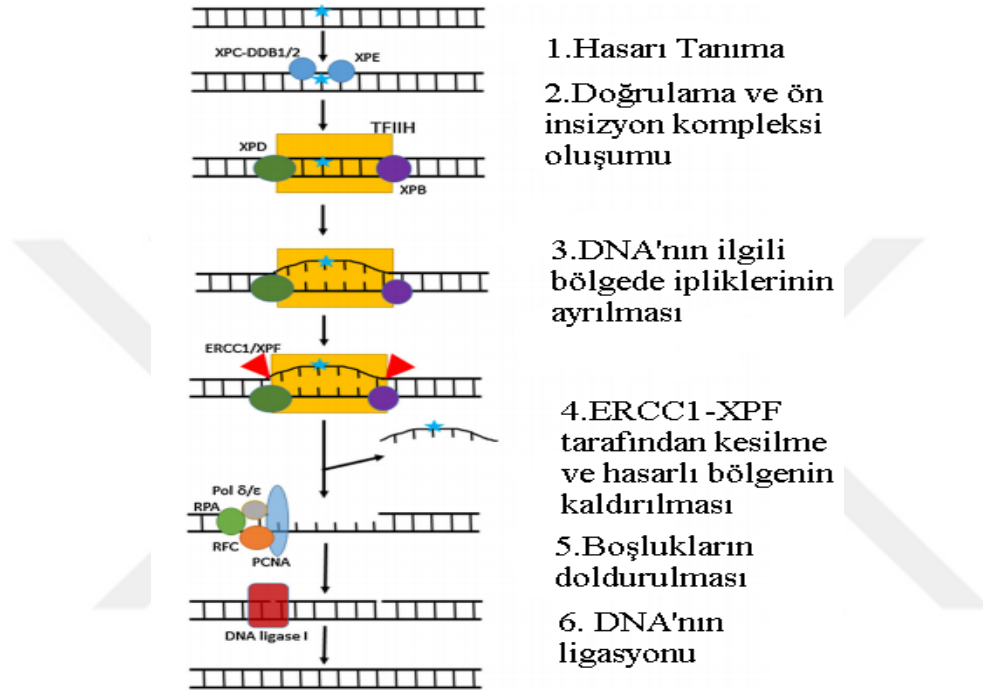
Sislpatin, hücre zarını pasif diffüzyon veya transmembran taşıyıcılar ile geçer. Hücrenin içine girdiğinde, sislpatin DNA'ya bağlanır ve DNA-platinyum kompleks formları oluşur. Hasar ERCC1 ve NER yolağının üyeleri tarafından onarılır.

Sisplatini GSH'a ekleyen GST ile inaktive edilir. GS- sisplatin konjugatı daha sonra MRP2 taşıyıcıları aracılığıyla hücre dışına atılır. Sisplatin ayrıca ATP7A ve ATP7B tarafından da hücre dışına atılır. Sisplatin inaktivasyonu MT proteinlerinin bağlanmasından da kaynaklanabilir. Düşük seviyelerdeki sisplatin direncinin, birincil mekanizması DNA onarımıdır. Orta seviye direnç seviyeleri, hücrel sisplatin birikiminin azalmasından kaynaklanır. Çok yüksek direnç seviyelerinde, sisplatinin sitozolik inaktivasyonu birincil mekanizma olmakla birlikte, birçok hücre hattında birden fazla mekanizmanın ortaya çıkabileceği gözlenmiştir.

*a. Değişen DNA onarımı;* Sisplatin hücre içine girip DNA'ya bağlanıp kompleks formlar oluşturması DNA'nın önemli ölçüde bükülmesine neden olur. Bu bükülme, nükleotid eksizyon onarımı (NER) yolu ile tanınır ve onarılır. Otuzdan fazla protein gerektiren bu yolda, DNA-platinum kompleks formları ilk olarak XPE ve XPC-DDB1/2 tarafından tanınır. Transkripsiyon faktörü II H (TFIIH) kompleks hasarı doğrular ve ön insizyon kompleksini birleştirir: RPA, XPA ve XPG. DNA daha sonra XPB ve XPD helikazlar ile ayrılır. ERCC1-XPF ve XPG endonükleazları, eksizyonu birkaç baz yukarı ve aşağı yönünde oluşturur. Bu, eklentiye içeren oligonükleotidi serbest bırakılır. Bu boşluk, RPA, RFC, PCNA ve Pol  $\delta/\epsilon$  içeren DNA onarım sentezi kompleksi ile doldurulur. Son adımda da, DNA, DNA ligaz I tarafından birleştirilir, böylece DNA onarımı tamamlanır. DNA hasarı ve DNA onarımının dengesi, sisplatin tedavisinden sonra ölüme karşı hücrenin hayatta kalmasını belirler. DNA adduct formlarının tamir edilme kabiliyetindeki değişiklikler, sisplatin duyarlılığındaki değişikliklerle sonuçlanır (Şekil 7).

*b. Sisplatinin hücre içindeki değişmiş birikimi;* Sisplatinin değişen birikimi, iki bağımsız hücrel yolun sonucudur. Azalmış hücre içi alımı veya artmış hücre dışına atılımı. Azalmış hücre içine sisplatin alınımında, fizyolojik pH'da, sisplatin klorürleri -OH grupları ile yer değiştirir ve nötr yük taşır. Bu durum, hücrel zar boyunca diffüzyon ile sisplatinin yüksek konsantrasyonundan hücrenin içindeki düşük konsantrasyona akmasını sağlar. Böylece, sisplatin alımının ilk olarak pasif diffüzyon yoluyla olduğu düşünülmüş, 3 mM'ye kadar olan akımı zamana veya ilaç konsantrasyonlarına karşı doyurulmamıştır. Ancak, sisplatinin hücreye çoğunlukla membran taşıyıcılar tarafından girdiği tesbit edilmiştir. Bu durum,

düşük transporter seviyelerinin, hücresel azalmış sisplatin düzeyleri ile ilişkili görülmesinin sebebini açıklayabilir (14).



Şekil 7. Nükleotid Eksizyon Onarımı Şeması (NER) (14)

Sisplatin alınımı, bakır taşıyıcı CTR1 ve CTR2 kadar organik katyon taşıyıcı (OCT) ailesi tarafından gerçekleştirilir. Sisplatin dirençli hücreler, CTR1'nin mRNA düzeylerinin ve sisplatin alınımının azaldığını gösterir. CTR2, CTR1 gibi hücre zar üzerinde bulunur. Ancak hücre içi organel membranlarının üzerinde de bulunup, alternatif hücre fonksiyonu olabilir. CTR1'den farklı olarak, hücrelerde CTR2 geninin susturulması sisplatinin artmış alınımı, sitotoksite ve sisplatin hassasiyeti ile sonuçlanır.

Sisplatinin hücre dışına atılımı pasif diffüzyon ile gerçekleştiği öne sürülmüştür. Ancak bu tezi incelemek için yapılan çalışmalarda, bunun sisplatinin yüksek konsantrasyonlarında gerçekleştiği açıklanmıştır. Bu nedenle sisplatinin hücreden

dışarıya atılımda membran taşıyıcıları ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Sisplatinin hücreden çıkarıldığı iki ana yol vardır: P-ATPaz taşıyıcıları (ATP7A ve ATP7B) veya ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcıları ile uzaklaştırılması. ATP7A ve ATP7B ile ilgili benzer gözlemler mevcuttur. Sisplatin direncinde artmış ekspresyonları görülmektedir. Çoklu ilaca dirençli proteinler (MRPler), ABC (ATP-bağlayıcı kaset) taşıyıcılarının ABCC alt ailesine aittir ve sisplatin direncinde rol oynar. MRP'ler, ATP'ye bağlı bir şekilde GSH-platin konjugatlarının dışarı akışından sorumlu membran taşıyıcılarıdır. MRP2'nin aşırı ekspresyonu, çeşitli sisplatin dirençli hücre hatlarında bulunur. MRP2'nin ifadesi, sisplatin ile de indüklenir.

*c. Sisplatinin sitozolik inaktivasyonu;* Son direnç mekanizması sisplatinin sitozolik inaktivasyonudur. Bu inaktivasyon sisplatinin DNA ile reaksiyona girememesi ile sonuçlanır. Daha az hasar meydana gelir ve kanser hücresi ilaç tedavisine rağmen yaşamını sürdürür. Birincil inaktivasyon şekli, sisplatin ile GSH konjugasyonu olup, daha önce tartışılan MRP taşıyıcıları tarafından hücrel atılıma yol açar. İkincil inaktivasyon biçimi, MT proteinlerine bağlanmadır.

GST'ler, GSH'ın sisplatin ile konjugasyonunu katalize eder. Platin-GS konjugatlarının oluşumu, ilacın çözünürlüğünü artırarak ilacın atılmasına yol açar ve ilacı etkisiz hale getirir. Hücrenin içinde GSH antioksidan görevi görür. İndirgenmiş sülfidril gruplarını tutarak redoks ortamını korur. Sisplatine dirençli hücrelerde hücrel GSH'ın oksitlenerek sisplatin-GS konjugatı olarak tükenmesi, sisplatinin sitotoksitesini artırır. Yumurtalık kanseri hücrelerinde platine dirençli hücre hatlarında artmış GSH seviyeleri gözlenmiştir.

Sisplatin ayrıca MT proteinlerine bağlanma ile inaktive edilir. MT proteinleri, bakır, çinko, kadmiyum ve civa gibi metallere bağlanan sistein bakımından zengin, düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir. MT'ler, hücrel metal homeostazının düzenleyicileri olarak görev yaptıkları gibi hücrelerde ağır metal maruziyetinin detoksifikasyonunda da işlev görürler. Sisplatin direnci açısından MT'ler, tümörlerdeki ağır metali detoksifiye edici olarak işlev görürler. MT'lerin aşırı ekspresyonu, sisplatine dirençli birçok hücre hattında belirlenmiştir (14).

### 2.1.3. Sisplatin Toksisitesi

Sisplatinin yüksek emetojenitesi (kusturucu özelliği) göz önünde bulunduğunda, rutin profilaktik antiemetik kullanımına rağmen şiddetli, uzun süreli mide bulantısı ve kusma meydana gelebilir. Bu ilk 24 saat içinde ve ilk saatte olduğu gibi daha erken bir zamanda meydana gelebilir. Yüksek doz sisplatin kullanımı durumunda da uygulamadan sonra 24 saatten 2 haftaya kadar süren bulantı ve kusma gözlemlenir. Mukozit oluşabilir. İlk saat içinde akut pankreatit, metalik veya değişik tat ile ishal bildirilmiştir. Sisplatin ile diğer antineoplastik ajanların kombinasyonları bu gastrointestinal toksisiteyi şiddetlendirip kötüleştirebilir.

Doz bağımlı akut ve kronik böbrek yetmezliği gelişebilir. Sisplatin doz aşımı sonrası 2-6 gün içinde akut oligüri ve nonoligürik böbrek yetmezliği ortaya çıkabilir. Her 3 haftada bir intravenöz yolla 5 gün boyunca 20 mg/m<sup>2</sup>/gün (vücut yüzey alanına göre) dozlarında 2 yıldan fazla sisplatin uygulaması kronik böbrek yetmezliği ile sonuçlanabilir.

Aşırı dozdan 2 ile 7 gün sonra başlayan, tersine çevrilebilir veya geri dönüşümsüz bilateral sensorinöral işitme kaybı meydana gelebilir. Altta yatan olası patofizyoloji, sisplatin kaynaklı Corti ve stria vaskularis organına verilen hasar ile ilgilidir. Baş ağrıları, yürüme dengesizliği, halüsinasyonlar, ensefalopati, nöbetler, periferik duyu nöropatisi ile “çorap-elden” modelinde uyuşma gibi yan etkiler özellikle 200 mg/m<sup>2</sup>lik sisplatin dozlarında ortaya çıkabilir.

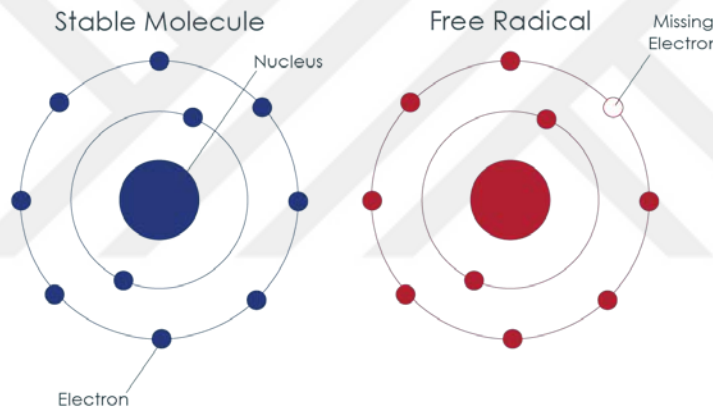
Yüksek transaminazlar, yüksek bilirubin veya yüksek protrombin zamanı ve kısmi tromboplastin zamanı ile oluşan hepatik yetmezlik ve kolestaz içeren hepatoksisite rapor edilmiştir. Paroksizmal supraventriküler taşikardi ve atriyal fibrilasyon dahil olmak üzere sinüs bradikardisi ve taşiaritmilerin tümü, daha önceden kardiyak disritmi öyküsü olmayan hastalarda bile, terapötik sisplatin kullanımında bildirilen kardiyovasküler toksisitelere (15).

### 2.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Kimyasal olarak, bir serbest ya da moleküler atomdan elektronların uzaklaştırılması oksidasyon, atoma elektronların kazanılması ise redüksiyon olarak tanımlanır. Oksidan teriminin genel anlamı “oksitleyici ajan”dır. Reaksiyonlarda serbest radikal, başka atom ya da moleküllerden tek bir elektron



olarak oksitleyici ajan olarak ya da diğer moleküllere tek bir elektron vererek indirgeyici molekül gibi davranabilir (16). Serbest radikaller, dış yörüngesinde (orbitalinde) eşleşmemiş elektron bulunduran atom, atom grupları veya moleküllerdir. Serbest radikaller normal metabolik süreçlerde vücut tarafından sentezlenir. Ayrıca güneş ışınları, çevre kirliliği, sigara, radyasyon, gibi dış etkenler de serbest radikallerin oluşmasına sebep olmaktadır. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler, etrafındaki moleküller ile etkileşime girerek, bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler. Serbest radikaller, bu reaktif yapıları nedeniyle başta lipitler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve zarar verme potansiyeline sahiptirler (17). Şekil 8’de serbest radikal ve stabil molekül yapısı gösterilmiştir.

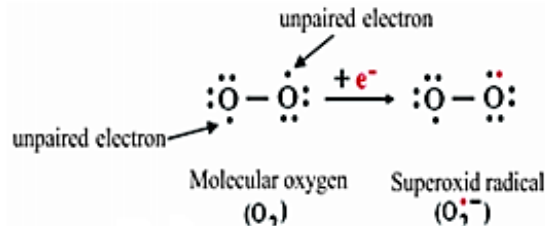


**Şekil 8.** Kararlı Molekül ve Serbest Radikal (18)

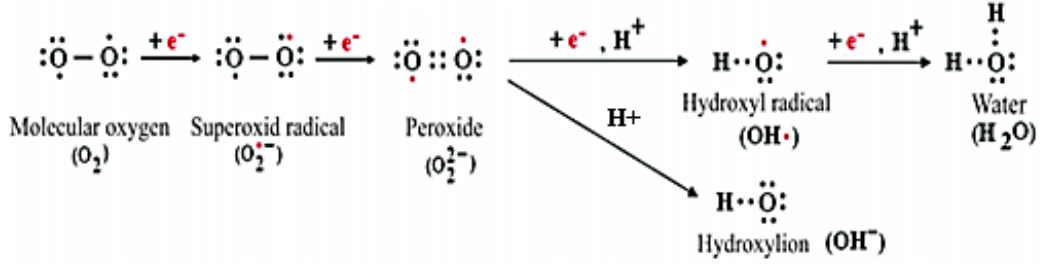
Aerobik canlılar yaşamlarının devamı için oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen molekülünde bulunan iki oksijen atomunun birleşmesinden oluşan aynı spin kuantum sayısına sahip fakat farklı orbitallerde bulunan iki tek elektronu vardır. Bu durumda oksijen molekülü bir biradikal olarak kabul edilir. Kuvvetli bir oksitleyici olma özelliğine rağmen aktif bir bileşik değildir. İki yarı boş orbitalini doldurmak için başka atom veya moleküllerin orbitallerindeki elektronlardan ters spinli iki elektron alması gerekir. Mevcut elektronların spinleri aynı olduğu için gelecek iki elektronun da spinleri aynı ama orbitaldekine ters olmalıdır. Bu koşulu karşılayarak oksijene aynı spinli iki elektron verecek atom veya molekül yoktur, çünkü verilebilecek elektron çifti birbiri ile ters spinli olarak eşleşmiştir. Bu

durum oksijen molekülünün elektron alışverişine spin kısıtlaması getirerek molekülün aktivitesini azaltmaktadır. Aerob organizmada oksijen molekülünün spin kısıtlaması elektronları teker teker alarak aşılır. Oksijene tek elektron verecek birçok madde vardır. Özellikle değişen değerliklere sahip geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) önemlidir. Hücrede NADH, FADH<sub>2</sub> gibi bileşiklere ait elektronların mitokondrideki elektron taşıma zinciri (ETZ) elemanları tarafından taşınarak oksijene aktarılması sonucunda oksijen suya dönüşür, bu sayede hücre kendisi için gerekli enerjiyi sağlar. Mitokondri ETZ elemanlarında ve pek çok oksidaz-oksijenazın aktif bölgesinde demir ve bakır vardır (19). Bu metabolik süreçte, mitokondride oksijenin % 2-3 kadarı suya dönüşmeyip, oksijen kaynaklı radikallerin oluşumuna kaynak oluşturur. Mitokondride oksijenin suya indirgenmesi sırasında sitokrom oksidaz enziminin elektronları oksijene aktarması sırasında süperoksit radikali ve diğer radikaller enzimin aktif bölgesine bağlı kalır. Kompleks 1 ve kompleks 3'den radikal kaçakları olabilir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşur (Şekil 9). Üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali (OH<sup>•</sup>) ve dördüncü elektronun eklenmesi ile su oluşur (Şekil 10). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bir prooksidandır (genel olarak bir prooksidan, oksidatif stresi indükleyebilen reaktif türler üretebilen herhangi bir madde, serbest radikal donörü olarak tanımlanır) (17).

Organizmada, serbest radikaller mitokondri dışında hücrenin diğer fraksiyonlarında da membrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sırasında oluşur (19, 21).



Şekil 9. Süperoksit Anyonu ve Oksijenin Kimyasal Yapısı (21)



Şekil 10. Süperoksit Radikalinden Diğer Radikallerin Oksidasyonu (21)

Serbest radikaller oksijen ve nitrojen kaynaklı olabilir. Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen (azot) kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak isimlendirilir. Tablo 3’de ROS, RNS ve radikal olmayan ama radikale dönüşebilen moleküller gösterilmiştir. ROS’lar içinde en reaktifi OH• radikaldır.

OH• radikali, biyomoleküllerle daha güçlü reaksiyona girmesinden dolayı biyolojik sistemlere diğer ROS’lardan daha fazla zarar verebilir. Şekil 11’de gösterildiği gibi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+</sup> veya diğer geçiş elementleri (Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) varlığında indirgenerek OH•’ne dönüştürülür. Bu reaksiyona “Fenton reaksiyonu” denir. O<sub>2</sub>•Fenton reaksiyonu ile bağlantı kurularak oluşan metal iyonlarının yeniden kullanılmasında önemli bir rol oynar. Bu iki reaksiyona “Haber-Weiss reaksiyonu” adı verilir. Geçiş metallerinin OH• oluşmasında önemli bir yeri vardır (20).

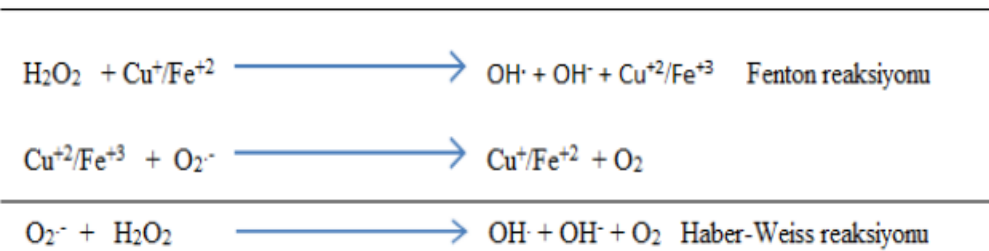
Reaktif oksijen türleri (ROS)

| Radikaller     |                | Nonradikaller     |          |
|----------------|----------------|-------------------|----------|
| Süperoksit     | $O_2^{\cdot-}$ | Hidrojen peroksit | $H_2O_2$ |
| Hidroksil      | $OH^{\cdot}$   | Hipokloröz asit   | $HOCl$   |
| Peroksil       | $ROO^{\cdot}$  | Hipobromöz asit   | $HOBr$   |
| Alkoksil       | $RO^{\cdot}$   | Singlet oksijen   | $^1O_2$  |
| Hidroperoksil  | $HO_2^{\cdot}$ | Ozon              | $O_3$    |
| Lipid peroksil | $LOO^{\cdot}$  |                   |          |

Reaktif nitrojen türleri (RNS)

| Radikaller       |                | Nonradikaller        |                 |
|------------------|----------------|----------------------|-----------------|
| Nitrik oksit     | $NO^{\cdot}$   | Nitrik asit          | $HNO_2$         |
| Nitrojen dioksit | $NO_2^{\cdot}$ | Nitrosil katyonu     | $NO^+$          |
|                  |                | Nitroksil anyonu     | $NO^{\cdot-}$   |
|                  |                | Dinitrojen tetroksid | $N_2O_4$        |
|                  |                | Dinitrojen trioksit  | $N_2O_3$        |
|                  |                | Peroksinitrit        | $ONOO^{\cdot-}$ |
|                  |                | Peroksinitrik asit   | $ONOOH$         |
|                  |                | Nitronyum katyonu    | $NO_2^+$        |
|                  |                | Nitril klorid        | $NO_2Cl$        |
|                  |                | Alkil peroksinitrit  | $ROONO$         |

**Tablo 1.** Reaktif Oksijen ve Nitrojen (Azot) Türleri (20)

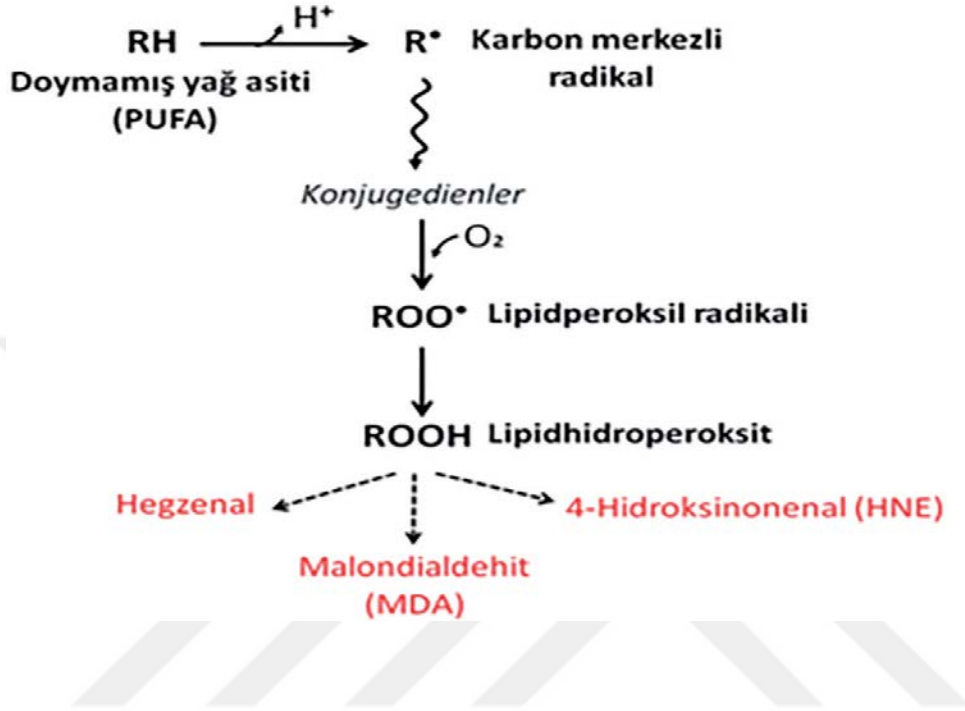


**Şekil 11.** Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonu (20)

Biyolojik sistemlerde normal metabolizma sonucu üretilen serbest radikaller yaşlanma, iskemi-reperfüzyon, yüksek oksijen basıncı radyasyon, inflamasyon ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi sebeplere bağlı olarak aşırı üretilmesi ve/veya bunların zararlı etkilerini ortadan kaldıran antioksidan sistemin yetersiz kalması ile oksidan-antioksidan dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır (23). Bu dengenin bozulmasının birkaç nedeni vardır: (i) artan düzeyde endojen ve eksojen ROS üretimi ile birleştirilmiş otooksidasyona giren bileşikler; (ii) düşük moleküler ağırlıklı antioksidan rezervlerinin tükenmesi; (iii) antioksidan enzimlerin inaktivasyonu; (iv) antioksidan enzimler ve düşük moleküler ağırlıkta olan antioksidanların üretiminde azalma ve (v) yukarıda listelenen faktörlerin iki veya daha fazlasının belirli kombinasyonları olabilir. Oksidatif doku hasarı, oksidan moleküllerin hücre yapı taşları olan protein, lipit, nükleik asit karbonhidrat ve enzimler üzerindeki reaksiyonlarından kaynaklanmaktadır. ROS'ların aşırı oluşumu, polimorf çekirdekli lökositlerin (PMNL) aktivasyonuna yol açmakta ve ROS'ların üretimini daha da arttırmaktadır. ROS'lar, hücre membran lipitlerini oksidasyona uğratarak, lipitlerden malondialdehid (MDA) gibi toksik ürünlerin meydana gelmesini sağlar (22).

- i. *Serbest radikallerin lipitlere etkisi;* Lipit peroksidasyonu, serbest oksijen radikalleri tarafından memeli hücre zarlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksitler, alkoller, hidroksi yağ asitleri, aldehitler, pentan, etan MDA gibi çeşitli ürünleri oluşturma tepkimesidir. Çoklu doymamış yağ asidi (LH) zincirindeki  $\alpha$ -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile lipit peroksidasyonu başlar ve böylece yağ asidi zinciri bir radikal niteliği kazanır. Bu lipit radikali (L $\cdot$ ) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. İlk önce, molekül içi çift bağ aktarılması (rezonans) ile dien konjugatı oluşur. Bu yağ asidi radikali oksijen eklenmesi ile hızlı bir şekilde peroksil radikaline (LOO $\cdot$ ) dönüşür. Bu lipit peroksil radikalleri membrana yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomları çıkartarak yeni reaksiyonları başlatır. Kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşür. Lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipit peroksidasyonu reaksiyonları sona erer. Hücre membranlarında lipit peroksidasyonu sonucu transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozulur. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar,

proteazlar aktive olur. Bu olaylar hücre hasarında etkin bir rol oynar. Ayrıca lipit peroksidasyonunun son ürünü olan aldehitler de sitotoksik etkilere sahiptir (Şekil 12).



Şekil 12. Lipit Peroksidasyon Ürünleri (23)

ii. *Hücre proteinlerine etkisi;* Serbest radikaller proteinler üzerinde doğrudan veya dolaylı etki gösterebilir. Peptid bağları, prolin ve lizin gibi amino asitler serbest radikallerden oldukça kolay etkilenir. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklinde olur. Lipit peroksidasyonun aldehit yapıdaki ürünleri, sistenin sülfidril gruplarıyla veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde fragmentasyon ve çapraz bağlanmalara yol açar. Bu olaylar proteinlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasıyla sonuçlanır.

iii. *Nükleik asitler ve DNA üzerine etkisi;* Serbest radikallerin etkisi ile DNA yapısında yapısal değişimler olur. Bu yapısal değişimler pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları, DNA denatürasyonu gibi çeşitli olayları kapsar. Özellikle yüksek reaktiviteye sahip OH•'leri, DNA bazlarındaki çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin

yapısındaki metil gruplarından H atomu çıkararak DNA molekülü ile reaksiyona girer. Sonuçta oluşan timin peroksil radikalleri indirgenir ve hidroksihidroperoksit, 5-hidroksimetilurasil, timin glikol, 5-formilurasil ve 5 - hidroksi 5-metilhidantoin gibi oksidasyon ürünlerine dönüşürler. DNA baz mutasyonları içerisinde en fazla bilineni 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin)'dir. OH• radikalleri, guanin molekülünde 8. pozisyonda etkileşerek oksidasyona yol açar. Ayrıca Cu<sup>+2</sup> iyonları DNA'nın özellikle guanin bazlarına yüksek afinite ile bağlanır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşime girerek DNA hasarına katkıda bulunurlar. 8-OHdG, DNA hasarının miktarının belirlenmesinde kullanılır (22, 23).

### **2.3. Antioksidanlar**

ROS oluşumunu engellemek, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak için vücutta görevli savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” adı verilir. Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/ peroksidasyonun ilerlemesini engellerler. Antioksidanların fonksiyonları arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak sayılabilir.

İnsan vücudunun serbest radikalleri ortadan kaldırmak için en önemli savunması antioksidanlardır. Antioksidanlar serbest radikalleri etkisiz hale getiren ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir. İnsanda bulunan antioksidanlar ya vücut tarafından sentezlenir ya da dışarıdan ilave olarak alınır. Hem endojen hem de eksojen antioksidanlar serbest radikal süpürücü olarak görev yaparlar. Bu özelliği ile savunma sistemini güçlendirerek hastalık riskini de azaltırlar. Antioksidanlar, normal hücre metabolizmasının toksik yan ürünü olan serbest radikalleri zararsız forma dönüştürüp koruyucu etki gösterirler.

Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, oksidan/antioksidan dengesini korurlar. Endojen kaynaklı antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik olarak iki alt grupta sınıflandırılabilir. Eksojenler ise vitamin ve ilaç olarak kullanılan eksojen

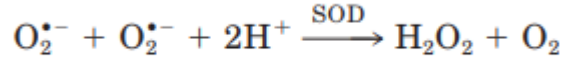
antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Tablo 2’de antioksidanların sınıflandırılması gösterilmiştir (24).

| ENDOJEN ANTIÖKSİDANLAR          |  |                       |
|---------------------------------|--|-----------------------|
| ENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR        | NONENZİMATİK ANTIÖKSİDANLAR  |                       |
| Süperoksit dismutaz (SOD)       | Glutatyon  | Koenzim Q 10          |
| Katalaz (CAT)                   | Melatonin  | Selenyum              |
| Glutatyon peroksidaz (GPx)      | Ürik asit  | $\alpha$ -lipoik asit |
| Glutatyon redüktaz (GR)         | Bilirubin  | Transferrin           |
|                                 | Albümin  | Seruloplazmin         |
| EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR          |  |                       |
| VİTAMİN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR  | İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTIÖKSİDANLAR  |                       |
| $\alpha$ -Tokoferol (Vitamin E) | Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)   |                       |
| $\beta$ -karoten (Vitamin A)    | NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar) |                       |
| Askorbik asit (Vitamin C)       | Rekombinant süperoksit dismutaz  |                       |
| Folik asit (Vitamin B9)         | Trolox-C (vitamin E analogu)   |                       |
|                                 | Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GPx aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)                              |                       |
|                                 | Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)  |                       |
|                                 | Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferoksamin)   |                       |
|                                 | Nötrofil adezyon inhibitörleri   |                       |
|                                 | Sitokinler (TNF ve IL-1)   |                       |
|                                 | Barbitüratlar  |                       |
|                                 | Demir şelatörleri  |                       |

**Tablo 2.** Antioksidanların Sınıflandırılması (24)

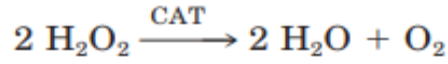
*Süperoksit Dismutaz (SOD)*; ROS’a karşı ilk savunma hattını oluşturur. SOD, süperoksit radikalini ( $O_2^{\cdot-}$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır.  $H_2O_2$  daha sonra, katalaz (CAT) ya da Glutatyon Peroksidaz (GPx) ile suya dönüştürülüp  $OH\bullet$  radikaline dönüşmesi engellenir. Organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzim SOD’dır.



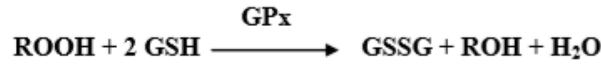
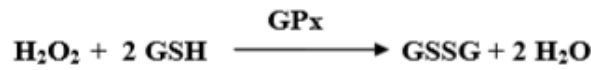


İnsanlarda SOD'un üç formu bulunur. Bunlardan Cu ve Zn içeren SOD (Cu/Zn SOD) sitozolde, manganez (Mn) içeren SOD (Mn SOD) mitokondride ve ekstrasellüler SOD (EC SOD) hücre dışı sıvılarda bulunur.

**Katalaz (CAT);** Katalaz, dört protein alt birimden meydana gelir. Her bir alt birim, bir hem grubu ve bir NADPH molekülü içerir. Birçok CAT'da NADPH molekülü yüzeye yakın ve sıkıca bağlıdır. CAT, büyük ölçüde peroksisom gibi hücre içi organelde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin, H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüşümünü katalize eder.



**Glutasyon Peroksidaz (GPx);** Hücrelerin sitoplazmasında bulunup H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den OH•'in oluşmasını engelleyerek, oksidatif strese karşı hücreyi korur. GPx, her bir alt birimi bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden oluşur. GPx, elektron kaynağı olarak GSH'ı kullanarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi ve diğer organik hidroperoksitleri (lipit hidroperoksitler, DNA hidroperoksitler) metabolize eden bir enzimdir.



GSH, hidrojen verici olarak davranıp, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve hidroperoksitleri indirgerken kendisi okside olur. Okside glutasyon, glutasyon disülfittir (GSSG). Glutasyon redüktaz (GR) enzimi varlığında GSSG, GSH haline geri indirgenir. Bu indirgenme reaksiyonu esnasında GR elektron vericisi olarak NADPH'yi kullanır.

**Glutasyon redüktaz (GR);** Flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren flavoprotein bir enzimdir. GR, NADPH'nin bir elektronunu GSSG disülfid bağlarına aktararak

yeniden GSH'ye dönüştürür. Bu nedenle NADPH, serbest radikal hasarını engellemek için gereklidir. En önemli kaynağı pentoz fosfat yoludur (19, 25).

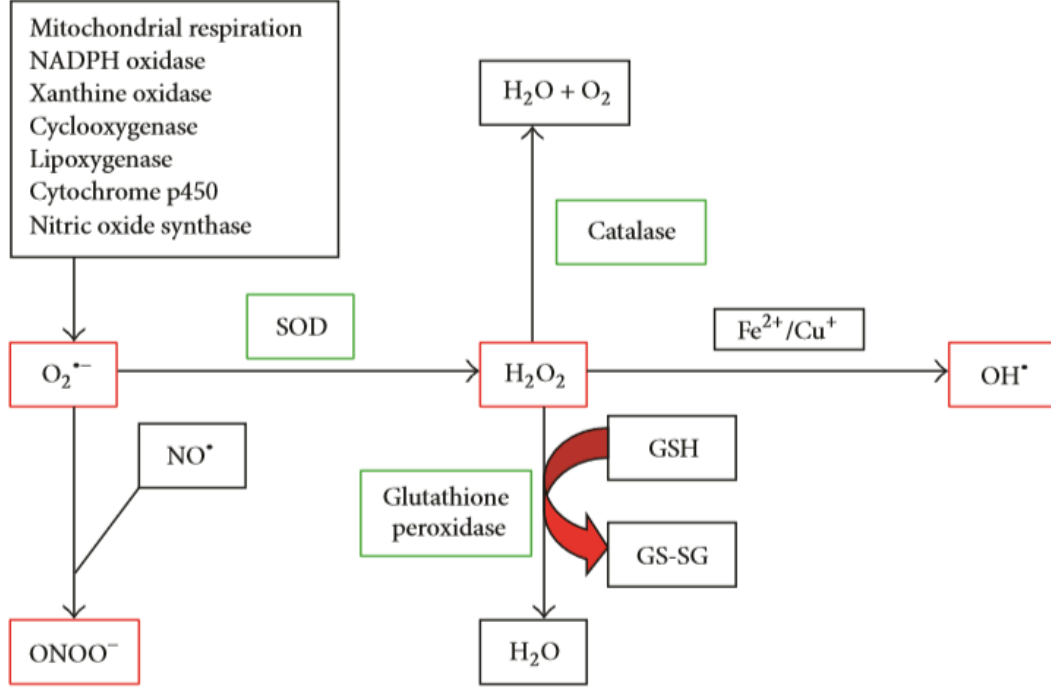


GSH, GPx'in katalitik etkisiyle lipit peroksitleri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi detoksifiye eder ya da singlet oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) ve OH•'ni temizler. Ayrıca GSH plazma membranından aminoasit transportunu sağlar, bazı önemli antioksidanları yeniden oluşturur. E vitamini ve C vitamini, GSH tarafından düzenlenir. Örneğin GSH direkt olarak E vitaminin'in tokoferol radikalini, dolaylı olarak da askorbatı semidehidroaskorbata indirgeyebilir (19).

**E Vitamini;** E vitamini, yağda çözünen yüksek antioksidan potansiyeli olan bir vitamindir. Bu vitamin, sekiz stereoizomeri olan asimetrik bir bileşiktir. Bu asimetrik formlar α, β, γ, δ tokoferol ve α, β, γ, δ tokotrienol olarak sınıflandırılmaktadır. İnsanlarda en biyoaktif formu α-tokoferoldür. α-tokoferol, serbest radikallerin zararlarına karşı hücre membranlarını korur. E vitamini serbest radikalleri kararlı hale getirerek peroksidasyon zincirini kırar ve bu olgu <sup>1</sup>O<sub>2</sub>'nin çoğunlukla OH•'ne ya da O<sub>2</sub><sup>•-</sup>'ye indirgenmesi ile gerçekleştirilir. E vitamini, radikallerin yok edilmesi, zincirin kırılması, bozulan yapıların onarılması ve endojen savunma sistemlerinin güçlendirilmesi gibi mekanizmaların tamamında görev yapabildiğinden antioksidan kapasitesi çok geniş ve yüksektir. Vitamin E'nin hücre zarında gösterdiği antioksidan etkiyi, hücre içerisinde genelde GPx üzerine alır. GPx ve α-tokoferol birbirlerini tamamlayıcı bir antioksidan etki gösterirler. α-tokoferol peroksitlerin oluşumunu engellerken, GPx oluşmuş olan peroksitleri ortadan kaldırır. E vitaminin antioksidan görevini yerine getirirken kendi bir radikal şekline dönüşür ve tekrar yenilenmesinde GSH, askorbik asit ve koenzim Q<sub>10</sub> görev alır.

**C Vitamini;** Askorbik asit olarak da bilinen C vitamini, suda çözünebilir bir vitamindir. Kollajen, karnitin ve nörotransmitter biyosentezi için gereklidir. C vitamini O<sub>2</sub>, hidroperoksil, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ozon, peroksinitrit, nitrojen dioksit, ve hipokloröz asit gibi ROS ve RNT'ni kolaylıkla temizler ve dolayısıyla oksidatif hasara karşı etkin bir şekilde koruma sağlar. C Vitamini, bu antioksidan görevlerinin yanı sıra,

$Fe^{+3}$ 'ü lipid peroksidasyonunu artıran  $Fe^{+2}$ 'ye dönüştürerek, oksidan bir davranış da göstermektedir (19, 24). Şekil 13'te oksidan-antioksidan reaksiyonlar gösterilmiştir.

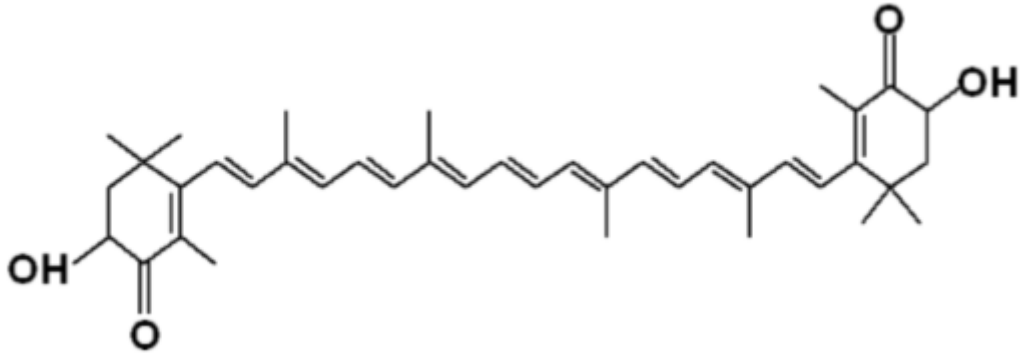


**Şekil 13.** Biyolojik Sistemle İlgili Başlıca Prooksidan-Antioksidan Reaksiyonlar (16)

## 2.4. Astaksantin

Astaksantin (ASTX), çeşitli mikroorganizmalarda ve deniz hayvanlarında bulunan bir ksantofil karotenoiddir. İnsan vücudunda pro- A vitamini aktivitesine sahip olmayan kırmızı, yağda çözünen bir pigmenttir. Ancak bazı çalışmalarda ASTX'nin diğer karotenoidlere göre daha güçlü biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Amerika Gıda ve İlaç Kurumu (US-FDA), hayvan ve balık yemlerinde gıda boyası olarak ASTX kullanımını onaylamıştır. Avrupa Komisyonu doğal ASTX bir gıda boyası olduğunu düşünmektedir. *Haematococcus pluvialis* yüksek tuzluluk, azot eksikliği, yüksek sıcaklık ve ışık gibi stres koşullarında maksimum astaksantin içeriğini biriktirebilen bir yeşil mikroalgdir. *H. pluvialis*'ten üretilen ASTX, insan tüketimi için ana kaynaktır. Somon, alabalık ve karides için yemde bir pigment kaynağı olarak kullanılır. Astaksantin tüketimi insanlarda ve hayvanlarda çeşitli rahatsızlıkların riskini azaltabilir veya önleyebilir (4)

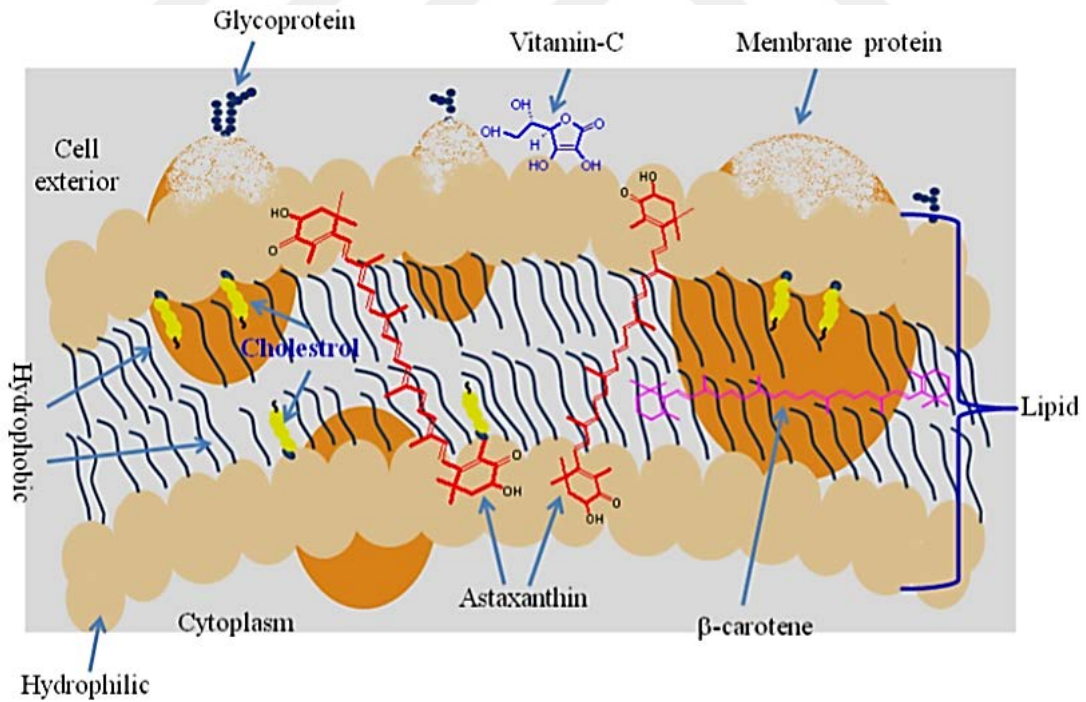
Astaksantin ksantofillerin bir üyesidir, çünkü sadece karbon ve hidrojen değil, aynı zamanda oksijen atomları içerir. Astaksantin, bir polien zinciriyle birleştirilen iki terminal halkasından oluşur. Bu molekülün her iki ucunda hidroksil grubu (-OH) ile  $\beta$ -iyonon halkasının 3, 3' pozisyonlarında yer alan iki asimetrik karbon bulunur. Bir -OH grubunun bir yağ asidi ile reaksiyona girmesi durumunda mono-ester, iki -OH grubunun yağ asitleri ile reaksiyona girmesi sonucu bir di-ester formlar şekil alır. ASTX,  $C_{40}H_{52}O_4$  moleküler formülüne sahiptir. Molar kütlesi 596.84 g/mol'dir (Şekil 14).



Şekil 14. Astaksantin Kimyasal Yapısı (4)

ASTX, lipofilik bileşik olup, çözücü ve yağlarda çözülebilir. Astaksantin ekstraksiyonu için solventler, yenilebilir yağlar, asitler, mikrodalga destekli ve enzimatik yöntemler kullanılır. Haematococcus'daki astaksantin, farklı asit muameleleriyle ekstrakte edilir, hidroklorik asit, pigmentin % 80'ine kadar geri kazanımı sağlar. Gıda, ilaç gibi uygulamalarda kullanılabilen ASTX pirinç kepeği, susam tohumu ve palmye yağları içinde 70-90°C sıcaklıklar arasında içeriği % 84-90'ını koruyup stabil iken, 120°C ve 150°C sıcaklıklar arasında içeriği azalır.

ASTX konjuge çift bağ, hidroksil ve keto grupları içerir. Hem lipofilik hem de hidrofilik özelliklere sahiptir. Bu tip konjuge çift bağ, elektronlarını vererek ve serbest radikaller ile reaksiyona girerek güçlü bir antioksidan görevi görür ve daha stabil bir ürün haline dönüşüp, çeşitli canlı organizmalarda serbest radikal zincir reaksiyonunu sonlandırır. Astaksantin diğer antioksidanlara göre daha iyi biyolojik aktivite gösterir, çünkü hücre zarına içeriden dışarıya bağlanabilir. Şekil 15'te hücre zarında astaksantin üstten görünümü gösterilmiştir (4).



Şekil 15. Hücre Zarında Astaksantin Üstten Görünümü (4)

Karotenoidler, vücuda lipitler gibi emilir ve lenfatik sistem yoluyla karaciğere nakledilir. Karotenoidlerin emilimi eşlik eden diyet bileşenlerine bağlıdır. Yüksek yağlı bir diyet, karotenoid emilimini artırabilirken, düşük yağlı bir diyet, emilimini azaltır.

Karotenoidler, zincir reaksiyonlarını sona erdirmek için  $^1O_2$ 'ni etkisizleştirip, radikalleri temizleyerek antioksidan aktiviteleri gerçekleştiren uzun zincirli çift bağları içeren polien (çoklu doymamış organik bileşik) içerir. ASTX, lutein, likopen,  $\alpha$ -karoten ve  $\beta$ -karoten gibi çeşitli karotenoidlere kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Haematococcus kaynaklı astaksantin ile beslenme sonrası sıçan plazması ve karaciğerinde bulunan CAT, SOD gibi antioksidan enzimler yükselir. ASTX, her bir iyonon halkasında yüksek antioksidan özelliklerinden sorumlu olan hidroksil ve keto gruplarının varlığında eşsiz bir moleküler yapı içerir. Astaksantin antioksidan aktivitesi, zeaksantin, lutein, kandeksin,  $\beta$ -karoten ve  $\alpha$ -tokoferolden 100 kat daha yüksektir. Astaksantin içindeki polien zinciri, hücre zarındaki radikalleri yakalarken, terminal halkası ise hücre zarının dış ve iç kısımlarındaki radikalleri temizleyebilir.

Astaksantin, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe ederek kısmen inflamasyonu inhibe eder. Bunun dışında, astaksantin anti-diyabetik ve anti-kanserojen aktivitelerini gösteren çalışmalar da bildirilmiştir (4).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

"Sisplatin ile Oluşturulan Deneysel Toksikite Modelinde Astaksantin Olası Koruyucu ve Antioksidan Rolü", adlı çalışmanın Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onayı alındı (13.02.2017- Onay yazısı ekte sunulmuştur). Çalışmamız İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi birimi (PROJE NO:1061) tarafından desteklenmiştir.

#### 3.1. Deneylerde Kullanılan Sarf Malzemeler ve Cihazlar

##### Sarf Malzemeler

- Eldiven: nitril standart ISOLAB
- Cam kalemi
- Astaxanthin, ≥97% (HPLC)- Sigma SML0982
- Cisplatin, Onco-Tain-Hospira
- Dimetilsülfoksit; (DMSO, Fisher)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı-Baxter)
- Eppendorf mikro pipet seti,
- Eppendorf Multichannel otomatik pipetler,
- Pipet rezervuarı-Isolab
- 1 ml, 10 ml steril enjektör
- 10 – 1000 µL hacim aralıklı pipet uçları
- 2,5 – 50 mL hacim aralıklı pipetör uçları
- Kurutma kağıdı, 40x40 cm (Isolab)
- Eppendorf tüp (1.5 ml)
- Bistüri ucu
- Parafilm- ISOLAB
- Thiobarbitürik asit-TBA (Sigma)
- Trikloroasetik asit-TCA (Sigma)
- Potasyum klorür -KCl (Sigma)
- Sodyum azid O- dianizidin (Sigma)
- Heksadecyltrimethylammonium bromid-HETAB (Sigma)
- Hidrojen peroksit-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)

- Di sodyum fosfat tamponu- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Sigma)
- Dithiobisnitrobenzoic acid -DTNB (Sigma)
- Hidroklorik asit -HCl (Sigma)
- Formaldehit-Merck
- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit-HEPES (Sigma)
- Di-potasyum karbonat- $\text{K}_2\text{CO}_3$
- Desferal
- Ethylendiamine Tetraacetic Acid (EDTA) Fisher
- Rat TNF- $\alpha$  Platinum ELISA Kit (BMS622- Ebioscience)
- Rat IL-6 Platinum ELISA Kit (BMS625- Ebioscience)
- Formaldehit-Merck
- Methanol-Merck
- Luminol (3-Aminophthalhydrazide) - Sigma A8511
- Lucigenin (N,N'-Dimethyl-9,9'-bisacridinium nitrate )-Sigma M8010

### Cihazlar

- Distile Su cihazı, Millipore Elix
- Absorbance plate reader+Nanodrop, ThermoScientific MultiSkanGo
- Mikro Plate Yıkayıcı- ThermoScientific
- Kar-Buz makinesi, Brema
- Derin dondurucu -86°, Panasonic
- No frost Buzdolabı (+4<sup>0</sup>, -20<sup>0</sup>), Bosch
- Santrifüj, Beckman Coulter
- Spektrofotometre - Shimadzu, UV-1280
- Hassas terazi- Shimadzu-TW423L
- Su banyosu-Wisebath
- Thermo-Shaker-Grant-Gio
- Santrifüj- Nüve NF800
- Santrifüj, soğutmalı- Thermo Scientific
- Homojenizatör-IKA-Ultra Turrax-T18
- pH metre-Hanna HI2221
- Vorteks-WiseMix VM-10
- Manyetik karıştırıcı-IKA C-MAG HS7



- Sinbo tekli ocak
- Luminometre (EG & G Berthold Mini Lumat LB 9506, Almanya)

### 3.2. Hayvan Deneyi

Çalışmamızda Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DEHAMER) 250-340 g ağırlığında yetişkin Sprague-Dawley erkek sıçanlar (n=32) temin edildi. Sıçanlar 20-22<sup>0</sup>C sıcaklıkta dörtlü olarak kafeslerde korundu. Laboratuvarda 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsünde, etik kurallara uygun olarak, yem su erişimi serbest olacak şekilde (*ad libitum*) bakım yapıldı.

Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce rastgele 4'lü gruplara ayrılarak, kafeslere konuldu ve ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Deney grupları aşağıdaki şekilde oluşturuldu:

#### **Deney Grupları:**

**Grup 1:** Sham Grubu (n=8)

**Grup 2:** Sisplatin Grubu (n=8)

**Grup 3:** Sisplatin+ Astaksantin Grubu (n=8)

**Grup 4:** Astaksantin Grubu (n=8)

Deneyin ilk gününde hayvanların bazal vücut ağırlıkları alınarak, günlük kilo takibi yapıldı. ASTX kullanılmadan önce 100 mg/ml zeytinyağı içinde çözüldü. Sisplatin sıvı formda olup direkt uygulandı. Sham grubuna 10 gün boyunca 1 ml zeytinyağı gavaj yoluyla verildi. Sisplatin grubuna 8 mg/kg/gün sisplatin ardışık üç gün boyunca günde bir kez (*ip.*) enjekte edildi. Sisplatin+astaksantin grubuna sisplatin uygulanmasından önce 7 gün boyunca ön tedavi olarak ASTX 100 mg/kg olacak şekilde gavaj yolu ile verilerek sisplatin uygulaması 8. günde başlanılıp 3 gün süre ile uygulandı. Bu 3 günde sisplatin ile beraber ASTX uygulaması da yapıldı. Tüm hayvanlara sisplatin aynı günlerde verildi. 7+3 gün sonunda hayvanlar, anestezi altında (Ksilazin hidroklorür 10 mg/kg ve ketamin hidroklorür 100 mg/kg) kalplerinden kan örnekleri alındıktan sonra sakrifiye edildi. Karaciğer, böbrek ve kalp dokuları çıkartılarak, biyokimyasal analizler için

ayrıldı. Ayrıca doku örneklerinden 5 mm<sup>3</sup>'lük doku örnekleri histolojik analizler için %10'luk tamponlu formole alındı. Kan örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılarak, analiz edilinceye dek -80<sup>0</sup>C'de saklandı.

### **3.3. Doku Lipit Peroksidasyonu (LPO) ve Glutasyon (GSH) Ölçümü**

Oksidan hasarın bir göstergesi olan lipid peroksidasyonun göstergesi MDA düzeyinin ve endojen antioksidan GSH miktarının ölçümü için, doku örnekleri 250-300 mg ağırlıklarında tartılıp üzerine 10 katına kadar % 10'luk TCA solüsyonu ile Ultra Turrax marka doku homojenizatöründe homojenize edildi. Daha sonra 3000 devir de 4<sup>0</sup>C'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 750 µL süpernatant alınıp üzerine 750 µL %0.67'lik TBA eklenip, 15 dk kaynatıldı. Buzda tutularak soğutuldu (Kaynatma sonrası eğer partikül varsa 3-4 dk daha santrifüj edilir). MDA düzeyi spektrofotometrede 535 nm absorbansta okunarak nmol/gr doku cinsinden ifade edildi (25). GSH ölçümü için modifiye Ellman yöntemi kullanıldı aynı homojenattan 250 µL süpernatant alınıp üzerine 1 mL 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,125 ml DTNB eklendi. GSH miktarı spektrofotometrik olarak 412 nm'de okundu ve µmol/gr doku olarak ifade edildi (26).

### **3.4. Doku Myeloperoksidaz (MPO) Düzeylerinin Ölçümü**

Nötrofiller tarafından kullanılan antibakteriyal savunma mekanizması myeloperoksidaz enzimidir. O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin dismutasyonu sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MPO enzimi aracılığı ile reaksiyona girerek güçlü bir antibakteriyal ajan olan hipoklorik asidi oluşturur (27).

MPO aktivitesi ölçümü için, 0,25-0,3 gram ağırlığındaki doku örnekleri % 0,5'lik HETAB (50 mM potasyum fosfat tamponu içinde; pH 6) içinde 10 kat sulandırılıp, homojenize edildikten sonra, 12.000 rpm'de 10 dakika süreyle 4<sup>0</sup>C'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet, aynı hacimde % 0,5'lik HETAB içeren 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile yeniden homojenize edildi. Daha sonra o-dianisidin.2HCl (20 mg/ml) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) + pellet olacak şekilde 37<sup>0</sup>C'de 3 dakika inkübasyon yapıldı. Reaksiyon % 2'lik sodyum azid ile durdurulduktan sonra tüpler 4<sup>0</sup>C'de 12.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve absorban değerleri

460 nm'de okundu. MPO aktivitesi, o-dianizidin.2HCl'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenerek, enzim aktivitesi U/gr doku olarak ifade edildi (28, 29).

### 3.5. Doku Kemilüminesans (KL) Ölçümü

#### Kemilüminesans ölçümleri

Sakrifikasyon sonrası alınan karaciğer, böbrek veya kalp dokuları bistüri yardımıyla 10-20 mg'lık küçük parçalara ayrıldı. Sonra 2 mL PBS + HEPES (0,5 M PBS ve 20 mM HEPES) tamponu içeren sayım tüplerine aktarıldı. Kemilüminesans ölçümler luminometrede (EG & G Berthold Mini Lumat LB 9506, Almanya) luminol ve lusigenin probaları kullanılarak yapıldı. Lusigenin aracılı ölçüm ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> saptanırken, luminol aracılı ölçüm ile OH•, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipoklorit asit ve hidroperoksil radikalleri saptanmaktadır. Luminol (0,2 mM) ve lusigenin (0,2 mM) probu eklenen sayım tüpleri luminometrede 1 dakikalık aralıklarla 5 dakika süreyle okutuldu (30).

#### Nitrik oksit (NO) salınımı ölçümü

NO salınım ölçümü için saflaştırılmış luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemi kullanıldı Bu amaçla, 2 mL PBS + HEPES tamponu içine alınan dokuların üzerine sırasıyla K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,4 mM), desferal (60 µM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 mM) ve luminol-sodyum tuzu (3,6 µM) eklenerek, luminometrede sayım 5 dakika süreyle gerçekleştirildi (31).

Kemilüminesans ölçümlerin sonunda dokular sayım tüplerinden alındı, sıvıları filtre kâğıdına emdirildikten sonra kuru ağırlıkları alındı. Sonuçlar eğri altı alan (AUC) hesaplanarak doku ağırlığına oranlandı. Sonuçlar *relatif light unit* (rlu/mg doku) cinsinden ifade edildi (31).

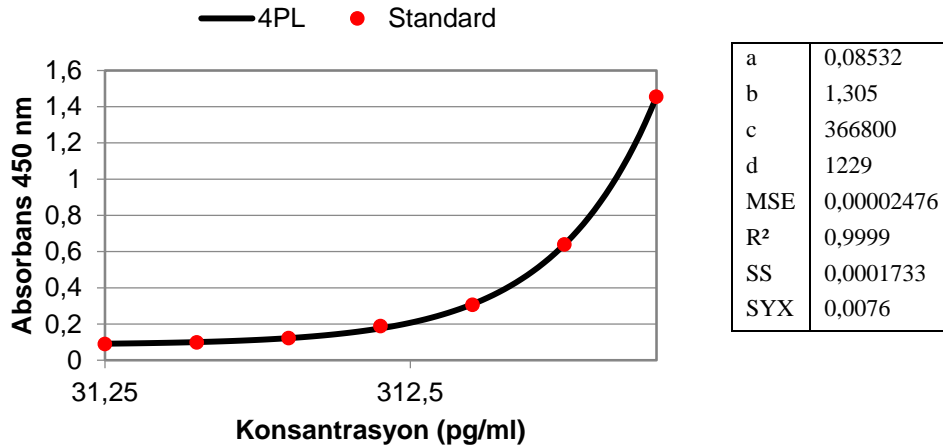
### 3.6. Sitokinlerin Tayini

#### 3.6.1. IL-6 Ölçümü

İnterlökin-6 (IL-6), immün yanıtları, akut faz reaksiyonlarını ve hematopoezi düzenleyen çok fonksiyonlu bir sitokindir ve konak savunma mekanizmalarında merkezi bir rol oynayabilir. IL-6 genellikle normal hücreler tarafından yapısal

olarak üretilmez, ancak ekspresyonu çeşitli sitokinler, lipopolisakkarid veya viral enfeksiyonlar tarafından kolayca indüklenir.

Serum IL-6 düzeyleri, Invitrogen Ebioscience Sıçan IL-6 platinum (BMS625) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak tayin edildi. Bu ticari kitin uygulanmasında numune veya standartta bulunan IL-6, mikro kuyucuklara emdirilmiş antikorlara bağlanır. Bir biotin-konjugatı eklenir ve birinci antikor tarafından yakalanan serum IL-6'ya bağlanır. İnkübasyonun ardından bağlanmamış biyotin-konjuge anti-sıçan IL-6 antikoruna, yıkama aşaması sırasında uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP eklenir ve biyotin-konjuge anti-sıçan IL-6 antikoruna bağlanır. İnkübasyonun ardından, bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama aşaması ile uzaklaştırılır ve HRP ile reaktif olan substrat çözeltisi kuyucuklara ilave edilir. Örnek veya standartta bulunan sıçan IL-6 miktarına orantılı olarak renkli bir ürün oluşur. Reaksiyon, asit ilavesiyle sona erdirilir ve absorbans, 450 nm'de ölçülür. Standart bir eğri, sıçan IL-6 standart dilüsyon serisinin absorbans-konsantrasyon miktarından çizilir ve sıçan IL-6 numune konsantrasyonu da bu eğrinin formülünden hesaplanır (Şekil 16).

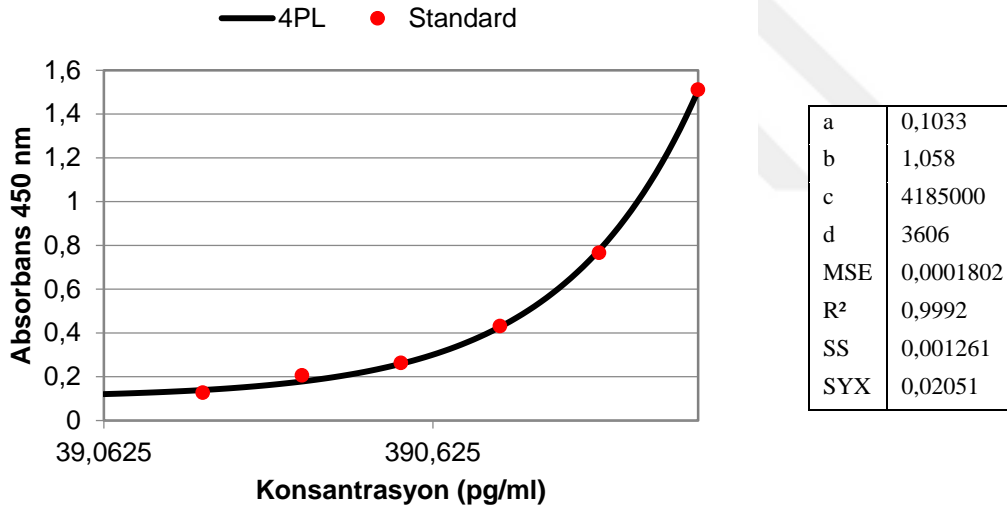


Şekil 16. IL-6 Standart Grafiği

### 3.6.2. TNF- $\alpha$ Ölçümü

Serum TNF- $\alpha$  düzeyleri Invitrogen Ebioscience Rat TNF-alpha platinum (BMS622) kantitatif ELISA test kiti kullanılarak ölçüldü. Yukarıdaki IL-6 protokolü ile aynı ölçüm metodu kullanıldı.

Plate yıkama işleminden sonra bilinen konsantrasyondaki TNF- $\alpha$  standartları, kontroller ve bilinmeyen örnekler kuyucuklara pipetlenir. Daha sonra biyotin ile konjuge edilmiş ikincil antikorlar eklenir. Tekrar yıkama işleminden sonra streptavidin ile konjuge peroksidaz enzimi eklenir. Üçüncü yıkamadan sonra bağlanmayan enzimler yıkama işlemiyle ekarte edilir. Substrat solüsyonu ilave edilerek bağlı enzimlerin reaksiyonuyla renk değişimi gözlenir. Renk şiddeti TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ile orantılı olarak değişim gösterir (Şekil 17).



Şekil 17. TNF- $\alpha$  Standart Grafiği

### 3.7. Serum Örneklerinde Analiz Edilen Biyokimyasal Parametreler

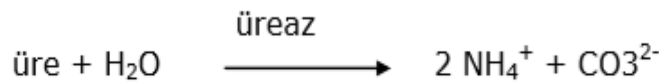
Böbrek fonksiyonlarındaki olası bozukluğu tespit etmek için kan üre azotu (BUN) ve Kreatinin düzeylerinin ölçümü gerçekleştirildi. Karaciğer dokusu olası fonksiyon bozukluğunu tespit etmek amacıyla biyokimyasal olarak serum örneklerinde aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT), Kalp dokusu için de High sensitivity troponin I (HsTnI) seviyeleri incelendi. Ayrıca gruplar arasında total protein seviyelerinde farklılık olup olmadığına

baktık. Son olarak oksidan-antioksidan seviyelerin serum düzeyinde yansımaları görmek için total oksidan ve antioksidan seviyeyi de değerlendirdik.

Serumda baktığımız BUN, Kreatinin, ALT, AST, Total Protein, TAS, TOS, HsTnI gibi parametreler klinik biyokimya laboratuvarında protokolleri aplike edilmiş otomatize cihazlar (Modular Systems (Abbott Diagnostics) yardımıyla ölçüldü.

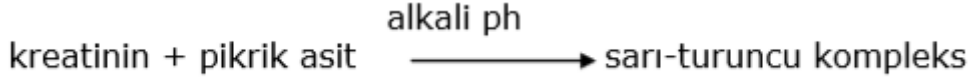
### 3.7.1. BUN Ölçüm Test Prensipleri

*Blood Urea Nitrogen* (BUN) testi ilk olarak Talke ve Schubert tarafından açıklanan tamamen enzimatik bir prosedürün modifikasyonudur. Test, reaksiyonun ilk hızının sınırlı bir süre için lineer olduğu kinetik bir test olarak gerçekleştirilir. Örnek içindeki üre, üreaz tarafından amonyak ve karbondioksit hidrolize edilir. Glutamat dehidrojenaz (GLD) ile katalize edilen ikinci bir reaksiyon, azaltılmış nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) eşzamanlı oksidasyonu ile birlikte amonyağı ve  $\alpha$ -ketoglutaratı glutamat ve suya dönüştürür. Mevcut her mol üre için iki mol NADH okside edilir. 340 nm'deki absorbans düşüşünün başlangıç hızı örnekteki üre konsantrasyonu ile orantılıdır.



### 3.7.2. Kreatinin Ölçüm Test Prensipleri:

Alkali bir pH'de, numunedeki kreatinin, bir kreatinin-pikrat bileşeni oluşturmak için pikrat ile reaksiyona girer. Bu bileşenin oluşması nedeniyle 500 nm'ye kadar yükselmiş absorbans oranı numunedeki kreatinin konsantrasyonuna doğrudan orantılıdır.



### 3.7.3. ALT Ölçüm Test Prensi

ALT denge reaksiyonunu katalizlemiştir. Piruvattaki artış laktat dehidrogenaz ile kataliz edilen bir indikatör reaksiyonunda belirlenmiştir. NADH NAD<sup>+</sup>'ya okside edilmiştir. NADH'da meydana gelen azalma piruvat oluşumu ile ve ALT aktivitesi ile doğru orantılı olarak belirlenmiştir.



ALT enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Piruvattaki artış, laktat dehidrogenazın katalize ettiği bir indikatör reaksiyonunda tayin edilir.



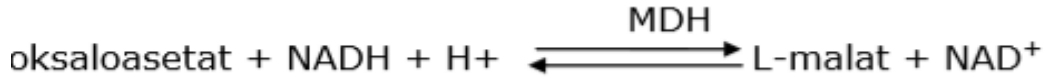
NADH, NAD<sup>+</sup>'ya yükseltgenir. NADH'ın NAD'ye oksitlenmesine bağlı olarak 340 nm'deki absorbans, düşüş oranının ölçümü ile izlenir. Fotometrik olarak tayin edilen NADH'nin azalma hızı, piruvatın oluşma hızı ve böylelikle ALT aktivitesiyle doğru orantılıdır.

### 3.7.4. AST Ölçüm Test Prensi

AST denge reaksiyonunu katalizlemiştir. Okzaloasetattaki artış malat dehidrogenaz ile kataliz edilen bir indikatör reaksiyonunda belirlenmiştir. NADH NAD<sup>+</sup>'ya okside edilmiştir. NADH'da meydana gelen azalma oksaloasetat oluşumu ile ve AST aktivitesi ile doğru orantılı olarak ölçülmüştür.



AST enzimi bu denge reaksiyonunu katalize eder. Oksaloasetattaki artış, malat dehidrogenazın katalize ettiği bir indikatör reaksiyonunda tayin edilir.



NADH, NAD<sup>+</sup>'ya yükseltgenir. Fotometrik olarak tayin edilen NADH'nin azalma hızı, oksaloasetatın oluşma hızı ve böylelikle AST aktivitesiyle doğru orantılıdır.

### 3.7.5. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Serum TAS seviyeleri piyasadaki mevcut tanı kitleri vasıtasıyla çalışıldı (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye). Bu metoda göre; Fe<sup>2+</sup>-o-dianisidine kompleksi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak, OH• radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. O-dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı. Örnekler spektrofotometrik olarak okutulduktan sonra sonuçlar mmol/L olarak hesaplandı.

### 3.7.6. Total Oksidan Seviye (TOS)

Serum TOS seviyeleri piyasadaki mevcut tanı kitleri vasıtasıyla çalışıldı (Rel Assay, Gaziantep, Türkiye). Bu metoda göre serumda bulunan oksidanlar, ferröz iyonu ferrik iyonla dönüştürürler. Ferrik iyonlar, asidik ortamda xilenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırmaktadır. Serumda bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti, spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı ve sonuçlar µmol/L olarak hesaplandı .

### 3.7.7. Total Protein Ölçümü

En az iki peptid bağı içeren polipeptidler biüre reaktifi ile reaksiyona girer. Alkalin çözeltide bakır iyonu, bir protein-nitrojen temelinde albümin ile globulin arasında çok az bir farkla protein nitrojen ile bir koordinasyon kompleksi oluşturur.



### 3.7.8. Yüksek Duyarlılıklı Kardiyak Troponin I (HsTnI)

Yüksek Duyarlılıklı-Troponin-I ölçümü , serum ve plazmada bulunan cTnI'nin belirlenmesi için CMIA teknolojisi ile Chemiflex olarak tanınan esnek protokoller kullanan 2 adımlı (two step) bir immünolojik tetkiktir. İlk adımda, örnek ve anti-troponin I antikoru kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Örnekte mevcut kardiyak troponin I, anti-troponin I kaplı mikropartiküllere tutunur. İnkübasyon ve yıkamadan sonra, ikinci adımda anti-troponin I akridinium etiketli konjugatı reaksiyon karışımına ilave edilir. Diğer bir inkübasyon ve yıkama dönüşümünden sonra pretrigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karışımına ilave edilir. Elde edilen kemilüminesan reaksiyon bağılı ışık üniteleri (rlu'lar) olarak ölçülür. Örnekteki cTnI miktarı ve ARCHITECT i System'i optik sistemleri ile tespit edilen rlu'lar arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. cTnI konsantrasyonu bilinen cTnI konsantrasyonlarının kalibratörlerinden gerçekleşen bir standart eğriye karşı rölatifdir.

### 3.8. Histokimyasal Değerlendirme

**Işık Mikroskopisi Yöntemi;** Dekapitasyon sonrası alınan doku örnekleri histokimyasal değerlendirme için alınan karaciğer, kalp ve böbrek dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 24 saat boyunca tespit edildi. Ardından dokular %70'den başlanarak sırasıyla %90, %96 ve %100 oranında yükselen etil alkol serilerinden geçirilip daha sonra ksilende saydamlaştırma işlemine tabi tutularak, doku takibi aşaması tamamlandı. Takip aşaması tamamlanan dokular 24 saat süreyle 60<sup>0</sup>C sıcaklığında sıvı parafin içerisinde bekletildi. Dokular, gömme kabini (Thermo Fisher Scientific, Shandon Histostar) kullanılarak parafin ile kasetler içerisine gömülüp ardından soğuk zemin üzerinde donmaları sağlanarak bloklandılar. Histolojik boyamalar için hazırlanan parafin bloklardan mikrotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Microm HM 340 E) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı. Sonuçlar Olympus Bx53 ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

**Hematoksilen ve Eozin Boyama;** Kesitler ksilen ile deparafinize edildikten sonra sırasıyla %100, %96, %90 ve %70 oranında inen alkol serilerinden geçirilerek yapılan rehidratasyon işleminin ardından distile su ile yıkandı. Genel doku morfolojisinin incelenmesi için hematoksilen ve eozin boyaması yapıldı. Kesitler

Harris hematoksilin ile 10 dakika boyandıktan sonra 30 dakika boyunca akar musluk suyu altında mordanlama yapıldı. Daha sonra kesitlere 5 dakikalık eozin boyamasının ardından distile su ile yıkandı. Boyama işlemi tamamlanan kesitler dehidrate edilmek üzere sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 oranında çıkan alkol serilerinde bekletildi. Kesitler, ksilende 2 dakika boyunca saydamlaştırıldıktan sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.9. İstatistiksel Analiz**

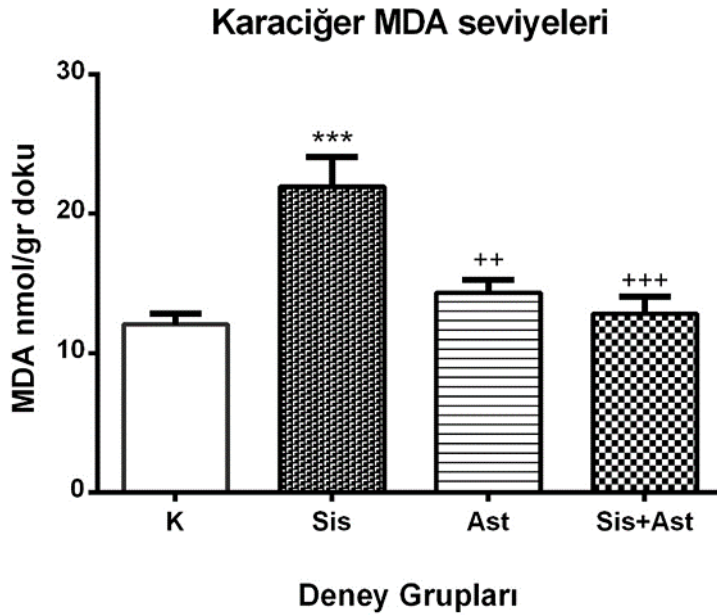
Öncelikle gruplar arasındaki değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadığı analiz edildi. Parametrik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analiz (Oneway ANOVA) testi kullanıldı. Grupların karşılaştırılması tek yönlü varyans analiz (ANOVA) sonrası Tukey-Kramer çoklu testi ile değerlendirildi. Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde ifade edildi. p değerinin 0,05'den küçük olması ( $p < 0,05$ ) durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Instat 3.0 istatistik paket programı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda sispilin uygulaması ile oluşturulan deneysel toksisite modelinde sıçan kalp, karaciğer, böbrek dokuları ile kanları alınarak, dokuda oksidatif stres parametrelerinden MDA, GSH, MPO ve kemilüminesans (KL) yöntemi ile luminol ve lusigenin aracılı serbest radikal ölçümü ve NO salınımı ölçümleri ile serumda doku hasar belirteçlerinden ALT, AST, BUN, Kreatinin, HsTnI, oksidatif stres göstergelerinden TAS, TOS, sitokinlerden TNF- $\alpha$  ve IL-6 ve total protein bakıldı. Bulgular aşağıdaki gibidir:

### 4.1. Karaciğer Dokusu MDA, GSH, MPO ve KL Ölçümleri

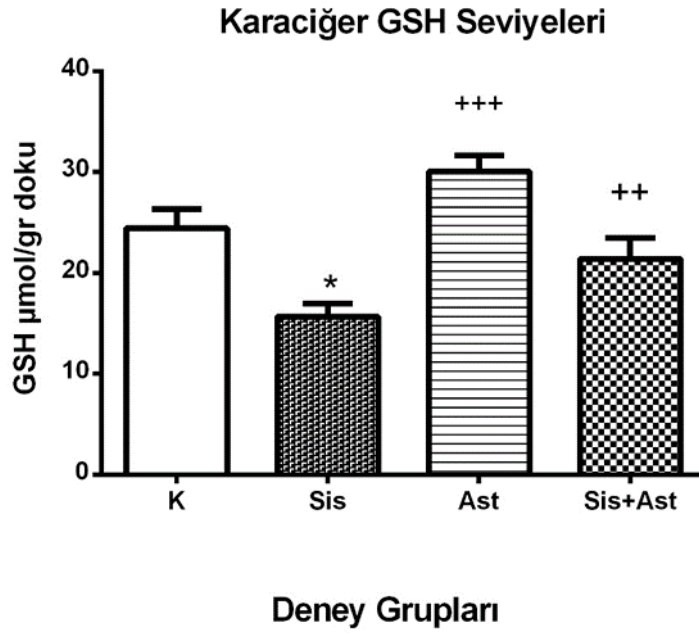
Çalışma gruplarımızın karaciğer dokusuna ait sırasıyla MDA, GSH, MPO ve KL ölçüm değerlerinin istatistiksel değerlendirmeleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



**Şekil 18.** Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri. \*\*\* $p < 0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında, \*\* $p < 0.01$  ve \*\*\* $p < 0.001$  sispilin grubu ile karşılaştırıldığında.

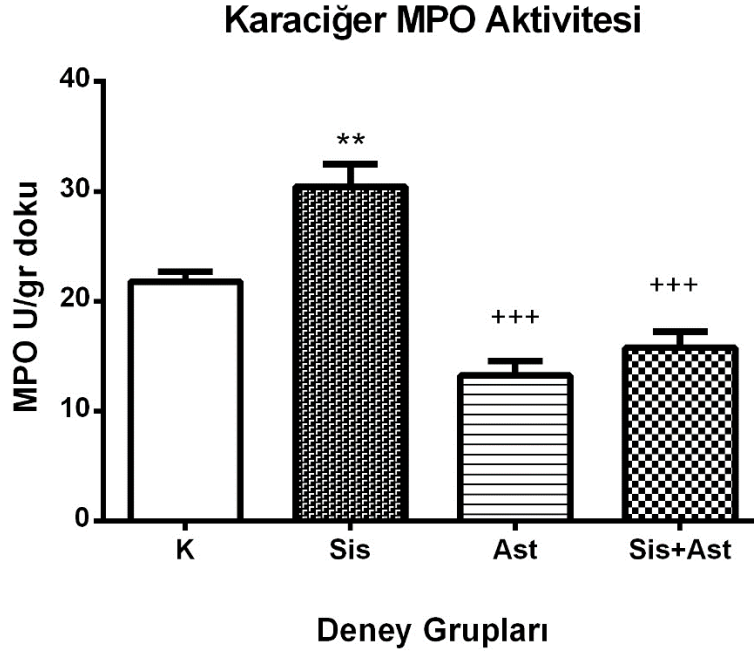
Deney gruplarına ait karaciğer dokularının MDA sonuçları değerlendirildiğinde sırasıyla kontrol grubunda  $12.1 \pm 0.8$  nmol/g doku, sispilin grubunda  $21.9 \pm 2.1$  nmol/g doku, astaksantin grubunda  $14.3 \pm 0.1$  nmol/g doku, sispilin+astaksantin

grubunda  $12.8 \pm 1.2$  nmol/g doku olarak saptandı. İstatistiksel değerlendirme sonucunda sislartin grubu kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı farklı ( $p < 0.001$ ) bulunurken, astaksantin ve sislartin+astaksantin grupları sislartin grubu ile karşılaştırıldığında sırası ile  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$  olarak anlamlı düştüğü tesbit edildi.



**Şekil 19.** Karaciğer Dokusunda GSH Düzeyleri. \* $p < 0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$  ve ++ $p < 0.01$  sislartin grubu ile karşılaştırıldığında.

Çalışma gruplarımızın karaciğer dokusu GSH değerleri hesaplandığında sırasıyla; kontrol grubunda  $24.4 \pm 1.9$   $\mu\text{mol/g}$  doku, sislartin grubunda  $15.7 \pm 1.3$   $\mu\text{mol/g}$  doku, astaksantin grubunda  $30.0 \pm 1.6$   $\mu\text{mol/g}$  doku, sislartin+astaksantin grubunda  $21.4 \pm 2.1$   $\mu\text{mol/g}$  doku olduğu belirlendi. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda sislartin grubunun GSH değerinin kontrol grubu GSH düzeyi ile karşılaştırıldığında anlamlı farklı ( $p < 0.05$ ) olduğu tesbit edildi. Astaksantin ve sislartin+astaksantin gruplarının GSH değerleri sislartin grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla  $p < 0.001$  ile  $p < 0.01$  olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu belirlendi.



**Şekil 20.** Karaciğer Dokusu MPO Aktivitesi. \*\*  $p < 0.01$  kontrol ile karşılaştırıldığında, +++  $p < 0.001$  sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Deney gruplarımızın karaciğer dokusu MPO aktivitesi tayin edildiğinde sırası ile kontrol grubunda  $21.8 \pm 0.9$  U/g doku, sisplatin grubunda  $30.4 \pm 2.1$  U/g doku, astaksantin grubunda  $13.2 \pm 1.4$  U/g doku, sisplatin+astaksantin grubunda  $15.8 \pm 1.4$  U/g doku olarak belirlendi. Yapılan istatistikî analizin sonucunda sisplatin grubunun MPO aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ( $p < 0.01$ ), astaksantin ve sisplatin+astaksantin gruplarının MPO aktivitesinin ise sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı olarak düşük olduğu tesbit edildi (her iki grup için  $p < 0.001$ ).

| Karaciğer                    | Kontrol Grubu | Sisplatin Grubu | Astaksantin Grubu      | Sisplatin+ Astaksantin Grubu |
|------------------------------|---------------|-----------------|------------------------|------------------------------|
| <b>Luminol KL (rlu/mg)</b>   | 5.5±0.8       | 10.4±0.9**      | 4.9±0.4 <sup>++</sup>  | 4.9±1.4 <sup>++</sup>        |
| <b>Lusigenin KL (rlu/mg)</b> | 5.6±0.6       | 14.2±1.3***     | 8.7±0.9 <sup>++</sup>  | 2.9±0.4 <sup>+++</sup>       |
| <b>NO Salınımı (rlu/mg)</b>  | 5.7±0.4       | 11.7±0.8***     | 6.1±0.7 <sup>+++</sup> | 2.5±0.3 <sup>+++</sup>       |

**Tablo 3.** Karaciğer Dokusu KL Ölçüm Sonuçları. \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>++</sup>p<0.01 ve <sup>+++</sup>p<0.001 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

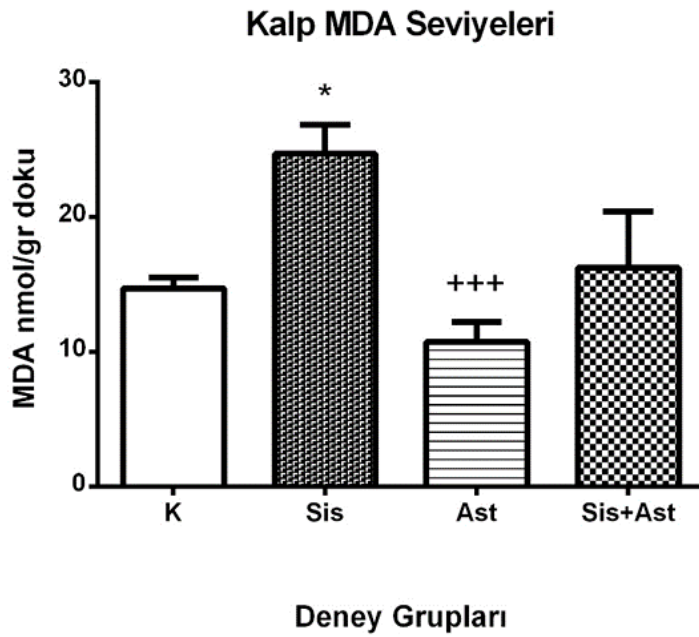
Karaciğer dokusu luminol aracılı KL değerleri tayin edildiğinde sonuçlar sırasıyla kontrol grubunda 5.5±0.8 rlu/mg, sisplatin grubunda 10.4±0.9 rlu/mg, astaksantin grubunda 4.9±0.4 rlu/mg, sisplatin+astaksantin grubunda 4.9±1.4 rlu/mg doku olarak belirlendi. İstatiksel olarak incelendiğinde sisplatin grubunun luminol aracılı KL değerinin anlamlı olarak arttığı (p<0.01), astaksantin ve sisplatin+astaksantin grubunda ise anlamlı olarak düşük olduğu belirlendi (her iki değer için p<0.01).

Lusigenin aracılı KL ölçümleri karaciğer dokusunda sırasıyla kontrol grubunda 5.6±0.6 rlu/mg, sisplatin grubunda 14.2± 1.3 rlu/mg, astaksantin grubunda 8.7± 0.9 rlu/mg doku, sisplatin+astaksantin grubunda 2.9±0.4 rlu/mg doku olarak ölçüldü. Yapılan istatiksel analiz sonucunda lusigenin aracılı KL ölçümlerinin sisplatin grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı farklı olarak arttığı belirlendi (p<0.001). Astaksantin grubunun lusigenin aracılı KL değeri ile sisplatin grubu arasında anlamlı fark varken (p<0.01), sisplatin+astaksantin grubunun lusigenin aracılı KL değerinin ileri derecede anlamlı olarak düştüğü tesbit edildi (p<0.001).

Karaciğer dokusunda NO salınımı tayin edildiğinde, ölçüm sonuçları sırasıyla kontrol grubunda  $5.7 \pm 0.4$  rlu/mg, sisplatin grubunda  $11.7 \pm 0.8$  rlu/mg, astaksantin grubunda  $6.1 \pm 0.7$ , sisplatin+astaksantin grubunda  $2.5 \pm 0.3$  rlu/mg olarak saptandı. İstatistiksel inceleme sonucunda sisplatin grubunun NO salınımının kontrol grubu NO salınımı ile karşılaştırıldığında, ileri derecede anlamlı farklı ( $p < 0.001$ ) olduğu, astaksantin uygulamasının da sisplatin+astaksantin grubu NO salınımını ileri derecede anlamlı farklı olarak düşürdüğü ( $p < 0.001$ ) belirlendi. Astaksantin grubunun NO salınımı da sisplatin grubu ile ileri derecede anlamlı farklı ( $p < 0.001$ ) idi.

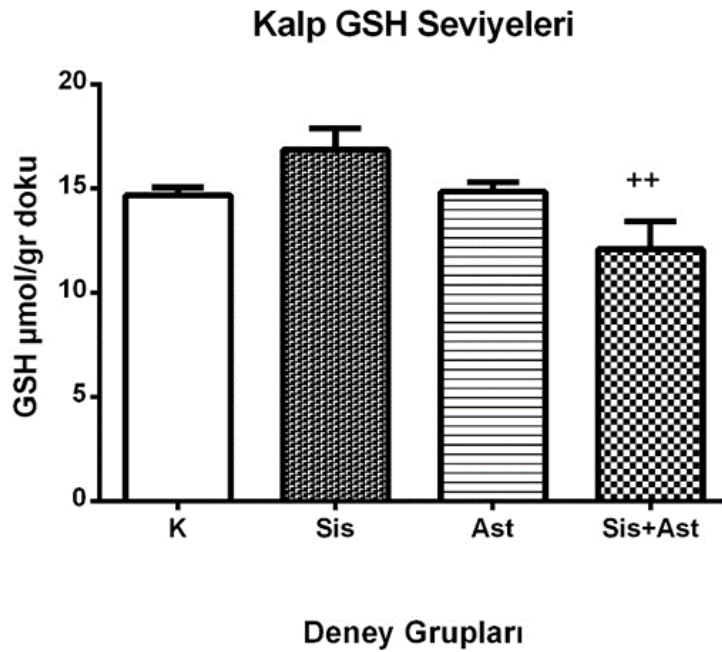
#### 4.2. Kalp Dokusu MDA, GSH, MPO ve KL Ölçümleri

Çalışma gruplarımızın kalp dokusuna ait sırasıyla MDA, GSH, MPO ve KL ölçüm değerlerinin istatistiksel değerlendirmeleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



**Şekil.21.** Kalp Dokusunda MDA Düzeyleri. \* $p < 0.05$  kontrol ile karşılaştırıldığında, +++ $p < 0.001$ , sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Deney sonucu elde edilen kalp dokularındaki MDA değerleri karşılaştırıldığında sırası ile kontrol grubunda  $14.7 \pm 0.8$  nmol/g doku, sisplatin grubunda  $24.7 \pm 2.2$  nmol/g doku, astaksantin grubunda  $10.7 \pm 1.5$  nmol/g doku, sisplatin +astaksantin grubunda  $16.2 \pm 4.2$  nmol/g doku olarak tayin edildi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sisplatin grubu kontrol grubuna göre anlamlı yüksek ( $p < 0.05$ ) bulunurken, astaksantin grubu sisplatin grubuna göre ileri derecede anlamlı düşük ( $p < 0.001$ ) olarak saptandı. Sisplatin+astaksantin grubu kalp dokusu MDA düzeyleri sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında düşük olmasına rağmen arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p > 0.05$ ).

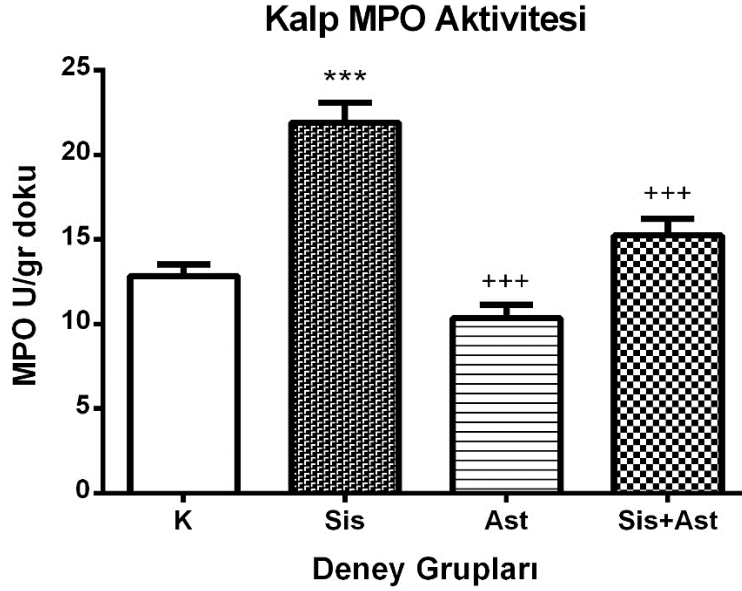


**Şekil 22.** Kalp Dokusunda GSH Düzeyleri. ++ $p < 0.01$  sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Kalp dokusu GSH değerleri sırası ile kontrol grubunda  $14.7 \pm 0.4$   $\mu\text{mol/g}$  doku, sisplatin grubunda  $16.8 \pm 1.0$   $\mu\text{mol/g}$  doku, astaksantin grubunda  $14.8 \pm 0.5$   $\mu\text{mol/g}$  doku, sisplatin+astaksantin grubunda  $12.1 \pm 1.3$   $\mu\text{mol/g}$  doku olarak belirlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir



farklılık olmadığı ( $p>0.05$ ), sadece sisplatin+astaksantin grubu kalp GSH düzeyinin sisplatin grubuna göre hafif düşük olduğu ( $p<0.01$ ) saptandı.



**Şekil 23.** Kalp Dokusunda MPO Düzeyleri. \*\*\* $p<0.001$  kontrol ile karşılaştırıldığında, +++ $p<0.001$ , sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Kalp dokusunun MPO aktivitesi gruplar içinde sırası ile kontrol grubunda  $12.8\pm 0.7$  U/g doku, sisplatin grubunda  $21.9\pm 1.2$  U/g doku, astaksantin grubunda  $10.4\pm 0.8$  U/g doku, sisplatin+astaksantin grubunda  $15.3\pm 1.0$  U/g doku olarak belirlendi. İstatistiksel analiz sonrasında kalp dokularında sisplatin grubunun MPO aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı farklı olduğu ( $p<0.001$ ) saptandı. Sisplatin + astaksantin tedavi grubu ile sadece astaksantin grubunun MPO aktivitesi ise sisplatin grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ( $p<0.001$ ).

| Kalp                         | Kontrol Grubu | Sisplatin Grubu | Astaksantin Grubu          | Sisplatin+Astaksantin Grubu |
|------------------------------|---------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>Luminol KL (rlu/mg)</b>   | 5.5±0.5       | 14.0±1.4**      | 12.4±1.4                   | 14.5±2.4                    |
| <b>Lusigenin KL (rlu/mg)</b> | 7.6±1.3       | 19.3±2.0***     | 9.6±0.8 <sup>++</sup>      | 13.2±2.0                    |
| <b>NO Salınımı (rlu/mg)</b>  | 551.5±86.0    | 305.0±51.0      | 1452.0±297.9 <sup>++</sup> | 895.2±274.5                 |

**Tablo 4.** Kalp Dokusu KL Ölçüm Sonuçları. \*\* p<0.01 ve \*\*\* p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, <sup>++</sup>p<0.01 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Kalp dokusu luminol aracılı KL değerleri tayin edildiğinde sonuçlar sırasıyla kontrol grubunda 5.5±0.5 rlu/mg, sisplatin grubunda 14.0±1.4 rlu/mg, astaksantin grubunda 12.4±1.4 rlu/mg, sisplatin+astaksantin grubunda 14.5±2.4 rlu/mg doku olarak belirlendi. İstatiksel olarak incelendiğinde sisplatin grubunun luminol aracılı KL değerinin anlamlı olarak arttığı saptandı (p<0.01). Sisplatin+astaksantin grubunda ise anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (p>0.05).

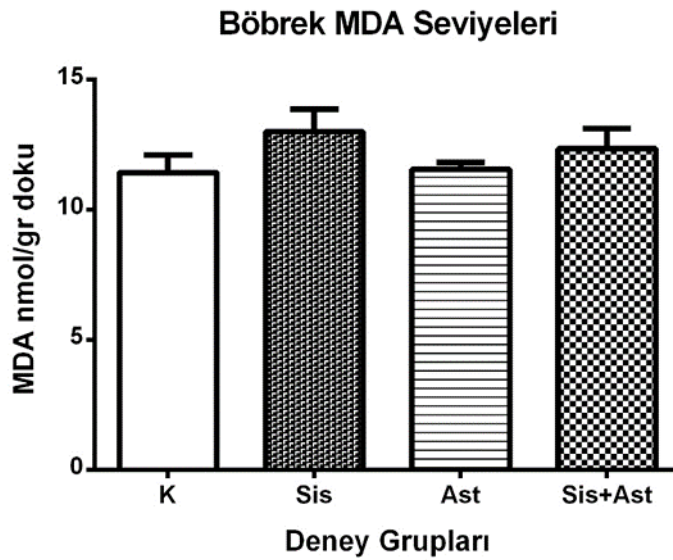
Lusigenin aracılı KL ölçümleri kalp dokusunda sırasıyla kontrol grubunda 7.6±1.3 rlu/mg, sisplatin grubunda 19.3± 2.0 rlu/mg, astaksantin grubunda 9.6± 0.8 rlu/mg doku, sisplatin+astaksantin grubunda 13.2±2.0 rlu/mg doku olarak ölçüldü. Yapılan istatiksel analiz sonucunda lusigenin aracılı KL ölçümlerinin sisplatin grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı farklı olarak arttığı belirlendi (p<0.001). Astaksantin grubunun lusigenin aracılı KL değeri ile sisplatin grubu arasında anlamlı fark saptandı (p<0.01). Sisplatin+astaksantin grubunun sisplatin grubuna göre lusigenin aracılı KL değerinde anlamlı bir farklılık tesbit edilmedi (p>0.05).

Kalp dokusunda NO salınımı tayin edildiğinde, ölçüm sonuçları sırasıyla kontrol grubunda 551.5±86.0 rlu/mg, sisplatin grubunda 305.0±51.0 rlu/mg, astaksantin grubunda 1452.0±297.9 rlu/mg, sisplatin+astaksantin grubunda 895.2±274.5 rlu/mg olarak saptandı. İstatistiksel inceleme sonucunda gruplar arası

karşılaştırma yapıldığında sadece astaksantin grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı olarak bir artış varken ( $p<0.01$ ), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

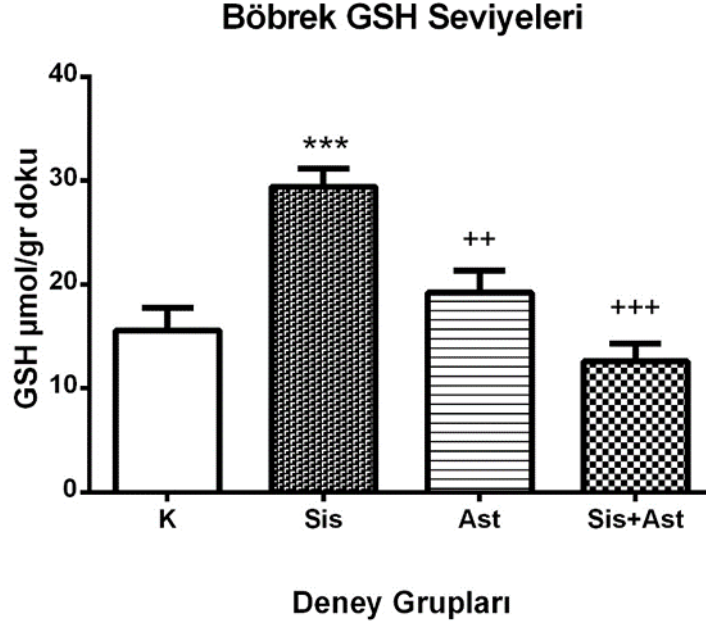
#### 4.3. Böbrek MDA, GSH, MPO ve Kemilüminesans Ölçümleri

Çalışma gruplarımızın böbrek dokusuna ait sırasıyla MDA, GSH, MPO ve KL ölçüm değerlerinin istatistiksel değerlendirmeleri aşağıdaki grafikler de gösterilmiştir.



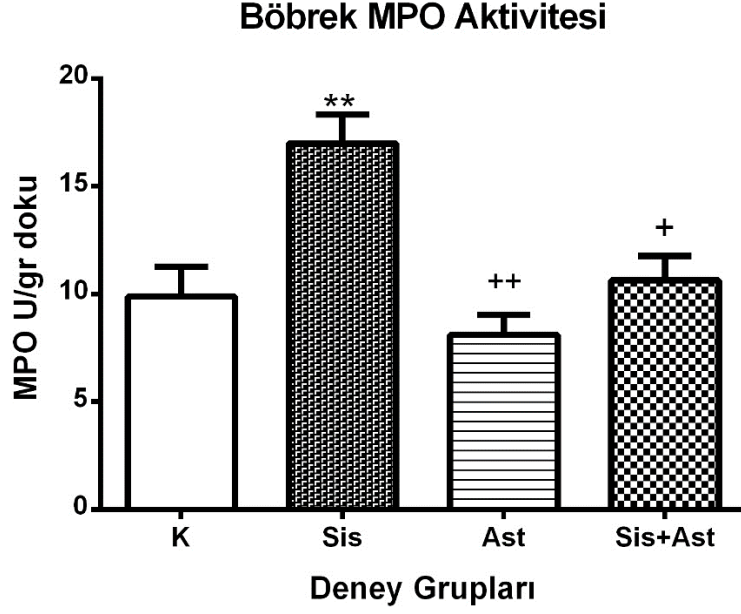
Şekil 24. Böbrek MDA Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.

Deney gruplarına ait böbrek dokularının MDA sonuçları değerlendirildiğinde sırasıyla kontrol grubunda  $11.4\pm 0.7$  nmol/g doku, sisplatin grubunda  $13.0\pm 0.9$  nmol/g doku, astaksantin grubunda  $11.6\pm 0.3$  nmol/g doku, sisplatin+astaksantin grubunda  $12.3\pm 0.8$  nmol/g doku olarak saptandı. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arası karşılaştırma yapıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ( $p>0,05$ ).



**Şekil 25.** Böbrek GSH Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması. \*\*\* p<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında, \*\*p<0.01 ve \*\*\*p<0.001 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Böbrek dokusu GSH değerleri sırası ile kontrol grubunda  $15.6 \pm 2.2 \mu\text{mol/g doku}$ , sisplatin grubunda  $29.4 \pm 1.7 \mu\text{mol/g doku}$ , astaksantin grubunda  $19.2 \pm 2.1 \mu\text{mol/g doku}$ , sisplatin+astaksantin grubunda  $12.6 \pm 1.7 \mu\text{mol/g doku}$  olarak belirlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sisplatin grubunda kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı bir artış saptandı ( $p < 0,001$ ). Astaksantin ve sisplatin+astaksantin gruplarının MDA değerleri sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla  $p < 0.01$  ile  $p < 0.001$  olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi.



**Şekil 26.** Böbrek MPO Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması. \*\* p<0.01 kontrol ile karşılaştırıldığında, +p<0.05 ve ++p<0.01 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Deney gruplarımızın böbrek dokusu MPO aktivitesi tayin edildiğinde sırası ile kontrol grubunda  $9.9 \pm 1.4$  U/g doku, sisplatin grubunda  $17.0 \pm 1.3$  U/g doku, astaksantin grubunda  $8.1 \pm 0.9$  U/g doku, sisplatin+astaksantin grubunda  $10.6 \pm 1.1$  U/g doku olarak belirlendi. Yapılan istatistiki analizin sonucunda sisplatin grubunun MPO aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı ( $p < 0.01$ ), astaksantin ve sisplatin+astaksantin gruplarının MPO değerleri sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla  $p < 0.01$  ile  $p < 0.05$  olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi.

| Böbrek                       | Kontrol Grubu | Sisplatin Grubu         | Astaksantin Grubu      | Sisplatin+Astaksantin Grubu |
|------------------------------|---------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|
| <b>Luminol KL (rlu/mg)</b>   | 6.0±0.6       | 12.3±1.4 <sup>***</sup> | 4.3±0.3 <sup>+++</sup> | 7.9±0.6 <sup>++</sup>       |
| <b>Lusigenin KL (rlu/mg)</b> | 5.4±0.7       | 11.4±1.4 <sup>**</sup>  | 6.4±0.7 <sup>++</sup>  | 10.8±1.1                    |
| <b>NO Salınımı (rlu/mg)</b>  | 6.8±0.6       | 16.9±1.4 <sup>***</sup> | 7.5±0.7 <sup>+++</sup> | 10.0±1.3 <sup>+++</sup>     |

**Tablo 5.** Böbrek KL Seviyelerinin Gruplar Arası Karşılaştırması. <sup>\*\*\*</sup>p<0.001 kontrol ile karşılaştırıldığında, <sup>++</sup>p<0.01 ve <sup>+++</sup>p<0.001 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Böbrek dokusu luminol aracılı KL değerleri tayin edildiğinde sonuçlar sırasıyla kontrol grubunda 6.0±0.6 rlu/mg, sisplatin grubunda 12.3±1.4 rlu/mg, astaksantin grubunda 4.3±0.3 rlu/mg, sisplatin+astaksantin grubunda 7.9±0.6 rlu/mg doku olarak belirlendi. İstatiksel olarak incelendiğinde sisplatin grubunun luminol aracılı KL değerinin anlamlı olarak arttığı (p<0.001), astaksantin ve sisplatin+astaksantin gruplarının luminol değerleri sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla p<0.001 ile p<0.01 olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu belirlendi.

Lusigenin aracılı KL ölçümleri böbrek dokusunda sırasıyla kontrol grubunda 5.4±0.7 rlu/mg, sisplatin grubunda 11.4±1.4 rlu/mg, astaksantin grubunda 6.4±0.7 rlu/mg doku, sisplatin+astaksantin grubunda 10.8±1.1 rlu/mg doku olarak ölçüldü. Yapılan istatiksel analiz sonucunda lusigenin aracılı KL ölçümlerinin sisplatin grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı farklı olarak arttığı belirlendi (p<0.01). Astaksantin grubunun lusigenin aracılı KL değeri, sisplatin grubuna göre anlamlı olarak düştüğü saptanırken (p<0.01), sisplatin+astaksantin grubunda anlamlı olarak bir fark tespit edilmedi (p>0.05).

Böbrek dokusunda NO salınımı tayin edildiğinde, ölçüm sonuçları sırasıyla kontrol grubunda  $6.8 \pm 0.6$  rlu/mg, sisplatin grubunda  $16.9 \pm 1.4$  rlu/mg, astaksantin grubunda  $7.5 \pm 0.7$  rlu/mg, sisplatin+astaksantin grubunda  $10.0 \pm 1.3$  rlu/mg olarak saptandı. İstatistiksel inceleme sonucunda sisplatin grubunun NO salınımının kontrol grubu NO salınımı ile karşılaştırıldığında, ileri derecede anlamlı farklı ( $p < 0.001$ ) olduğu, astaksantin uygulamasının da sisplatin+astaksantin grubu NO salınımını ileri derecede anlamlı farklı olarak düşürdüğü ( $p < 0.001$ ) belirlendi. Astaksantin grubunun NO salınımı da sisplatin grubu ile ileri derecede anlamlı farklı ( $p < 0.001$ ) idi.

#### **4.4. Serum Örneklerinde Analiz Edilen Biyokimyasal Parametreler**

Deney gruplarını oluşturan sıçanların kanlarından elde edilen serum örneklerinde ALT, AST, BUN, Kreatinin (Crea), HsTnI, total protein, TAS, TOS, sitokinlerden TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın sonuçları aşağıdaki tabloda (Tablo 6) ayrıntılı olarak gösterilmiştir:

|                             | <b>Kontrol Grubu</b> | <b>Sisplatin Grubu</b>    | <b>Astaksantin Grubu</b> | <b>Sisplatin+ Astaksantin Grubu</b> |
|-----------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| <b>TNF-alpha (pg/mL)</b>    | 90.4±4.0             | 178.1±4.0 <sup>***</sup>  | 101.3±11.2               | 156.1±2.2 <sup>+</sup>              |
| <b>IL-6 (pg/mL)</b>         | 173.1±5.4            | 250.0±14.2 <sup>***</sup> | 170.5±11.6               | 245.6±11.6                          |
| <b>ALT (U/L)</b>            | 47.4±2.0             | 100.3±9.0 <sup>***</sup>  | 56.6±3.3                 | 69.4±12.2 <sup>+</sup>              |
| <b>AST (U/L)</b>            | 99.2±4.7             | 197.5±26.8 <sup>***</sup> | 106.9±7.2                | 153.4±15.7                          |
| <b>BUN (mg/dL)</b>          | 13.2±0.5             | 111.1±25.1 <sup>***</sup> | 11.9±0.9                 | 122.3±2.7                           |
| <b>Crea (mg/dL)</b>         | 0.5±0.0              | 2.9±0.3 <sup>***</sup>    | 0.5±0.0 <sup>+++</sup>   | 2.7±0.3                             |
| <b>HsTnI (ng/mL)</b>        | 2.5±0.9              | 13.1±2.7 <sup>***</sup>   | 1.2±0.7 <sup>+++</sup>   | 3.0±0.1 <sup>+++</sup>              |
| <b>Total Protein (g/dL)</b> | 6.7±0.1              | 6.3±0.0                   | 7.4±0.1 <sup>+++</sup>   | 6.9±0.0 <sup>++</sup>               |
| <b>TAS (mmol/L)</b>         | 1.8±0.0              | 1.8±0.0                   | 2.1±0.0 <sup>++</sup>    | 2.0±0.0                             |
| <b>TOS (µmol/L)</b>         | 32.2±3.7             | 35.8±5.8                  | 18.6±1.9                 | 56.8±6.9 <sup>+</sup>               |

**Tablo 6.** Serum Örneklerinde Biyokimyasal Analiz Sonuçları. \*\*\*p<0.001 kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; <sup>+</sup>p<0.05, <sup>++</sup>p<0.01 ve <sup>+++</sup>p<0.001 sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında.

Sisplatin grubunu oluşturan deney hayvanlarının serum örneklerindeki ALT, AST, BUN, Kreatinin, HsTnI düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlı yüksek bulundu (p<0.001). Sisplatin+astaksantin uygulaması ALT ve HsTnI düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı olarak düşürürken, AST, BUN ve Kreatinin düzeylerini anlamlı olarak etkilemedi (p>0.05).



TNF- $\alpha$  değerleri, gruplar arası değerlendirildiğinde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Sisplatin+astaksantin uygulaması TNF- $\alpha$  değerini anlamlı olarak düşürdü ( $p<0.05$ ). Oysa sisplatin grubunun IL-6 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı ( $p<0.001$ ) olarak artarken, sisplatin+astaksantin uygulaması ile anlamlı ( $p>0.05$ ) bir değişiklik saptanmadı.

Total Protein değerleri, gruplar arası değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre astaksantin grubunda ileri düzeyde anlamlı bir artış belirlendi. ( $p<0.001$ ) Sisplatin grubuna göre sisplatin+astaksantin grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı ( $p>0.05$ ).

TAS değerleri, gruplar arası değerlendirildiğinde sadece astaksantin grubunda kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı bir artış belirlendi ( $p<0.01$ ). Oysa TOS değerleri, gruplar arası değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlar ortaya çıkmadı ( $p>0.05$ ).

#### **4.5. Histolojik Sonuçlar**

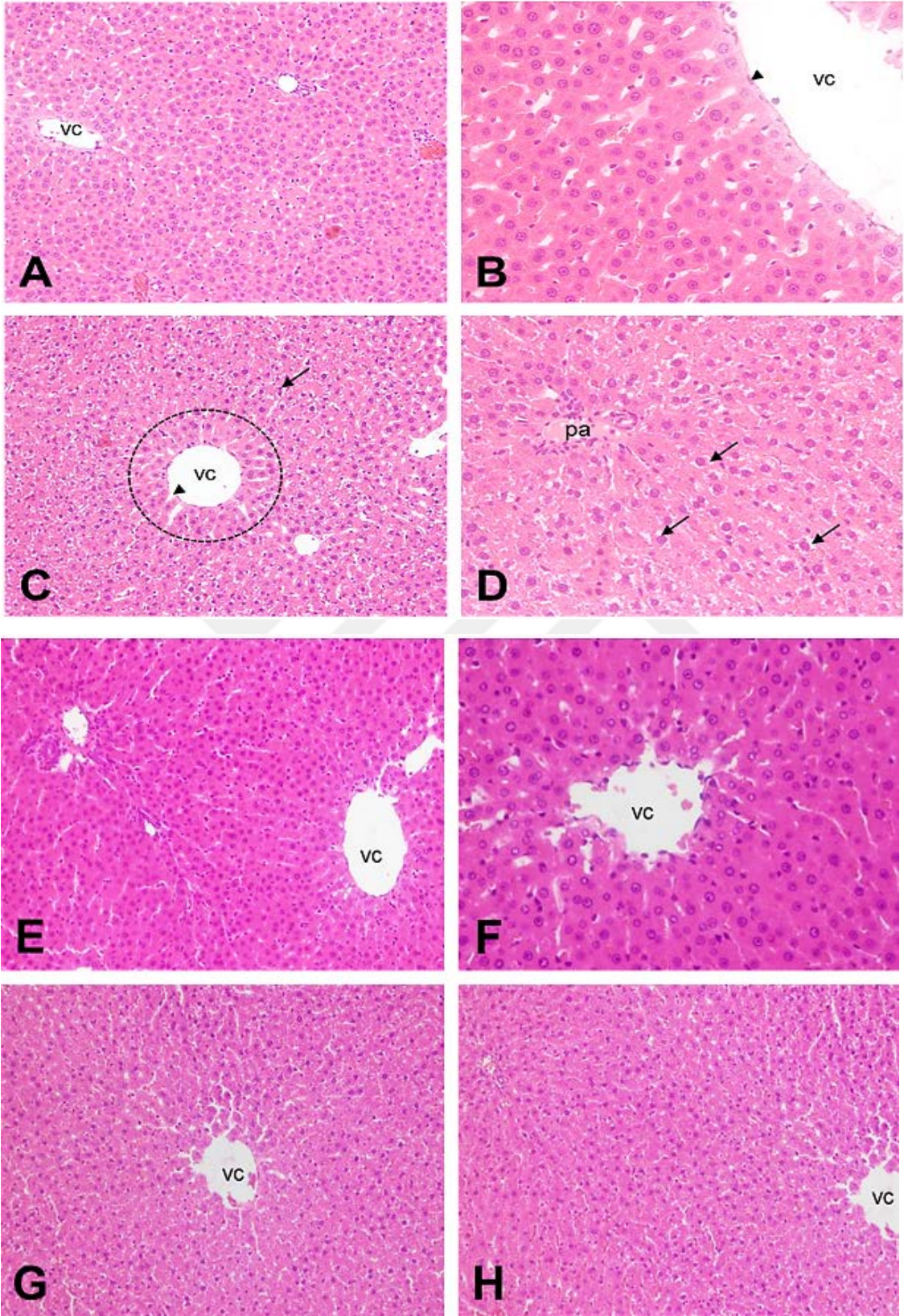
Çalışmamızdaki karaciğer, kalp ve böbrek doku örneklere Hematoksilen-Eozin boyama yöntemiyle incelendi.

Karaciğer dokusuna ait ışık mikroskopik incelemede, kontrol grubuna ait karaciğer parankim hücreleri merkezi ven (vc) düzenli ve ışınsal kordonlar şeklinde bir yerleşim gösteriyordu. Hepatositlerin merkezi yerleşimli bir ya da çift yuvarlak nükleuslara sahipti. Portal triadlar normal görünümde idi (A-B) Sisplatin grubuna ait karaciğer doku kesitlerinde morfolojik bozulmalar gözlendi. Sinuzoidlerin olduğu bölgelerde genişlemelerin olduğu özellikle zon 1 ve 3 ‘ oluşturan hepatositlerin sitoplazmalarında vakuolleşmelerin olduğu izlendi. Hepatosit nükleusları piknotik görünümlere sahipti. Portal alanda (pa) yer yer kanama alanları yer alıyordu (C-D). Hem tedavi grubunda (sis+ast) (E-F) hemde astaksantin grubunda (G-H) karaciğer doku kesitlerinde merkezi veni döşeyen tek katlı yassı epitel hücrelerinde kontrol grubuna göre devamlılığını kaybettiği gözleniyordu. Tedavi grubundaki hepatositlerin sitoplazması ve nükleus yapısının kontrole yakın astaksantin grubundaki hepatositlerin ise morfolojik bozulmalar

olduğu izlendi. Şekil 30'da karaciğer dokusuna ait ışık mikroskop görüntüleri görülmektedir.

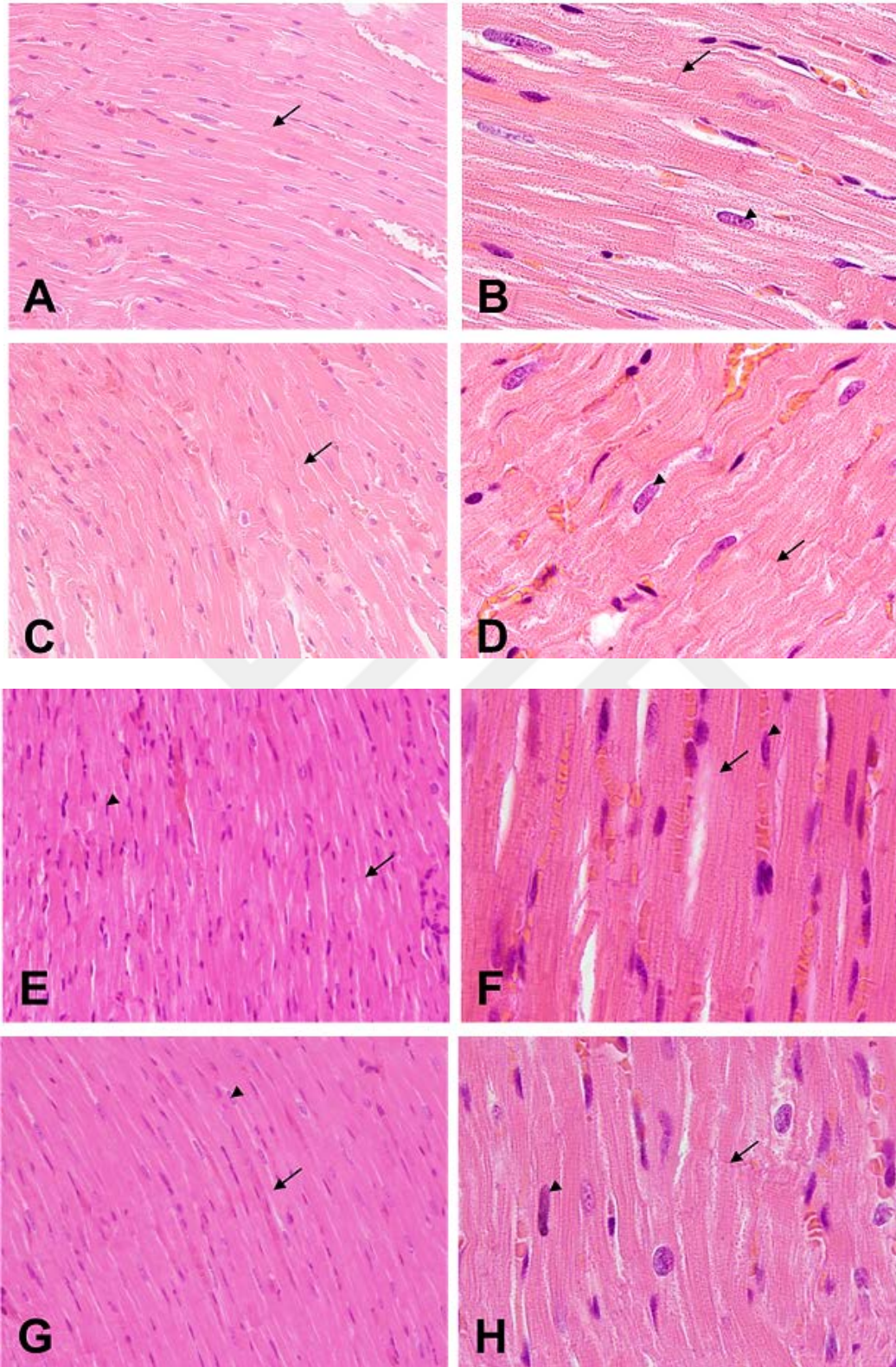
Işık mikroskopik incelemelerde H&E ile boyalı kalp dokusu incelemeleri sonucu Kas liflerinin birbirine olan paralellikleri ve bifurkasyonları belirgindi (A). Kalp kası hücrelerinin çizgilenmeleri düzgün, belirgin interkalar diskler ve hücrelerin nükleusları merkezi yerleşimli normal morfoloji yapıları gösteriyordu (B). Sispatin grubuna ait doku kesitlerinde kas lifleri arasındaki sınırların bozulduğu ve bazı bölgelerde kanama alanlarının olduğu, yer yer kas hücrelerinin nükleusların membran bütünlüğünün olmadığını, piknotik görünümlere sahip olduğu ve sitoplazmalarında çizgilenmelerin kaybolduğu izlendi (D) Tedavi grubundaki kalp kası lifleri arasında kanama alanların devam ettiği, çizgilenmelerin belirgin olmadığı gözleniyordu (E-F). Benzer bulguların astaksantin grubundaki kalp kası lifleri içinde paralellik gözlemlenmekteydi (G-H). Şekil 31'de kalp dokusuna ait ışık mikroskop görüntüleri görülmektedir.

Işık mikroskopik incelemelerde H&E ile boyalı böbrek dokusu kesitleri incelemeleri sonucu kontrol grubuna ait glomerül yapısı, bowman kapsülü ve bowman aralığı, proksimal (pt) ve distal tübüler(dt) normal morfolojik yapı özelliği gösteriyordu (A-B). Sisplatin grubuna ait doku kesitleri incelemesi sonucunda glomerül yapısında bozulmalar özellikle bazal membranda kalınlaşmalar(gl), parietal membranda düzensizlikler, proksimal tübülün epitel dokusunun hücrelerinde nekrotik yapılar, distal tübül lümeninde hemoraji(\*) alanlar izlendi (C-D). Sisplatin astaksantin grubuna ait böbrek doku kesitlerinde sisplatin gruplarına benzer bulgular olan glomerular yapısında bozulmalar, distal tübüller alanlarında yer yer kanama alanları yer almaktadır (E-F). Astaksantin grubunda ise kontrol grubuna göre glomerül yapılarında büzülme, tübüllerin epitel doku yapısında bütünlüğün bozulduğu gözleniyordu (G-H). Şekil 32'de böbrek dokusuna ait ışık mikroskop görüntüleri görülmektedir.



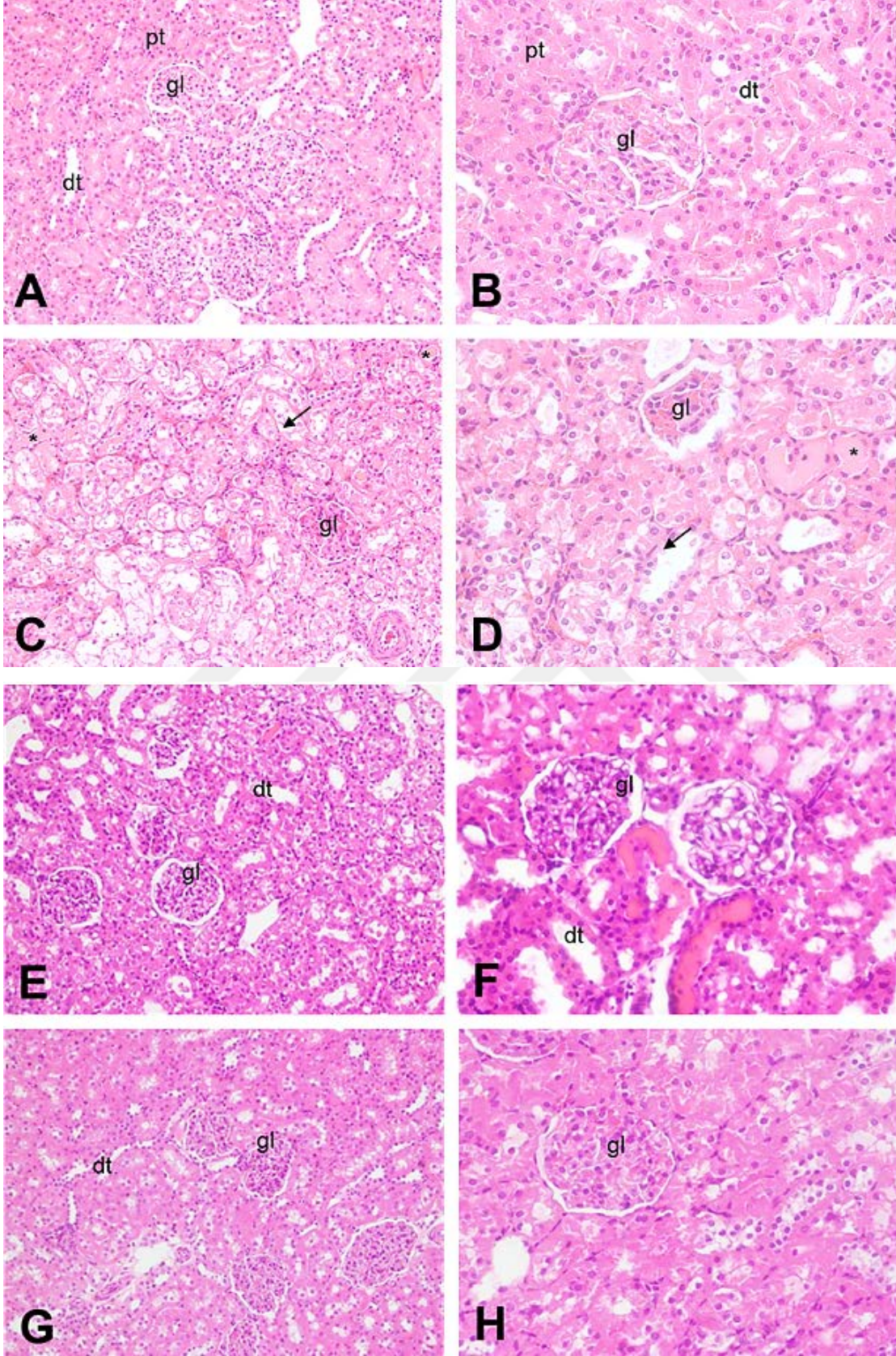
**Şekil 30.** Karaciğer Dokusuna Ait Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubuna (C-D) Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık Mikroskobu Inceleme Görüntüleri





**Şekil 31.** Kalp Dokusunu Ait Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubuna ( C-D) Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık Mikroskobu İnceleme Görüntüleri





**Şekil 32.** Böbrek Dokusuna Ait Kontrol Grubu (A-B), Sisplatin Grubu ( C-D) Sisplatin+Astaksantin Grubu (E-F) ve Astaksantin Grubuna (G-H) ait Işık Mikroskobu Görüntüleri

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda sisplatinin karaciğer, kalp ve böbrek dokusunda oluşturduğu hasar ve astaksantin olası koruyucu rolünü oksidan-antioksidan parametreler, inflamatuvar ve bazı biyokimyasal belirteçler ve histopatolojik incelemelerle ortaya koymaya çalıştık.

Genotoksik ajan sisplatinin tek başına, radyasyon veya diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyonlar halinde kullanılması geniş bir kanser yelpazesi için önemli bir kemoterapi yöntemidir. Sisplatinin klinik kullanımı, direnç geliştirmesi ve doza bağlı toksisite oluşturması nedeni ile sınırlıdır. Bu da sisplatin hem normal doku hem de tümörlü doku için toksik hale getirirken, tedavi değerini sınırlayan kritik bir faktördür. Bununla birlikte, ilacın normal ve tümör dokusu arasında seçici olmayan davranışı, akut nefrotoksisite, miyelosupresyon ve kronik nörotoksisite dahil olmak üzere doz bağımlı yan etkilerini artırır (32).

Sisplatinin yüksek dozlarda hepatotoksisite gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (33, 34). Son çalışmalarda, sisplatin kaynaklı hepatotoksisite mekanizmasının multifaktöryel olabileceği bildirilmiştir. ROS'dan kaynaklanan oksidatif stres bu faktörler arasında birinci sırayı alırken, apoptozun da önemli bir yeri olduğu gösterilmiştir (3).

Çeşitli çalışmalarda sisplatinin farklı dozlarda ve sürelerde verildiği gözlenmiştir. Tek doz uygulamalar, ardışık 2-3 gün ya da haftalık uygulamalar ile 5 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg ya da daha yüksek veya daha düşük dozlarda sisplatin uygulamaları literatürde mevcuttur (3, 35, 36, 37, 38). Yaptığımız ön çalışmaların sonucunda çalışmamızda 8 mg/kg/gün sisplatin ardışık 3 gün olmak üzere uyguladık (36, 39).

Çağın ve ark. sıçanlar üzerinde yapmış olduğu çalışmada 5 mg/kg tek doz sisplatin uygulaması ile karaciğerde lipid peroksidasyon ürünü, total oksidan durum ve ALT düzeylerinin belirgin olarak arttığını, SOD ve GPx aktivitelerinin ise belirgin olarak azaldığını bildirmiştir (3). Malki ve Sayed'in çalışmasında 12 mg/kg tek doz sisplatin uygulaması sonrası karaciğer fonksiyonları ve histopatolojik değişikliklerin belirgin bir şekilde etkilendiği, antioksidan enzim aktiviteleri ve GSH içeriklerinin önemli ölçüde azaldığını, MDA seviyelerinin

anlamli olarak arttığını, inflamatuvar belirteçlerden TNF- $\alpha$ , indüklenabilir-nitrik oksit sentaz (iNOS) ve interlökin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) ekspresyonları ile konsantrasyonlarının belirgin şekilde yükselmiş olduğunu göstermiştir (40). Başka bir çalışmada Kim ve ark. 7.5 mg/kg *ip.* tek doz sisplatin uygulaması ile oluşturulan karaciğer toksisitesi sonrasında, serum aminotransferazlarında artış ve hepatositlerin dejenerasyonu/ nekrozu, vakuolasyon ve sinüzoidal dilatasyon gibi histopatolojik değişikliklerinin ortaya çıktığını belirlemiştir. Ayrıca karaciğer dokularında MDA konsantrasyonunda artış, GSH, CAT, SOD ve GST aktivitelerinde azalma tespit etmiştir (41).

Çalışmamızda 8 mg/kg/gün ardışık üç doz sisplatin uygulaması sonucunda karaciğer dokularını incelediğimizde MDA, MPO, KL parametrelerini artmış, bir hücre içi antioksidan olan GSH düzeylerini ise azalmış tespit ettik. Ayrıca serum ALT ve AST düzeyleri anlamli olarak yükselmiş bulundu. Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde ise karaciğer sinüzoidlerin olduğu bölgelerde genişlemelerin olduğu özellikle zon1 ve zon3'ü oluşturan hepatositlerin sitoplazmalarında vakuolleşmelerin olduğu izlendi. Bu bulgularımız sisplatin ile oluşturulmuş hepatotoksisite modellerinin çalışma verileri ile uyumluluk göstermektedir.

Kanser hastalarına uygulanan sisplatinin kardiyotoksik etkileri arasında elektrokardiyografik değişiklikler, aritmiler, ventriküler aritmiler, supraventriküler taşikardi, atriyal fibrilasyon, sinüs bradikardi ve tam atriyo-ventriküler bloğu içeren değişiklikler yer almaktadır. Bu kardiyotoksik (ve diğer potansiyel olarak bilinmeyen) problemler sonucunda konjestif kalp yetmezliği ve ani kardiyak ölümler ortaya çıkar. Sisplatin ile indüklenen kardiyak toksisiteyi iyileştirmek için klinik yaklaşımlarda başarı sağlanamamıştır. Bu nedenle, birçok klinik müdahaleye rağmen, sisplatin ile tetiklenen kardiyotoksisitenin sınırlandırılması için geçerli bir terapi yönteminin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir (42).

Coşkun ve ark. yaptığı çalışmada 14 gün süreyle 5 mg/kg *ip.* uygulanan sisplatinin kardiyak dokuda oksidatif hasara yol açtığı, DNA hasarı ürünleri ve MDA'nın yükseldiğini, buna karşın GSH seviyelerinin düştüğünü tespit etmiştir (43). Bir başka çalışmada, kardiyotoksisiteyi indüklemek için sıçanlara 20 mg/kg, *i.p.* tek doz sisplatin verilmiş, sisplatin grubunda kontrol grubuna göre azalmış GSH ve

CAT aktivitesi ile yükselmiş MDA seviyesi oksidatif stresin belirgin olarak arttığını

göstermiştir. Aynı çalışmada kardiyotoksisitenin biyokimyasal parametreleri arasında yer alan laktat dehidrogenaz, CK-MB, kardiyak troponin T (cTnT),  $\beta$ -natriüretik peptid (BNP), inflamatuvar TNF- $\alpha$  ve MPO aktivitesi ile apoptozla ilişkili olan kaspaz-3 gen ekspresyonunun ve nükleer DNA fragmentasyonunun sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını belirtmişlerdir (44).

Çalışmamızda kardiyotoksisiteyi göstermek için kalp dokusunda MDA, GSH, MPO, KL ölçümlerin yanısıra serumda da HsTnI parametresini ve histopatolojisini değerlendirdik. MDA, luminol, lusigenin ve MPO'da anlamlı bir artış belirlerken, GSH düzeylerinde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir sonuç elde edemedik. Serumda baktığımız HsTnI sisplatin grubunda kontrol grubuna göre yüksek çıkmış olup, yukarıdaki araştırma sonuçları ile uyumlu görülmüştür.

Akut böbrek hasarı, sisplatin tedavisinden sonra görülen en önemli yan etkidir. İnsanlarda sisplatinin ilk doz uygulamasından sonra oluşan bu yan etki, hastaların %25-30'unda sisplatin'in klinik kullanımını sınırlamıştır. Nefrotoksisite, sisplatin ile tedavinin ciddi bir sonucu olmakla birlikte, proksimal tübül hücrelerine seçici olarak nasıl zarar verdiği mekanizması halen belirsizliğini korumaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesine katkıda bulunmak için çoklu mekanizmalar belirlenmiş olmakla birlikte, böbrek patolojisini uyarmak için bu sinyal yollarının nasıl düzenlendiği büyük ölçüde bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar, esas olarak sisplatinin renal hücrelerde antioksidan enzim aktivitelerini ve hücre içi GSH konsantrasyonlarını azaltarak oksidatif strese neden olduğunu göstermiştir (45, 46, 47, 48, 49, 50, 51). Birçok çalışma sisplatin kaynaklı nefrotoksisitede çeşitli antioksidanların yararlı etkilerini belgelemiştir (45, 47, 51, 52, 53).

Sisplatin nefrotoksisitesi, akut böbrek hasarının oluşumunda temel bir rol oynayan proksimal tübül hücrelerinin hasarlanmasının başlıca patofizyolojik mekanizma



olduğu kabul edilir. Böbrekte en yüksek sisplatin konsantrasyonuna proksimal tübül hücreleri içerisinde rastlanır ve hücre içinde sisplatin, doza ve uygulama süresine bağlı olarak, renal toksisiteye, tübüler hasara ve hücre ölümüne yol açar (54).

Hagar ve ark'nın çalışmasında tek bir *ip.* sisplatin enjeksiyonu (5 mg/kg) ile yükselmiş BUN ve kreatinin seviyeleri ile böbrek fonksiyonları bozulmuş; böbrek dokusunda artmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler ile toplam antioksidan durumunun azalması belirlenmiştir. Sisplatin grubunda nitrit konsantrasyonunun artmasıyla oksidatif/nitrozatif stres gösterilmiştir. Sisplatin, renal dokularda GSH, GPx, CAT ve SOD aktivitelerinde düşüşe neden olurken, TNF- $\alpha$  düzeylerini yükseltmiş, NF- $\kappa$ B ve kaspaz-3'ün immünohistokimyasal olarak artmış ifadelerinin olduğunu bildirmiştir (55).

Bir başka çalışmada sisplatin (7 mg/kg tek doz, *ip.*) enjeksiyonu yapılan sıçanlardan alınan böbrek dokusunda MDA seviyelerinde önemli bir artış gösterilmiş, aynı şekilde serumda yüksek BUN ve Kreatinin değerlerini tespit edilmiştir (56).

El-Naga'nın çalışmasında tek doz 7 mg/kg sisplatin enjeksiyonu sonrası sıçanlarda akut nefrotoksisite belirgin olarak serumda artmış BUN ve kreatinin seviyeleri ile gösterilmiştir. Ayrıca, sisplatinin lipid peroksidasyonunu arttırdığı ve azalmış GSH seviyesi ve SOD'a ek olarak, dokuda IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, iNOS, ICAM-1 ve MCP-1 gibi parametrelerin belirgin artışla bir pro-inflamatuar yanıt olduğu belirtilmiştir (57).

Çalışmamızda sisplatin uygulanan sıçanların böbrek dokusu ile kontrol grubunun böbrek dokularının MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulamadık. Öte yandan GSH seviyeleri ise ilginç bir şekilde sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Bulgularımızın, olası sisplatin direnç mekanizmalarındaki bulgular ile eşleştini düşünürüz. Şöyle ki, sisplatin direnci, antioksidan yanıtı, hücrel detoksifikasyonu ve ilacın hücre içine alımı / atılımı, DNA hasar toleransı ve artan DNA hasar tamiri dahil olmak üzere farklı

hücrel adaptasyonları içeren karmaşık bir mekanizmanın sonucudur. Örneğin, tedavi öncesi GSH düzeyi, sisplatin bazlı kemoterapiye yanıtla negatif korelasyon gösterir. Çeşitli GSH ve antioksidan mediyatörler (GPx ve SOD), normal dokuya göre aşırı eksprese edilir (57). Sisplatin hücre içine girdikten sonra sitoplazmada hidrolize edilerek iki su molekülünün –OH grupları klor iyonları ile yer değiştirir. Bu şekliyle sülfür (tiyol) içeren bileşiklerle de reaksiyona girebilmektedir. GSH, sisplatin ile reaksiyona giren bir sülfür bileşiğidir ve bazı çalışmalarda bu bileşiklerin artışı ile sisplatin direncinin de arttığı bildirilmektedir (8,10). Hücre içinde antioksidan olarak görev yapan GSH, sitoplazma ve nukleusta sisplatin ile bağlanarak GSH-sisplatin konjugatlarını oluşturarak DNA-platin kompleks formların oluşumunu engellemekte ve sitotoksik etkilerini azaltmaktadır. Plazma membranında bulunan GSH-X pompası, GSH sisplatin komplekslerini ATP bağımlı bir mekanizma ile hücre dışına taşınmaktadır (59). Sisplatin dirençli mesane kanseri hücre serilerine GSH inhibitörü uygulanarak hücre içi GSH düzeyi azaltılmakta ve sisplatin duyarlılığı artırılmaktadır (60). Ayrıca sisplatin duyarlılığı yüksek bir tümör olarak bilinen testis kanseri hücre serilerinde GSH düzeyleri düşük iken, sisplatin dirençli mesane kanseri hücre serilerinde yüksek bulunmaktadır (61). Rudin ve ark. çalışmasında artmış hücrel GSH konsantrasyonları, sisplatin direnci ile yakından ilişkili olduğunu ancak sisplatin-DNA kompleks formlarının oluşumunu azaltmadığını bildirir. GSH'ın sisplatin sitotoksitesini inhibe etmesini apoptotik düzenleyici yollarda rol oynamasından ileri geldiği hipotezi öne sürülmüştür. Bu hipotezi, apoptotik inhibitör Bcl-2 ile transfekte edilmiş MCF-7 meme kanseri hücrelerini kullanarak değerlendirmiştir. MCF-7 hücrelerinde Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, sisplatin maruziyetinden sonra hücre ölümüne karşı artan direnç ve hücre içi GSH seviyelerinde yaklaşık 3 kat artış ile ilişkilidir. MCF-7 hücre hatlarının GSH sentezinin bir inhibitörü olan bütinyonin sülfoksimin ile inhibisyonu sonucu GSH seviyeleri normalize edilip, Bcl-2 ekspresyonunu etkilemeden sisplatin direncini ortadan kaldırmıştır. Bu sonuçlar, MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 aracılı sisplatin direncinin, GSH üretiminin artışına bağlı olduğunu ve bunun da, sisplatin inaktivasyonundan veya DNA eklenti formasyonlarının inhibisyonundan bağımsız mekanizmalarla hücre sağ kalımına katkıda bulunduğunu belirtmiştir (62).

Böbrekte baktığımız diğer parametrelerden doku MPO'yu, KL ölçümlerini, serumda BUN ve kreatinin seviyeleri mevcut çalışmalar ile uyumlu, istatistiksel anlamlı artmış bulundu. Bu da yüksek doz ve ardışık uyguladığımız sisplatin etkisinin hücre içi mekanizmalarında farklı yollar üzerinden eş zamanlı olarak ilerlediğini gösterdi.

Çalışmamızda sisplatin aracılı hepatoksisiteyi, kardiyotoksisiteyi ve nefrotoksisiteyi eş zamanlı gösterip, astaksantin olası koruyucu, antioksidan ve/veya antiinflamatuvar etkilerini bu toksisitelere karşı ortaya koyduk.

Kırmızı ketokarotenoid astaksantin iki hidroksil, 2 keto grubu ile bağlanan 13 konjuge çift bağa sahiptir. Bu nedenle, serbest radikalleri nötrleştiren ve ROS'u tutan bir antioksidan etkiye sahiptir. Astaksantin antioksidatif aktivitesine ek olarak antitümör (63), anti-inflamatuvar (64), antidiyabetik (65) ve hepatoprotektif (66) etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu da astaksantin insan sağlığı ve beslenmesinde yararlı olabilme potansiyeline sahip olabileceğini düşündürmektedir (67).

Zhou ve ark. sıçanlarda oluşturdukları deneysel sepsis modelinde astaksantini 100 mg/kg şeklinde 7 gün boyunca oral olarak operasyon öncesi uygulamışlardır. Sepsis sonucu serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MDA düzeylerinde anlamlı bir artış saptanırken, SOD aktivitesinde belirgin bir azalma, BUN, kreatinin, laktat dehidrojenaz, CK-MB, ALT ve AST gibi organ hasarı ile ilişkili parametrelerde histolojik inceleme ile doğrulanan yükselmeye neden olmuştur. Astaksantin uygulaması bu inflamatuvar ve oksidan yanıtı tersine çevirmiş, organ hasarını azaltmış, çekum ligasyonu ve perforasyonu tarafından indüklenen septik sıçanların sağkalımını arttırmıştır (68).

Sisplatin nefrotoksisinde astaksantin etkisine Akça ve ark. tarafından yeni yayınlanan bir çalışmada bakılmış, sisplatin 16 mg/kg *i.p.* olarak tek doz çalışmanın 5. günü uygulanmış ve astaksantin, TAS düzeylerini arttırırken, BUN, serum kreatinin, TOS, kaspaz-3 ve böbrek doku ödemi azalttığını tespit etmişlerdir (69).

Bir başka çalışmada, astaksantin sisplatin gibi antineoplastik bir ajan olan doksorubisin (2 mg/kg *i.p.*) ile indüklenen davranışsal ve nörobiyolojik anormalliklere karşı potansiyel nöroprotektif ve bellek arttırıcı etkileri

araştırılmıştır. Astaksantin tedavisinin (25 mg/kg) doksorubisin ile indüklenen hafıza bozukluğunu önemli ölçüde koruduğunu, hipokampal histopatolojik iyileşme sağladığını bildirmişler. İndüklenen oksidatif ve inflamatuvar olayları MDA, GSH , CAT, TNF- $\alpha$  gibi parametreler ile değerlendirip, astaksantin MDA ve TNF- $\alpha$ 'yı anlamlı derecede azaltırken, GSH ve CAT'ı arttırdığını, asetilkolinesteraz aktivitesindeki artışı azalttığı ve apoptotik yolları down-regüle ettiğini bildirmiştir (70).

Diğer bir çalışmada sıçanlarda arsenik (5 mg/kg *ip*) maruziyetinin neden olduğu nefrotoksisite ve oksidatif stres üzerinde astaksantin (10, 20, and 40 mg/kg ) oral uygulamasının, koruyucu etkileri olup olmadığını incelemiş, böbrek fonksiyon belirteçlerinden BUN, kreatininin değerlerinin arsenik grubuna göre tedavi grubunda azaltması, oksidatif stres parametrelerinden MDA'yı azaltırken GSH, CAT, SOD'u arttırmasıyla astaksantin, arseniğin neden olduğu nefrotoksisiteye karşı önemli bir koruyucu etkisini göstermiştir (71).

Sila ve ark. sıçanlarda (120 mg/kg, subkutan) alloksan monohidrat ile oluşturdukları diyabet modelinde karaciğer dokusu üzerine astaksantin (20 mg/kg, gavaj) koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. Karaciğer MDA kontrol grubuna göre diyabet grubunda anlamlı olarak artmıştır. SOD, CAT, GPx, GR ve GSH düzeyleri gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını, astaksantin bu parametrelerin değerlerini kontrol grubuna yakın olarak restore ettiğini bildirmişlerdir (72).

Başka bir çalışmada, iki hafta boyunca haftada iki doz subkutan 50 mg/kg isoproterenol (ISO) uygulaması ile indüklenen miyokard infarktüsü ve kardiyak hipertrofi oluşturulan sıçanlarda astaksantin (25 mg/kg/gün, oral) etkisi incelenmiş ve kalp dokusunda MDA, NO, ileri oksidayon protein ürünleri (AOPP) ISO grubunda kontrol grubuna göre artarken; CAT, GSH, SOD değerleri azalmış, plazmada ise ALT, AST, CK-MB artmış olarak tespit etmişlerdir. Astaksantin tedavisi artan oksidan parametreleri azaltırken, antioksidan kapasiteyi artırmıştır. Bu veriler doğrultusunda astaksantin ISO ile indüklenmiş kardiyak hasara karşı koruyucu etkisi bildirilmiştir (73).

Çalışmamızda sisplatin ile toksisite oluşturulan sıçanlara astaksantin uygulaması sonucunda karaciğer, kalp ve böbrek dokularında birbirileriyle uyumlu olmayan

farklı sonuçlar elde ettik. Sisplatin+astaksantin grubunun karaciğer dokularında MDA düzeyi anlamlı olarak azalırken, GSH düzeyleri beklenildiği üzere anlamlı olarak yükselmiş bulundu. Kalp dokusunda sisplatin+astaksantin uygulaması MDA düzeylerinde düşme göstermesine rağmen, anlamlı bulunmadı. Sisplatin grubunun kalp GSH düzeylerinin yüksek bulunması nedeni ile sisplatin+astaksantin grubunun GSH düzeyleri anlamlı yüksek bulunmadı, tam tersi bir sonuç ortaya çıktı. Sisplatin üzerine astaksantin uygulamaları böbrek dokularında tam tersi bir etki yaratarak, MDA düzeylerini değiştirememiş, GSH düzeylerini de sisplatin grubu yüksekliği nedeni ile yeterince yüksek bir seviyeye taşıyamamıştır. Bu sonuçların nedenleri aşağıdaki gibi olabilir:

1. Astaksantin dozu ve uygulamaları yeterli gelmemiş olabilir. Doz ve süre artırılması ile farklı sonuçlar ortaya konabilir.
2. Sisplatinin bazı dokularda (böbrek) direnç göstermesi nedeni ile beklenen etkiyi yaratmamasına bağlı olarak, sonuçlar istatistiksel olarak ortaya konamamıştır.
3. Hücre içi redoks dengesi etkilenmiştir. Özellikle sisplatin toksisitesi nedeni ile hücre içi GSH dengesi değişmiş, muhtemel antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklik ortaya çıkmış olabilir.
4. Astaksantin hücre içinde olası anti- inflamatuvar yolları aktive ederek, inflamasyon ilişkili transkripsiyon faktörlerini zıt yönde aktive ettiği söylenebilir. Nitekim karaciğer, kalp ve böbrek dokularının MPO aktiviteleri astaksantin uygulamaları ile anlamlı olarak düşük bulunmuştur.
5. Bireyler arasında genetik farklılıklar ilaç metabolizmasında farklı ilaç cevaplarına sebep olur. İlacın hücre içine alımı ve atılımında membranda bulunan görevli taşıyıcılardaki, hücre içi detoksifikasyonda görevli enzimlerdeki ve DNA tamir genlerindeki polimorfizm, mutasyon gibi genetik varyasyonlar sebebi ile metabolik süreçlerin indüklenmesi veya baskılanması ilaca karşı dayanıklılık ya da duyarlılık durumlarını etkilediğinden olabilir.

Sisplatin uygulamaları doku ve organlarda inflamatif yolları aktive ederek, nötrofil infiltrasyonunu arttırmakta, hücre içi bazı transkripsiyon faktörlerini ve sitokinlerin artışına neden olmaktadır (74, 75). Çalışmamızda sisplatin uygulaması

sonucu artan doku (karaciğer, kalp ve böbrek) MPO aktiviteleri artan inflamasyonun en önemli karakteristiğidir. Öte yandan serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeyleri de sisplatin uygulanan grupta anlamlı yüksek bulunmuştur. Astaksantin sisplatin toksisitesi üzerine etkisine bakıldığında doku düzeyinde MPO aktiviteleri azalırken, sistemik bir bulgu olan serum sitokin düzeylerini düşürmesine rağmen çok da etkili bulunmamıştır. Tedavi grubunun TNF- $\alpha$  düzeyleri anlamlı düşüktür.

KL yöntemi serbest radikal salınımını ölçen non-invazif bir yöntemdir. Mikrosaniyeler düzeyinde salgılanan, ortamda bulunan antioksidan enzimler ve transisyon metallerin varlığında birbirine hızla dönüşebilen veya tutulan ROS ve/veya RNT'lerinin ölçümü için çeşitli problar kullanılmaktadır (76). Luminol aracılı KL yöntemi ile OH $\cdot$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hipoklorit ve hidroperoksil radikalleri tayin edilirken, lusigenin probu ile O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikali ölçülmektedir. Sisplatin uygulanan grupların karaciğer, kalp ve böbrek dokularının luminol ve lusigenin aracılı KL ölçümleri beklenildiği üzere, anlamlı olarak yüksek bulundu. Doku harabiyetinin ve sisplatin toksisitesinin en önemli bulgusu olarak hücre içi serbest radikal artışı meydana gelmiştir. Sisplatin grubuna astaksantin uygulaması ile karaciğer ve böbrek dokusunda anlamlı bir düşüş saptanmış, astaksantin olası serbest radikal tutucu etkisi kanıtlanmıştır. Sisplatin+astaksantin uygulanan grupta inflamasyon kaynaklı ROS'un analizine katkıda bulunan luminol aracılı KL değerlerinin düşmesi ile büyük oranda astaksantin anti-inflamatuvar etkisi olarak açıklanabilir. Nitekim bu bulgular MPO ve TNF- $\alpha$  değişimleri ile de ortaya konmuştur.

NO hücrelerde nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile üç ayrı formda oluşmaktadır. Bunlardan endotelial NOS (eNOS) endotel hücrelerinden salgılanmakta ve vazodilatasyona neden olmaktadır. Beyin ve sinir sisteminden salgılanan nöronal NOS (nNOS) aracılı NO bir nörotransmitter olarak davranmakta ve öğrenme, bellek ile sinyal iletimi mekanizmalarında görev yapmaktadır. Özellikle inflamasyon sonucu polimorfonükleer hücrelerin ve mononükleer hücrelerin varlığında ortaya çıkan indüklenebilir NOS (iNOS) aracılı NO ise hücre yıkımı, anti-bakteriyel etki, inflamasyon gibi etkiler ortaya çıkarmaktadır (77). Saflaştırılmış luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sistemi ile ölçülen kemilüminometrik yöntemde total

NO ölçümü gerçekleşmektedir. Sisplatin uygulanan gruplarda karaciğer ve böbrek dokusunda NO salınımı anlamlı yüksek bulunurken, kalp dokusunda ise düşük saptandı. Bu durumun en önemli nedeni ise hücre içinde 1:1 oranında bulunan  $O_2^-$  ile NO'nun etkileşerek, daha toksik olan peroksinitrit radikalini oluşturabilir. Kalp dokusunun eNOS açısından zengin olması, muhtemel NO'nun aşırı artmasının sağlarken, lusigenin aracılı KL ile de süperoksit radikalinin yükseldiği açıkça ortaya konmuştur. Peroksinitrit ile oluşturulan hasar hem bir lipit peroksidasyonu ürünü olan MDA hem de inflamasyon kaynaklı MPO'nun artışı ile desteklenmektedir. Sisplatin toksisitesine astaksantin uygulandığında karaciğer ve böbrek dokusunda NO azalmış görülmektedir. Oysa kalp dokusunda izafi olarak yükselmiş NO görülmektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere olası peroksinitrit oluşumu ile azalan sisplatin grubu NO salınımı sisplatin+astaksantin grubunda bir artış şeklinde yansımaktadır. Bu bulgular astaksantin uygulamalarının olası iNOS üzerinde NO salınımını azalttığını göstermektedir.

Serum örneklerinde baktığımız doku hasar göstergeleri sisplatin grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklı bulunurken, sisplatin+astaksantin uygulaması serum ALT, HsTnI düzeylerinin anlamlı olarak düştüğü, Kreatinin ve AST düzeylerinin de düştüğü fakat anlamlı olmadığı görüldü. Bu bulgular deney hayvanlarının sistemik bulgularının bir göstergesi olarak doku bulguları ile uyumlu olarak tesbit edildi. TAS düzeyleri sadece astaksantin uygulaması ile anlamlı artmış bulundu. Buna karşın TOS düzeyi düşerken anlamlı fark saptanmadı. Bu bulguların deney hayvanlarının olası bireysel farklılıklarından etkilenmiş olabileceği kanaatini oluşturdu.

Çalışmamızda karaciğer, kalp ve böbrek dokusu histolojik olarak incelendiğinde sisplatin grubunda görülen morfolojik bozulmalar, yer yer kanamaların ve hücre kayıplarının olması şeklinde belirlenirken, sisplatin+astaksantin grubunun sadece karaciğer dokusu hepatositlerinde sitoplazma ve nükleus yapısının kontrole yakın düzeldiği tespit edilmiş olup, kalp ve böbrek dokularında, sisplatin grubuna göre, anlamlı bir iyileşme görülmemesi doku ve serum biyokimyasal sonuçlarımız ile örtüşmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sisplatin ile oluşturulan deneysel toksisite modelinde astaksantin olası koruyucu ve antioksidan rolü karaciğer, kalp ve böbrek dokularında araştırıldığında; astaksantin karaciğer dokusunda antioksidan, anti-inflamatuvar, serbest radikal tutucu etki yaratarak, iyileştirici etki yarattığı histolojik olarak da desteklemiştir. Astaksantin kalp dokusunda sisplatin ile oluşturulan serbest radikal hasarını lipid peroksidasyonunu ve MPO aktivitesini azaltarak gösterirken, sürpriz bir şekilde olası doku kaynaklı NO salınımı arttırarak ve peroksinitrit düzeyin azaltarak, düzenleyici etkisine neden olmuştur. Böbrek dokusunda ise sisplatin grubunda GSH direnci gelişmiş, hücre içi GSH düzeyleri artmış, buna karşın serbest radikal salınımı yükselmiştir. Muhtemel hücre içi redoks değişimi ile lipid peroksidasyonu artışı önlenmiştir. Ancak inflamatuvar süreçler kendi yolları üzerinden ilerlemiştir. Böbrek dokusunda sisplatin+astaksantin uygulaması ise anti-inflamatuvar ve serbest radikal tutucu etki yaratmıştır.

Çalışma sonuçlarımız sistemik serum biyokimya bulguları, sitokin düzeyi sonuçları ile histopatolojik görüntülerle desteklenmiştir. Sisplatin uygulamalarında, ortaya çıkabilecek sisplatin direnç faktörünün mutlaka göz önünde bulundurulurken dokular arası farklılık ihmal edilmemelidir. Sisplatin kaynaklı inflamasyon tüm dokularda görülmüş, sistemik olarak da desteklenmiştir.

Astaksantin gibi güçlü bir antioksidanın kullanımı farklı dokularda farklı cevaplar oluşturmuş, özellikle NO ve peroksinitrit salınımı üzerine etkisi ilk kez ortaya konmuştur. Çalışmamızın sonucunda astaksantin anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri ile sisplatin toksisitesini farklı dokularda farklı mekanizmalar üzerinden azalttığı görülmüştür.

Sisplatinin özellikleri göz önüne alındığında, ileri çalışmalar planlanması aşamasında doz-cevap ve sisplatin direnci mekanizmalarının ayrıntılı olarak incelenmesi gereklidir. Bu aşamada apoptotik/nekrotik ve hatta otofajik yolların incelenmesi önerilir. Astaksantin biyokimyasal etkilerinin araştırılması amacıyla moleküler yönde projelerin planlanması, transkripsiyon faktörleri üzerine etkinliğinin araştırılması gereklidir.



## KAYNAKLAR

1. Yang Y, Liu H, Liu F, Dong Z. Mitochondrial dysregulation and protection in cisplatin nephrotoxicity. *Arch Toxicol.* 2014; 88(6):1249–1256.
2. Dugbartey GJ, Peppone LJ, Graaf IAM. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology* 2016; 371: 58–66.
3. Cagin YF, Erdogan M, Sahin N, Parlakpınar H, Atayan Y, Polat A et al. Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Med Res* 2015; 46: 517-526.
4. Ambati RR, Moi PS, Ravi S, Aswathanarayana RG. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-A review. *Mar. Drugs* 2014; 12: 28-152.
5. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European J Pharmacol* 2014; 740: 364–378.
6. Dilruba S, Kalayda GV. Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol* 2016; 77: 1103–1124.
7. Quintanilha JCF, Sousa MV, Visacri MB, Amaral LS, Santos RMM, Zambrano T et al. Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017; 80:223–233
8. Petrović M, Todorović D. Biochemical and molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer cells. *Med & Biol.* 2016; 18: 12-18.

9. BC Cancer Agency Cancer Drug Manual.[Internet]. Drug Name: Cisplatin [Revision: 2016 June 1] Available from: [http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/drug%20index/cisplatin\\_monograph\\_1jul2016.pdf](http://www.bccancer.bc.ca/drug-database-site/drug%20index/cisplatin_monograph_1jul2016.pdf)
10. Fuertesa MA, Castilla J, Alonso C, Pérezc JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Current Med Chem* 2003; 10: 257-266.
11. Spreckelmeyer S, Orvig C, Casini A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. *Molecules* 2014; 19: 15584-15610.
12. Achkar IW, Abdulrahman N, Al-Sulaiti H , Joseph JM, Uddin S, Mraiche F. Cisplatin based therapy: the role of the mitogen activated protein kinase signaling pathway. *J Transl Med* 2018; 16: 96.
13. Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol* 2018; 31: 15–25.
14. Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res* 2016; 106: 27–36.
15. Roger TY, Al-Fayea T, Au HJ. Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf* 2009; 32: 1109-1122.
16. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Hindawi Publishing Corporation *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 5698931.
17. Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üni. Sağlık Bil. Enst. Dergisi* 2015; 5: 197-203.

18. Chemistry Online Guru. Free Radical. [Internet, 2016] Available from: <https://chemistryonline.guru/free-radical/>
19. Grdl F, editör. Tıbbi Biyokimya. Nobel tıp kitabevi. 2015; 641-646.
20. Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy ni. Sağ Bil Enst Derg. 2016; 4: 50-59.
21. Filip C, Albu E, Zamosteanu N. Superoxide dismutase: Therapeutic targets in sod related pathology. Health 2014; 975-988.
22. Süleyman H, Gl V, Erhan E. Oksidatif stres ve doku hasarı. Erzincan Tıp Derg. 2018;1:1-4.
23. zcan O, Erdal H, akırca G, Ynden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. J Clin Exp Invest 2015; 6: 331-336.
24. Karabulut H, Gülay MŞ. Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy ni Vet Fak Derg. 2016;1: 65-76
25. Beutler E., Red Blood Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, Grune & Stratton, New York. 1975; 112–114.
26. Aykac G, Uysal M, Yalcın, AS, Kocak Toker N, Sivas A, Oz H. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. Toxicology 1985; 36,71–76.
27. avdar C, Sifil A, amsarı T. Reaktif oksijen partiklleri ve antioksidan savunma. Trk Nefro Diy Transpl Derg. 1997; 3-4: 92-9.
28. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation. Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol. 1982; 78: 206–9.

29. Hillegass LM, Griswold D. E, Brickson B, Albrightson- Winslow C. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. *J Pharmacol Methods*. 1990; 24: 285-95.
30. Haklar U, Yüksel M, Veliöglu A, Türkmen M, Haklar G, Yalçın AS: Oxygen radicals and nitric oxide in chondral and meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; 403: 135-142.
31. Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M. Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Anal Chem*. 1993;65:1794-9.
32. Xiaopin D, Chunbai H, Kron SJ, Wenbin L. Nanoparticle formulations of cisplatin for cancer therapy. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2016; 8: 776–791.
33. Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, Maria VO, Ottone M, Bocchini V et. al. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 442: 265– 272.
34. Bentli R, Parlakpınar H, Polat A, Samdancı E, Sarihan ME, Sagir M. Molsidomine prevents cisplatin-induced hepatotoxicity. *Arch Med Res* 2013; 44: 521-528.
35. Kenza B, Djihane A, Mouad B, Ratiba M, Samir B, Fadila B.et. al. Renoprotective effect of centaurea choulettiana pomel (asteraceae) leaves on cisplatin -induced oxidative stress and renal dysfunction in mice. *J Applied Pharmac. Sci*. 2017; 7: 147-154.
36. Hyppolito MA, Oliveira JA, Lessa RM, Rossato M. Amifostine otoprotection to cisplatin ototoxicity: a guinea pig study using otoacoustic emission distortion products (DPOEA) and scanning electron microscopy. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2005; 7: 1268-73.

37. Huang QY, Li XF, Liu SP. Endothelin-1 and type III collagen alterations in the heart of rats following cisplatin-induced toxicity. *Mol Med Rep* 2012; 5: 651-654.
38. Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F, Morales A, Lopez-Novoa JM. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26: 3484–3495.
39. Rabelo De Freitas M, Figueiredo AA, Brito GA de C, Leitao RF de C, Junior JV de C, Junior RMG. The role of apoptosis in cisplatin-induced ototoxicity in rats. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009; 75: 745-52.
40. Al-Malki AL, Sayed AAR. Thymoquinone attenuates cisplatin-induced hepatotoxicity via nuclear factor kappa-  $\beta$ . *BMC Complement Alternat. Med.* 2014; 14: 282.
41. Kim SH, Kim JC, Ko JW, Lee IC, Park SH, Moon C. Protective effects of pine bark extract against cisplatin-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Lab Anim Res* 2014; 30: 174-180.
42. Bahadır A, Ceyhan A, Gergin ÖÖ, Yalçın BÜM., Özyazgan TM. Protective effects of curcumin and beta-carotene on cisplatin-induced cardiotoxicity: An experimental rat model. *Anatol J Cardiol* 2018; 19: 213-21.
43. Coskun R., Turan MI, Siltelioglu TI, Gulapoglu M. The protective effect of thiamine pyrophosphate, but not thiamine, against cardiotoxicity induced with cisplatin in rats. *Drug Chem Toxicol* 2014; 37: 290–294.
44. Soliman AF, Anees LM, Ibrahim DM. Cardioprotective effect of zingerone against oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by cisplatin or gamma radiation in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2018; 391: 819–832.

45. Nasr AY, Ibrahim AAS. Aged garlic extract ameliorates the oxidative stress, histomorphological, and ultrastructural changes of cisplatin-induced nephrotoxicity in adult male rats. *Micros Res Techn* 2015;78(6): 452-461.
46. Parhizgar S, Hosseinian S, Hadjzadeh MAR, Soukhtanloo M, Ebrahimzadeh A, Mohebbati R et al. Renoprotective effect of plantago major against nephrotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin. *Iranian J Kidney Dis*. 2016; 10: 182-8.
47. Boroushaki MT, Rajabian A, Farzadnia M, Hoseini A, Poorlashkari M, Taghavi A et al. Protective effect of pomegranate seed oil against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *Ren Fail* 2015; 37 (8): 1338-1343.
48. Naqshband A, Khan MW, Rizwan S, Rehman S, Khan F. Studies on the protective effect of dietary fish oil on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 265–273.
49. Sahu BD, Kalvala AK, Koneru M, Mahesh Kumar J, Kuncha M, Sistla R et al. Ameliorative effect of fisetin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats via modulation of NF- $\kappa$ B activation and antioxidant defence. *PLOS One* 2014; 9 (9): e105070.
50. Kellea I, Akkoc H, Tunik S, Nergiz Y, Erdinc M , Erdinc L. Protective effects of ethyl pyruvate in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biotech Biotechnol. Equip*. 2014; 28: 674-680.
51. 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.
52. Kamel KM, Abd El-Raouf OM, Metwally SA, Abd El-Latif HA, El-sayed ME. Hesperidin and rutin, antioxidant citrus flavonoids, attenuate cisplatin-Induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2014; 28: 312-9.

53. Karwasra R, Kalra P, Gupta YK, Saini D, Kumar A, Singh S. Antioxidant and anti-inflammatory potential of pomegranate rind extract to ameliorate cisplatin induced acute kidney injury. *Food Funct.* 2016;7: 3091-101.
54. Kim HJ, Park DJ, Kim JH, Jeong EY, Jung MH, Kim TH, Yang J. Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation. *J Pharmacol. Sci.* 2015; 127:117-126.
55. Hagara H, Medanya AE, Salam R, Medany GE, Nayal OA. Betaine supplementation mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity by abrogation of oxidative/nitrosative stress and suppression of inflammation and apoptosis in rats. *Exp Toxicol Pat* 2015; 67:133–141.
56. Ugur S, Ulu R, Dogukan A, Gurel A, Pembegul Yigit I, Gozel N, The renoprotective effect of curcumin in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Ren Fail*, 2015; 37: 332–336.
57. El-Naga RN. Pre-treatment with cardamonin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: Impact on NOX-1, inflammation and apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014; 274: 87–95.
58. Hayden A, Douglas J, Sommerlad M, Andrews L, Gould K, Crabb SJ. et al. The Nrf2 transcription factor contributes to resistance to cisplatin bladder cancer. *Urol Oncol.* 2014; 32: 806-14.
59. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem.* 1993;268:20116-25.
60. Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int.* 2005; 95: 1086-90.

61. Masters JR, Thomas R, Hall AG, Hogarth L, Matheson EC, Cattan AR, Lohrer H. Sensitivity of testis tumour cells to chemotherapeutic drugs: role of detoxifying pathways. *Eur J Cancer*. 1996; 32: 1248-53.
62. Rudin CM, Yang Z, Schumaker LM, VanderWeele DJ, Newkirk K, Egorin MJ et al. Inhibition of glutathione synthesis reverses bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer Res*. 2003; 63: 312-8.
63. Zhang L, Wang H. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. *Mar Drugs* 2015;13: 4310-4330.
64. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 2694-701.
65. Li X, Qi Z, Zhao L, Yu Z. Astaxanthin reduces type 2 diabetic-associated cognitive decline in rats via activation of PI3K/Akt and attenuation of oxidative stress. *Mol Med Rep*. 2016;13: 973-9.
66. Turkez H, Geyikoglu F, Yousef MI, Togar B, Gürbüz H, Celik K, Akbaba GB, Polat Z. Hepatoprotective potential of astaxanthin against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Ind Health*. 2014; 30: 101-12.
67. Yang Y, Kim B, Lee JY. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. *J Hum Nutr Food Sci* 2013; 1: 1003.
68. Hou L, Gao M, Xiao Z, Zhang J, Li X, Wang A. Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *J Surg Res*. 2015; 195: 559-67.
69. Akca G, Eren H, Tumkaya L, Mercantepe T, Horsanali MO, Deveci E et al. The protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2018; 100: 575-582.



70. El-Agamy SE, Abdel-Aziz AK, Wahdan S, Esmat A, Azab SS. Astaxanthin ameliorates doxorubicin-induced cognitive impairment (chemobrain) in experimental rat model: impact on oxidative, inflammatory, and apoptotic machineries. *Mol Neurobiol.* 2018; 55: 5727-5740.
71. Wang X, Zhao H, Shao Y, Wang P, Wei Y, Zhang W. Nephroprotective effect of astaxanthin against trivalent inorganic arsenic-induced renal injury in wistar rats. *Nutr Res Pract.* 2014; 8: 46-53.
72. Sila A, Kamoun Z, Ghilissi Z, Makni M, Nasri M, Sahnoun Z et al. Ability of natural astaxanthin from shrimp by-products to attenuate liver oxidative stress in diabetic rats. *Pharmacol Rep.* 2015; 67: 310-6.
73. Alam MN, Hossain MM, Rahman MM, Subhan N, Mamun MAA, Ulla A et al. Astaxanthin prevented oxidative stress in heart and kidneys of isoproterenol-administered aged rats. *J Diet Suppl.* 2018; 15: 42-54.
74. Yousef MI, Hussien HM. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: Protective effect of ginseng. *Food Chem Toxicol.* 2015;78: 17-25.
75. Özkök A, Ravichandran K, Wang Q, Ljubanovic D, Edelstein CL. NF- $\kappa$ B Transcriptional inhibition ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury. *Toxicol Lett.* 2016; 240: 105-13.
76. Boveris A, Cadenas E, Reiter R, Filipkowski M, Nakase Y, Chance B. Organ chemiluminescence: Noninvasive assay for oxidative radical reactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77: 347-51.
77. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *J Turgut Özal Med Cen.* 1997; 4: 453-461.

## **EKLER**

### **EK-1. ÖZGEÇMİŞ**

Adı Soyadı: Saniye ADA

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 29 Eylül 1987, Kadıköy

Elektronik Posta: saniye.ada@medeniyet.edu.tr

### **EĞİTİM**

| <b>Derece Yılı</b> | <b>Kurum</b>   | <b>Mezuniyet</b> |
|--------------------|--|------------------|
| Lisans             | Anadolu Üni.Biyoloji   | 2010             |
| Yüksek Lisans      | İMU, Sağlık Bilimler Enstitüsü,<br>Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı | -                |

### **İŞ TECRÜBESİ**

| <b>Tarih</b> | <b>Kurum</b>                            | <b>Görev</b>        |
|--------------|---|---------------------|
| 2015-        | İMU, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. | Araştırma Görevlisi |

### **YABANCI DİLLER**

İngilizce-YÖKDİL(2017) sağlık bilimleri- 82,500

### **YAYINLAR**

#### Posterler

1. **Ada S**, Erman ., Erek Toprak A, Kılıç, Koçer A, Kesgin Ayhan S et. al. Evaluation Of Prognosis with Total Oxidant/ Antioxidant Status And Some Oxidative Stress Parameters in Patients with Acute Ischemic The FEBS Journal, 283, P-09.03.3-007, 2016.
2. **Ada S**, Erman H, Erek Toprak A, Kılıç E, Koçer A, Kesgin Ayhan S et. al. Akut iskemik inmeli hastalarda total oksidan/antioksidan durumun değerlendirilmesi. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Uluslararası Katılımlı Kongre & Lab Expo, Kongre ve özet kitabı:163/PS-051,27 Eylül-1 Ekim 2016. Trabzon, Türkiye

## Proje

1. Araştırmacı: Sisplatin ile Oluşturulan Deneysel Toksikite Modelinde Astaksantin Olası Koruyucu ve Antioksidan Rolü- İMU BAP 1061 nolu Tez Projesi (Devam eden...)
2. Araştırmacı: Lösemi Hücre Hatlarında GLUT3 Ekspresyonunun Düzenlenmesinde STAT3 Geninin Rolünün Araştırılması- İMU BAP 1109 nolu genel araştırma projesi-(Devam eden...)

## Sertifikalar

- Deneysel Hayvanları Uygulama Ve Araştırma Sertifika Programı, Marmara Üni-DEHAMER, 2016
- Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası, Eskişehir Osmangazi Üni-Eğitim Fakültesi, 2014
- AÜ-Kromotografik Sistemler' Teorik ve Uygulamalı Eğitim programı, Anadolu Uni-AÜBİBAM, 2010
- 6. Kök Hücre Sempozyumu-2017 Mayıs
- Eppendorf Hücre Kültürü Semineri- 17 Nisan 2017

## EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



### MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

#### PROJE ONAY FORMU

|                             |   |  |                                     |                           |             |
|-----------------------------|---|--|-------------------------------------|---------------------------|-------------|
| <b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>    | <b>PROTOKOL KODU</b>  | 15.2017.mar  | <b>ÇALIŞMA: BİLİMSEL</b>            |                           |             |
|                             | <b>PROJE ADI</b>  | Sisplatin İle Oluşturulan Deneysel Toksikite Modelinde Astaksantinın Olası Koruyucu Ve Antioksidan Rolü. |                                     |                           |             |
|                             | <b>SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI</b>  | Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN  |                                     |                           |             |
|                             | <b>ARAŞTIRMA MERKEZİ</b>  | DEHAMER  |                                     |                           |             |
|                             | <b>DESTEKLEYİCİ</b>   |  |                                     |                           |             |
| <b>KARAR BİLGİLERİ</b>      | <b>TARİH: 13.02.2017</b>  |  |                                     |                           |             |
|                             | Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir. |  |                                     |                           |             |
| <b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b> |   |  |                                     |                           |             |
| <b>ÇALIŞMA ESASI</b>        | Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.   |  |                                     |                           |             |
| <b>ÜYELER</b>               |   |  |                                     |                           |             |
| <b>Ünvanı/ Adı/ Soyadı</b>  | <b>Uzmanlık Dalı</b>  | <b>Kurumu/ Ek Üyeliği</b>  | <b>Onaylanan Proje ile İlişkisi</b> | <b>Toplantıya Katılım</b> | <b>İmza</b> |
| Prof.Dr. Göksel ŞENER       | Farmakoloji   | M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Prof.Dr. Levent KABASAKAL   | Farmakoloji   | M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Prof.Dr. Ayşen YARAT        | Biyokimya   | M.Ü. Dış Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Prof.Dr. Serap ŞIRVANCI     | Histoloji Embriyoloji ABD   | M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN      | Farmakoloji   | M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Doç.Dr. Gürkan SERT         | Tıp Tarihi ve Etik  | M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ      | Veteriner Hekim   | M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                | Araştırmacı |
| Bio. Arif GÜMÜŞ             | Biyoloji  | Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye                                 | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |
| Cihanşah MURATOĞLU          | Serbest Danışmanlık   | Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye  | Var<br>Yok                          | Evet Hayır                |             |