

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN
RATLARDA EPİGALLOKATEŞİN GALLATİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Mustafa TİMURKAAN**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN**

**ELAZIĞ
2010**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN

Danışman

Uzmanlık Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN olmak üzere, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Emir DÖNDER ve diğer saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. İbrahim Halil BAHÇECİOĞLU, Prof. Dr. Ahmet IŞIK, Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKER, Doç. Dr. Yusuf ÖZKAN, Doç. Dr. Mehmet YALNIZ, Doç. Dr. Emin Tamer ELKIRAN, Doç. Dr. Süleyman Serdar KOCA, Doç. Dr. Aziz KARAOĞLU, Doç. Dr. Ramiz ÇOLAK, Yrd. Doç. Dr. Cem AYGÜN, Yrd. Doç. Dr. Bilge AYGEN'e teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, her konuda destek olarak, yol gösteren tez danışmanı Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN'a, Veterinerlik Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları öğretim üyesi Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e, tezimin istatistiklerinin yapılması ve sonuçların yorumlanma safhasında emeği geçen Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, histopatolojik inceleme safhasındaki yardımlarından dolayı Patoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Hanifi Özeran'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım dostluklarımı esirgemeyen tüm asistan ve uzman olmuş arkadaşlarıma, iç hastalıkları servislerinde çalışan tüm hemşire, personel ve kliniğimiz çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm hayat boyu olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini biran bile eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

Yazım aşamasında da her zaman olduğu gibi; her türlü desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren yol arkadaşım, sevgili eşim Dr. Esra Suay TİMURKAAN ve gülümsemesiyle motivasyon sağlayan kır çiçeğim, kızım LAMRA'ya sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Sisplatin (CDDP) nefrotoksitesini böbrekte oksidatif strese neden olur ve CDDP'nin klinik kullanımını kısıtlar. Epigallokateşin gallat (EGCG) yeşil çaydan derivate edilen güçlü bir antioksidandır. Bu çalışmada; CDDP'nin neden olduğu nefrotoksite ve lipid peroksidasyonuna EGCG'nin etkisi deneysel olarak araştırıldı.

Çalışmada, 4 gruba (n=7) ayrılarak toplam 28 adet erkek Wistar rat kullanıldı. (i) Kontrol grubu, (ii) EGCG (100 mg/kg/gün) grubu, (iii) CDDP verilen CDDP (7 mg/kg i.p, tek doz), (iv) EGCG (100 mg/kg/gün)+CDDP grubu (7 mg/kg i.p., tek doz). CDDP uygulaması serum üre nitrojeni ve kreatininde belirgin bir artışa neden oldu ($p<0.001$). Serum üre nitrojeni ve kreatinin düzeyleri EGCG+CDDP grubunda CDDP grubuna göre daha düşüktü ($p<0.001$). CDDP verilen ratlarda serum malondialdehid (MDA) düzeylerinde belirgin artış gözlemlendi ($p<0.05$). EGCG, MDA'daki artışı önledi ($p<0.05$). Renal Bax protein ekspresyonu CDDP grubunda kontrol grubuna göre daha yüksekti, EGCG tedavisi ile Bax düzeylerinde anlamlı azalma oldu ($p<0.05$). Bcl-2 protein ekspresyonu EGCG+CDDP grubunda CDDP grubuna göre daha yüksekti ($p<0.05$). Böbrek dokusunda Hsp60 ve Hsp70 ekspresyonu yalnız CDDP verilen ratlara göre, CDDP ile birlikte EGCG verilen ratlarda daha düşüktü ($p<0.001$). CDDP'nin neden olduğu renal histopatolojik değişiklikler EGCG tedavisi ile belirgin ölçüde düzeldi.

Bu sonuçlar CDDP'nin oksidatif strese ve böbrek hasarına neden olduğunu gösterir. EGCG tedavisi oksidatif stresi azaltarak ve Bax/Bcl-2 protein ekspresyonlarını etkileyerek sisplatin nefrotoksitesinin önlenmesinde terapötik rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: sisplatin, nefrotoksite, EGCG, MDA, Bax/Bcl-2, Hsp60-70

ABSTRACT

THE INVESTIGATION of THE EFFECTS OF EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) in CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY in RATS

Cisplatin (CDDP)-induced nephrotoxicity is related to an increase in oxidative stress in the kidney and limits clinical use of CDDP. Epigallocatechin gallate (EGCG), a very potent antioxidant derived from green tea. In the present study, we investigated the effect of EGCG against CDDP-induced lipid peroxidation and nephrotoxicity in rats.

Male wistar rats (n=28, 8 wk-old, between 200-215 g) were divided into four groups: (i) control rats, (ii) EGCG (100 mgkg⁻¹, daily)-control rats, (iii) CDDP-injected rats, CDDP group (7 mgkg⁻¹ i.p, single dose) (iv) EGCG-treated (100 mgkg⁻¹, daily) CDDP-injected rats (EGCG+CDDP group). CDDP administration resulted in significant increase in serum urea nitrogen and creatinine (p<0.001). Serum creatinine and urea nitrogen levels were lower in rats treated with EGCG+CDDP compared with rats treated with CDDP alone (p<0.001). The serum from the CDDP-treated rats showed a significant increase in malondialdehyde (MDA) levels in comparison to the values (p<0.05). EGCG prevented the rise of MDA (p<0.05). Renal Bax protein expression was significantly higher in CDDP-treated rats compared with control rats, and EGCG treatment significantly reduced the levels of Bax (p<0.05). Bcl-2 protein expression was higher in EGCG+CDDP administered rats than CDDP-injected rats (p<0.05). The expression of renal Hsp60 and Hsp70 was significantly lower in EGCG+CDDP group compared with rats treated with CDDP alone (p<0.001). CDDP-induced renal histopathological changes were significantly improved with EGCG.

These results show that CDDP produces oxidative stress and renal damage. In conclusion, our study show that EGCG, which reduces oxidative stress and changes the expression of Bax and Bcl-2 protein, has significant potential as a therapeutic intervention for CDDP-induced renal injury.

Key words: cisplatin, nephrotoxicity, EGCG, MDA, Bax/bcl-2, Hsp60-70

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sisplatin	1
1.1.1. Sisplatinin Farmakokinetik Yapısı	2
1.1.2. Sisplatinin Yan Etkileri ve Nefrotoksisite	2
1.1.3. Patogenez	5
1.1.3.1. Hücresel toksisite	5
1.1.3.2. Vazokonstriksiyon	5
1.1.3.3. Proinflamatuvar etkiler	5
1.1.3.4. Proksimal tübüldeki etkiler	6
1.1.4. Sisplatin Nefrotoksisitesinin Klinik Yansıması	6
1.1.4.1. Renal Bozulma	6
1.1.4.2. Hipomagnezemi	8
1.1.4.3. Trombotik anjiopati	8
1.1.4.4. Fanconi-benzeri sendrom	8
1.1.4.5. Tuz kaybı	9
1.1.4.6. Anemi	9
1.2. Oksidatif Sistem	9
1.2.1. Lipid Peroksidasynu	10
1.2.2. Biyolojik Sistemlerde Lipid Peroksidasyonun Sonuçları	10
1.3.3. Endojen Antioksidanlar	12
1.3.3.1. Enzimatik Antioksidanlar	12
1.3.3.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	14
1.3.3.3. Diğer Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar	14
1.3.4. Eksojen Antioksidanlar	14

1.3.5. Diğer antioksidanlar (Farmakolojik)	14
1.3.5.1. Yeşil Çayın Bileşenlerinin Kimyası	15
1.3.5.2. Çay Polifenollerinin Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Uzaklaştırılması	15
1.3.5.3. Çay Polifenollerinin Metabolizma ve Sağlık Üzerine Etkileri	17
1.3.5.3.1. Yağ Metabolizması Üzerine Etkileri	17
1.3.5.3.2. Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri	18
1.3.5.3.3. İyonların Emilimi Üzerine Etkileri	18
1.3.5.3.4. Hormon Metabolizması Üzerine Etkileri	18
1.3.5.3.5. Sağlık Üzerine Etkileri	18
1.3.5.4. Katesinlerin Antioksidan Aktivitesi	19
1.4. Sisplatin ve Apoptozis	20
1.4.1. Apoptozun Gen Regülasyonu	21
1.4.1.1. p53'ün Rolü	21
1.4.1.2. Bcl-2 / Bax	21
1.5. Hsp	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1. Hayvan Materyali	24
2.2. Deneme Düzeni	24
2.3. Laboratuvar Analizi	25
2.3.1. Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Ölçümü	26
2.4. Histopatolojik Değerlendirme	27
2.5. İstatistiksel analizleri	27
3. BULGULAR	28
3.1. Gruplarda Üre ve Kreatinin Düzeyleri	28
3.1.1. Üre Düzeyleri	28
3.1.2. Kreatinin Düzeyleri	28
3.2. Serum MDA Düzeyleri	29
3.4. Böbrek Bax Ekspresyonu	29
3. 5. Böbrek Bcl-2 Ekspresyonu	29
3.6. Böbrek Hsp60 Ekspresyonu	30
3.7. Böbrek Hsp70 ekspresyonu	32

3.8. Histopatolojik Sonuçlar	32
4. TARTIŞMA	34
5. KAYNAKLAR	43
6. ZGEMIŐ	62

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması.	13
Tablo 2. Çay Yaprağının Bileşimi.	16
Tablo 3. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu.	17
Tablo 4. Saf antioksidanlar ve çay fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi.	20
Tablo 5. Araştırmada kullanılan diyetin bileşimi.	24
Tablo 6. Gruplarda serum üre-N ve kreatinin düzeyleri.	28
Tablo7. Gruplarda serum MDA düzeyleri.	29
Tablo 8. EGCG uygulamasının rat böbrek dokusundaki morfolojik değişiklikler üzerine etkisi.	32

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP).	1
Şekil 2. Memeli hücrelerinde apoptotik programın basitleştirilmi şeması.	22
Şekil 3. Graplarda ratların böbrek dokusu bax ekspresyon düzeyleri.	30
Şekil 4. Graplarda ratların böbrek dokusu Bcl-2 ekspresyon düzeyleri.	30
Şekil 5. Graplarda ratların böbrek dokusu Hsp60 ekspresyon düzeyleri.	31
Şekil 6. Graplarda ratların böbrek dokusu Hsp70 ekspresyon düzeyleri.	31
Şekil 7. Hematoxylin and eosin (H&E) ile gruplara göre böbreğin histopatolojik görünümü.	33

KISALTMALAR LİSTESİ

ABY	: Akut Böbrek Yetmezliği
AIF	: Apoptozis İndükleyici Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktivite Edici Faktör-1
ARE	: Antioksidan Cevap Elementi
ATP	: Adenintrifosfat
BSO	: Butionin Sulfoksimin
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
Ca	: Kalsiyum
CDDP	: Sisplatin
Cu	: Bakır
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Epikateşin
ECG	: Epikateşingallat
EGC	: Epigallokateşin
EGCG	: Epigallokateşin galat
EPO	: Eritropoietin
FDA	: Food and Drug Administration
GFH	: Glomeruler Filtrasyon Oranı
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IL-6	: İnterlökin-6
İ.P.	: İntraperitoneal
K	: Potasyum
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
Na	: Sodyum

ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksid Dismutaz
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktor-alfa
TPA	: 12-o-tetradekanoil porbol-13-asetat
Zn	: Çinko

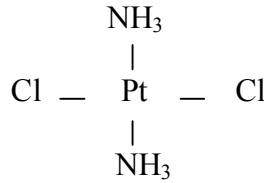
1. GİRİŞ

1.1. Sisplatin

Sisplatin (*cis-diamminedichloroplatinum(II)* =CDDP) birçok malignensinin tedavisinde kullanılan potent ve değerli bir kemoterapi ajanıdır(1).

Sisplatinin antitümöral aktivitesi, Rosenberg ve ark.(2) 1961’li yıllarda başlayan çalışmalarının sonucunda şans eseri olarak ortaya çıkarılmıştır. Amonyum klorür içeren odacık içine bırakılan platinum elektrodlar sayesinde *Echerichia Coli*’nin hücre bölünmesinin durduğu, ancak uzamanın devam ettiği gözlenmiştir. Bu etkinin, elektrodlar arasında elektrik akımı ilerlerken, burada üretilen elektroliz ürünlerinin varlığı neticesinde oluştuğu anlaşılmıştır. Elektroliz ürünlerinin analiziyle ilk olarak *ammonium chloroplatinate* elde edilmiş, daha sonra bu ajanın, nötral türleri olan –trans ve –cis izomerlerine dönüşmesiyle *cis-diamminedichloroplatinum II* elde edilmiştir (3) (şekil 1).

Faz 1 çalışmalarda, CDDP’nin belirgin gastrointestinal ve böbrek toksisitesinin görülmesi üzerine nerede ise terk edilmek üzere iken, testiküler kanserlerde elde edilen başarılı sonuçlar, bol hidrasyon ve mannitol kullanımı ile nefrotoksitenin azaltılabileceğinin görülmesi üzerine tekrar ilaç üzerinde çalışmalar yapıp, geliştirildikten sonra, 1978’de FDA’nin (Food and Drug Administration) onayıyla klinik uygulama alanına hızla girmiştir (1, 4-5). CDDP günümüzde de; daha çok Akciğer küçük hücreli tümörleri, over, testis, mesane, baş-boyun kanserleri gibi solid tümörlerde ve refrakter lenfoma gibi hematolojik malignensilerde kullanılan geniş spektrumlu bir antineoplastik ilaçtır (5).



Şekil 1. Cis-Diamminedichloroplatinum (CDDP)

Sisplatin cis yapılanmasında iki klorlu “*yer değiştiren grup*” içeren nötral bir moleküldür. CDDP molekülü içerisindeki “-trans” yerine “-cis” yapılanması sayesinde deoksiribonükleik asitlere (DNA) bağlanması ve aktivite kazanması gerçekleşmektedir. Bu açıdan cis yapılanmasının etkisi oldukça önemlidir (2, 6). Bu

yapı kan plazması gibi klorür içeriği 100 mM'dan yüksek olan ortamlarda stabildir. Hücre içi klorür yoğunluğunun az olduğu ortamlarda ise molekül yapısındaki klorür atomlarını kaybederek, DNA ve diğer büyük moleküllerle kovalent olarak bağlanıp reaktif elektrofillerini verir (7). CDDP pürinlerin N₇ pozisyonu ile reaksiyona girip mono veya bifonksiyonel DNA fragmantasyonlarının oluşmasına sebep olur (8). CDDP DNA etkileşimi sonucunda d(GpG)Pt, d(ApG)Pt ve d(GpNG)Pt zincir içi çapraz bağlanmaları oluşur. Bu bağlar ile DNA sarmalında yerel kıvrımlanmalar ve açılmalar gerçekleşir. Bu değişikliklerle hücre zedelenmesi oluşturup, Apoptozis düzeyindeki morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle etkisini gerçekleştirir (9-10). Ayrıca CDDP'nin radyasyon ve diğer kemoterapatik ajanlarla sinerjistik etkileşimi olmaktadır. Platin bileşiklerinin hem letal hem de subletal radyasyonla indüklenen hasarın onarım sürecini inhibe ettiği gösterilmiştir.

1.1.1. Sisplatinin Farmakokinetik Yapısı

Sisplatin gastrointestinal kanaldan emilmez, plazma proteinlerine yaygın olarak bağlanır (% 90) (11-12). Ratlarda dolaşımdaki total plazma platinumun % 50'si CDDP verilmişinden bir saat sonra proteinlere bağlı olarak tespit edilir (10). İntravenöz bolus olarak verilmesini takiben serbest CDDP iki saat içinde plazmada tespit edilemez hale gelir. 1 mg/kg CDDP'nin bir saatlik infüzyonu sonunda pik plazma düzeyleri oluşur, sonra hızla azalır. Sıçanlara CDDP verilmesinden 30 dk. sonra böbrek, mesane, karaciğer, femur, böbrek üstü bezi ve ince bağırsaklarda plazmadan daha yüksek oranda CDDP saptanır (13). İlacın prostat ve overlerdeki yoğunlukları da yüksek miktarlardadır (14). CDDP'nin merkezi sinir sistemine geçiş oranı düşüktür (11, 12).

İnsan ve hayvan çalışmalarında ilk 24 saatte ilacın % 80'inin idrarla atıldığı tespit edilmiştir. İlacın % 8'i sonraki 24 saatte atılır. CDDP'nin safra kanalı yoluyla atılım oranı % 10'un altındadır (15).

Uzamış infüzyonlarda azalmış böbrek klirensi nedeniyle total CDDP ve değişmeden atılan ilaç yüzdesi azalır. Böbrek yetmezliklerinde CDDP'nin yarı ömrü uzar (12).

1.1.2. Sisplatinin Yan Etkileri ve Nefrotoksisite

Sisplatin tedavisine bağlı olarak bulantı-kusma, nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve daha seyrek olarak da oküler toksisite gözlenebilir (16).

Sisplatin etkisi kümülatif ve doza bağımlıdır. Düşük dozlarda (≤ 40 mg/m²) böbrek hasarı genellikle geri dönüşümlüdür. Daha yüksek dozlarda (2 mg/kg veya 75 mg/m²) böbrek hasarı akut ve geri dönüşümsüz olabilir. CDDP kullanan hastaların 1/3'ünde böbrek hasarı oluşabilir. Kreatinin klirensi 70 ml/dak'nın altında olanlarda ve 60 yaşın üzerindeki hastalarda risk artar. Şayet aminoglikozidler gibi nefrotoksik ilaç kullanımı da söz konusu ise yüksek CDDP dozları ve hızlandırılmış infüzyon hızları böbrek hasarı riskini daha da artırır (12). Kreatinin klirensinin azalması nefrotoksisite açısından başlangıç klinik bulgularından olup, serum kreatinin yüksekliği de gözlenebilir (16, 17). CDDP alan hastaların % 25'inde 1-2 hafta süreli ve geri dönüşümlü azotemi meydana gelebilir. Kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin değerlerinde görülen bu yükselme hafif ve geri dönüşümlü ya da ağır ve geri dönüşümsüz olabilir. BUN ve kreatinin seviyelerindeki pik seviyelere tedavi sonrası 13. günde ulaşılır ve ortalama 21 günde normal seviyelere döner (16).

Sisplatin sonrası gözlenen nefrotoksisitenin etkisi net olarak bilinmemekle birlikte genel kabul gören görüş; renal hasarın renal peroksidasyonla ilgili mekanizma üzerinden olduğudur. Yapılan çalışmalarda CDDP tedavisi sonrasında *in vivo* şartlarda lipid peroksidasyonundaki artıştan ziyade, peroksidasyona karşı koruyucu enzim aktivitelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (18). Sıçanlarda CDDP tedavisi sonrasında glutatyon (GSH), Glutatyon-S-Transferaz (GST), redüktaz ve peroksidaz aktiviteleri böbrek; kortikal, mikrozomal ve sitozolik fraksiyonları da azalır. Lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon (GSSG) ise artar GST'nin α sınıfındaki azalma oldukça belirgindir (10). Lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rolü olan GST, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz enzimlerinin böbrek ve karaciğerlerde azaldığı sıçan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir (19, 21).

Dokularda çalışılan enzimler içinde en ciddi azalmayı gösteren böbrekteki GST aktivitesidir (22). GST enzimi alkilleyici ajanların detoksifikasyonlarının başlatılmasında önemli bir fizyolojik role sahiptir. Bu enzim, zararlı etkiye sahip ajanlarla glutatyonun sülfidril grubu arasındaki reaksiyonu katalizleyerek daha fazla suda eriyebilen ürünler meydana getirir (21). GST izoenzimleri incelendiğinde CDDP tedavisi alan ratların böbreklerinde özellikle α -GST'nin aktivitesinde azalma olduğu görülüp, bunun da CDDP'ye bağlı böbrek hasarı ile yakından ilişki içerisinde olduğu

görülmüştür (19, 23). CDDP'ye bağlı nefropatide CDDP'nin sülfür grubu içeren moleküllerle olan etkileşimi de önemlidir. Nükleofilik sülfür atomu CDDP'nin bağlanma yeridir. CDDP cis-[Pt(NH₃)²(H₂O)]⁺ cis-[Pt(NH₃)² Cl (H₂O)]⁺ gibi hidrolize olmuş ürünleri, sülfür grubu içeren moleküllerle CDDP'ye göre çok daha hızlı olarak etkileşime girer (23). Pozitif yüklü hidrolize ürünler, CDDP kadar kolayca hücre zarlarını geçemez. Bu nedenle CDDP'nin hidrolize olmuş ürünlerinin etkisine duyarlı noktaların başında, proksimal tübülüs hücreleri gelmektedir (24).

Sisplatin metabolitlerinin GSH ve metallothioneinler gibi sülfidril grubu içeren proteinler ve sitozolik hücre proteinlerine bağlanması son derece önemlidir. Protein ve protein olmayan yapılarda sülfidril grupları enzim aktiviteleri gibi birçok hücre fonksiyonunun devamlılığı için kullanılır (25, 26). Sülfidril içeren gruplarla CDDP'nin etkileşimi başta GSH olmak üzere bazı hücre koruyucularında azalmaya neden olur. CDDP'ye bağlı GSH azalmasının GSH'nin oksidasyonundan çok CDDP'nin sülfidril gruplarına doğrudan bağlanmasıyla olduğu tespit edilmiştir (27). Yine benzeri şekilde CDDP'nin indüklediği böbrek hasarında olduğu gibi GSH seviyelerini azaltan bir başka madde olan Butionin Sulfoksimin (BSO) kullanımı ile de renal hasarın arttığı bildirilmiştir (28). Sülfidril içeren bir yapısı olan ve nükleofilik özelliklere sahip olan GSH, CDDP'nin DNA ve diğer büyük moleküllerle olan etkileşimini engeller. BSO ile ortaya çıkarılan GSH azalmasının CDDP'nin tümör hücrelerine karşı olan etkisini arttırdığı da ileri sürülmüştür (15). Bunun aksini düşünerek GSH ve sülfidril içeren bileşiklerin kullanımının CDDP'ye bağlı oluşan nefropatide koruyucu rolünün olabileceği ileri sürülmüştür (18, 27, 29). Bununla birlikte bu maddelerin koruyucu rolünün olmadığını ileri süren yayınlar da mevcuttur (17).

Sisplatin tedavisine bağlı olarak mitokondrielerde solunum zincirinin devamlılığının bozulması, mitokondrielerde kalsiyum çıkışının artması, kontraktıl proteinlerin inaktivasyonu, adenintrifosfat (ATP) üretiminin azalması, sodyum (Na)⁺ potasyum (K)⁺ - ATP'az ve kalsiyum (Ca)⁺⁺/ magnezyum(Mg)⁺ ATP'az gibi değişik ATP'azların etkilenmesi ortaya çıkar. Bu enzim aktivitesinin inhibisyonu ile Na⁺/K⁺ iyonlarının akımı etkilenerek hücre içi K⁺ seviyeleri düşmesi gözlenebilir ve bu durum hücre toksisiteye sebep olabilir (30, 32). Mitokondrial GSH azalması mitokondri içindeki sülfidril gruplarının kaybını da beraberinde getirir (28).

Sisplatin uygulanan deney hayvanları kontrol gruplarıyla karşılaştırılmış ve mevcut mitokondri kaybının yanında şişme ve birleşmeye bağlı mitokondri yüzey alanında bir artış görülmüştür (33). CDDP nefrotoksitesinde mitokondrial DNA hasarı da önemlidir (18). CDDP'nin indüklediği nefropatide hemodinamik faktörler de önemli rol oynamaktadır. CDDP tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan platelet aktive edici faktörün (PAF) arteriolar ve/veya mezangial vazokonstriksiyona neden olarak renal kan akımı ve GFH'yi (glomerular filtrasyon hızı) azalttığı bildirilmektedir. CDDP'ye bağlı renal hasarın başlangıcında görülen proksimal tüp emilim bozukluklarının azalmış renal kan akımı ile arttığı ve böbrek hasarında preglomeruler vazokonstriksiyonun önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (34, 35).

1.1.3. Patogenez

Sisplatine maruziyeti takiben renal disfonksiyonların gelişimine birçok mekanizma neden olmaktadır. Bunlar selüler toksisite, renal mikrovasküler yapıda vazokonstriksiyon ve proinflamatuvar etkilerdir.

1.1.3.1. Hücresel toksisite

Özellikle düşük klor ortamında CDDP güçlü hücresel toksindir. Hücrelerin içinde, CDDP'deki klor atomları su molekülleri ile yer değiştirirler. Bu hidroliz ürününün nükleusda DNA ile sitoplazmada GSH ile reaksiyona giren aktif bir yapı olduğuna inanılır (12). Tümör ve diğer bölünen hücrelerde, CDDP-DNA "*intrastrand crosslink*" sitotoksitesisi ile sonuçlanır (36). Bu moleküler olayların kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmada sorumlu olduğuna inanılır (37, 38).

1.1.3.2. Vazokonstriksiyon

Renal mikrovasküler yapıdaki vazokonstriksiyon CDDP uygulanmasından hemen sonra ortaya çıkıyor gibi gözükmektedir (39, 40).

1.1.3.3. Proinflamatuvar etkiler

Sisplatin; tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ), hücresel inflamatuvar cevapta T hücreleri, nötrofiller ve hücresel inflamatuvar cevabın diğer komponentlerinin farklılaşması, matürasyonu ve aktivasyonu sağlayan kaspaslar gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırmaktadır (41, 42). CDDP ile oluşturulan akut böbrek yetmezliğinin (ABY) deneysel modelinde böbrekte endotelial hücre adhezyon moleküllerinin artmış ekspresyonunu ve T hücreleri ve lökositlerin daha sonraki infiltrasyonu

gösterilmektedir (43-45). Bu mediatörlerin potansiyel önemi bu inflamatuvar yollarda defekti olan sıçanlarda CDDP'ye maruziyeti takiben ABY'nin şiddetinin daha az olması ile gösterilmiştir (42, 46, 47).

1.1.3.4. Proksimal tübüldeki etkiler

Proksimal tübül hücreleri CDDP'den selektif şekilde etkilenirler. Bu hem nekroz hem de apoptozis ile gösterildiği gibi, proliferasyon olmayan hücreler DNA'ya hasar veren ajanların toksisitesine genellikle daha az sensitiftirler (48). Gözlenen nefrotoksisite için muhtemel nedenler; yardımcı transport ile renal uptake'inin artması, proksimal tübüldeki CDDP'nin GSH'a ve sistein-glisin konjugatlarına metabolize olması (49) ve reaktif oksijen tiplerinin oluşumudur (50-52).

Sisplatin-ile oluşan nefrotoksisite için öne sürülen diğer hüresel etkiler:

- Mitokondrial F1F0-ATPaz'ın inhibisyonunun, sitokrom C salınımına ve apoptotik hücre ölümüne neden olarak membran potansiyeli ve mitokondrial oksidatif fosforilasyonu azaltması (53).
- Proksimal tübülde yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonundan dolayı, böbrek dokusunda *non-esterifiye yağ asitleri* (NFED) ve trigliseridlerin akümülyasyonu ve hiperlipideminin indüksiyonu (54, 55).
- Renal epitelyal hücrelerde *peroxisome-proliferator-activated-receptor-alpha* (PPAR- α) aktivitesinin direkt inhibisyonu (56, 57).

1.1.4. Sisplatin Nefrotoksisitesinin Klinik Yansıması

Sisplatin nefrotoksisitesinin en önemli belirtisi ilerleyici olabilen renal bozulmadır. Diğer renal belirtiler hipomagnezemi, tuz kaybı, *Fanconi-benzeri sendrom* ve anemiye içermektedir.

1.1.4.1. Renal Bozulma

Renal bozulma insidansı ilacın uygulama dozu ve frekansına ve nefrotoksisiteyi tanımlamak için kullanılan kriterlere göre değişmektedir. CDDP ile yapılan başlangıç faz I ve faz II çalışmalarında nefrotoksisite gözlenmiştir ve yoğun hidrasyon rejimleri kullanılmadan önceki dönemlerde bu çalışmalardan % 50 daha fazla görülmüştür (1, 58).

Renal yetmezliğin bu insidans ve şiddeti daha sonraki dönemlerde artmakta ve daha da ileriki dönemlerde geri dönüşümsüz olmaktadır. Sonuç olarak; CDDP

tedavisinin durdurulması genellikle progresif renal bozulmanın erken kanıtları başladığında olur.

Bu gözlemler platinumun konvansiyonel dozlarının uygulamasında yapılmaktadır. Potent anti-tümör aktivitesine rağmen, CDDP hematopoiteik kök hücre transplantasyonu öncesi kemik iliği ablasyonu için gereken yüksek dozlarda şiddetli toksisite nedeni ile kullanılamazlar (59). Bunun yerine bu amaç için daha az toksik bir analog olan karboplatin kullanılmaktadır.

Eğer renal yetmezlik ilerlememiş ise, nefrotoksisiteli hastalarda idrar çıkışı, konsantrasyon defekti nedeni ile tipik olarak 1000 ml/gün olmaya devam eder. Bu defekt üriner konsantrasyon için zıt akım gradyanın gerekli olduğu henle kulpunda veya antidiüretik hormonun etki yeri olan toplayıcı tübüllerde platinum ile oluşan hasarı göstermektedir (60). Toplayıcı tübüllerdeki hasar su kanallarının (aquaporin) azalmış ekspresyonu ile birliktedir (61). Ayrıca CDDP nefrotoksitesinin organik katyonik transporter ile oluşabileceği de gözükmemektedir (62).

Sisplatine bağlı ABY genellikle nonoligürik şekilde olur. Poliürinin iki ayrı safhası vardır. CDDP verildikten sonraki ilk 24-48. saatlerde idrar osmolaritesi düşer ancak GFH düşmez. Bu erken poliüri spontan olarak düzelir. İkinci poliüri 72-96 saatlerde osmolarite ve GFH düşüklüğü ile birlikte gelişen fazdır. İlk faz dışarıdan verilen yüksek doz vazopressine yanıt verir. Bu fazda prostaglandinlerin fazla salgılanması ile oluşan konsantrasyon defektleri oluşmaktadır. Prostaglandin sentezinde artış olmasına rağmen dışarıdan verilen aspirin ve diğer antienflamatuarlara yanıt yoktur. Bu faz boyunca vazopressin seviyesi düşüktür. Gelişen poliüri ise böbrekteki konsantrasyon defektine bağlıdır. Bu fazda prostaglandinlerin ve vazopressinin rolü yoktur (63). Özellikle yüksek doz uygulanan CDDP tedavisi sonrasında plazma K^+ seviyelerinde belirgin azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum renal K^+ kaybına bağlı olup beraberinde Mg^+ eksikliğine de yol açabilir. Ayrıca kemoterapi esnasındaki şiddetli kusmalar da hipokalemiyi derinleştirir (3, 17). Proksimal tübüldeki reabsorbsiyonun düşüşü Na^+ ve suyun daha distal segmentlere salınmasına sebep olur. Bu da Na^+ yükü bağımlı K^+ sekresyonuna yol açıp, mevcut hipokalemiyi daha da derinleştirir (17, 64).

Yapılan çalışmalarda CDDP'nin hem proksimal hem de distal tübüllerde Na^+ reabsorbsiyon hızlarını etkilediği, renal Na^+ kaybının doza bağımlı olduğu ve hemen

her zaman yüksek doz CDDP tedavisine eşlik ettiği gösterilmiştir (>40 mg/m²/gün). Hastalarda gözlenen Na⁺ klirensindeki artışın tedaviyi izleyen 6 ay boyunca devam edebileceğine dikkat çekilmiştir (17, 64).

1.1.4.2. Hipomagnezemi

Normal erişkinlerde filtre edilen Mg⁺'nin sadece % 25'i proksimal tübülden reabsorbe edilir. Yapılan çalışmalarda CDDP (20 mg/m²/gün) ile 4-6 siklus sonrasında hipomagnezeminin geliştiği gösterilmiştir (65). Bu çalışmalarda akut klinik tablo sıklıkla gözlenmemektedir. Bu durumun sebebi Mg⁺'deki düşüşün yavaş olarak gözlenmesine bağlanmıştır. Yüksek doz CDDP ile tedavi edilen hastalarda Mg⁺ klirensinde belirgin bir artış ve plazma Mg⁺ seviyesinde anlamlı düşüş gözlenmemiştir. CDDP'nin henle kulpunun çıkan kolunda Mg⁺ transportunu değiştirdiği anlaşılmıştır. Proksimal tübülden Mg⁺ reabsorpsiyonu azalması ile birlikte hastalara uygulanan serum fizyolojik infüzyonu da plazma Mg⁺ seviyesinin düşmesine katkıda bulunmuş, hatta bu artış mannitol kullanımıyla % 40-50 oranında şiddetlenmiştir (62).

1.1.4.3. Trombotik anjiopati

Sisplatin, bleomisin ile birlikte verildiğinde; hemolitik-üremik sendromun (HÜS) veya trombotik trombositopenik purpuranın (TTP) özellikleri ile birlikte olan trombotik mikroanjiopatiden oluşan renal yetmezliğin farklı bir formu ile birlikte olabilir (66). Trombotik mikroanjiopati ayrıca gemsitabin ile CDDP verildiğinde de tanımlanmıştır. Bu bozukluk muhtemelen sekonder trombosit aktivasyonu ile olan direkt vasküler yaralanmayı yansıtmaktadır.

Renal yetmezliğin başlaması ani veya yavaştır. Yavaş olduğunda, tedavi bırakıldıktan aylar sonra da gelişebilir. Tanı mikroanjiopatik hemolitik anemi veya trombositopeninin varlığı ile konur.

1.1.4.4. Fanconi-benzeri sendrom

Sisplatin ile oluşan nefrotoksisite Fanconi-benzeri bir sendromun gelişmesi ile olabilir. Bu sendrom; glukoz ve aminoasidlerin (alanin, valin, lösin, metionin) üriner konsantrasyonlarının artması ve trikarboksilik asid siklus (TCA) metabolitlerinin (laktat ve piruvat) idrarda bulunması ile tanımlanır. Tübüler hasarın bir belirtici olmasının yanında, glukozüri ayrıca CDDP ile oluşan glukoz intoleransı ve glukoz uyarısına anormal insulin ve glukagon cevabı nedeni ile olan hiperglisemi sonucu da

olabilir (54, 67, 68). Klasik Fankoni sendromu hiç bildirilmemiştir, ancak orta derecede tübüler disfonksiyon devam edebilir (69).

Ayrıca, yüksek moleküler ağırlıklı proteinler ve N-acil-beta-glucozaminidaz (NAG) gibi glomerüler ve tübüler toksisite belirteçleri, akut CDDP nefrotoksitesinde oldukça artmıştır (70).

1.1.4.5. Tuz kaybı

Klinik olarak belirgin tuz kaybı, vaka bildirimlerinde ve küçük klinik serilerde tanımlanmış olan CDDP nefrotoksitesinin nadir bir belirtisidir (71-72).

1.1.4.6. Anemi

Sisplatin sıklıkla anemi ile ilişkilidir ve bu diğer kan hücreleri üzerine olan myelosüpressif etkisinin dışındadır. İnsan ve hayvan çalışmaları CDDP ile oluşan renal tübüler yaralanmanın anemiye neden olan eritropoietin (EPO) eksikliğinden kaynaklandığını düşündürmektedir (73).

EPO-stimüle edici ajanlar ile tedavi böyle durumlarda yararlı olabilir.

1.2. Oksidatif Sistem

Sağlıklı bir organizmada normal metabolizma sırasında serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşmaktadır. Bu nedenle ROS'ların varlığı her zaman biyolojik bozukluk olarak kabul edilmemektedir. Oksidatif hasar oluşmasında serbest ROS yapımında artış ve/veya antioksidan sistem yetersizliği söz konusudur. Hiperoksi, inflamasyon, iskemi, radyasyon, antibiyotik tedavisi gibi bazı hücrel metabolik bozukluk durumlarında artan ROS üretimi durumunda membranlar, enzim, nükleik asit ve polisakkaritler üzerine toksik etki ile doku hasarı gelişmektedir. Antioksidan sistem yetersizliğinde ise ortamdan uzaklaştırılamayan ROS ile doku hasarı ortaya çıkmaktadır (74). Hafif oksidatif stres artışı durumuna dokular ekstra antioksidan sistemlerini aktifleştirerek yanıt verirler. Şiddetli oksidatif stress, hüce hasarı ve ölümüne sebep olabilir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller; oksijen kökenli olanlardır. ROS aerobik metabolizma esnasında üretilir ve hücredeki tüm moleküller (özellikle lipidler) ile reaksiyona girebilirler (75). ROS'ların önemli kaynaklarından biri nötrofil, monosit, eozinofil ve makrofajlarda bulunan plazma membranına bağımlı nikotin adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazdır. Fagositik hücreler stimüle edildiğinde oksijen tüketiminde artış ve hekzos-monofosfat şantının aktivasyonu gerçekleşir (76).

1.2.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu poliansature lipidlerin ROS'lar tarafından oksidatif bozunma reaksiyonudur. Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan ve fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında yer alan poliansature yağ asitlerinin, ROS tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan, pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (77). Lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikaller, bir yada daha çok sayıda eşleşmemiş elektronları içeren moleküllerdir. Eşleşmemiş iki elektronu nedeniyle kararsız yapıda olan moleküler oksijenin redüklenmesi ya da eksitasyonu süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot) ve singlet oksijen (1O_2) gibi, serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır (78, 79).

1.2.2. Biyolojik Sistemlerde Lipid Peroksidasyonun Sonuçları

Lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve bazı aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (80, 81).

Lipid hidroperoksitleri ve lipid peroksi radikalleri, ROS gibi aynı hücrenin birçok komponenti ile reaksiyona girerek, sellüler ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkilerini gösterirler (77, 80). Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Böylece;

- Membranın sekretuar fonksiyonunun kaybına neden olurlar.
- Transmembran iyon gradientini bozarlar. Ca^{+2} gibi iyonlara karşı non-spesifik permeabiliteyi artırır.
- Mitokondride oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerinde değişikliklere yol açarlar, subsellüler organellerin bütünlüğünün kaybolmasına neden olurlar.
- Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır (80). Membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA; deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi,

iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (80-82).

Yağ asidi hidroperoksitlerinin başka bir toksik etkisi de araşidonik asit metabolizmasında gözlenmektedir. Yüksek lipid peroksid seviyeleri prostasiklin sentezini güçlü bir şekilde inhibe edeceğinden araşidonik asit metabolizması tromboksan sentezine doğru yeniden düzenlenecek, nihayetinde nötrofil stimülasyonu, süperoksit anyon üretimi ve trombosit agregasyonu tekrar module olacaktır (80).

Aterosklerotik süreçte ilk adım vasküler endotelial tabakanın hasarındır. Aterosklerotik plağın yapısındaki ansature yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu açığa çıkan lipid peroksitleri ilave peroksit üretimine yol açtıkları gibi arteriyel duvarın protein, mukopolisakkarit gibi başka komponentlerini hasara uğratmaktadır. İnsan plazma lipoproteinleri arasında en çok LDL'lerin peroksidasyona maruz kaldığı gösterilmiştir. Peroksidasyon sonucunda LDL'nin bileşimi ve biyolojik özellikleri değişerek "modifiye LDL" oluşmaktadır (82).

Sonuç olarak; hücre membranı hasarında, aterosklerozda, kanser ve yaşlanmada etyolojik bir faktör olarak lipid peroksidasyonu önemli şekilde yer işgal etmektedir.

1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücreler, oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden koruyucu mekanizmalara sahiptirler (83). Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir (83, 84):

- a- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu,
- b- Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi,
- c- Radikal oluşumunun sınırlandırılması.

1. 3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidan maddeler endojen, eksojen ve gıda kaynaklı antioksidanlar olarak 3 grupta toplanırlar (85). Antioksidan maddelerin sınıflaması Tablo.1'de gösterilmiştir.

1. 3. 2. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar etkilerini 4 yol ile gerçekleştirirler (86).

1. Toplayıcı etki: ROS'ları etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni

bir moleküle çevirme işlemiyle antioksidan etki oluşumu

2. Bastırıcı etki: ROS'larla etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltarak veya inaktif şekle dönüştürerek antioksidan etki oluşumu

3. Onarıcı etki: ROS'ların oluşturduğu oksidatif streste süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin artırılması ile koruyucu etkinlik gerçekleştirilmesi

4. Zincir kırıcı etki: ROS'ları kendine bağlayarak (hemoglobin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek antioksidan etki oluşturulması

1.3.3. Endojen Antioksidanlar

1.3.3.1 Enzimatik Antioksidanlar

SOD, sitokrom oksidaz, katalaz, GSH-Px, glutatyon redüktaz serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir (87).

1. Sitokrom oksidaz sistemi: Hücrelerdeki oksijenin % 95-99 kadarını etkisizleştirir. Yetmezlik durumunda diğer enzimler devreye girer (83).

2. Süperoksid dismutaz (SOD): Süperoksit radikallerini hidrojen perokside dönüştüren dismutasyon reaksiyonunda etkili metalloprotein yapısındaki enzimlerdir (87). Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali substrat olarak kullanır.

Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi düşüktür. Organizmada oksidan stresin attığı klinik durumlarda SOD enzim aktivitesi artarak koruyucu etkinliğini devam ettirir. Üremi, Down sendromu, karaciğer hastalığı, böbrek yetmezliği olan hastaların eritrositlerinde Cu-Zn SOD enzim aktivitesi yüksek bulunmuştur (88).

Tablo 1. Antioksidan Maddelerin Sınıflandırılması

I-Endojen antioksidanlar
1-Enzim olanlar
a-Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
b-Süperoksid dismutaz
c-Katalaz
d-Glutatyon peroksidaz, Glutatyon –S-transferaz
e-Hidroperoksidaz
2-Enzim olmayanlar
a-Lipid fazda bulunanlar
i - α - tokoferol (E vitamini)
ii - β - karoten
b-Sıvı fazda bulunanlar: Askorbik asit, melatonin, ürat, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferin, myogloblin, hemoglobin, ferritin, metionin, albumin, bilirubin, glutatyon
II- Eksojen Antioksidanlar (ilaçlar)
1- Ksantinoksidaz İnhibitörleri: Tungsten, allopurinol, oksipurinol, folik asit
2- NADPH Oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestetikler
3- Rekombinant Süperoksid Dismutaz
4- Endojen antioksidan aktiviteyi arttıran maddeler: Ebselen, asetilsistein
5- Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albumin
6- Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferroksamin, seruloplazmin
7- Sitokinler: Tümör nekroz factor(TNF), IL-1
8- Demir şelatörleri
III- Gıda antioksidanları
1- Butylated Hydroxytoluen(BHT)
2- Butylated Hydroxyanisone (BHA)
3- Sodyum Benzoat
4- Fe-Süperoksid Dismutaz

3- Glutatyon ve Glutatyon Enzimleri : Glutatyon enzimleri 3 ana grupta toplanır (85).

a- GSH-Px

b-Fosfolipid Hidroperoksid Glutatyon Peroksidaz (PGSH-Px)

c-Glutatyon S- Transferaz:

4- Glutatyon redüktaz ve Glukoz –6- fosfat dehidrogenaz: Antioksidan savunma etkinliğinin sürdürülmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle dönüşmesi gerekir. Glutatyon redüktaz NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu oksido-redüksiyon enziminin koenzimi NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonun indirgenme reaksiyonunu katalizler. Bu oksido-redüksiyon enziminin koenzimi NADPH, prostetik grubu ise flavin adenin dinükleatidir (FAD). Sitozol ve mitokondride lokalizedir. Şelat yapıcı ajanlar ve steroid hormonları glukoz –6-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederler (85).

5- Katalaz: Hidrojen peroksitin (H_2O_2) indirgenmesini katalizler, ancak katalaz H_2O_2 'nin üretildiği tüm hücrel komponentlerde bulunmaz. Bu nedenle radikallere karşı korumada ikincil derecede önemli olduğu kabul edilir ve % 20 oranında stoplazma, % 80 oranında peroksizomlarda lokalizedir. Katalazın indirgeyici aktivitesi H_2O_2 , metil hidroperoksitleri etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü hidroperoksitlerine ise etki etmez (85, 87).

1.3.3.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

1-E Vitamini: Tüm hücrel membranlarda bulunur ve lipid peroksidasyonuna karşı koyucudur. Singlet oksijenin kuvetli bir tutucusudur. Ayrıca hidroksil radikali, peroksi radikali ve süperoksitlerle direkt olarak reaksiyona girebilir. Önemli bir endojen ve eksojen antioksidan olarak hücre membranı bütünlüğünün korunması α -tokoferolün başlıca görevlerinden biridir (75, 89).

2- β –Karoten: A vitamini ön maddesi olan beta karoten etkili bir singlet oksijen ve radikal tutucu antioksidandır. Beta karoten çok etkin olarak triklorometilperoksil radikallerini indirger ve hücrel membranlarda bulunur (83).

3- C Vitamini: Biyolojik ortamların çoğunda askorbat olarak bulunan C vitamini hücre dışı sıvıların en önemli antioksidanıdır. Askorbat etkili olarak H_2O_2 , hipoklorit, süperoksit, hidroksil ve peroksil radikallerini ve singlet oksijeni tutar. C vitamini fizyolojik ve yüksek konsantrasyonlarda antioksidan etkilidir. (83, 87).

1.3.3.3. Diğer Nonenzimatik Endojen Antioksidanlar

Bazı durumlarda albumin, ürik asit, sistin, bilürubin, seruloplazmin, transferrin, ferritin, keratinin, laktoferrin, östrojenler gibi ufak moleküller de serbest radikallere karşı koruyucu rol oynarlar.

1.3.4. Eksojen Antioksidanlar

1- Besinlerdeki doğal antioksidanlar: Vitamin A, C, E ve β –Karoten

2- Besinlere eklenen antioksidanlar

1.3.5. Diğer antioksidanlar (Farmakolojik)

Çok sayıda ilaç ve kimyasal madde serbest radikallerle oluşan hasarları azaltmak için ya da engel olmak için kullanılmaktadır. Deneysel olarak değişik sitoprotektif etkileri gösterilmiş birçok antioksidan vardır.

İnsan sağlığı bakımından antioksidan fonksiyonları ile ön plana çıkan maddeler E ve C vitaminleri, karotenoidler ve fenolik maddelerdir (90). Fenolik

maddeler, meyve, sebze, baharat, tahıl ve içecekler gibi bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunmaktadır. ay; fenolik maddelerce zengin içeceklerden birisidir.

Günümüzde sudan sonra en popüler içecek olan çay, güneybatı in ve kuzeydoğu Hindistan orjinli çay bitkisinin (*Camellia sinensis* L. (O) Kuntze), *assamica vesinensis* Çesitlerinin taze yapraklarından üretilmektedir (91). Dünya genelinde üretimi yapılan çaylar, yeşil çay, oolong çay ve siyah çay olmak üzere başlıca üç grup altında sınıflandırılır. ay bitkisinden hasat edilen yaprakların, kavrma ile birlikte hemen bir ısı uygulamasına (genellikle buhar uygulaması) maruz bırakılarak, kurutulmasıyla elde edilen yeşil çay, dünya çay tüketiminin yaklaşık olarak % 20'sini oluşturmakta ve daha çok Japonya, in ve diğer Asya ülkelerinde yaygın olarak tüketilmektedir (92, 93). Son yıllarda yapılan pek çok araştırmada sağlık üzerine yararlı etkileri bildirilen yeşil çayın dünya çapında da popülerliği hızla artmaktadır.

1.3.5.1. Yeşil ayın Bileşenlerinin Kimyası

ay yapraklarının bileşimi klimatolojik, kültürel ve genetik faktörlere bağlı olarak değişmektedir (94). ay fenollerinin miktarı diğer bileşenlere göre oldukça fazladır (Tablo 2).

ay yaprağındaki polifenollerin yaklaşık 3/4'ünü flavanoller, flavanollerin de % 60-70'ini (-)-epigallokateşin-3-gallat (ECGC) oluşturur (94). Bunların yanı sıra *quercetin*, *kaempferol* ve *rutin* gibi flavanoller, kafein, fenolik asitler, *theanine* ve koku bileşikleri yeşil ayda bulunan diğer bileşiklerdir (97). İşleme yöntemine bağlı olarak çayın fenolik madde miktarıyla birlikte fenolik madde kompozisyonu da değişmektedir (Tablo 3). Örneğin siyah çay kuru maddede % 3-10, oolong çay % 8-20, yeşil çay ise % 30-42 oranında toplam flavanol içermektedir (98).

1.3.5.2. ay Polifenollerinin Emilimi, Dağılımı, Metabolizması ve Uzaklaştırılması

ay polifenollerinin farmakolojik özelliklerinin incelenmesi amacıyla insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada; epigallokateşin galat (EGCG), epigallokateşin (EGC) ve epikateşin'nin (EC) plazmadaki en yüksek düzeylerine sindirimden yaklaşık olarak 1.4-2.4 saat sonra ulaşıldığı saptanmıştır. EGCG'nin (5.0-5.5 saat) yarısının vücuttan uzaklaştırılması, EGC ve EC'ninkinden (2.5 ve 3.4 saat) daha uzun sürede olmuştur. Toplam idrar EGC ve EC'sinin % 90'lık kısmı 8 saat içinde dışarı atılmıştır. Yeşil

çayın içilmesinden sonra tükrükteki EGC, EGCG ve EC seviyelerinin aynı sürede plazmadakinin 2 katına çıktığı bildirilmektedir. Tükrükteki kateşinlerin yarılanma ömrü 10-20 dk. olup, plazmadakinden daha kısa sürede olmaktadır. Kateşinlerin (EGCG ve EGC'nin) oral mukozayla absorbe edildiğini gösteren ifadeler de bulunmaktadır. Sıçanlar üzerinde yapılan daha detaylı farmakolojik çalışmalar, yeşil çayın damar içerisine enjeksiyonundan sonra yarılanma ömrü EGCG, EGC ve EC için sırasıyla 212, 45 ve 41 dk olarak bulunmuştur. EGCG'nin en yüksek düzeyine bağırsaklarda, EGC ve EC'nin en yüksek düzeyine ise böbreklerde rastlanmıştır. Yeşil çay solüsyonlarının sıçanlara içme suyu şeklinde verildiği zaman, EGC ve EC'nin kandaki seviyeleri EGCG'ninkinden yüksek bulunmuş, fakat EGC ve EC'nin seviyesi uzun süreli yemlemeden sonra azalmıştır (101).

Tablo 2. Çay Yaprağının Bileşimi (95-96).

Bileşen	Kuru Maddede (%)
Flavanoller (Kateşinler)	17-30
Epikateşin (EC)	1-3
Epikateşingallat (ECG)	3-6
Epigallokateşin (EGC)	3-6
Epigallokateşin galat (EGCG)	9-13
Kateşin (C)	1-2
Gallokateşin (GC)	3-4
Flavanoller ve flavanol glikozitleri	3-4
Leykoantosiyeninler	2-3
Polifenolik asitler ve depsitler	5
Toplam polifenoller	30-36
Kafein	3-4
Aminoasit ve protein	15-19
Basit karbonhidratlar	4
Polisakkaritler	13
Kül	5
Selüloz	7
Lignin	6
Lipidler	2-3
Organik asitler	0.5-1,5
Pigmentler	0.5

Tablo 3. Farklı Çay Tiplerinin Fenolik Madde Kompozisyonu (99-100).

Bileşen	Yeşil Çay	Siyah Çay	Oolong Çayı
Epikateşin	6.06a; 1.0-9.54b; 7.22-13.3c; 0.55-0.87e	4.0b; 4.1d; 0.04e	1.75a; 0.34e
Epikateşin gallat	5.34a; 3-4.92b; 1.42-4.54c; 1.95-2.91e	1.19-11b; 8.0d	3.58a; 0.63e
Epigallokateşin	36.53a; 2.0-36.2b; 3.94-7.92c; 0.44-0.88e	0.9-6.0b; 10.5d; 0.19e	7.7a; 0.38e
Epigallokateşin Galat	18.10a; 6.0-32.6b; 5.55-10.4c; 13.37-13.74e	0.95-12.0b; 16.6d; 0.3e	8.99a; 3.62e
Gallokateşin Galat	0.26-0.38e	-	0.11e
Gallokateşin	2.57-2.81b	0.40-1.57b	-
Gallik asit	0.74-0.78b; 0.23-0.52e	2.79-3.33b; 1.83e	0.58e
Teaflavin	-	2.5d	0.66a
Tearubugin	-	59.4d	-

* a mg/g; b mg/100 mL; c %; d mg/g (kuru maddede); e % (kuru maddede)

1.3.5.3. Çay Polifenollerinin Metabolizma ve Sağlık Üzerine Etkileri

1.3.5.3.1. Yağ Metabolizması Üzerine Etkileri

Yeşil çay kateşinleri, hayvanlarda (sıçan, fare ve tavşan) yağ metabolizmasını farklı yollardan etkilemekte ve arterlerde plakaların oluşmasını engellemektedir. Yeşil çay kateşinlerinin tüketimi, dışkıdaki yağın atılımını artırmak suretiyle

trigliseritlerin ve kolesterolün emilimini azaltmaktadır (102-104). Çay kateşinleri sistemik etkileri ile direkt kolesterol sentezini inhibe etmektedir. Yeşil çay kateşini tüketimi, özellikle insanda plazma LDL kolesterolünü azaltmak ve plazma HDL kolestrolünü ise artırmak suretiyle damar sertliğini önlemektedir (102). Yapılan çalışmaların sonuçları, uzun süreli çay kateşini tüketiminin yağ metabolizmasını düzenlemek suretiyle yüksek yağlı gıda tüketiminden kaynaklanan obeziteyi önlediğini göstermiştir. Bu mekanizma vasıtasıyla, şeker hastalığının ve koroner kalp hastalığı riskinin yeşil çay tüketimiyle azaldığı saptanmıştır (105).

1.3.5.3.2. Karbonhidrat Metabolizması Üzerine Etkileri

Çay kateşinleri hipoglisemik ajan olarak pankreasın β hücrelerini zarardan koruyarak, insulin salgısını ve biyolojik aktivitesini artırmaktadır. Normal kan glukoz düzeyine sahip sıçanlara oral yoldan uygulanan glukoz tolerans testinde, yeşil çay kateşini tüketiminin plazma insülin ve trigliserit seviyesini azalttığı fakat plazma glukoz seviyesini etkilemediği bildirilmiştir (106). Yapılan çalışmaların sonuçları; yeşil çay kateşinlerinin tip 2 şeker hastalarını da kapsayan lipid ve glukoz metabolizma hastalıklarına karşı yararlı bir etkiye sahip olduğunu ve önleyici rol oynadığını göstermiştir (105).

1.3.5.3.3. İyonların Emilimi Üzerine Etkileri

Çay kateşinleri Fe eksikliği durumunda demirin emilimini etkilemekte ve anemiye yol açmaktadır. Yeşil çayın uzun süre tüketilmesi Cu'nun emilimini etkilememekte ancak Zn'ninkini azaltmakta ve manganinkini (Mn) artırmaktadır. Yeşil çay kateşinlerinin iyon metabolizmasını ve tüketimini etkileyecek potansiyeli bulunmaktadır. Çünkü flavonoidler metal iyonlarıyla etkileşime girmektedir (105).

1.3.5.3.4. Hormon Metabolizması Üzerine Etkileri

On üç hafta süreyle % 5 gibi yüksek düzeyde yeşil çay ekstraktı içeren rasyonla beslenen sıçanlarda plazmadaki tiroid hormonlarının seviyesinin değiştiği ve tiroid bezinin büyüdüğü saptanmıştır. Yeşil çayın uzun süre çok yüksek miktarlarda tüketilmesi, tiroid bezinin fonksiyonunu olumsuz etkilediğini göstermiştir.

1.3.5.3.5. Sağlık Üzerine Etkileri

LDL oksidasyonu da içeren çeşitli faktörler kalp-damar rahatsızlıklarının başlamasını ve ilerlemesini etkileyebilmektedir. Yeşil çay kateşinleri antioksidan özelliğinden dolayı, oksidatif enzimlerin aktivitesini önlemek veya hücresel

antioksidanları artırmak suretiyle, arterlerde LDL oksidasyonu ve plaka oluşumunu önlemektedir. Ayrıca plazmada HDL düzeyini artırmak suretiyle kalp-damar rahatsızlıklarını azaltabilmektedir. Yapılan bir çalışmada yüksek düzeyde yağ ve kolesterol içeren rasyonları tüketen hayvanlarda, çay polifenollerinin serum ve karaciğer lipidlerindeki artışı önlediği, serum total kolesterolünü azalttığı, total lipidlerin ve kolesterolün dışkıyla atılımını artırdığı saptanmıştır (107, 108).

Çay tüketiminin deri, akciğer, özefagus, mide, karaciğer, pankreas, meme, prostat ve kolon kanserlerinin oluşumuna neden olan kimyasal kanserojenlere karşı koruma sağladığı bildirilmektedir (94, 96, 101). Yeşil çayın polifenol fraksiyonları H₂O₂ oluşumunu teşvik eden 12-o-tetradekanoil porbol-13-asetat (TPA)'ı ve 8-hidroksideoksi guanozin oluşumunu inhibe etmektedir. Yeşil çay preparatları TPA tarafından teşvik edilen epidermal ornitin dekarboksilaz, preoin kinaz C, lipoksigenaz ve siklogenaz gibi kanserin ilerlemesiyle ilgili enzimlerin aktivitesini önlemektedir (101, 109). ECGC'nin prostat ve meme tümörlerinin büyümesine ek olarak deri, mide, kolon ve akciğer kanserlerini; teaflavinlerin ise akciğer ve özefagus kanserinin oluşumunu önlediği bildirilmektedir (110).

Aşırı derecede şişman fareler üzerinde yapılan çalışmalar, farelerin 10 haftadan daha uzun süre yeşil çay tüketmeleri durumunda obezitenin ve yağlı karaciğer sendromunun önlendiği saptanmıştır. Bu durum artan enerji tüketimine rağmen yeşil çay kateşinlerinin etkisiyle azalan besin maddesi emiliminden kaynaklanmaktadır (111).

Ayrıca yeşil çay tüketimi kırmızı kan hücrelerinin hemolizinde azalmaya neden olmaktadır. Yeşil çay kırmızı kan hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin oksidasyonundan; serbest radikallerin başlamasında önemli rol oynayan katyonları ve Cu⁺²'i inaktif etmek için bir şelatör olarak görev yapmak; serbest radikal zincirini tahrip edici olarak görev yapmak ve okside olan α-tokoferolü yeniden aktif hale getirmek suretiyle korumaktadır (112).

1.3.5.4. Kateşinlerin Antioksidan Aktivitesi

Çayın antioksidan aktivitesi esas itibariyle içerdiği fenolik maddelerden kaynaklanmaktadır. Saf antioksidanlar ve çay fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi Tablo 4'de verilmiştir. Yeşil çay fenolik maddelerce zengin olan bazı içeceklere göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaktadır. Yeşil çay yapısındaki kateşinlerin yüksekliğinden dolayı vitamin C ve E'den daha güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir (113). Çay kateşinlerinin antioksidan aktiviteleri büyükten küçüğe

doğru epigallokateşin gallat>epigallokateşin>epikateşin gallat>epikateşin şeklinde sıralanmaktadır (107).

1.4. Sisplatin ve Apoptozis

Apoptozis programlı hücre ölümüdür ve normal dokuların homeostazı açısından önemlidir. Normal embriyonik gelişimde hücrelerin fokal delesyonunda da işlev görmektedir. Apoptotik hücre ölümünün kanser dışında da pek çok durumda potansiyel patojenik rolü vardır; örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar verilebilir.

Total büyüme veya regresyonu değerlendirirken, apoptozis ve proliferasyon arasındaki denge önemlidir. Tüm bunlar göstermektedir ki apoptozis ve apoptozis regülasyonunun moleküler olaylarını anlamak ve apoptozisi yönlendirecek yolları saptamak gerekmektedir (114-116).

Tablo 4. Saf antioksidanlar ve çay fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi (107)

Vitaminler	IC50(μ M)*
β -karoten	4.30
E vitamini	2.40
C vitamini	1.25
Çay Fenolleri	
Gallik asit	1.25
Kateşin	0.67
Klorojenik asit	0.30
Epikateşin	0.19
Epikateşin gallat	0.14
Epigallokateşin	0.10
Epigallokateşin gallat	0.08
Çay Fraksiyonları	
Siyah çay ekstraktı (%46.32)	0.59
Kafeinsiz siyah çay ekstraktı(%47.08)	0.59
Teaflavinler	0.29
Yeşil çay ekstraktı (%46.19)	0.22
Kafeinsiz yeşil çay ekstraktı(%49.15)	0.22
Saf siyah çay polifenolleri(%91.38)	0.16
Saf yeşil çay polifenolleri(%95.22)	0.13

*IC50: %50 inhibisyon sağlayan antioksidan konsantrasyonu

1.4.1. Apoptozun Gen Regülasyonu

Apoptozun genetik mekanizması ilk kez *Caenorhabditis elegans* isimli nematodun gelişim aşamalarında belirlenmiştir.

Apoptozun regülasyonu nematodlardan insana kadar çoğu aynı gen kontrol süreci ile oldukça sıkı bir biçimde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile düzenlenebilmesine rağmen, süreç genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb) veya sitokinlerin olmaması gibi (eritropoietin vb) farklı uyarılarla harekete geçirilebilir. DNA sarmalındaki nükleotit azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola girer (117).

1.4.1.1. p53'ün Rolü

Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax / Bax, Bax / Bcl-2, Bcl-2 / Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (118).

1.4.1.2. Bcl-2 / Bax

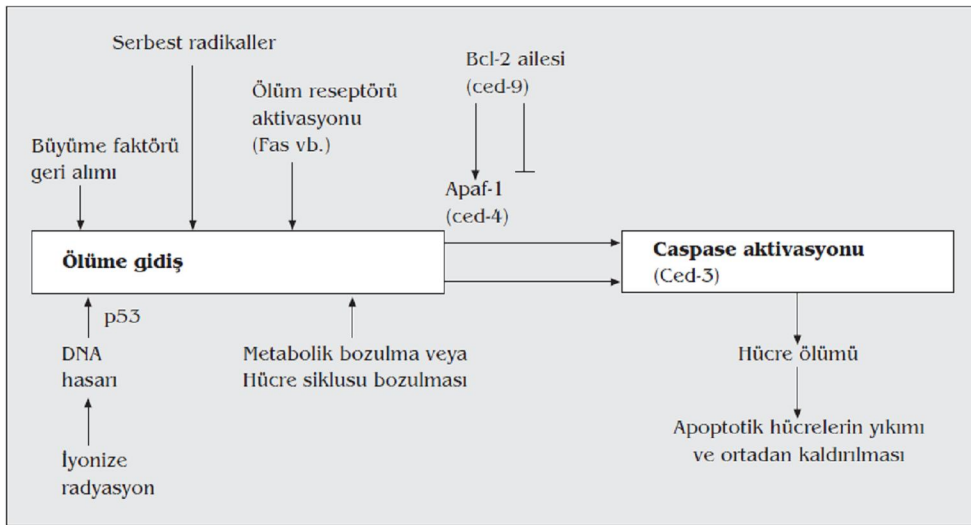
Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır (118, 119). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanısıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (118, 120). Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması hücrenin yaşamını sürdürmesini sağlarken, Bax'ın daha fazla olması durumunda hücre ölüme gitmektedir (121). Son yıllardaki, hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde toplamıştır (122).

Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, bir protoonkogendir ve ürettiği protein, mitokondirinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir (123). Bu proteinler, iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Özellikle anti-apoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz inhibisyonu gerçekleşmektedir (124). Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen

düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir (122).

Bax proteinleri sitoplâzma da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının "permeabilite geçiş poruna" doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplâzmaya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplâzmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktivite edici faktör-1) 'in aktivatörüdür (118). Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir (125). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (118). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır (120). (Şekil 2)

Cisplatin nefrotoksitesinde Bax geninin de rol oynadığı düşünülmele beraber kanıtlar yeterli değildir. Cisplatin nefrotoksitesinde, renal tübül hücre mitokondrilerinde Bax gen aktivasyonu ve birikiminin ve akut böbrek hasarının eşlik ettiği gösterilmiştir (126). İskemik reperfüzyon hasarı sonrası tübül epitelyal hücrelerde Bcl-2 protein artışı; hücrel otofaji süpresyonu ve apoptozis inhibisyonu sağlayabilmektedir (127).



Şekil 2. Memeli hücrelerinde apoptotik programın basitleştirilmiş şeması (120).

1.5. Hsp

Isı şok proteinleri

Isı şok proteinleri (Hsp) hücrel hasarın çeşitli formlarında salınabilen proteinlerdir. Bazı Hsp'lerin (HspP60-70) -vitro olarak T hücre aracılı immun yanıtı direk olarak uyardır. Deneysel çalışmalarda Hsp60-70 injeksiyonu sonrası geçici proteinüri ve minimal organ hasarı oluştuğu, fakat bu hasarın son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemediği gözlemlenmiştir. Enjeksiyon sonrası 10-12 saat sonra global glomeruler nekroz, tubulointertisyel hasar ve anüri görülmüştür. Deneysel çalışmalarda da oksidatif stres altındaki tubuler hücre hasarı sırasında hücrel düzeyde Hsp60 ve Hsp70 proteinlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir (128).

Hsp60 primer olarak mitokondriyal bir protein olarak bilinir. Ancak önemli miktarda Hsp60 çok sayıda hücrenin ekstra-mitokondriyal sitozolünde bulunmaktadır (129). Hsp60 Bax, Bak ve Bcl-XL'e bağlanır, Bcl-2'ye bağlanmaz. Hipoksi esnasında bu kompleks ayrılır, Bax mitokondriye Hsp60 ise plazma membranına hareket eder. Baxın bu hareketiyle sitokrom c salınır ve kaspaz kaskadı aktive olur. Hsp60 lokalizasyonu ise apoptoz ve TNF artışı ile korelasyon gösterir (130).

Bu bilgilerin ışığı altında, bu çalışmada antioksidan etkili olan EGCG'nin cisplatin verilen ratlarda, hücre fonksiyonlarında anahtar rol oynayan bazı proteinlerin (Hsp60, Hsp70, Bax, Bcl-2) ekspresyonu üzerine etkiler araştırılmıştır. Ayrıca EGCG'nin böbrekteki histopatolojik değişimler, böbrek fonksiyon testleri (serum üre, kreatinin düzeyleri) ve oksidatif stres (MDA düzeyleri) üzerine etkileri de araştırıldı.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen ve ağırlıkları 200-215 g arasında değişen erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı (n=28, 8 haftalık) Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Etik Kurulu'ndan (FÜHADEK), onay alındıktan sonra, çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal musluk suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelet yemle beslendi. Deney süresince hayvanlara yem ve su *ad libidum* olarak verildi. Ratlara verilen yemin bileşimi Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Araştırmada kullanılan diyetin bileşimi

Yem ham maddeleri	%
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

2.2. Deneme Düzeni

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının buldukları ortam

sıcaklığı 22±2 °C ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde takip edildi. Hayvanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi.

Bir defalık intraperitoneal (i.p.) CDDP enjeksiyonu ile nefrotoksisite oluşturuldu. CDDP (Sigma Chemical Co, USA), % 0.9 salin (1 ml/100 gr/kg i.p.) içinde 7 mg/kg olacak şekilde i.p. enjeksiyon yoluyla araştırmanın 3. gününde tek dozda uygulandı.

Ratlar rastgele aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

- 1. Kontrol Grubu (n=7):** CDDP uygulanmayan, 3. Gün i.p. olarak sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve bazal diyetle beslenen grup.
- 2. EGCG grubu (n=7):** CDDP uygulanmayan, 3. Gün i.p. olarak sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 10 gün süreyle EGCG (TEAVİGO, DSM Co, Switzerland) (100 mg/kg) verilen ratlar
- 3. CDDP (Sisplatin) grubu (n=7):** CDDP (CDDP; Sigma Chemical Co, USA), % 0.9 salin (1 ml/100 gr/kg i.p.) içinde (7 mg/kg) uygulanan ratlar
- 4. EGCG + CDDP grubu (n=7):** CDDP uygulanan ve cisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 10 gün süreyle EGCG (100 mg/kg) verilen ratlar.

EGCG gavaj yolu ile 100 mg/kg dozda fizyolojik salinde sulandırılarak (%0.89) (131), CDDP uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 10 gün toplam 12 gün süreyle günde 1 kez olacak şekilde uygulandı. Cisplatin uygulamasından 10 gün sonra ratlar hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek histopatolojik ve western blot analizleri için doku örnekleri alınmış ve western analizleri yapılmaya kadar analizler yapılmaya kadar -80 °C' de saklanmıştır. Böbrekler fosfat tamponlu solüsyon ile (PBS; 0.15 M NaCl ve 0.01 M sodyum fosfat tamponu, ph 7.4) aorta yoluyla perfüze edilerek histolojik inceleme için çıkarıldı. Serum üre-azotu ve kreatinin ölçümleri için kan alındı.

2.3. Laboratuvar Analizi

Kan örnekleri 300 g'de 10 dk süreyle santrifüje edildi ve serumları ayrıldı. Serum üre nitrojeni ve kreatinini biyokimyasal analizör ile (Olympus AU-660,

Japonya) ölçüldü. Doku malondialdehit (MDA) seviyeleri, Karatepe'den (132) modifiye edilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) analiz edildi.

HPLC için Doku Homojenizasyonu:

- Her deney gurubundan 150'şer mg beyin dokusu alındı.
- Üzerine 450 µl deiyonize su ve 50 µl butilat hidroksitoluen (BHT) eklenerek cam homojenizatörde doku parçalandı.
- 0.5 M'lık HClO₄' den 500 µl ilave edilerek proteinler çöktürüldü.
- Karışım 4500 devir/dk hızla soğutmalı santrifüjde 5 dk boyunca santrifüjlendi.
- Supernatant kısımlar alınarak dikkatlice alınarak HPLC viallerine dizildi.
- Tüm işlemlerde homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ve soğuk zincire riayet edildi.

HPLC' de MDA Analizi:

- Hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) kullanıldı.
- 250 nm'de İnertsil 5µ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.
- Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi.
- MDA için geri kazanım % 98.8 olarak bulundu.

2.3.1. Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Ölçümü

Böbrek dokusu 1:10 (w/v) 'luk tampon [10 mM Tris-HCl, ph 7.4, 0.1 mM NaCl, 0.1 mM fenilmetilsulfonyl fulorür (PMSF), tripsin inhibitörü olarak, 5 µM soya (solubl toz; Sigma, St. Luis, MO, USA)] içinde homojenize edildi. Doku homojenatları 15.000 x g at 4°C de 30 dk süreyle santrifüje edildi. Süpernatantlar yeni tüplere alındı. Protein konsantrasyonu *Lowry* prosedürüne uygun şekilde protein ölçüm kiti kullanılarak (Sigma, St. Luis, MO, USA) ölçüldü. Süpernatantlara, % 2'lik β-merkaptolanol içeren sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi tamponu eklendi. SDS-PAGE jel içinde eşit mikterlarda (20 µg) protein, elektroforez için kullanıldı. Arkasından nitrosellülöz membranlara (Schleicher and Schuell Inc, Keene, NH, USA) aktarıldı (133). Nitrosellülöz blotlar PBS içinde 5 dk süreyle 2 kez yıkandı ve % 1'lik sığır serum albümini ile primer antikor uygulamasından önce 1 saat bekletildi. Primer antikor (anti Bax, anti-Bcl-2, anti-

Hsp60, anti-Hsp70; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) % 0.05 Tween-20 içeren aynı tampon içinde 1:1000 oranında dilüe edildi. Nitrosellülöz membran gece boyunca 4°C’de protein antikorları ile inkübe edildi. Blotlar yıkandı ve *horseradish peroksidaz-conjugated goat anti rabbit* veya *anti-mause IgG* (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) ile inkübe edildi. Spesifik bağlanma, diaminobenzidin ve H₂O₂ substratları kullanılarak tespit edildi. Protein yükleme β-aktin antikora (A5316; Sigma) karşı monoklonal bir mause antikorunu kullanılarak kontrol edildi. Protein düzeyleri bir görüntü analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) ile dansitometrik olarak analiz edildi.

2.4. Histopatolojik Değerlendirme

Her bir rattan alınan sol böbrek histolojik inceleme için hemen %20’lik nötral tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edildi. Daha sonra yavaş yavaş dehidrate edilip parafine gömüldü. Parafin bloklar standart işlemlere uygun olarak 5µM’lik kesitler halinde kesilerek hematoksilin- eosin boyası ile boyandı (134). Her bir böbrek lamı için minimum 10 alan incelendi. Vaküoler dejenerasyon, tübüler atrofi ve dilatasyon, tübüler nekroz, interstisyel ödem ve inflamasyon tedavi gruplarından haberdar olmayan bir patolog tarafından semikantitatif olarak değerlendirildi. Değişimin şiddetini belirlemede kullanılan derecelendirme sistemi: (-): yok, (+): hafif derece hasar, (++): orta derece hasar, (+++): şiddetli hasar olarak belirlendi.

2.5. İstatistiksel analizleri

Veriler SAS (2002) paket programında PROC GLM (General Linear Model) prosedürü ile analiz edildi. Grup içi farklılığı ortaya koymak amacıyla Fisher post hoc testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Gruplarda Üre ve Kreatinin Düzeyleri

Sisplatin'e bağlı nefrotoksisitenin klinik biyokimyasal göstergelerinden olan üre ve kreatinin değerlerinin ortalamaları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Gruplarda serum üre-azotu ve kreatinin düzeyleri

	Gruplar					
	Kontrol	EGCG	CDDP	CDDP+EGCG	SEM	P
Üre-azotu (mg/dl)	41.0 ^c	38.0 ^c	141.8 ^a	84.8 ^b	9.67	0.0001
Kreatinin (mg/dl)	0.43 ^c	0.43 ^c	1.51 ^a	0.61 ^b	0.13	0.001

a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$).

3.1.1. Üre Düzeyleri

Gruplardaki üre düzeyleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Tablodan görüleceği üzere gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.0001$). Grupları içi farklılığa bakıldığında ise, CDDP verilen gruptaki üre değerlerinin (141.8 mg/dl), kontrol grubundaki üre değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$). CDDP grubu ile karşılaştırıldığında EGCG+CDDP grubu üre düzeyleri önemli bir düşüş göstermiştir ($p<0.05$). Kontrol grubu ile EGCG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi. EGCG grubunda üre değerleri CDDP grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.005$).

3.1.2. Kreatinin Düzeyleri

Gruplardaki kreatinin düzeylerinin ortalaması Tablo 6'da gösterilmiştir. CDDP verilen gruptaki kreatinin değerlerinin (1.51 mg/dl), kontrol grubundaki kreatinin değerlerine (0.43 mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). CDDP grubu ile karşılaştırıldığında EGCG tedavisi verilen EGCG+CDDP grubu üre düzeylerinde anlamlı düşüklük tespit edildi ($p<0.0001$). K grubu ile A grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

3.2. Serum MDA Düzeyleri

Bir oksidatif stres faktörü olan MDA'nın serumdaki düzeyinin ortalaması ve gruplar arasındaki değişiklikler Tablo 7'de gösterilmiştir. Gruplararasıdaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Serum MDA düzeyleri en büyükten en küçüğe doğru; CDDP grubu > CDDP+EGCG grubu > Kontrol grubu > EGCG grubu şeklinde sıralanmıştır. CDDP grubu serum MDA düzeylerinde (179.1 nmol/g), kontrol grubuna (90.5 nmol/g) ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlılık taşıyan yükselme saptandı ($p<0.005$). EGCG grubundaki MDA değerleri kontrol grubunda göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0.05$) daha düşük tespit edildi. EGCG tedavi grupları olan EGCG ve CDDP+EGCG grupları serum MDA düzeyleri CDDP grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Tablo7. Gruplarda serum MDA düzeyleri

	Gruplar					P
	Kontrol	EGCG	CDDP	CDDP+EGCG	SEM	
MDA (nmol/g)	90.5 ^c	84.6 ^c	179.1 ^a	108.0 ^b	8.38	0.001

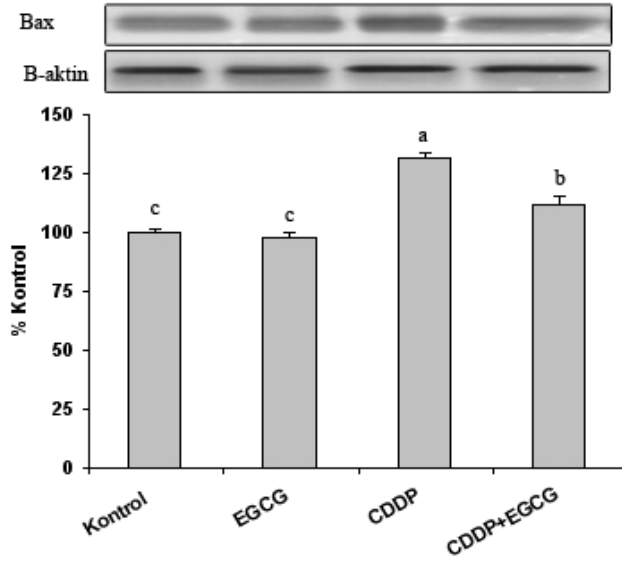
a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$).

3.4. Böbrek Bax Ekspresyonu

Gruplarda böbrek bax ekspresyonu Şekil 3'de gösterilmiştir. CDDP grubu Bax ekspresyonu, kontrol grubu Bax ekspresyonuna göre artmıştır ($p=0.05$). CDDP grubu ile karşılaştırıldığında CDDP+EGCG grubu Bax ekspresyonlarında anlamlı düşme tespit edildi ($p=0.05$). Kontrol grubu ile EGCG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

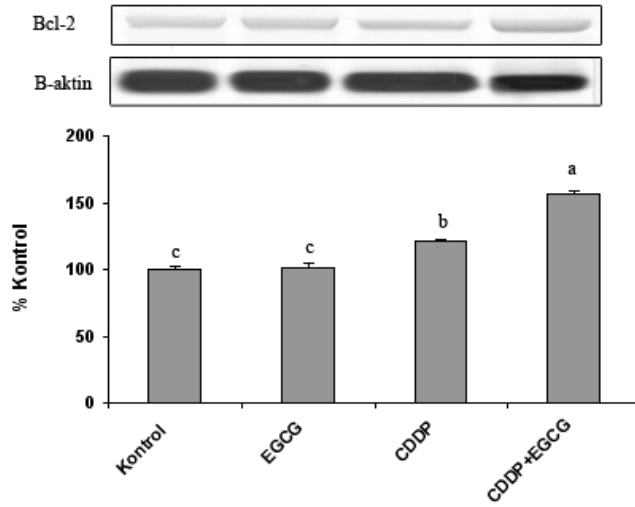
3. 5. Böbrek Bcl-2 Ekspresyonu

Gruplardaki Bcl-2 ekspresyonları Şekil 4'de gösterilmiştir. Kontrol, EGCG grupları arasında Bcl-2 düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Apoptoziste koruyucu rolü olduğu düşünülen Bcl-2 düzeylerinin, CDDP+EGCG grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.



Şekil 3. Gruplarda ratların böbrek dokusu bax ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).



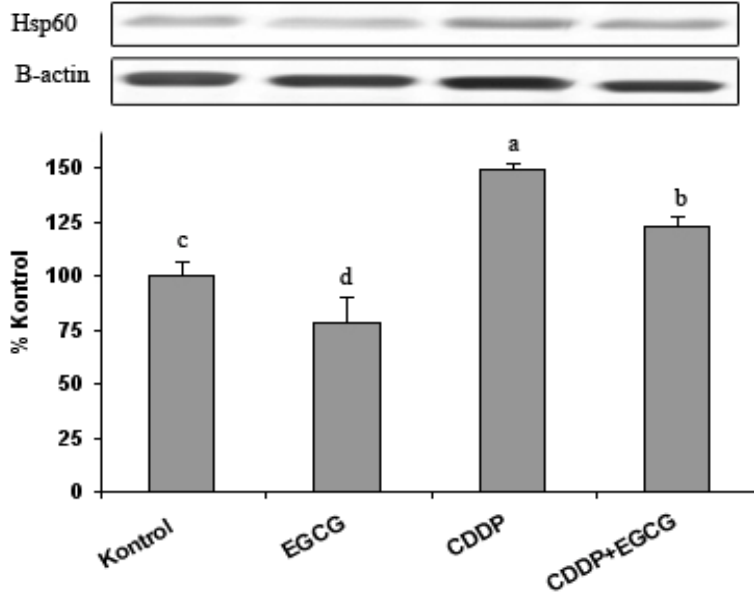
Şekil 4. Gruplarda ratların böbrek dokusu Bcl-2 ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

3.6. Böbrek Hsp60 Ekspresyonu

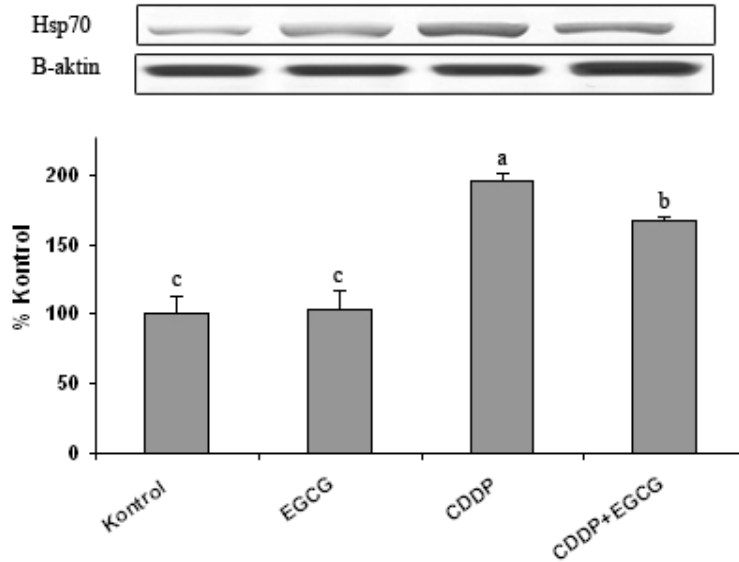
Gruplardaki Hsp60 ekspresyonu Şekil 5’de gösterilmiştir. Tübüler hasar sırasında arttığı düşünülen Hsp60 ekspresyonları büyükten küçüğe doğru; CDDP > CDDP+EGCG > Kontrol > EGCG olarak tespit edildi. CDDP grubunda diğer bütün gruplara oranla anlamlı derecede yüksek olarak tespit edildi ($p < 0.05$).

grubu ile karşılaştırıldığında CDDP+EGCG grubu Hsp60 düzeylerinde anlamlı derecede düşme tespit edildi ($p<0.05$). Yine sadece EGCG grubu ile kontrol grubu kendi arasında kıyaslandığında; EGCG grubu Hsp60 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olduğu saptandı.



Şekil 5. Gruplarda ratların böbrek dokusu Hsp60 ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).



Şekil 6. Gruplarda ratların böbrek dokusu Hsp70 ekspresyon düzeyleri

a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P<0.05$).

3.7. Böbrek Hsp70 ekspresyonu

Gruplardaki Hsp70 ekspresyonları Şekil 6'da gösterilmiştir. CDDP grubunda diğer bütün gruplara oranla anlamlı derecede yüksek olarak tespit edildi ($p<0.001$). CDDP grubu ile karşılaştırıldığında CDDP+EGCG grubu Hsp70 ekspresyonlarında anlamlı derecede düşme tespit edildi ($p<0.05$). Yine sadece EGCG grubu ile kontrol grubu kendi arasında kıyaslandığında; EGCG grubu Hsp70 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermediği saptandı.

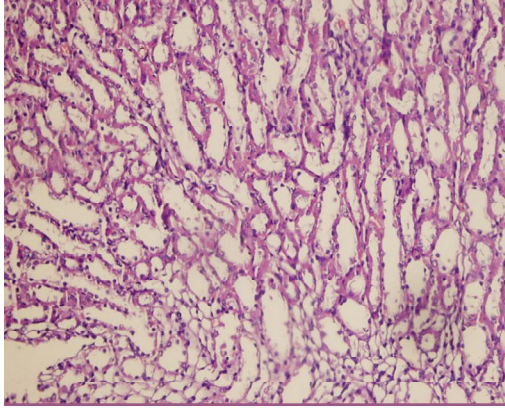
3.8. Histopatolojik Sonuçlar

Kontrol ve EGCG grubundaki ratlardan alınan böbreklerde bir patoloji gözlenmedi. Buna karşılık, sisplatin verilen grupta korteks ve dış medullada vakuolizasyon, interstisyel ödem ve inflamasyon, şiddetli derecede tübüler nekroz ve tübüler atrofi gözlemlendi. EGCG ile tedavi edilen EGCG+CDDP grubunda ise sisplatinin indüklediği histopatolojik değişikliklerin (öz. Tübüler nekroz ve interstisyel inflamasyon) oldukça az olduğu görüldü (Tablo 8, Şekil 7)

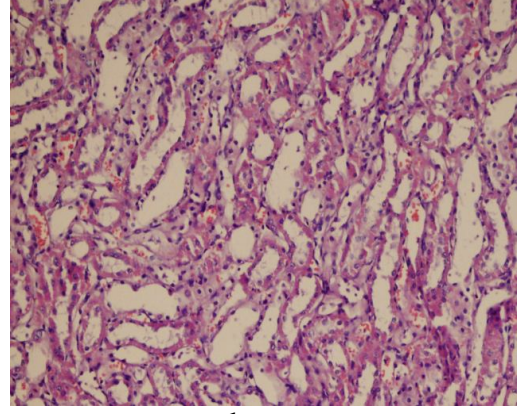
Tablo 8. EGCG uygulamasının rat böbrek dokusundaki morfolojik değişiklikler üzerine etkisi

Morfolojik Değişiklikler	Gruplar			
	Control	EGCG	CDDP	CDDP+EGCG
Vakuolizasyon	-	-	++	+
Interstisyel ödem	-	-	+	-
Tübüler nekroz	+/-	+/-	+++	+
Tübüler atrofi	-	-	++	+/-
Interstisyel inflamasyon	-	-	++/+++	+

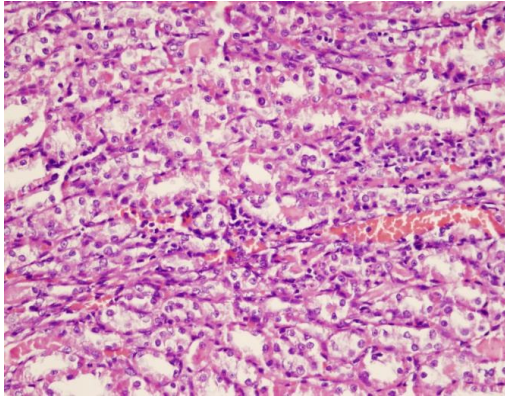
- : Yok, + : hafif, ++ : orta, +++ : şiddetli.



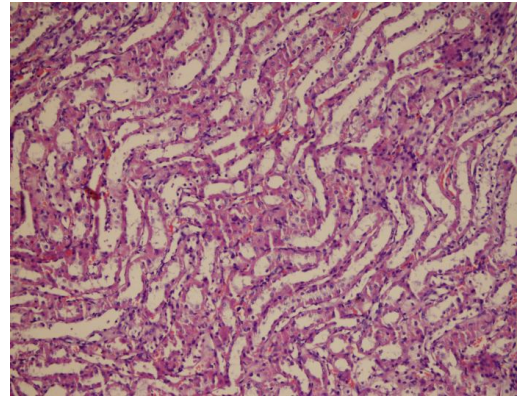
a



b



c



d

Şekil 7. Hematoxylin and eosin (H&E) ile gruplara göre böbreğin histopatolojik görünümü. Kontrol (a), EGCG (b), cisplatin (c) ve cisplatin+ EGCG (d).

4. TARTIŞMA

Kanser hastalıkları dünyada en sık ölüme yol açan hastalıklar içinde erkekler arasında 2. bayanlar arasında 1. sırada yer almaktadır. Genel olarak kanser hastalıkları tedavisi 3 strateji üzerine kurulmuştur. En önemlisini kemoterapi uygulamaları oluştururken diğerleri ancak lokal tedaviye olanak sağlayan radyoterapi ve cerrahi uygulamalarıdır. Adjuvant, neoadjuvant ve palyatif amaçlarla oluşturulan kemoterapi uygulamaları kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır. 1940'lı yıllarda nitrojen muştardın hematolojik sorunlarda kullanılmasıyla kemoterapi uygulamaları hızla gelişmiştir (135).

Çok seçenekli bu tedavi rejiminde; cerrahi ve radyoterapi ile hastalığın çoğu zaman lokal kontrolü sağlanabilirken, sistemik etki yalnızca kemoterapi uygulamaları ile sağlanabilmektedir.

Kanser kemoterapisinin esası; hastanın normal hücrelerine zarar vermeden tümör hücresinin büyümesini ve çoğalmasını durdurmak veya mümkünse onları yok etmektir. Ancak antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri, antibiyotiklerin bakteri hücresine karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Çünkü malign hücre ile normal insan hücresi arasında kalitatif bakımdan fazla fark yoktur; mevcut fark daha çok kantitatif yöndedir. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler. Bu nedenle çoğu kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu üzerine de yan etkileri vardır (136).

Bazı ajanların kanser tedavisinde oldukça yaygın kullanılmalarına rağmen sıklıkla tümörlü doku dışındaki diğer dokularda etkilenmekte ve ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkilerin görülmesiyle birlikte birkaç alternatifte yol denenmektedir. Tedavi protokolü değiştirilebilmekte; bu da çok etkili olan bir ilaç yerine daha az etkili bir ilaca geçilmekle mümkün olmaktadır ve arzu edilmeyen bir seçenektir. Diğer bir seçenek tedavi dozunda kısıtlamaya gidilmesidir. Bu da tümör dozunun istenen oranda sınırlanmasına engel olabilmektedir. Diğer bir seçenek ise istenmeyen bu yan etkileri önleyecek veya azaltacak diğer bir ajanın kullanılmasıdır ki bu da maliyeti oldukça arttıran bir seçenektir (137).

Böbrek hücreleri, bölünme hızları yüksek olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etme yeteneği

ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olması nedeniyle toksik zedelenmeye oldukça duyarlıdır (138). Sitotoksik ilaçlara bağlı nefrotoksisite kemoterapinin en sık görülen yan etkilerinden birisidir (136). Antimetabolitler, alkilleyici ilaçlar ve antrasiklinler en sık nefrotoksisiteye neden olan ilaçların başındadır. Sisplatin, siklofosfamid ve yüksek doz sitozin arabinozidin nefrotoksik etkileri bilinmektedir. Kanser ilaçlarının nefrotoksik etkisi; serum elektrolit düzensizliği, serum kreatinin artışı ve GFH'nin azalmasından kalıcı böbrek yetmezliğine kadar ciddi boyutta olabilir (139). Kemoterapi alan hastalarda nefrotoksisite derecesi DOQI (Dialysis Outcome Quality Index) sınıflamasına göre değerlendirilmektedir (140). Kemoterapi ilaçları böbrekte başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerül olmak üzere nefronun üç ana bölümünde hasarlanmaya ve fonksiyon bozukluğuna neden olur (141).

Anti-neoplastik ilaçlar içinde oldukça önemli bir yere sahip olan CDDP 1978 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafınca da onaylandıktan sonra hızla klinik kullanıma girmiştir (4). CDDP; yüksek antitümöral aktivite gösteren ve oldukça geniş kullanım alanına sahip antineoplastik bir ajandır. Ancak oldukça etkili olan bu ajanın, doza bağlı olarak ortaya çıkan ve % 25 hastada gelişen nefrotoksisite nedeniyle kullanım alanı sınırlanmaktadır (142, 143). Bu özelliğinin bilinmesiyle, kullanımı sırasında ve/veya sonrasında bol hidrasyon ve mannitol ile diürezin arttırılması gibi önlemlere rağmen, CDDP alan hastalarda GFR'de kalıcı düşmeler ortaya çıkabilmekte, ilerleyici ve hatta kalıcı ranal hasar meydana gelebilmektedir. Bu ciddi nefrotoksisite yüzünden CDDP'nin rutin kullanımında kısıtlamalar meydana geldiği gibi "yüksek doz sisplatin " tedavi modaliteleri hala mümkün olamamaktadır.

Sisplatin nefrotoksisitesinin; serbest oksijen radikallerinin üretimi ve daha çok glutatyon redüktaz enziminin baskılanması ile antioksidan sistemin çökmesine yol açmak suretiyle oluştuğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (3). CDDP süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi ROS üretimini arttırıp renal lipid peroksidasyonunu stimüle eder (144). CDDP verilmesiyle oluşan ROS'lar oksidatif stresin şiddetiyle paralel doğrultudadır. Oksidatif stress sonucunda protein, lipid, nükleik asit gibi maddelerin yapısında anormal değişiklikler oluşur (145). Kanser zaten konakçıda oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünlerini arttırarak

antioksidan sistemin çökmesine yol açmaktadır. Bir de kanserli hastalarda beslenmenin zayıflaması ve ilave olarak antikanserojenlerin kullanılması oksidatif sistemi daha da zayıflatacaktır.

Sisplatinle oluşturulan nefrotoksisiteyi ve diğer yan etkileri azaltmak için deneysel ve klinik çalışmalarda çeşitli ilaçlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda CDDP'nin daha çok aşırı serbest radikal üretimiyle oksidatif renal hasar yaptığına dair kanıtlar ileri sürülmüştür. Bu yüzden Ginko alkaloidleri, C vitamini, asetilsalisilik asit, ebselen, curcumin, taurine, mizoprostol, bixin, lipoik asit, SOD, selenyum, flavonidler, dietil ditiyokarbamates, erdosteine, kafeik asit fenetil ester (CAPE), Nigella sativa ekstraktı gibi çeşitli antioksidan maddelerin deney hayvanlarında CDDP ile oluşturulan nefrotoksisitede önleyici rolleri çalışılmıştır (146-148).

ABY gelişimi için artmış risk faktörleri; yüksek doz CDDP uygulaması, yüksek pik plazma serbest platinum konsantrasyonları, önceki CDDP maruziyeti, önceden var olan böbrek hasarı ve diğer nefrotoksik ajanların aynı anda kullanılması şeklindedir. Yüksek pik plazma serbest platinum konsantrasyonları yüksek ABY riskleri ile beraberdir. Örnek olarak, ilk kürlerinde 50-140 mg/m² CDDP ile tedavi edilen 22 hastadan oluşan bir çalışmada, serbest platinum pik plazma konsantrasyonları glomerular toksisite ile korele bulunmuştur (149). Yüksek plazma platinum konsantrasyonlarının önemi GFH ve serum magnezyum seviyelerinin >50 mg/m² den fazla CDDP uygulama sonrası önemli derecede azalmanın gözlemlenmesi ile anlaşılmıştır. Karşılaştırma için, 5 ardışık gün en düşük dozda (20 mg/m²) CDDP alan hastalarda GFH'nin korunmuş olduğu gözlemlenmiştir (150).

N-asetilsistein (NAC) gibi diğer tioller primer profilaksi için kullanılmışlardır ve yüksek riskli hastalarda platinum nefrotoksisitesini önlemek için bazı rolleri olabilirler. Thiollerin hem ölü reseptör hem de CDDP ile oluşmuş olan mitokondrial apoptotik yollar üzerine etki ettiği düşünülmektedir (151).

Aminofilinin de CDDP ile oluşan nefrotoksisiteyi önlediği gösterilmiştir (152). Yapılan başka bir çalışmada, 41 hasta teofilin veya plasebo alması için 50 mg/m² doz CDDP içeren kemoterapi ile birlikte rastgele sıralanmıştır (153). Teofilin ile tedavi edilen hastaların GFR düzeylerinde hiçbir değişiklik yok iken, plasebo alanlarda azalma olduğu saptanmakla birlikte (92.9 vs 71.8 ml/dk) Didier Portilla ve

ark. bu konuda hala ek klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğunu öne sürmektedirler (154). Özellikle hasta yüksek doz CDDP alacaksa ve kemoterapinin multipl dozları uygulanacaksa bu konu daha önemli hale gelmektedir.

Amifostin organik bir tiofosfattır ve koruyucu tiol grubunu bırakarak CDDP ile oluşan toksisiteye karşı koruyucu olabilir. Tiolun bırakılması normal hücreler için oldukça selektif olmasına rağmen malign hücreler için selektif değildir (155). Sisplatinin böbrek yetmezliği yan etkisini önlemek amacıyla Capizzi ve ark (156) ve Weichert-Jacobsen ve ark. (137). Bir antioksidan olan amifostine gibi bir antioksidan maddeyi denemişlerdir. CDDP uygulamadan önce amifostin ile tedavinin hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda nefrotoksisiteyi belirgin dereceden azalttığı görülmüştür. Over kanserli kadın hastalarda faz III çalışmalar amifostinin nefrotoksisite (kreatinin klerensinde %'40 dan fazla azalma) insidansını, CDDP (100 mg/m²) içeren kemoterapi rejiminin 6 siklüsünde % 33'den % 10'a azalttığı bulunmuştur (33). Bu sonuçlar eşliğinde, American Society of Clinical Oncology'nin (ASCO) 2002 kılavuzunda amifostinin over veya küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastaların CDDP tedavilerine eklenebileceği düşünülmüştür (157, 158). Fakat amifostinin bu yan etkiyi azaltmasına rağmen CDDP ile beraber kullanıldığında maliyeti 10 kat artmakta olduğundan kullanılması şu an için çok da akılcı görünmemektedir (10, 159).

Sato ve ark. (160) ratlarda taurin tedavisi (organizmada sisteinden sentez edilen, protein yapısına katılmayan bir aminoasittir. Biyolojik sistemlerde gösterdiği antioksidan etkinin, biyomembranların stabilizasyonunda görev alması gibi özelliklerine bağlı olduğu ileri sürülmektedir) ile CDDP nefrotoksitesinin azaltılabileceğini bildirmişlerdir. Taurin tedavisi alan sıçanların, CDDP grubundakilere kıyasla daha az renal hasara sahip oldukları histo-morfometrik analiz aracılığıyla gösterilmiştir. Yoshida ve ark. (161) erkek Sprague-Dawley sıçanlarında yaptıkları deneysel çalışmada i.p. 6 mg/kg CDDP ile nefrotoksisite oluşturmuşlar ve yapısında Se içeren bir bileşik olan ebselenin nefrotoksiteden koruyucu rolünü araştırmışlardır. Bu çalışmada CDDP verilen sıçanlarda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre 3. gün 1.3 kat, 5. gün 1 kat artmış olduğunu bildirmek suretiyle ebselenin, antioksidan sistemi düzenleyerek CDDP alan sıçanlarda nefroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde, Husein ve ark. (162), erkek

Wistar sıçanlarda CDDP'ye bağlı gelişen nefrotoksisite üzerinde ebselenin etkinliğini araştırmışlar ve CDDP verilen grupta MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre % 74 oranında arttığını bildirmişlerdir. Bolaman ve ark. (163) alfa-tokoferolün sıçan böbreğinde CDDP'ye bağlı lipid peroksidasyonunu önlemedeki rolünü araştırmak amacıyla yaptıkları rat deneyinde; CDDP grubuna i.p. 10 mg/kg CDDP ve tedavi grubuna CDDP ile eş zamanlı olarak i.p. 200 mg/kg vitamin E uygulamışlardır. CDDP grubunda artmış lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak renal doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Alfa-tokoferol verilen grupta ise renal doku MDA düzeylerinin, CDDP grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu ve alfa-tokoferolün CDDP'ye bağlı lipid peroksidasyonunu önlemede kullanılabileceği görüşünü savunmuşlardır.

Durak ve ark.(164) ise tek doz 5 mg/kg i.p. CDDP uyguladıkları guinea pig'lerinde nefrotoksisitenin gelişimi üzerine etkilerini gözlemek amacıyla vitamin E+C kompleksi ve doğal bir antioksidan olan Sarmex uygulamışlardır. Çalışmalarında CDDP'nin hem enzimatik hemde non-enzimatik antioksidan sistem üzerine olumsuz etkide bulunduğu ve çalışmadaki değer antioksidanların ise CDDP'ye sekonder gelişen böbrek yetmezliğini önlediği sonucuna ulaşmışlardır.

Antunes ve ark. (165) erkek Wistar sıçanlarda yaptıkları deneysel çalışmada, CDDP ile oluşturulan nefrotoksisiteyi önlemek için CDDP uygulamasından 24 saat ve 10 dk önce olmak üzere 8 mg/kg toplam iki doz, curcumin (diferuloylmethane) vermişlerdir. Bu dozda curcuminin CDDP'ye sekonder gelişen renal GSH kaybını engelleyemediğini ve böbrekleri CDDP'ye sekonder gelişebilen nefrotoksisiteden koruyamadığını rapor etmişlerdir. CDDP ye sekonder gelişen nefrotoksisiteyi önlemede curcumin ile ilgili bildirilen bu olumsuz sonuç, curcuminin oral yolla ve yetersiz dozda alınımına bağlanmıştı. Silva ve ark. (166) çalışmalarında tek dozluk CDDP (5 mg/kg) uygulaması öncesinde başka bir antioksidan olan karetonoid bixin 2.5/5 mg/kg kullanımı ile CDDP'ye bağlı artmış lipid peroksidasyonu ve renal GSH kaybının azaldığını tesbit etmişlerdir. Satoh M. ve ark. (167) hem hidroksil radikalini süpüren, hem de demir aracılı peroksidatif hasarları önleyen, lipofilik bir bileşik olan *Edarabone'un* CDDP tedavisini takiben ortaya çıkan ABY'ye karşı böbrekleri koruduğunu göstermişlerdir.

Yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda görüldüğü gibi nefrotoksisiteyi önlemede kullanılan moleküllerin önemli bir kısmı antioksidan özelliğe sahiptir ve CDDP-nefrotoksisitesinde suçlanan bir mekanizma olan oksidatif stres nedeniyle denenmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız ve yeşil çay içinde bulunan EGCG'nin en çok çalışılmış etki mekanizmalarından biri antioksidan özelliğidir. EGCG'nin hem lipid hem de DNA'ya karşı olan oksidatif hasarın biyobelirteçlerinin plazma seviyelerini önemli derecede azalttığı bulunmuştur (168). Oksidatif protein hasarı üzerine EGCG'nin etkileri ayrıca çalışılmıştır ve çelişkili sonuçlar ortaya çıkmıştır. Ratlarda, EGCG'nin kas proteinlerinin oksidatif modifikasyonunu suprese ettiği bulunmuştur; bununla birlikte, insanlardaki kontrollü bir çalışma oksidatif protein hasarı biyobelirteçleri üzerine EGCG'nin etkisini gösterememiştir (169).

Yeşil çayda ve diğer bitkilerde bulunan antioksidanların değişik yollarla oksidatif hasara engel olduğu bulunmuştur. EGCG ve diğer antioksidanlar vücuttaki serbest radikalleri nötralize eder ve zararlı reaktif nitrojen ve oksijen türlerinin hücre elemanlarında oksidatif hasar oluşturmadan önce etkisiz hale getirir (170). Bazı metal iyonlarına yüksek afinite (benzerlik) gösteren bu antioksidanlar (171), serbest radikal formasyonunu katalize eden redoks-aktif transisyon metal iyonlarını inaktive eden metal şelatör gibi davranmaktadırlar (169). Antioksidanlar hücrelere bakteri ve karsinojenler gibi yabancı ajanların yapışmasını bloke edebilirler (172). EGCG ayrıca peroksidatif aktiviteleri ile bazı dokularda potansiyel olarak oksidatif hasar oluşturabilen lipooksijenaz, sikloksijenaz ve ksantin oksidazı inhibe ederek hücrel oksidatif hasarı önleyebilir (169).

Çay flavanollerinin antioksidan yeteneği hidroksil gruplarının sayısı, bağlandığı yer ve galloil parçalarının varlığına bağlı olarak değişmektedir (93, 98). Vinson ve Dabbagh (107) yaptıkları deneysel çalışmada; çay kateşinlerinin antioksidan gücünün vitaminlere göre daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmalar özellikle yeşil çayın fenolik maddelerce zengin bazı içeceklere göre daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Biz çalışmamızda, oksidatif stress belirteci olarak serum MDA düzeylerini kullandık. Malondialdehid, lipid peroksidasyonun en güvenilir ve kabul gören in vivo belirteçlerinden biridir (173). Li ve Xie (174)'ın yapmış oldukları rat deneylerinde, çay sekonder fenolik maddelerinin tehlikeli türde radikalleri parçalama

yeteneğine sahip bir enzim olan süperoksit dismutaz zararlanmasını ve oksidasyonunu önlediğini, böylece SOD enzim aktivitesini artırdığını ve lipid oksidasyon ürünü olan MDA miktarını düşürdüğünü göstermiştir. Başka bir çalışmada da, yeşil çay kateşinlerinin böbrekte süperoksit dismutaz enziminin aktivitesini azaltıp katalazinkini de artırarak oksidatif stresin azaltılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (105). Bolaman ve ark. (163) alfa-tokoferolün sıçan böbreğinde CDDP'ye bağlı lipid peroksidasyonunu önlemedeki rolünü araştırmak amacıyla rat deneyinde; CDDP grubuna i.p. 10 mg/kg CDDP ve tedavi grubuna, CDDP ile eş zamanlı olarak i.p. 200 mg/kg vitamin E uygulamışlardır. CDDP grubunda artmış lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak renal doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Alfa-tokoferol verilen grupta ise renal doku MDA düzeylerinin, CDDP grubuna göre anlamlı olarak düştüğü ve alfa-tokoferolün CDDP'ye bağlı lipid peroksidasyonunu önlemede kullanılabileceği görüşünü savunmuşlardır. Silva ve ark. (166) çalışmalarında tek dozluk CDDP (5 mg/kg) uygulaması öncesinde başka bir antioksidan olan karetonoid bixin 2.5/5 mg/kg kullanımı ile CDDP 'ye bağlı artmış lipid peroksidasyonu ve renal GSH kaybını azalttığını tesbit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara uygun olarak CDDP uygulanan gruptaki serum MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (Tablo 7). Buna karşılık sisplatin EGCG eklenmesi serum MDA düzeylerinde düşmeye neden oldu. Bu sonuçlar EGCG kullanımının serumda antioksidan savunma sistemini düzelttiğini göstermektedir. Ek olarak, bu veriler daha önce bahsettiğimiz çeşitli antioksidanların kullanıldığı birçok çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir.

Apoptoz çok sayıda ek genler tarafından regüle edilmektedir. Bu genler programlı hücre ölümünü ya güçlendirir (p53, Bak, c-myc) ya da inhibe eder (bcl-2, bcl-xl, setrin) (175). Sisplatin nefrotoksisitesinin inflamasyon ve apoptoz ile birlikte olduğu görülmüştür Francescato ve ark.(176) sisplatin nefrotoksisitesinde pro-apoptotik Bax proteininde artış, anti-apoptotik Bcl proteininde azalma olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde başka bir çalışmada sisplatin nefrotoksisitesinde, renal tübül hücre mitokondrilerinde Bax gen aktivasyonu ve birikiminin akut böbrek hasarına eşlik ettiği gösterilmiştir (126). İskemik reperfüzyon hasarı sonrası tübül epitelyal hücrelerde Bcl-2 protein artışı; hücrel otofaji süpresyonu ve

apoptoz inhibisyonu sağlayabilmektedir (127). Çalışmamızda buna uygun olarak CDDP uygulanan gruptaki Bax düzeylerinin, kontrol grubundaki Bax düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. CDDP grubu ile karşılaştırıldığında EGCG grubu Bax ekspresyonunda anlamlı düşme tespit edildi (şekil 3). Yine EGCG, CDDP ve Kontrol grupları arasında Bcl-2 ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi. Apoptozda koruyucu rolü olduğu düşünülen Bcl-2 düzeylerinin, CDDP+EGCG grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4).

Sisplatine bağlı nefrotoksisite gelişiminde kreatinin klirensindeki azalma erken dönem bulgularındandır. CDDP alan hastaların 1/4'ünde bir iki hafta süreyle ve geri dönüşümlü azotemi ve kreatinin yüksekliği görülmektedir (177, 178). Bu nedenle üre ve kreatinin, CDDP nefrotoksisitesini değerlendirmek amacıyla yapılan klinik ve deneysel çalışmaların önemli parametrelerinden birini oluşturmaktadır. Çalışmamızda CDDP grubunda, Kontrol ve EGCG grubuna göre böbrek fonksiyon bozukluğunu gösteren bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi. EGCG'nin CDDP ile birlikte verildiği grupta ise EGCG tedavisinin CDDP'nin neden olması beklenen üre ve kreatinin değerlerindeki artışı bloke ettiği görüldü. Bu sonuç, EGCG'nin böbrek fonksiyonlarında düzelme sağladığını göstermektedir. (Tablo 6). Safirstein ve ark. (179) yaptıkları çalışmada 5 mg/kg CDDP uygulaması sonrasında böbrek fonksiyonlarında bozulma ile beraber plazma kreatinin seviyelerinde de artış olduğunu bildirmişlerdir. Mansour ve ark. (180) 7.5 mg/kg CDDP ile oluşturdukları nefrotoksisite grubunda serum üre ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 2.5 ile 3.3 kat arttığını bildirmişlerdir. CDDP öncesi 5 gün amiguanidinle tedavi edilen grupta serum üre ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olmakla beraber, CDDP grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir. Durak ve ark.'da (164) tek doz 5 mg/kg i.p. CDDP uyguladıkları guinea pig'lerinde nefrotoksisitenin gelişimi üzerine etkilerini gözlemlemek amacıyla vitamin E+C kompleksi ve doğal bir antioksidan olan Sarmex uygulamışlardır. Çalışmalarında CDDP'nin hem enzimatik hem de non-enzimatik antioksidan sistem üzerine olumsuz etkide bulunduğu ve kullanılan antioksidanların ise CDDP'ye sekonder gelişen böbrek yetmezliğini önlediği sonucuna ulaşmışlardır. Sonuç olarak, çalışmamızda ve literatürdeki diğer çalışmalarda nefroprotektif etkisi olan bir çok ajanın, lipid peroksidasyonunu azaltmasıyla doğru orantılı olarak üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşüş sağlandığı gösterilmiştir (164, 179, 180). Çalışmamızda biyokimyasal

olarak elde ettiğimiz bu sonuç, histopatolojik bulgularla da desteklenmiştir. CDDP ile meydana gelen tübüler nekroz, interstisyel inflamasyon, vakuolizasyon gibi bulguların EGCG uygulaması ile önemli ölçüde önlendiği görüldü.

Hsp'ler ile oksidatif stres arasındaki yakın ilişki yakın zamanda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (181). Isı stresinin indüklediği Hsp60, Hsp70 ve Hsp25 overekspresyonu, kardiyak miyositlerde serbest radikal oluşumunu düzeltmiştir (182). Kardiyomiyositlerde, Isı stresi ile Hsp70 ve Hsp90'ın indüksiyonu caspase-9 ve caspase-3'ün aktivasyonunu ve dolayısıyla apoptozu da inhibe eder (183). Takayuki ve ark.(184) güçlü bir antioksidan olan dimetiltiyürenin (DMTU) renal tübüler hücrelerde Hsp60'ı erken dönemde indükleyerek Bax-ilişkili apoptozu önlediğini ve bu yolla CDDP'nin neden olduğu ABY'ye karşı koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir. Gerçekten bu çalışmada organel ve membranlarda Bax proteinin CDDP'ye bağlı artışının da engellendiği gözlenmiştir. DMTU ile olduğu gibi çeşitli in vitro çalışmalarda oksidatif strese karşı koruyucu etkinin, farklı hücrelerdeki Hsp ekspresyonunun supresyonu sonucu olduğu anlaşılmıştır (185). Bizim bulgularımız da, Hsp60 ve Hsp70 düzeylerinin bazal düzeylere (kontrol grubundaki değerlere) düşmesine bile CDDP grubuna göre EGCG uygulanan CDDP+EGCG grubunda daha az olduğunu, dolayısıyla sisplatin nefrotoksisitesinden koruyucu etkinin en azından kısmen Hsp'ler yoluyla olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, bu bulgular, sisplatin uygulanan ratlarda EGCG kullanımı ile ısı şok proteinleri arasında belirgin ölçülerde pozitif bir ilişki olduğunu göstermekte ve sisplatin uygulanan ratlarda Hsp ekspresyonunun değiştiği ve dokuların hasara karşı duyarlılığın arttığına dair sonuçları desteklemektedir. EGCG'nin güçlü bir antioksidan etkisinin olduğu ve sisplatinin oluşturduğu oksidatif etki ile etkileşime gireceği iyi bilinmekle birlikte, EGCG'nin böbrekte ısı şok proteinleri üzerine etkisini araştıran çalışmamızla karşılaştırabilecek şekilde bir çalışmaya rastlamadık.

Sonuç olarak, sisplatin uygulanan ratlarda tedaviye EGCG eklenmesinin bax proteininde down-regülasyona, ısı şok proteinlerinde ise up-regülasyona neden olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, biyokimyasal ve histopatolojik bulguların da desteğiyle, bir antioksidan olan EGCG'nin sisplatinin neden olduğu renal hasarı azalttığını göstermektedir. Bu etki oksidatif stres belirteçlerinde azalma ve ısı şok proteinlerinin cevabında artış ile ilişkili olabilir.

5. KAYNAKLAR

1. Cvitkovic E, Spaulding J, Bethune V. Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum therapeutic index in an animal model. *Cancer* 1977; 39: 1357–1361.
2. Rosenberg B, VanCamp, Trosko J, Mansour V. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222: 385–386.
3. Kuhlmann MK, Burkhardt G and Kohler H. Insight into potential cellular mechanism of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478–2480.
4. Loehrer PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Int Med* 1984; 100: 704–713.
5. Links M, Lewis C. Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 1999; 57: 293–308.
6. Roberts JJ, Thomson AJ. The mechanism of action of antitumor platinum compounds. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1979; 22: 71–133.
7. Scovell WM, Muirhead N, Kroos LR. cis-Diamminedichloroplatinum (II) selectively cross-links high mobility group proteins 1 and 2 to DNA micrococcal nuclease accessible regions of chromatin. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 142: 826–835.
8. Kelman AD, Peresie HJ. Mode of DNA binding of cis-platinum (II) antitumor drugs: a base sequence-dependent mechanism is proposed. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1445–1452.
9. Den Hartog HJ, Altona C, Vander Marel GA, Reedijk J. A¹H and ³¹P NMR study of cis-Pt(NH₃)₂ [d(CpGpG)-N7 (2),N7 (3)] The influence of a 5'-terminal cytosine, on the structure of the cis-Pt(NH₃)₂ [d(GpG)-N7,N7] intrastrand cross-link. *Eur J Biochem* 1985; 147: 371–379.

10. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Actvation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2353–2362.
11. Sleijfer DT, Meijer S and Mulder NH. Cisplatin: A Review of Clinical Applications and Renal Toxicity. *Pharm Weekbl Sci* 1985; 7: 237-244.
12. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10: 1663.
13. DeConti R, Toftness B, Lange R and Creasey W. Clinical and pharmacological studies with cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1973; 33; 1310–1315.
14. Jhonson SW, Stevenson JP, O'Dwer PJ. Cisplatin and its analogues. In: DeVita V, Helmann S, Rosenberg S (editor). *Cancer principles and practice of oncology*. 6th ed. Lippincott Wiliams & Wilkins Publishers. Philadelphia-New York 2001: 376–388.
15. Casper ES, Kelsen DP, Alcock NW, Young CW. Platinum concentrations in bile and plasma following rapid and 6-hour infusions of cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 2023–2025.
16. Cooley ME, Davis LE, Stefano M, Abraham J. Cisplatin: A clinical review, Part 1-Current uses of cisplatin and administration guideliness. *Cancer Nurs* 1994; 17: 283–293.
17. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxiety. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 25: 1–9.
18. Zhang JG, Lindup WE. Role of mitochondria in cisplatin–induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2215–2222.

19. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Effects of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1872–1875.
20. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Role of glutathione S-transferase isoenzymes in cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat. *Toxicol Lett* 1994; 70: 211–222.
21. Bompart GJ, Prevot DS, Bascants JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin induced toxicity. *Clin Biochem* 1990; 23: 501–504.
22. Bompart GJ, Orfila C, Girolami JP. Cisplatin nephrotoxicity in lead-pretreated rats: Enzymatic and morphological studies. *Toxicol Lett* 1990; 50: 237–247.
23. Jones MM, Basinger MA, Holshern MA. Control of the nephrotoxicity of cisplatin by clinically used sulfur-containing compounds. *Fundam Appl Toxicol* 1992; 18: 181–188.
24. Weiner MW, Jacobs C. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc* 1982; 42: 2974–2978.
25. Anand AJ, Bashey B. Newer insights into cisplatin nephrotoxicity. *Ann Pharmacol* 1993; 27: 1519–1525.
26. Mistry P, Merazga Y, Spargo DJ, Riley PA, Mc Brien DCH. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 28: 277–282.
27. Hanigan MH, Gallego BC, Taylor PT, Large MK. Inhibition of g-glutamyl transpeptidase activity by acivicin in vivo protects the kidney from cisplatin-induced toxicity. *Cancer Res* 1994; 54: 5925–5929.
28. Zhang JG, Lindup WE. Cisplatin nephrotoxicity: Decrease in mitochondrial protein sulphhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1994; 47: 1127–1135.

29. Jones MM, Basinger MA, Holscher MA. Relative effectiveness of some compounds for the control of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1991; 68: 227–247.
30. Singh GA. Possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 58: 71–80.
31. Aggarwal SKA. Histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1053–1071.
32. Halabe A, Wong NLM, Sutton RAL. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. *Nephron* 1991; 57: 197–200.
33. Kemp G, Rose P, Lurain J, Berman Maenetta A, Rouillet B, Hmesley H, Belpomme Glic J. Amifostine pretreatment for the protection against cyclophosphamide and cisplatin-induced toxicities: Results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. *Clin Oncol* 1996; 14: 2101–2112.
34. Dos Santos OFP, Boim MA, Barros EJG, Schor N. Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 1991; 40: 742–747.
35. Dos Santos OFP, Boim MA, Barros EJG, Pirotzky E, Braquet P, Schor N. Effect of platelet activating factor antagonist BN52063 nephrotoxicity of cisplatin. *Lipids* 1991; 26: 1324–1328.
36. Galea AM, Murray V. The interaction of cisplatin and analogues with DNA in reconstituted chromatin. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1579: 142–152.
37. Litterst CL, Torres IJ, Guarino AM. Plasma levels and organ distribution of platinum in the rat, dog, and dog fish following intravenous administration of cis-DDP (II). *J Clin Hematol Oncol* 1977; 7: 169–179.

38. Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984; 25: 753–758.
39. Luke DR, Vadie K, Lopez-Berestein G. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 1–7.
40. Winston JA, Safirstein R. Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1985; 249: 490–496.
41. Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110: 835–842.
42. Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: 166–174.
43. Kelly KJ, Meehan SM, Colvin RB. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int* 1999; 56: 922–931.
44. Li S, Gokden N, Okusa MD. Anti-inflammatory effect of fibrate protects from cisplatin-induced ARF. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: 469–480.
45. Liu M, Chien CC, Burne-Taney M. A pathophysiologic role for T lymphocytes in murine acute cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 765–774.
46. Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int* 2007; 72: 37–44.
47. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int* 2004; 66: 2202–2213.

48. Portilla D, Kaushal GP, Basnakian AG. Recent progress in the pathophysiology of acute renal failure. In: Principles of molecular medicine, 2nd ed, Runge, MS, and Patterson C (editor). Humana Press Inc Totawa NJ 2006: 643–649.
49. Townsend DM, Deng M, Zhang L. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1–10.
50. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2683–2690.
51. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug Metab Rev* 1999; 31: 971–997.
52. Tanaka-Kagawa T, Kitahara J, Seko Y. Reduced sensitivity of HeLa cells to cis-platinum by simultaneous overexpression of copper, zinc-superoxide dismutase and catalase. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 545–548.
53. Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 43377–43388.
54. Portilla D, Li S, Nagothu KK. Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 2006; 69: 2194–2204.
55. Abdel-Gayoum AA, El-Jenjan KB, Ghwarsha KA. Hyperlipidaemia in cisplatin-induced nephrotic rats. *Hum Exp Toxicol* 1999; 18: 454–459.
56. Li S, Wu P, Yarlaga P. PPAR alpha ligand protects during cisplatin-induced acute renal failure by preventing inhibition of renal FAO and PDC activity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: 572–580.
57. Nagothu KK, Bhatt R, Kaushal GP, Portilla D. Fibrate prevents cisplatin-induced proximal tubule cell death. *Kidney Int* 2005; 68: 2680–2693.

58. Wittes RE, Brescia F, Young CW. Combination chemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum (II) and bleomycin in tumors of the head and neck. *Oncology* 1975; 32: 202–207.
59. Vasey PA. Dose dense chemotherapy in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 226–232.
60. Rose BD, Post TW. *Clinical physiology of acid-base and electrolyte disorders*, 5th ed, McGraw-Hill (editor). New York 2001: 120–135.
61. Kim SW, Lee JU, Nah MY. Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 875–882.
62. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167: 1477–1484.
63. Madias NE, Harrinton JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* 1978; 65: 307–314.
64. Blachley JD, Hill JB. Renal and electrolyte disturbances associated with cisplatin. *Ann Intern Med* 1981; 95: 628–632.
65. Lam M, Adelstein DJ. Hypomagnesemia and renal magnesium wasting in patients treated with cisplatin. *Am J Kidney Dis* 1986; 8: 164–169.
66. Jackson AM, Rose BD, Graff LG. Thrombotic microangiopathy and renal failure associated with antineoplastic chemotherapy. *Ann Intern Med* 1984; 101: 41–44.
67. Goldstein RS, Mayor GH, Gingerich RL. The effects of cisplatin and other divalent platinum compounds on glucose metabolism and pancreatic endocrine function. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983; 69: 432–441.

68. Oeffinger KC, Hudson MM. Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *CA Cancer J Clin* 2004; 54: 208–236.
69. Koch Nogueira PC, Hadj-Aissa A, Schell M. Long-term nephrotoxicity of cisplatin, ifosfamide, and methotrexate in osteosarcoma. *Pediatr Nephrol* 1998; 12: 572–575.
70. Hartmann JT, Fels LM, Knop S. A randomized trial comparing the nephrotoxicity of cisplatin/ifosfamide-based combination chemotherapy with or without amifostine in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* 2000; 18: 281–289.
71. Hutchison FN, Perez EA, Gandara DR. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin. *Ann Intern Med* 1988; 108: 21–25.
72. Cao L, Joshi P, Sumoza D. Renal salt-wasting syndrome in a patient with cisplatin-induced hyponatremia: case report. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 344–346.
73. Wood PA, Hrushesky WJ. Cisplatin-associated anemia: An erythropoietin deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1995; 95: 1650–1659.
74. Liochev SI, Fridovich I. The role of O⁻ in the production of Ho[•]: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 29–33.
75. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull* 1993; 49: 481–493.
76. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381–389.
77. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 129–135.

78. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 79–110.
79. Ramasarma T. Generation of H₂O₂ in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 1982; 694: 69–93.
80. Freeman Ba, Crapo JD. Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412–26.
81. Frank L, Massaro D. Oxygen toxicity. *Am J Med* 1980; 69: 117–26.
82. McQueen CA; Williams G M. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis-2-chloroaniline. *Mutat Res* 1990; 239: 133–142.
83. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J Med* 1996; 27: 41–50.
84. Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidants therapies. *Drugs* 1995; 49: 345–61.
85. Akkuş I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimosza Yayınları, Konya. 1995; 1: 3–95.
86. Cross CE, Halliwell B, Barish ET, Pryor WA, Ames BN, Sam RL, et al. Oxygene radicals and human disease. *Ann Intern Med* 1987 107: 526–545.
87. De Martinis BS, Bianchi MD. Effect of vitamin C supplementation against cisplatin-induced toxicity and oxidative DNA damage in rats. *Pharmacol Res* 2001; 44: 317–320.
88. Kılınç K. Oksijen Radikalleri, üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biokimya Dergisi* 1995; 10: 60–89.
89. Halliwell B. Reactive oxygene species in living system: Source, biochemistry and role in human disease. *Arn J Med* 1991; 91: 14–22.

90. Sivritepe N. Asma, üzüm ve şaraptaki antioksidantlar. *Gıda. Dünya Yayınları*. 2000; 12: 73–78.
91. Owuor PO, Obanda M. *Food Chemistry* 1998; 61: 435–441.
92. Yang CS. *Nutrition* 1999; 15: 946–949.
93. Wang H, Provan G.J, Helliwell K. *Trends in food science and technology* 2000; 11: 152–160.
94. Katiyar, SK, Mukhtar, H. Tea antioxidants in cancer chemoprevention. *J Cellular Bioch* 1997; 27: 59–67.
95. Wu WW, Chadik PA, Davis WM, Powell DH, Delfino JJ. Disinfection byproduct formation from the preparation of instant tea. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 3272–3279.
96. Trevisanato SI, Young-In Kim MD. Tea and health. *Nutrition Reviews*. 2000; 58: 1–10.
97. Koo MWL. and Cho CH. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur J Pharm* 2004; 500: 177–185.
98. Benzie IFF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioksidant power assay. *J Agric Food Chem*. 1999; 64: 633–636.
99. Lee B, Ong C. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatography A*. 2000; 881: 439–447.
100. Wang H, Helliwell K, You X. Isocratic Elution System for the Determination of Catechins, Caffeine and Gallic Acid in Green Tea Using HPLC. *Food Chem* 2000; 68: 115–121.
101. Yang CS, Landau JM. Effects of tea consumption on nutrition and health. *American Society for Nutr* 2000; 130: 2409–2412.

102. Miura Y, Chiba T, Tomita I, Koizuma H, Miura S, Umegaki K, et al. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr* 2001; 131: 27–31.
103. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T. and Tokimitsu I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: Stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26: 1459–1464.
104. Tijburg LB, Wiseman SA, Meijer GW. and Weststrate JA. Effects of green tea, black tea and dietary lipophilic antioxidants on LDL oxidizability and atherosclerosis in hypercholesterolaemic rabbits. *Atherosclerosis* 1997; 135: 35–47.
105. Crespy V, Williamson G. International research council on food, nutrition, and cancer. A review of the health effects of the catechins in in vivo animal models. *J Nutr* 2004; 134: 3431–3440.
106. Wu LY, Juan CC, Ho LT, Hsu YP and Hwang LS. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in sprague-dawley rats. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 643–648.
107. Vinson JA, Dabbagh YA. Tea phenols: Antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutr Res* 1998; 18: 1067–1075.
108. Matsumoto N, Okushio K. and Hara Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. *J Nutr Vitaminol* 1998; 44: 337–342.
109. Shahidi F. Naturals antioxidant: Sources, effects and applications. 2003, <http://www.sifstorg.sg/article.naturalantioxidants.html>.
110. Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ. Tea and tea poliphenols in cancer prevention. *J Nutr* 2000; 130: 472–478.

111. Han LK, Takaku T, Li J, Kimura Y. and Okuda H. Antiobesity action of oolong tea. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999; 23: 98–105.
112. Yeh J. Green Tea and it's antioxidant properties. *Nutritional noteworthy*: 1999, <http://repositories.cdlib.org/uclabiolchem/nutritionnoteworthy/vol2/iss1/art7>.
113. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: Health effects, metabolism and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci and Nutr* 2003; 43: 89–103.
114. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1991; 7: 663–698.
115. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T, De Beis F. Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. *Curr Top Microbial Immunol* 1995; 200: 195–211.
116. Dragunow M, MacGibbon GA, Lawlor P. Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration. *Rev Neurosci*. 1997; 8: 223–265.
117. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America* 2001; 98: 13884–13888.
118. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4: 332–339.
119. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395–419.
120. Hetts SW. To die or not to die. *The J Am Med Assoc (JAMA)* 1998; 279: 300–307.
121. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of the American College of Chest Physicians (CHEST)* 2000; 117: 1771-1777.
122. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102–107.

123. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 577–628.
124. Budihardjo I, Oliver HLM. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269–290.
125. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2000; 14: 1340–1344.
126. Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 2007; 72: 53–62.
127. Isaka Y, Suzuki C, Abe T. Bcl-2 protects tubular epithelial cells from ischemia/ reperfusion injury by dual mechanisms. *Transplant Proc* 2009; 41: 52–54.
128. Lang A, Benke D, Eitner F. Heat shock protein 60 is released in immune-mediated glomerulonephritis and aggravates disease: in vivo evidence for an immunologic danger signal. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 383–391.
129. Gupta S, Knowlton AA. Hsp60, Bax, apoptosis and the heart. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 51–58.
130. Lin L, Kim SC, Wang Y, Gupta S, Davis B, Simon SI, Toore-Amione G, Knowlton A. Hsp60 in heart failure: abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293: 2238–2247.
131. Kumaran S, Arulmathi K, Srividhya R, Kalaiselvi P. Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats, *Exp Gerontol* 2008; 43: 176–183.
132. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV. *LC-GC North America* 2004; 22: 362–365.

133. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
134. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histology-A Text and Atlas*, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1989.
135. Gilman A. The initial clinical trial of Nitrogen Mustard. *Amer J Surgery* 1963; 105: 574.
136. Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. *Drug Safety* 2001; 24: 19–38.
137. Weichert-Jacobsen KJ, Bannowski A, Küppers F, Loch T, Stöckle M. Direct amifostine effect on renal tubule cells in rats. *Cancer Res* 1999; 59: 3451–3453.
138. Boogaard PJ, Nagelkerke JF, Mulder GJ: Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem Biol Interact* 1990; 76: 281–291.
139. Fillastre JP, Godin M. Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York. Oxford University Press 1998; 2645–2657.
140. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31–41.
141. Ikarashi Y, Kakihara Y, Imai C. Glomerular dysfunction, independent of tubular dysfunction, induced by antineoplastic chemotherapy in children. *Pediatr Int* 2004; 46: 570–575.
142. Taguchi T, Nazneen A, Abid M, Razzaque MS. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 2005; 148: 107–121.
143. Dillioglulil MO, Maral Kir H, Gulkac MD, Ozon Kanli A, Ozdogan HK, Acar O, Dillioglulil O. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on

- cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol Int* 2005; 75: 340–344.
144. Meyer KB, Medias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab.* 1994; 20: 201–213.
 145. Packer L, Landvik S. Vitamin E in biological systems. In: Emerit L Packer and C Auclair (editor). *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. New York: Plenum Press. 1990; 93–104.
 146. Anand AJ, Bashey B. Newer insights into cisplatin nephrotoxicity. *Ann Pharmacother* 1993; 27: 1519–1525.
 147. Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 1998; 131: 518–526.
 148. Yildirim Z, Sogut S, Odaci E, Iraz M, Ozyurt H, Kotuk M, Akyol O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res* 2003; 47: 149–156.
 149. Reece PA, Stafford I, Russell J. Creatinine clearance as a predictor of ultrafilterable platinum disposition in cancer patients treated with cisplatin: relationship between peak ultrafilterable platinum plasma levels and nephrotoxicity. *J Clin Oncol* 1987; 5: 304–309.
 150. Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 866–869.
 151. Wu YJ, Muldoon LL, Neuwelt EA. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 424–431.

152. Heidemann HT, Muller S, Mertins L. Effect of aminophylline on cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 313–318.
153. Benoehr P, Krueth P, Bokemeyer C. Nephroprotection by theophylline in patients with Cisplatin chemotherapy: a randomized, single-blinded, placebo-controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 452–458.
154. Portilla D, Safar AM, Penson RT. Cisplatin-induced nephrotoxicity 2007.
155. Castiglione F, Dalla Mola A, Porcile G. Protection of normal tissues from radiation and cytotoxic therapy: The development of amifostine. *Tumori* 1999; 85: 85–91.
156. Capizzi RL. Amifostine reduces the incidence of cumulative nephrotoxicity from cisplatin: Laboratory and clinical aspects. *Semin Oncol* 1999; 26: 72–81.
157. Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3333–3355.
158. Schuchter LM, Hensley ML, Meropol NJ. Update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2895–2903.
159. Topuz E, Aydiner A, Karadeniz AN. *Klinik Onkoloji. Dinçol K: Kemoterapatide Temel Prensipler. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Yayınları.* 2000; 34–47.
160. Sato S, Yamate J, Saito S, Kurasaki M. Protective effect of taurine against renal interstitial fibrosis of rats induced by cisplatin. *N-S Arch Pharmacol* 2002; 365: 277–283.

161. Yoshida M, Itzuka K, Hara M, Nishijima H, Shimada A, Nakada K, Satoh Y. Prevention of nephrotoxicity of cisplatin by repeated oral administration of ebselen in rats. *Tohoku J Exp Med* 2000; 191: 209–220.
162. Husain K, Morris C, Whitworth C, Trammell GL, Rybak LP, Somani SM. Protection by ebselen against cisplatin-induced nephrotoxicity: antioxidant system. *Mol Cell Biochem* 1998; 178: 127–133.
163. Bolaman Z, Köseoğlu MH, Demir S, Kadıköylü G, Barutca S, Atalay H, Aslan D. Effect of α -Tocopherol on lipid peroxidation. Caused by cisplatin in Rat Kidney. *Turk J Hematol* 2003; 20: 35–38.
164. Durak İ, Özbek H, Karaayvaz M, Öztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug and Chem Toxicol* 2002; 25: 1–8
165. Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi M de LP. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 145–150.
166. Silva CR, Antunes LMG, Bianchi M de LP. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidations in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 561–566.
167. Satoh M, Kashihara N, Fujimoto S, Horike H, Tokura T, Namikoshi T, et al. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 1183–1190.
168. Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr* 2003; 133: 3285–3292.
169. Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003; 133: 3275–3284.

170. Jung YD, Kim MS, Shin BA. EGCG, a major component of green tea, inhibits tumour growth by inhibiting VEGF induction in human colon carcinoma cells. *Br J Cancer* 2001; 84: 844–850.
171. Tosetti F, Ferrari N, De Flora S, Albini A. Angioprevention: angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents. *FASEB J.* 2002; 16: 2–14.
172. Maiti TK, Chatterjee J, Dasgupta S. Effect of green tea polyphenols on angiogenesis induced by an angiogenin-like protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 64–67.
173. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 410–416.
174. Li C, Xie B. Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea oxypolymers. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 6362–6366.
175. Kyama CM, Overbergh L, Debrock S. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril* 2006; 85: 1667–1675.
176. Francescato HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* 2007; 230: 64–75.
177. Cooley ME, Davis LE, Stefano M, Abraham J. Cisplatin: A clinical review. Part 1-Current uses of cisplatin and administration guidelines. *Cancer Nurs* 1994; 17: 173–184.
178. Verplanke AJW, Herber RFM de Wit R, Veenhof CHN. Comparison of renal function parameters in the assessment of cisplatin induced nephrotoxicity. *Nephron* 1994; 66: 267–272.

179. Safirstein R, Miller P, Dikman S, Lyman N, Shapiro C. Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. *Am J Physiol* 1981; 241: 175–185.
180. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002; 132: 123–128.
181. Johnson JD, Fleshner M. Releasing signals, secretory pathways, and immune function of endogenous extracellular heat shock protein 72. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 425–434.
182. Jiang B, Xiao W, Shi Y, Li M, Xiao X. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperon* 2005; 10: 252–262.
183. Ilangovan G, Venkatakrishnan CD, Bratasz A, Osinbowale S, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppusamy P. Heat shock-induced attenuation of hydroxyl radical generation and mitochondrial aconitase activity in cardiac H9c2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: 313–324.
184. Takayuki T, Akihiko K, Hideo Y, Takehiko M, Jinghui L, Yukitoshi S, et al. The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 234: 202–208.
185. Nunez MT, Osorio A, Tapia V, Vergara A, Mura CV. Iron-induced oxidative stress up-regulates calreticulin levels in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Cell Biochem* 2001; 82: 660–665.

6. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Malatya'da doğdum. İlköğretim 4. sınıfa kadar Eskişehir'de okuduktan sonra ilköğretimin kalan kısmını, ortaöğretimi ve liseyi Malatya'da tamamladım. 1998 yılında yükseköğrenime başladığım İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden 2004 yılında mezun oldum. Kasım 2005 tarihinde Fırat Üniversitesinde Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğinde başladığım ihtisasa devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.