

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİNDE THYMOQUINONE’NİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ramazan ULU

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN

ELAZIĞ

2011

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 Sınavı Jüri Üyeleri

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

TEŞEKKÜR

Nefroloji eğitimim süresince değerli yardım ve katkılarını unutamayacağım tez danışmanım Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN'a, eğitimime büyük katkıları olan Nefroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKER ve Doç. Dr. Bilge AYGEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin tüm aşamalarında kıymetli katkıları olan Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları öğretim üyesi Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya ve histopatolojik inceleme safhasındaki yardımlarından dolayı Patoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Nusret AKPOLAT'a ve değerli çalışma arkadaşım Dr. İrem PEMBEGÜL YİĞİT'e teşekkür ederim.

Bu tez, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından 1966 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Sisplatin birçok solid tümörün tedavisinde yaygın biçimde kullanılan antineoplastik ajandır. En iyi bilinen yan etkisi yoğun intravenöz salin infüzyonuna rağmen görülebilen nefrotoksisitedir. Sisplatin ile gelişen akut böbrek hasarının patogenezi oksidatif stres, inflamasyon ve hücre siklüs değişikliklerini de içerecek şekilde multifaktöriyeldir. Thymoquinone (TQ), serbest radikal oluşturan çeşitli ajanların yapmış olduğu oksidatif hasara karşı organları korumada etkili bir ajandır.

Çalışmamızda TQ'nun sisplatin nefrotoksisitesinde koruyucu etkisi araştırıldı.

Çalışmada 28 adet 8 haftalık (180-245 gr) Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı. Bu amaçla ratlar (i) kontrol, (ii) sisplatin (7 mg/kg/ip tek doz), (iii) TQ (10 mg/kg, içme suyu ile) (iv) sisplatin (7 mg/kg/ip tek doz) +TQ (10 mg/kg, içme suyu ile) olarak 4 gruba ayrıldı. Sisplatin uygulanan grupta üre, kreatinin değerleri belirgin olarak yüksek bulundu ($P<0.001$). Sisplatin+TQ grubunda üre ve kreatinin düzeyleri sisplatin grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulundu ($P<0.05$). Böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂ α seviyeleri sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.001$). Tübüler transport proteinlerinden olan OKT1 ve OKT2 düzeyleri sisplatin+TQ grubunda sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($P<0.05$). Sisplatin ile oluşan histopatolojik değişikliklerin TQ ile belirgin olarak düzeldiği görüldü.

Elde ettiğimiz veriler sisplatinin oksidatif stres ve böbrek hasarına yol açtığını gösterdi. Sonuç olarak çalışmamız, oksidatif hasarı azaltan, OKT1 ve OKT2 ekspresyonunu düzelteren TQ'nun sisplatin nefrotoksisitesinde önemli bir koruyucu ajan olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla spesifik OKT2 antagonistleri de sisplatin nefrotoksisitesini önleyebilir.

Anahtar kelimeler: sisplatin, thymoquinone (TQ), oksidatif hasar, organik katyon transporter.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF THYMOQUINONE ON CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY

Cisplatin is a widely used antineoplastic agent for the treatment of several solid tumors. The well-known complication of cisplatin administration is acute kidney injury even with vigorous intravenous saline infusion. Acute kidney injury by cisplatin is multifactorial, including oxidative stress, inflammation and changes in cell cycle.

Thymoquinone (TQ) has been shown to protect organs against oxidative damage induced by a variety of free radical generating agents. We investigated the protective effects of TQ against cisplatin-induced nephrotoxicity.

Male Wistar rats (n= 28, 8 wk-old between 180-245 gr) were divided into four groups: (i) control rats, (ii) cisplatin (7 mg/kg, IP single dose), (iii) TQ (10 mg/kg, orally), (iv) cisplatin (7 mg/kg, IP single dose)+ TQ (10 mg/kg, orally). Cisplatin administration resulted in significant increase in serum urea nitrogen and creatinine (P<0.001). Serum urea nitrogen and creatinine levels were lower in rats treated with cisplatin+TQ compared with rats treated cisplatin alone (P<0.05). The renal tissue MDA and 8-iso-PGF₂α levels showed a significant increase in cisplatin-treated rats compared to the control rats (P<0.001). The expression of renal OKT1 and OKT2 was significantly higher in cisplatin+TQ group compared with cisplatin group (P<0.05). Cisplatin-induced renal histopathological changes were significantly improved with TQ.

These results show that cisplatin produces oxidative stress and renal damage. In conclusion, our study shows that TQ, which reduces oxidative stress and ameliorates the expression of OKT1 and OKT2, has significant potential as a therapeutic intervention for cisplatin-induced renal injury. Thus OKT2 specific antagonists may prevent the nephrotoxicity of cisplatin.

Keywords: cisplatin, thymoquinone (TQ), oxidative damage, organic cation transporter.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sisplatin	1
1.1.1. Sisplatinin Farmakokinetik Yapısı	1
1.1.2. Sisplatin Nefrotoksisitesi	1
1.1.3. Patogenez	1
1.1.3.1. Hücresel Toksikite	1
1.1.3.2. Proinflamatuvar Etkiler	2
1.1.3.3. Proksimal Tubulusa Etkileri	2
1.1.4. Nefropatinin Klinik Yansımaları	2
1.1.4.1. Böbrek Yetmezliği	3
1.1.4.2. Trombotik Mikroanjiopati	3
1.1.4.3. Hipomagnezemi	3
1.1.4.4. Fanconi Benzeri Sendrom	3
1.1.4.5. Tuz Kaybı	4
1.1.4.6. Anemi	4
1.2. Tübüler Taşıyıcı Sistemler (Organik Anyon ve Katyon Taşıyıcı Sistemler)	4
1.2.1. Organik Anyon Transport Sistemi (SLC 22 A)	4
1.2.1.1. Bazolateral Transport	5
1.2.2. Organik Katyon Transport Sistemi (SLC22A)	5
1.2.2.1. Bazolateral OK Girişi	6
1.2.2.2. Apikal OK Atılımı	6
1.3. Oksidatif Sistem	6

1.4. Thymoquinone	7
1.4.1. Farmakolojik Özellikleri	7
1.4.1.1. Antioksidan Etkisi	7
1.4.1.2. Antiinflamatuvar ve Analjezik Etkisi	7
1.4.1.3. Antikarsinojenik ve Antimutajenik Etkisi	8
1.4.1.4. Antihepatotoksik ve Antinefrotoksik Etki	9
1.4.1.5. Respiratuvar ve İmmünojenik Etkisi	10
1.4.1.6. Antidiyabetik Etki	10
1.4.1.7. Kardiyovasküler Sistem ve Hematolojik Sistem Üzerine Etkisi	11
1.4.1.8. Antiülser Etkisi	11
1.4.1.9. Antimikrobiyal ve Antiparazitik Etki	11
1.4.1.10. Toksik Özellikleri	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	13
2.1. Hayvan Materyali	13
2.2. Deney Düzeni	13
2.3. Laboratuvar Analizi	14
2.3.1. HPLC için Doku Homojenizasyonu	14
2.3.2. HPLC’ de MDA Analizi	14
2.3.3. 8-iso-PGF ₂ α	14
2.4. Histopatolojik İnceleme	15
3. BULGULAR	17
3.1. Üre Düzeyleri	17
3.2. Kreatinin Düzeyleri	17
3.3. OKT1 Düzeyleri	17
3.4. OKT2 Düzeyleri	18
3.5. Doku MDA Düzeyleri	19
3.6. 8-iso-PGF ₂ α Düzeyleri	19
4. TARTIŞMA	23
5. KAYNAKLAR	29
6. ÖZGEÇMİŞ	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Araştırmada kullanılan diyetin bileşimi	13
Tablo 2. Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda üre ve kreatinin üzerine etkisi (n=7).	17
Tablo 3. Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF ₂ α üzerine etkisi (n=7).	19
Tablo 4. Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler üzerine etkisi (n=7).	20

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Rat böbrek dokusunda OKT1 ekspresyon düzeyleri	18
Şekil 2. Rat böbrek dokusunda OKT2 ekspresyon düzeyleri	18
Şekil 3. Rat böbrek dokusunda OKT1 ve OKT2' Western Blot yöntemi ile analizi .	18
Şekil 4. Kontrol grubu normal görünüm (HE, x400)	20
Şekil 5. TQ grubu normale yakın böbrek histolojisi (HE, x400).	21
Şekil 6. Sisplatin grubu, tübüslarda yaygın dejenerasyon, nekroz ve rejeneratif değişiklikler (HE, x400).	21
Şekil 7. Sisplatin+ TQ grubu tübülus epitel hücrelerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ve tübüler hasar (HE, x400).....	22

KISALTMALAR LİSTESİ

İP	: İntraperitoneal
MDA	: Malondialdehit
OAT1	: Organik Anyon Transporter 1
OAT3	: Organik Anyon Transporter 3
OKT1	: Organik Katyon Transporter 1
OKT2	: Organik Katyon Transporter 2
PT	: Proksimal Tübül
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TBARS	: Tiyobarbutirikasit-Reaktif Substance
THQ	: Thymohydroquinone
TQ	: Thymoquinone
8-iso-PGF₂α	: 8-iso-prostaglandin F ₂ α

1. GİRİŞ

1.1. Sisplatin

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) önemli bir sitotoksik maddedir ve insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi birçok solid tümörde etkili bir antikarsinogenik olarak yaygın biçimde kullanılır (1). Sisplatin tedavisine bağlı olarak bulantı-kusma, nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve seyrek olarak da oküler toksisite gelişebilmektedir (2). Profilaktik intravenöz salin infüzyonuna rağmen görülebilen en önemli yan etki nefrotoksisitedir. Progresif renal yetersizlik gelişmesi durumunda yapılabilecek tek işlem sisplatin uygulamasının sonlandırılmasıdır. Sisplatin proksimal tübül (PT) S3 segmenti boyunca emilerek iç korteks ve dış medulla kısımlarında yüksek konsantrasyonlarda birikmektedir. Dolayısıyla bu bölgeler, sisplatin ile oluşan böbrek hasarında en çok etkilenen kısımlar olmaktadır (3).

1.1.1. Sisplatinin Farmakokinetik Yapısı

Gastrointestinal kanaldan emilmediği için oral kullanılmaz. Yüzde 90 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Kandan kaybolması iki fazlı bir seyir gösterir. İlk faz sisplatinin intravenöz uygulamasından sonra başlangıç yarı ömrü 25-49 dakika kadar süren safha olup daha sonra günlerle ifade edilen ikinci faz (ortalama yarı ömrü 58-73 saat) takip eder. Uygulamadan sonraki ilk beş günde ürünün sadece % 27-43'lük kısmı değişmeden atılır. Karaciğer, böbrek ve prostatta yüksek oranda birikmektedir. Böbrek yetmezliğinde sisplatinin yarı ömrü uzamaktadır (4).

1.1.2. Sisplatin Nefrotoksisitesi

Sisplatin nefrotoksisitesinde hücresel toksisite, Serbest Oksijen Radikalleri (SOR) oluşması sonucu gelişen membran peroksidasyonu, DNA hasarı, protein sentezinin inhibisyonu ve mitokondriyal hasar nedeni ile olmaktadır. Bu duruma inflamasyonun da neden olduğu ileri sürülmektedir.

1.1.3. Patogenez

1.1.3.1. Hücresel Toksisite

Sisplatin, özellikle PT'ün S3 segmentindeki hücrelerde kandaki düzeyin beş katı kadar birikir ve asıl hasarı bu bölgede yapar (5). Hücre içinde sitozolde,

mitokondri, nükleus ve mikrozoamlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Düşük klor ortamında potent bir hücrenel toksindir. Hücre içinde sisplatindeki klor atomları su molekülleri ile yer değiştirerek daha toksik platinum derivelere oluşur. Proksimal tübül hücrelerinde sisplatin toksisitesinin morfolojik değişiklikleri tübüler nekroz, mikro villüslerin kaybı, lizozomların sayı ve boyutlarında değişiklik ve mitokondrial vakuolizasyon ile karakterizedir. Bu yapısal değişiklikler hücrenel organellerin fonksiyonlarında bozulmayı da beraberinde getirir. Hücre hasarına iki patofizyolojik mekanizma yol açmaktadır. Bunlar; hücre içi protein sentezinin ve glutatyonun azalmasıdır. Ancak bazı yazarlar, sisplatin hücre içerisine alındığında Gamma Glutamil Transferaz enzimi aracılığı ile glutatyon ile birleştirildiği ve oluşan bu sisplatin-glutatyon bileşiklerinin nefrotoksik olduğunu ileri sürmektedirler. Buna kanıt olarak da Gamma Glutamil Transferaz inhibitörü olan acivicin uygulandığında nefrotoksitesinin şiddetinin azalması gösterilmektedir (6). Sisplatinin atılımı primer olarak böbrek yolu ile olduğundan ve böbrek dokusunda diğer organlardan daha fazla biriktiğinden en fazla böbreğe zarar vermektedir (3).

1.1.3.2. Proinflatuar Etkiler

Sisplatin, nötrofil, T lenfositler ve hücrenel inflammatuar cevabın diğer komponentlerinin farklılaşması, olgunlaşması ve aktivasyonunda rol alan tümör nekrosiz faktör alfa, interlökin-6, interferon gama ve kaspaz gibi proinflatuar sitokinlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (7). Sisplatin nefrotoksitesini deneysel modelinde endotelial hücre adhezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı ve sonrasında lökosit ve T lenfositlerinin böbrek dokusuna infiltrasyonu gözlenmiştir (8).

1.1.3.3. Proksimal Tubulus Etkileri

Sisplatin özellikle PT hücrelerinde nekroz ve apoptoza yol açarak toksisiteye neden olur. Hatta bu toksisiteye daha az hassas olan çoğalmayan hücrelerde bile DNA hasarına neden olur (9). Bu toksitesinin muhtemel mekanizmaları arasında artmış böbrek tutulumu, sisplatinin PT hücrelerinde glutatyon ve sisteinil-glisin konjugatlarına metabolize olması ve SOR'nin gösterilmektedir (10).

1.1.4. Nefropatinin Klinik Yansımaları

Sisplatin nefrotoksitesinin en önemli komponenti, bazen ilerleyici olabilen böbrek yetmezliğidir. Diğer klinik yansımaları ise hipomagnezemi, tuz kaybı,

Fanconi benzeri sendrom ve anemidir.

1.1.4.1. Böbrek Yetmezliği

Böbrek yetmezliğinin insidansı, ilacın uygulama dozu ve sıklığı, nefropati tanımlanırken kullanılan kriterlere bağlı olarak değişmektedir. İlk yapılan farmakolojik çalışmalarda 1.95 mg/kg veya daha yüksek dozlarda uygulandığında %50 oranında nefrotoksisite geliştiği bildirilmektedir (4). Nefropatinin insidans ve şiddeti tekrarlayan uygulamalarda artmakta ve sonuçta geri dönüşümsüz olmaktadır. Sonuç olarak, ilerleyici böbrek yetersizliği geliştiğinde sisplatin tedavisinin kesilmesi endike olmaktadır. Güçlü bir antitümör etkinliği olmasına rağmen ciddi toksisitesi nedeni ile yüksek doz gerektiren hemotopoetik kök hücre transplantasyonu öncesinde kemik iliği ablasyonu için kullanılmaz. Bu amaçla sisplatin yerine daha az toksik olan carboplatin kullanılır.

Ciddi böbrek yetmezliğinde bile günlük idrar miktarı 1 lt/gün üzerindedir. Bu durum sisplatinin ya Henle kulpunda hasara yol açarak sıvı emilimi için gerekli olan meduller osmolariteyi azaltarak ya da antidiüretik hormonun toplayıcı tübüllerde etki yerlerinde hasara yol açarak yaptığını düşündürmektedir. Toplayıcı tübüllerdeki etkisi aquaporin su kanallarının ekspresyonunun azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (11). Sisplatin uygulanmasından sonra PT hücrelerine geçişin organik kation transporter 2 (OKT2) aracılığı ile olduğu yapılan in vivo bir çalışmada gösterilmiştir (12). Bu husus sisplatinin organ spesifik toksisitesini açıklamaktadır.

1.1.4.2. Trombotik Mikroanjiopati

Sisplatin bleomisin ile birlikte uygulandığında böbrek yetmezliğinin bir formu olan hemolitik üremik sendrom veya trombotik trombositopenik purpura gibi trombotik mikroanjiopatiye yol açabilir (13).

1.1.4.3. Hipomagnezemi

Sisplatin tedavisi esnasında idrarla kayıp olabilir ve hastaların yaklaşık yarısında görülür. Dikkat edilmesi gereken husus, tedavi ile hipomagnezemi gelişebileceği gibi, kronik hipomagnezeminin de sisplatin nefrotoksisitesini arttırabileceğidir (14, 15).

1.1.4.4. Fanconi Benzeri Sendrom

Sisplatin nefrotoksisitesinde bir diğer klinik prezantasyon, Fanconi benzeri sendromdur. Bu durumda idrarda glukoz ve aminoasitler (alanin, valin, lösin,

metionin gibi) ile beraber trikarboksilik asit siklüs metabolitleri (laktat ve pirüvat) bulunur. Tübüler hasarın bir göstergesi olan idrarda glukoz bulunması aynı zamanda sisplatine bağlı olarak gelişen, glukoz uyarısına anormal insülin ve glukagon cevabının olduğu glukoz intoleransına da bağlı olabilir (16). Henüz klasik Fanconi sendromu tanımlanmış olmamakla birlikte ılımlı bir tübüler disfonksiyon kalıcı olabilmektedir.

1.1.4.5. Tuz Kaybı

Sisplatin nefrotoksisitesinde nadir görülen bir klinik durum olup genellikle vakalar veya küçük seriler halinde rapor edilmiştir (17).

1.1.4.6. Anemi

Anemi, sisplatinin myelosüpresif etkilerinin bir sonucudur. İnsan ve hayvan çalışmalarında, oluşan renal hasarın eirtropoetin eksikliğine yol açtığı ve bu şekilde aneminin derinleşmesine yol açtığı bildirilmektedir (18).

1.2. Tübüler Taşıyıcı Sistemler (Organik Anyon ve Katyon Taşıyıcı Sistemler)

Daha önceki terminolojide Solid Carrier Superfamily (SLC22A) olarak adlandırılan bu taşıyıcı proteinler PT hücrelerinde yerleşmiş olup gerek endojen olarak üretilen ve gerekse dışarıdan alınan birçok anyon ve katyonu aktif olarak salgırlar. Bu çalışmada Organik Katyon Transporter 1 (OKT1) ve Organik Katyon Transporter 2 (OKT2) düzeyleri çalışılacağından, Organik Anyon Transporter 1-3 (OAT1, OAT2 ve OAT3) kısaca değindikten sonra daha çok OKT'ler üzerinde durulacaktır.

1.2.1. Organik Anyon Transport Sistemi (SLC 22 A)

Tübüler epitelyal hücrelerin bazolateral yüzeylerinde anyonlar için aktif taşıyıcılar vardır. Taşıyıcılar göreceli olarak seçicilik göstermeyerek bir çok anyon ve yabancı maddenin vücuttan uzaklaşmasını sağlar. Çünkü bu mekanizma ile atılması gereken substrat sayısı taşımayı yapacak olan proteinlerden çok daha fazladır. Fritch ve ark. (19) yaptığı mikropenfüzyon çalışmasına göre bir anyonun bu sistemin substratı olabilmesi için hidropik bir bölgeye sahip olması yeterlidir.

Bu taşıyıcı proteinlerin önemi organizmayı toksinlerden korumasıdır. Substratların PT'de bazolateral membrandan alınması aktif taşınma yolu ile olur. Burada gerekli olan Na ve voltaj gradiyenti Na+K-ATPaz aracılığı ile sağlanır.

Taşınan organik anyonların bir kısmı endojen, bir kısmı ise eksojen kaynaklı olmakla birlikte zararsızdır. Ancak yine de hepsi toksin olarak değerlendirilmektedir (20).

1.2.1.1. Bazolateral Transport

Proksimal tübülün bazolateral membranında OAT1 ve OAT3 yer alır. Organik Anyon Transporter 1 dikarboksilatlerden α -ketoglutarat tarafından stimüle edilen Paraaminohippurik asit atılımını sağlar. Bu da OAT1'in organik anyon-dikarboksilat kotransporterini olduğunu gösterir (21). Aynı şekilde OAT3 bazolateral membranda yer alır ve substrat listesi OAT1 ile aynıdır. Bir diğer üye OAT2 ise karaciğerde tanımlanmıştır. Böbrekte OAT1 ve OAT3'den daha zayıf olarak bulunur (22).

1.2.2. Organik Katyon Transport Sistemi (SLC22A)

Çalışmalar PT'nin renal organik katyon atılımının primer bölgesi olduğunu göstermiştir. Her ne kadar birçok endojen organik katyonun (N¹-metilnikotinamid, kolin, epinefrin ve dopamin gibi) aktif atılımı gerçekleşirse de, önemli olmayan bir miktarda ksenobiyotiklerin (ör; alkaloidler), diğer pozitif yüklü diyet bileşenleri, katyonik ilaçlar ve diğer katyonik toksinler (ör; nikotin) atılımını sağlar (23). Bir diğer önemli nokta, bu bölgenin atılım süreçlerinin klinik olarak önemli etkileşimlerine sahne olmasıdır. Örneğin, terapötik dozda simetidin prokainamidin renal eliminasyonunu geciktirir (24). Organik katyonlar büyüklüklerine göre iki gruba ayrılmaktadır. Tip 1 OK'lar mol ağırlığı <400 Da altında olan tetraetilamonyum, tributimetilamonyum, prokanamid ve etobromid gibi moleküllerdir. Birçok katyonik ilaç (Ör; antihistaminikler, kas gevşeticiler, antiaritmikler ve β -blokörler) bu grupta yer almaktadır. Tip 2 OK'lar ise >500 Da'dan ağır molekülleri (Ör; d-tubakürarin, vecuronyum ve heksafluoramin gibi) kapsamaktadır. Karaciğer daha çok tip 2 OK'ların eliminasyonunda rol alırken böbrek, tip 1 OK'ların eliminasyonunda rol alır (23). Sisplatin ile oluşturulmuş üremik rat modelinde üremik anyonik toksin olan ve proximal tübülden anyonik transporterler aracılığı ile sekrete edilen Indoxyl sülfatın kanda biriktiği gösterilmiştir (25). Daha önce bildirilen raporlarda, sisplatinin hücre içine alınımının OKT2 ile olduğu gösterilmiştir (12). OKT2 PT hücrelerinin bazolateral yüzeyinde lokalizedir (26). İlginç şekilde, ratlarda tek ve toksik doz sisplatin yedi günde OKT2 mRNA düzeylerini azaltır. Bu da sisplatinin tekrar uygulanması durumunda hücre içine alınımına karşı defans oluşturur (27).

1.2.2.1. Bazolateral Organik Katyon Giriş

Organik Katyon Transport proteinlerinin (OKT1, OKT2 ve OKT3) böbrekte yerleşiminin PT bazolateral membranı ile sınırlı olduğu gösterilmiştir (28). Böbrekte OKT1 ve OKT2'ye nazaran OKT3 daha zayıf olarak ekprese olmaktadır (29). Organik katyon atılımında birinci aşama OK'ların kandan PT hücrelerine geçişidir. Bu olay tip 1 OK'lerde elektriksel gradiyent farkı ile gerçekleşir. Bu hücrelerde 50-60 mV'luk bir elektriksel gradiyent (hücre içi negatif) OK'ların PT hücrelerinde kana göre 10 kat daha fazla birikmesini sağlar. Tip 2 OK'ler için bu geçiş mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

1.2.2.2. Apikal Organik Katyon Atılımı

Bazolateral membranda yerleşmiş taşıyıcılar ile hücre içerisine alınan OK'lar apikal membranda yerleşmiş bulunan H^+ ve Na^+ antiporterler aracılığı ile tübül lümenine atılır. OKT1, tetraetilamonyum ve H^+ değişiminde rol alır (30). Organik Katyon Transporter 2 ise Na^+ ve karnitin taşınmasında, tetraetilamonyum ve seçilmiş tip1 OKT substratlarının taşınmasında rol alır (31).

1.3. Oksidatif Sistem

Serbest oksijen radikalleri sağlıklı kişilerde normal metabolizma sonucunda da oluşmakta ve vücuttaki antioksidan sistemler tarafından bertaraf edilmektedir. Oksidatif hasar, bu son ürünlerin yapımında artış veya antioksidan sistemlerin yetersizliği durumunda ortaya çıkan hücre hasarı veya hücrenin ölümü ile sonuçlanan durumdur. Serbest oksijen radikalleri hücrenin tüm molekülleri ile etkileşime girerken özellikle lipidlere olan etkileri ile lipid peroksidasyonu gelişir (32). Oksidatif hasarı önlemeye yönelik olarak endojen bir çok enzimatik (Süperoksid dismutaz, Fosfolipid Hidroperoksid Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon S- Transferaz, Glutasyon redüktaz, Glukoz -6- fosfat dehidrogenaz, Katalaz gibi) ve non-enzimatik (E vitamini, β -karoten ve C vitamini) mekanizmalar mevcuttur. Ayrıca eksojen olarak gıdalarla alınan doğal veya farmakolojik amaçlarla kullanılan bir çok antioksidan madde bulunmaktadır. Serbest oksijen radikalleri son derece reaktif ve kısa ömürlü olduklarından direkt ölçümleri zordur. Bu amaçla lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçülmesi en sık olarak uygulanan indirekt yöntemdir. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır (33). İndirekt yöntemle ölçülen birkaç madde olmakla birlikte en

kolay MDA ölçümü yapılabilir. Bu amaçla isoprostanların da kullanılabilirliği belirtilmektedir. İsoprostanlar, oksijen radikalleri tarafından doku fosfolipidlerinin oksidasyonu sonucu eikosanoidlerden non-enzimatik yolla ortaya çıkan bir gruptur. Bu grubun üyelerinden olan ve lipid peroksidasyonu sonucu non-enzimatik olarak arachidonic asitten üretilen 8-iso-prostaglandin F₂α (8-iso-PGF₂α) son yıllarda oksidatif hasarın belirteci olarak kullanılabilirliği belirtilmektedir (34, 35).

1.4. Thymoquinone

Thymoquinone (TQ), çörek otu olarak bilinen, Ortadoğu ve Asyada ise siyah tohum veya siyah kimyon olarak da bilinen Ranunculaceae ailesinden *Nigella sativa* Linn' den elde edilen temel yağların en önemlilerindedir. Hindistan, Arap ülkeleri ve Avrupada yıllardır yemek yapımında ve halk arasında tıbbi rahatsızlıklarda doğal ilaç olarak kullanılmaktadır. Doğal ilaç olarak kullanıldığı rahatsızlıklar arasında astım, hipertansiyon, diyabet, inflamasyon, öksürük, bronşit, başağrısı, ekzema, ateş, baş dönmesi ve gripal infeksiyonlar gelmektedir (36). *Nigella sativa* bitkisi %36-38 oranında fixed (uçucu olmayan) yağ, protein, alkaloid, sabun ve % 0.4-2.5 oranında temel yağlardan oluşmaktadır. Temel yağlardan p-cymene, carvacrol, t-anethole, 4-terpineol ve longifoline bulunmakla birlikte en önemli komponenti % 27.8-57 oranında bulunan TQ'dur (37).

1.4.1. Farmakolojik Özellikleri

1.4.1.1. Antioksidan Etkisi

Thymoquinonun lizozomlarda non-enzimatik lipid peroksidasyonunu önlediği gösterilmiştir (38). Fotokimyasal veya biyokimyasal olarak SOR üretimi durumunda, polimorfonükleer lökositlerin TQ tarafından uyarılması ile SOR'un zararlı etkileri önlenmektedir. Bu da TQ'nun potent bir SOR yakalayıcısı olduğunu göstermektedir (39). Bu antioksidan etki N. sativanın karbontetraklorür hepatotoksitesinde de gözlenmiştir (40). Bu özelliği aynı zamanda halk tıbbındaki kullanımını da açıklamaktadır.

1.4.1.2. Antiinflamatuvar ve Analjezik Etkisi

Thymoquinonenin analjezik etkinliği oral, intraperitoneal (İP) ve intraserebroventriküler uygulandığı ve mü, kappa ve delta reseptör antagonisti olan naloksanın kullanıldığı bir çalışmada TQ'nun supraspinal mü ve kappa reseptörlerini

indirekt etkileyerek analjezik etkinliğini oluşturduğu belirtilmiştir (41). *Nigella sativa*'nın muhtemel antinflamatuar etki mekanizması üzerine yapılan çalışmalarda TQ'nun hem siklooksijenaz hem de lipooksijenaz enzimini bloke ederek tromboksan B2 ve lökotrien B4 üretimini azalttığı bulunmuştur (42).

1.4.1.3. Antikarsinojenik ve Antimutajenik Etkisi

Nigella sativa ekstresinin muhtemel antitümör etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ait ve ark. (43) tümör oluşturulmuş fareler üzerinde yaptıkları çalışma sonuçlarına göre *N.sativa* ekstraktının tümör dokusu içerisine uygulanması tümör boyutunda azalma, metastaz oranında azalma ve metastaz gelişimine kadar geçen sürenin uzaması şeklinde raporlanmıştır. Yine Ivankovic ve ark. (44) in vitro ve in vivo yaptıkları çalışmada olumlu sonuçlar elde etmişlerdir. In vitro çalışmalarında fibroblast (kontrol grubu), squamoz hücreli karsinom ve fibrosarom hücre kültürlerine 0.1 veya 0.01 mg/ml oranında TQ ve Thymoquinone (THQ) eklenmesi ve 24 saat inkübe edilmesi sonucunda değerlendirilmiştir. Sitotoksik aktivitenin fibroblastlara göre tümör hücrelerinde daha belirgin olduğu, sitotoksik aktivitenin yüksek konsantrasyonda (0.1 mg/ml) squamoz hücreli karsinom da %87, fibrosarkomda ise %92'ye ulaştığı bildirilmiştir. TQ sitotoksitesinin doz bağımlı olduğu, düşük dozlarda (0.01 mg/ml) sitotoksik aktivite %44'lere ulaşırken bu oranın yüksek dozda (0.1 mg/kg) %92'lere vardığı bulunmuştur. Aynı çalışmanın in vivo kısmında ise fibrosarkom ve squamoz hücreli karsinom substratı farelere enjekte edilmiştir. Tümör hücrelerinin inokülasyonundan 3 gün sonra TQ ve THQ (5 mg/kg dozunda 4 kez, toplamda 20 mg/kg) intratümöral olarak uygulanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırmalı yapılan tümör büyüme inhibisyonu incelemesinde TQ ile kontrol grubuna göre squamoz hücreli karsinomda %52, fibrosarkom grubunda ise %43'lük büyüme inhibisyonu tespit edilmiştir. Bu çalışmada TQ ile THQ arasında fark gözlenmemiştir (44). Yine bir diğer çalışmada farelerde Ifosfamid uygulamasından 5 gün önce ve 5 gün sonra içme suyu ile TQ uygulaması (5mg/kg/gün) ajanın renal toksitesini (Fanconi sendromu) önemli ölçüde azaltmış ve aynı zamanda antitümör etkinliğini de artırmıştır (45). Bu çalışmada yazarlar, TQ'nun etkinliğinin sahip olduğu antioksidan özelliğinden kaynaklandığını düşündüklerini belirtmişlerdir. Thymoquinoneun farelerde in vivo ve in vitro olarak 20-metilcolantrenin fibrosarkom ve benzopirenin mide karsinomu yapıcı etkilerini

inhibe ettiği çalışmalarda gösterilmiştir. Thymoquinonenun içme suyuna % 0.01 oranında eklenmesi ve 20-metilkolantren uygulamasından 1 hafta önce ve sonra uygulanması tümör insidansı ve tümör çapının ikiye katlanmasını sırasıyla fibrosarkomda % 43 ve 34, mide kanserinde ise yine sırasıyla % 70 ve 67 gibi önemli bir oranda azaltmıştır (46).

Şistozomiyasiz ile enfekte fare kemik iliği ve dalak hücrelerinde yapılan karyotip incelemelerinde *N. sativa* ekstrelerinin ve TQ'nun kromozomal aberasyonları önlediği, bu yönü ile antimitojenik özelliği sahip olduğu belirtilmektedir (47).

1.4.1.4. Antihepatotoksik ve Antinefrotoksik Etki

Nigella sativa bazı ülkelerde halk arasında karaciğer hastalıklarında kullanılmaktadır. 1998 yılında Daba ve Abdel-Rahman tarafından TQ'nun tert-butilhidroperoksit ile oluşturulan karaciğer toksisitesini önlediği gösterilmiştir. Oksidatif stres varlığında hücre içi glutatyon düzeyinin azalması hücrenin geri dönüşümsüz olarak hasar görmesi ile sonuçlanır. Araştırmacılar TQ'nun koruyucu etki mekanizmasının, hücre içi glutatyon seviyesini koruması ile ilişkili olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir (48). Yapılan bir çalışmada karbontetraklorür uygulamasından beş gün önce içme suyuna 16 mg/kg/gün dozunda TQ eklenmesi ve çalışma boyunca devam ettirilmesi karaciğer hasarını düzeltmiş ve bu etki, TQ'nin lipid peroksidasyonuna yol açan SOR'u inhibe etmesine bağlanmıştır (49).

Thymoquinonenun sisplatin uygulamasından beş gün önce ve beş gün sonrasına kadar 50 mg/kg dozunda uygulanması, sisplatin nefrotoksitesinin biyokimyasal ve fizyolojik parametrelerinde düzelme ile sonuçlanmış, TQ uygulanan grupta serum üre düzeylerinde anlamlı azalma, böbrek boyut ve kreatinin klirensinde anlamlı artışlar elde edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada TQ'nun sisplatinin antitümoral etkisini potansiyalize ettiğini ve aynı zamanda sisplatinin nefrotoksik etkisini azaltarak ilacın teröpotik indeksini genişlettiğini göstermişlerdir (50). Bir diğer çalışmada ise, nefrotoksik etkisini daha çok SOR üzerinden gerçekleştirdiği düşünülen merkurik klorid ($HgCl_2$) ile oluşturulan nefrotoksitede işlem den önce 5 gün ve sonrasında ise 3 gün TQ verilmesi ile nefrotoksitenin düzeldiği gösterilmiştir. Thymoquinone alan grupta böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunu göstergesi olan MDA'da anlamlı azalma, antioksidan enzimler olan süperoksit

dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinde ise anlamlı yükselmeler olduğu gösterilmiştir (51).

Koruyucu mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte sisplatin nefrotoksisitesinin oluşan serbest radikaller üzerinden gerçekleştiğinin bilinmesi, TQ'nun koruyucu etkisinin de muhtemelen antioksidan özelliğinden dolayı olduğunu düşündürmektedir.

1.4.1.5. Respiratuvar ve İmmünolojik Etkisi

Gilani ve ark. (52) tarafından yapılan bir araştırmada N.sativa ekstresinin izole tavşan jejunumu ve Guinea domuz trakea preparatlarındaki etkileri çalışılmıştır. Bu ekstrenin jejunum üzerinde doz bağımlı bir şekilde spontan kontraksiyonları ve KCl' ye bağlı kontraksiyonları önlediği gösterilmiştir. Bu etkiler kalsiyum antagonisti verapamile benzer olduğu belirtilmiştir. Trakeal preparatta N. sativa ekstresi histamin, karbakol ve KCl ile oluşan kontraksiyonları antagonize ettiği saptanmıştır. Spazmolitik ve bronkodilatatör etkilerinin kalsiyum kanalları aracılığı ile olduğu düşünülmüştür.

In vitro çalışmalarda TQ'nun karbonil polimeri olan nigellonun rat peritoneal mast hücrelerinde histamin salınımını engellediği gösterilmiştir (53). Haq ve ark. (54) yaptığı çalışmalarda in vitro ortamda N.sativanın T lenfositlerini stimüle ederek interlökin, IL-3 ve IL-1 β salınımını arttırarak makrofajları aktive ettiğini göstermişlerdir.

1.4.1.6. Antidiyabetik Etki

Al-Hader ve ark. (55) yaptığı bir çalışmada N.sativadan elde edilen yağın tavşanlara 50 mg/kg dozunda 4-6 hafta boyunca İP uygulanması hem normoglisemik hem de hiperglisemik tavşanlarda açlık glukoz düzeylerinde %15-23 gibi önemli bir oranda azalma sağlamıştır. Bu çalışmada insülin düzeylerinde bir değişikliğin olmaması henüz bilinmeyen farklı bir mekanizma üzerinden etkili olduğunu düşündürmektedir. Meral ve ark. (56) 2001 yılında diabetik tavşanlarda bu ekstrenin serum glukoz düzeyi, MDA, glutatyon, seruloplazmin ve karaciğer histolojisi üzerine etkilerini araştırdı. Ekstre ile yapılan iki aylık tedavi sonrası artmış olan serum glukoz ve MDA düzeylerinin azaldığını, azalmış olan glutatyon ve seruloplazmin düzeylerinin ise arttığını ve aynı zamanda lipid peroksidasyonunun indüklediği karaciğer hasarının biyokimyasal ve histolojik parametrelerinin düzeldiğini

göstermişlerdir. Yazarlar bu maddenin lipid peroksidasyonunu önlediğini, antioksidan sistemi güçlendirdiği ve bu yolla karaciğer hasarını önlediğini belirtmektedirler.

1.4.1.7. Kardiyovasküler Sistem ve Hematolojik Sistem Üzerine Etkisi

N. sativa ekstresi ve onun aktif komponenti olan TQ kardiyovasküler sistem üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada anestezi altındaki ratlara uygulandığında kan basıncında ve kalp hızında azalma gözlenmiştir. Thymoquinone ile elde edilen etki atropin ve siproheptadin ile antagonize olurken reserpin ile antagonize olmamıştır. Bu da TQ'nun kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerin santral yol ile değil de direkt olduğunu düşündürmektedir (57). Enomoto ve ark. (58) yaptığı bir çalışmada ise ekstrenin araşidonik asit tarafından indüklenen platelet agregasyonunu ve koagülasyonu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu etkinin aspirinden daha güçlü olduğu belirtilmiştir.

1.4.1.8. Antiülser Etkisi

Etanol ile oluşturulan mide ülserinde *N. sativa* yağının koruyuculuğunun değerlendirildiği bir çalışmada yağın %53 oranında koruyuculuğunun olduğu tespit edilmiştir. Çalışma da yağın uygulandığı grupta glutatyon, müsin ve serbest asidite düzeyinin anlamlı şekilde arttığı, gastrik mukozal histamin düzeyinin ise önemli oranda azaldığı belirlenmiştir (59). Buna benzer başka bir çalışmada *N. sativa* ve TQ'nun etanol ile oluşturulmuş gastrik ülserde gastrik glutatyon, süperoksit dismutaz ve glutatyon-S-transferaz enzim aktivitesini arttırarak gastroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir. Yazarlar, bu etkinin SOR'nin eliminasyonu üzerinden olabileceğini belirtmişlerdir (60).

1.4.1.9. Antimikrobiyal ve Antiparazitik Etki

Nigella sativa yağının geniş spektrumlu bir antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirtilmektedir. In vitro ortamda 1/100 dilüsyonda bile *Staphylococcus albus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella niger* ve *Vibrio cholera* üzerine etkili olduğu bildirilmektedir. Genel olarak Gr (+) etkinliğinin Gr (-) den daha fazla olduğu söylenmektedir. Bu yağın, özellikle *Aspergillus species* olmak üzere mükemmel bir antifungal etkinliği de kanıtlanmıştır (61).

Yapılan bir çalışmada *Shistosoma mansoni* ile enfekte farelere bu yağın (2.5 ve 5 ml/kg, oral) 2 hafta boyunca uygulanması karaciğerde *Shistosoma mansoni*

sayısını ve aynı zamanda karaciğer ve bağırsaklardaki yumurta sayısını da azaltmıştır (62).

1.4.1.10. Toksik Özellikleri

Nigella sativa yağının düşük toksisiteye sahip olduğu belirtilmektedir. Thymoquinonenin akut ve subkronik toksitesinin değerlendirildiği bir çalışmada; akut toksisitenin incelendiği grupta LD50 2.4 gr/kg (1.52-3.77 gr/kg aralığında) oral olarak bulunmuştur. Ölümler ilk üç saat içerisinde gözlenmiştir. Yaşayan hayvanlarda ise hipoaktivite ve solunum güçlüğü gelişmiştir. Yirmidört saat sonra sakrifiye edilen hayvanlarda karaciğer, böbrek ve kalpte glutasyon seviyelerinin azaldığı, serum ALT, LDH, CPK, üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Kronik toksisite kolunda 90 gün boyunca 30, 60 ve 90 mg/kg/gün uygulanmış, çalışma sonunda bütün hayvanları yaşadığı, vücut ağırlığında, sıvı ve gıda alımında herhangi bir fark olmadığı görülmüştür. Akut toksisite kolunda değerlendirilen bütün parametrelerde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılık oluşmamıştır. Sadece açlık plazma glukoz düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur (63).

Bu çalışmanın amacı sisplatin nefrotoksitesine karşı antioksidan özelliği olan TQ'nun koruyucu etkisi, lipid peroksidasyonunu önleme kapasitesi ve sisplatinin PTde bulunan OKT' ler üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan (FÜHADEK) alınan onay sonrasında Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen ve ağırlıkları 180-245 gr arasında değişen 28 adet sekiz haftalık Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı. Çalışma esnasında standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına riayet edildi. Ratlara, Elazığ yem fabrikasında özel olarak hazırlanan pelet yem (Tablo 1) ve musluk suyu ab libitum olarak verildi.

Tablo 1. 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. Deney Düzeni

Deney hayvanları, uygulamadan önce 10 gün süre ile standart şartlara adapte olması için uygun koşullarda barındırıldı. Ortam sıcaklığı 25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında, 12 saatte karanlıkta kalacak şekilde takip edildi. Daha sonra 10 gün süre ile deney sürdürüldü.

Ratlar rastgele aşağıdaki gibi gruplandırıldı

1-Kontrol Grubu (n=7): Sisplatin uygulanmayan, 5. günde sisplatine eşit miktarda(1.2-1.7 cc) izotonik salin solüsyonu intraperitoneal (İP) uygulanan grup.

2-Thymoquinone Grubu (n=7): 10 gün boyunca içme suyu içerisinde 10 mg/kg dozda Thymoquinone uygulanan grup.

3-Sisplatin Grubu (n=7): Çalışmanın 5. gününde İP tek doz olarak 7mg/kg olacak şekilde sisplatin uygulanan grup (sisplatin; Sigma Chemical Co, USA).

4-Sisplatin+Thymoquinone Grubu (n=7): 10 gün boyunca içme suyu içerisinde 10 mg/kg dozda TQ, 5. günde İP tek doz olarak 7 mg/kg olacak şekilde sisplatin uygulanan grup.

Sisplatin uygulamasından 5 gün sonra hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek böbrek örnekleri alındı. Böbrekler fosfat solüsyonlu solüsyon ile (PBS; 0.15 M NaCl ve 0.01 M sodyum fosfat tamponu, pH 7.4) aorta yolu ile perfüze edilerek alındı. Western blot analizleri için doku örnekleri analiz yapıncaya kadar -80 C'de saklandı. 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 MDA seviyeleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) analiz edildi.

2.3.1. HPLC için Doku Homojenizasyonu

150 mg böbrek dokusu 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 beş dakika boyunca santrifüjlendi. Supernatant kısımlar dikkatlice alınarak HPLC viallerine dizildi. Tüm işlemlerde homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ve soğuk zincire riayet edildi.

2.3.2. HPLC' de MDA Analizi

Hareketli faz olarak 30 mM KH₂PO₄ - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) kullanıldı. 250 nm'de İnertsil 5µ C18 ODS3 (15cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı. Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi. MDA için geri kazanım % 98.8 olarak bulundu.

2.3.3. 8-iso-PGF_{2α}

8-iso-prostaglandin F_{2α} düzeyleri ELISA'da (BioTek-ELx800) ticari kitlerle (Cayman Chemical, MI, USA) ölçüldü.

2.3.4. Western Blot Analizi İle Protein Ekspresyonunun Ölçümü

Böbrek dokusu 1:10 7w/v'luk tampon [10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM NaCl, 0.1 mM fenilmetilsulfonül florür (PMSF), tripsin inhibitörü olarak, 5µM soya (solubl toz; Sigma, St. Luis, MO USA)] içinde homojenize edildi. Doku homojenatları 15.000 x g 4°C'de 30 dk süre ile santrifüje edildi. Süpernatant kısmı yeni tüplere alındı. Protein konsantrasyonu Lowry prosedürüne uygun olarak protein ölçüm kiti kullanılarak (Sigma, St. Luis, MO USA) ölçüldü. Süpernatantlara, %2'lik β-merkaptolanol içeren sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektorforez tamponu eklendi. SDS-PAGE jel içinde eşit miktarlarda (20 µg) protein, elektorez için kullanıldı. Akabinde nitroselüloz membranlara (Schleicher and Schuell Inc, Keene, NH, USA) aktarıldı. Nitroselüloz blotlar PBS içinde 5 dk süreyle 2 kez yıkandı ve % 1'lik sığır albümini ile primer antikor uygulamasından önce 1 saat bekletildi. Primer antikor (anti OKT1, OKT2; Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) % 0.05 Tween-20 içeren aynı tampon içinde 1:1000 oranında dilüe edildi. Nitroselüloz membran gece boyunca + 4°C'de protein antikorları ile inkübe edildi. Blotlar yıkandı ve horseradish peroksidase-conjugated goat anti rabbit veya anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) ile inkübe edildi. Spesifik bağlanma, diaminobenzidin ve H₂O₂ substratları kullanılarak tespit edildi. Protein yükleme β-aktin antikora (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) karşı monoklonal bir mouse 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 İnceleme

Her bir deney hayvanından alınan sol böbrekler inceleme için %20'lik nötral tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edildi. Dokular daha sonra parafin bloklara gömülerek 5µM lik kesitler halinde kesilerek hematoksilin-eosin ve PAS boyası ile boyandı. Bütün preparatlar tedavi gruplarından haberdar olmayan patolog tarafından semikantitatif olarak değerlendirildi. Böbrek dokusu tübüler rejenerasyon, tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon, interstisyel inflamasyon ve tübüler nekroz açısından incelendi. Skorelama - =normal, + = hafif (<%25), ++ =orta (%25-50 arası), +++ = şiddetli (>%50) olarak değerlendirildi.

2.5. Veri Analizi

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. Üre Düzeyleri

Tüm grupların üre değerleri incelendiğinde gruplar arasında önemli bir farklılık elde edildi ($P<0.001$). Kontrol ve TQ grupları arasında bir farklılık tespit edilmezken, ($P>0.05$)u gruplar ile sisplatin grubu arasında anlamlı fark tespit edildi ($P<0.05$). Üre düzeyi Thymoquinone+sisplatin grubunda kontrol ve TQ grubuna göre yüksek, sisplatin grubuna göre ise düşük bulundu ($P<0.05$) (Tablo 2).

3.2. Kreatinin Düzeyleri

Kreatinin değerlerine bakıldığında, Kontrol ve TQ grubunda birbirine yakın değerler elde edildi ($P>0.05$). Sisplatin grubunda kontrol, TQ ve TQ + sisplatin grubuna göre anlamlı fark tespit edildi ($P<0.05$). Yine TQ + sisplatin grubu ile kontrol ve TQ grupları arasında da anlamlı farklılık bulunmuştur ($P<0.05$) (Tablo 2).

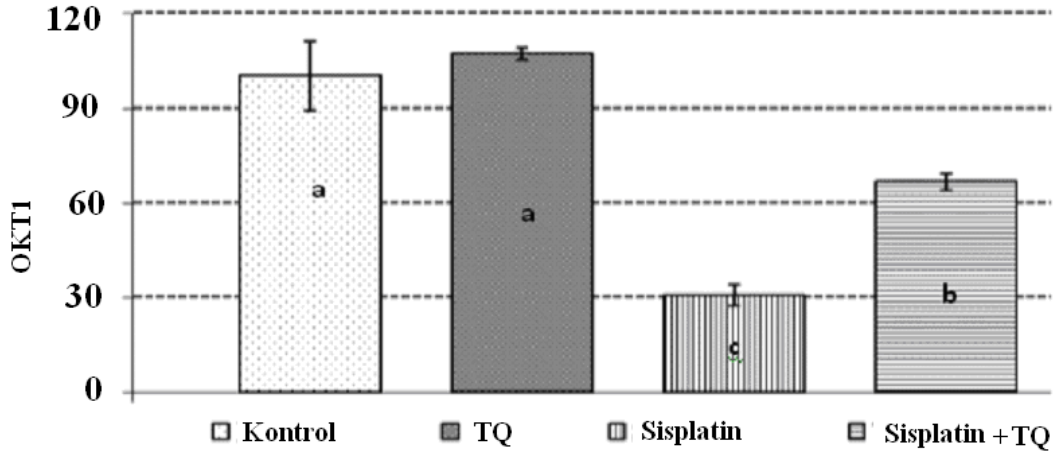
Tablo 2. Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda üre ve kreatinin düzeyleri üzerine etkisi (n=7).

Parametre	Gruplar				P Değeri
	Kontrol	TQ	Sisplatin	TQ + Sisplatin	
Üre (mg/dl)	53.5±15.8 ^c	55.1±2.4 ^c	152.1±10.5 ^a	104.1±2.71 ^b	P<0.001
Kreatinin (mg/dl)	0.43±0.08 ^c	0.43±0.01 ^c	1.46±0.18 ^a	0.71±0.18 ^b	P<0.001

a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan anlamlıdır ($P<0.05$)

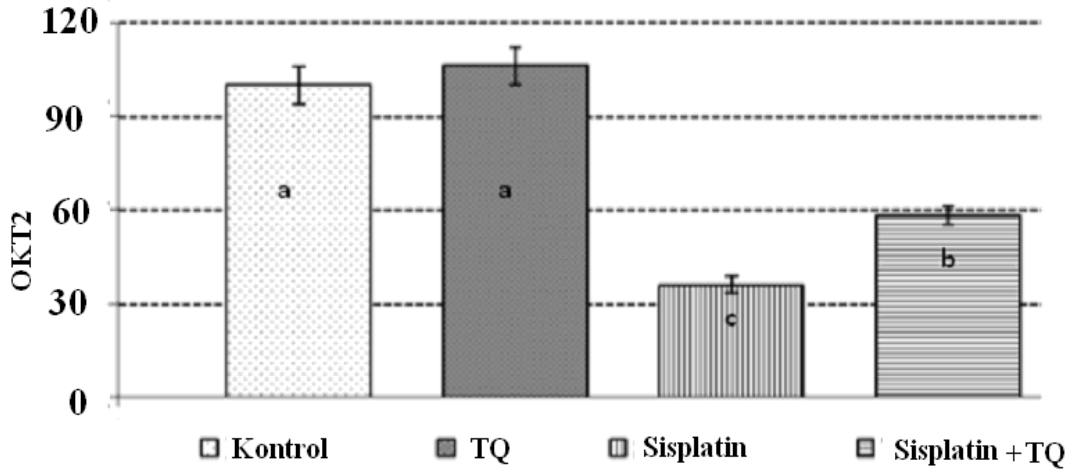
3.3. Organik Katyon Transporter 1 Düzeyleri

Rat böbrek dokusunda OKT1 ekspresyonu ele alındığında OKT1 ekspresyonu bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P<0.001$). Kontrol grubu ile TQ grubu arasında herhangi bir fark gözlenmedi ($P>0.05$). Bu iki grup ile Sisplatin grubu ve TQ+Sisplatin arasında anlamlı farklılık elde edildi ($P<0.05$). Yine sisplatin ve TQ+sisplatin grubu arasında da önemli fark bulundu ($P<0.05$) (Şekil 1).



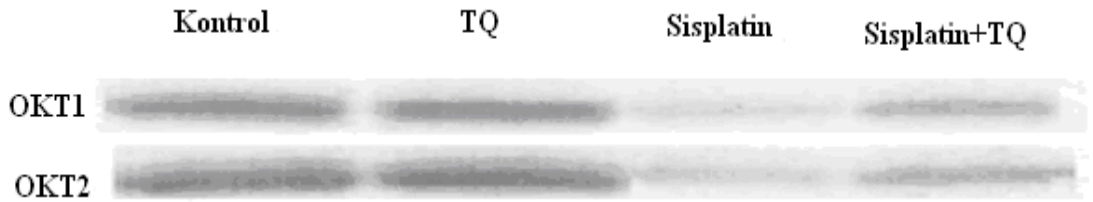
Şekil 1. Rat böbrek dokusunda OKT1 ekspresyon düzeyleri

a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan anlamlıdır ($P < 0.05$)



Şekil 2. Rat böbrek dokusunda OKT2 ekspresyon düzeyleri

a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan anlamlıdır ($P < 0.05$)



Şekil 3. Rat böbrek dokusunda OKT1 ve OKT2' Western Blot yöntemi ile analizi

3.4. Organik Katyon Transporter 2 Düzeyleri

Rat böbrek dokusunda OKT2 ekspresyonlarına bakıldığında kontrol grubu ve TQ grubu arasında herhangi bir fark gözlenmedi ($P > 0.05$). Sisplatin grubunda

kontrol ve TQ gruplarına göre düşük değerler elde edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0.05$). Bu fark sisplatin ile TQ+sisplatin grubu arasında da mevcuttu ($P<0.05$). TQ+sisplatin grubunda kontrol ve TQ grubuna göre yüksek değerler bulundu ve bu fark anlamlı idi ($P<0.05$) (Şekil 2).

3.5. Doku MDA Düzeyleri

Grupların doku MDA düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($P<0.001$). Kontrol grubu ile TQ grubu arasında fark bulunmadı ($P>0.05$). Sisplatin grubu değerlendirildiğinde bu iki grup ile arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($P<0.05$). Thymoquinone + sisplatin grubunda kontrol ve TQ gruplarına göre yüksek, sisplatin grubuna göre düşük değerler bulundu. Bu fark, istatistiksel açıdan anlamlı idi ($P<0.05$) (Tablo 3).

3.6. 8-iso-PGF₂α Düzeyleri

8-iso-prostaglandin F₂α düzeylerine bakıldığında kontrol grubu ve TQ grubu arasında fark gözlenmedi ($P>0.05$). En yüksek değerler sisplatin grubunda bulundu. Sisplatin grubu ile kontrol ve TQ grubu arasında anlamlı fark bulundu ($P<0.05$). Thymoquinone+sisplatin grubuna bakıldığında sisplatin grubuna göre daha düşük, kontrol ve TQ grubuna göre ise daha yüksek değerler tespit edildi ($P<0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3. Sisplatin nefrotoksitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂α üzerine etkisi (n=7).

Parametre	Gruplar				P Değeri
	Kontrol	TQ	Sisplatin	TQ + Sisplatin	
MDA (nmol/g)	81.5±5.8 ^c	82.5±6.0	161.1±12.6 ^a	113.2±7.5 ^b	$P<0.001$
8-iso-PGF ₂ α (pg/g)	550±18 ^c	539±26 ^c	1640±32 ^a	1133±28 ^b	$P<0.001$

a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan anlamlıdır ($P<0.05$)

3.7. Histopatolojik Değerlendirme

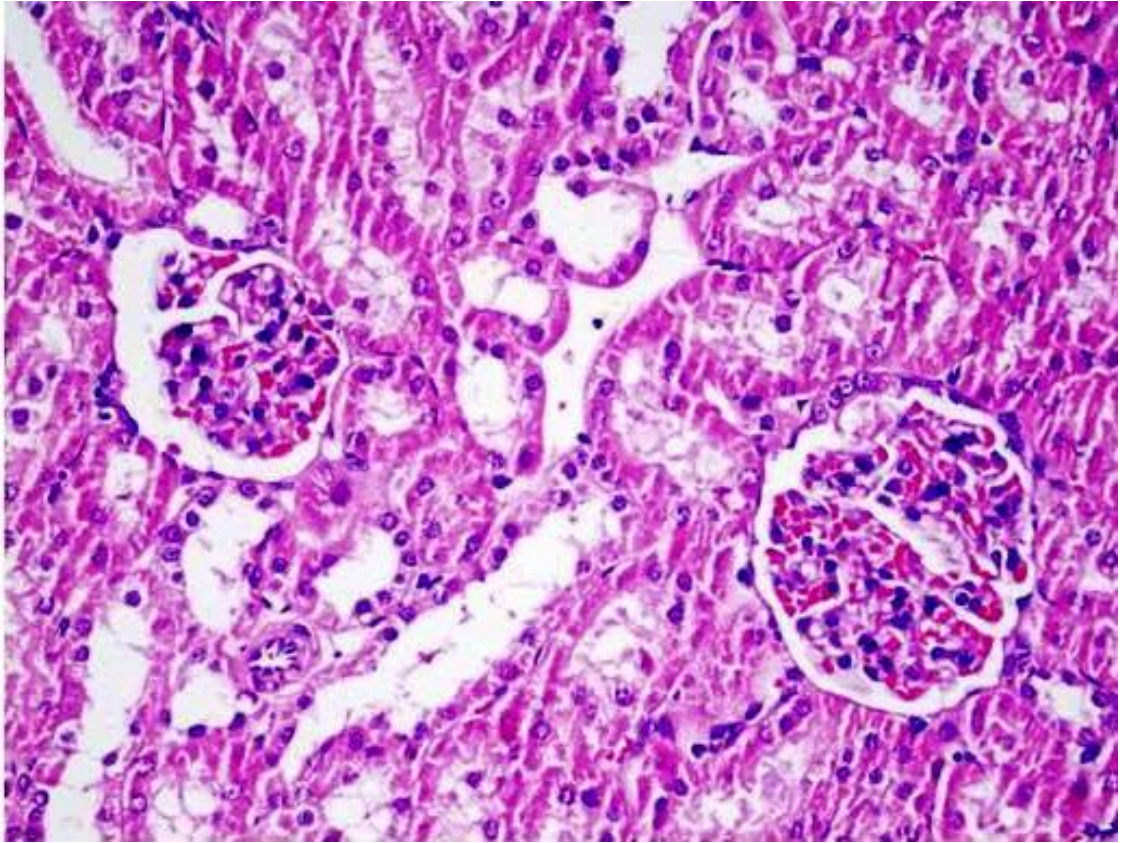
Kontrol ve TQ grubunda hafif bir tübüler vakuolizasyon dışında normal böbrek histolojisi gözlemlendi. Sisplatin grubunda genelde orta düzeyde bir değişiklik

gözlenirken TQ uygulaması ile bu değişikliklerin şiddetinin azaldığı gözlemlendi (Tablo 4).

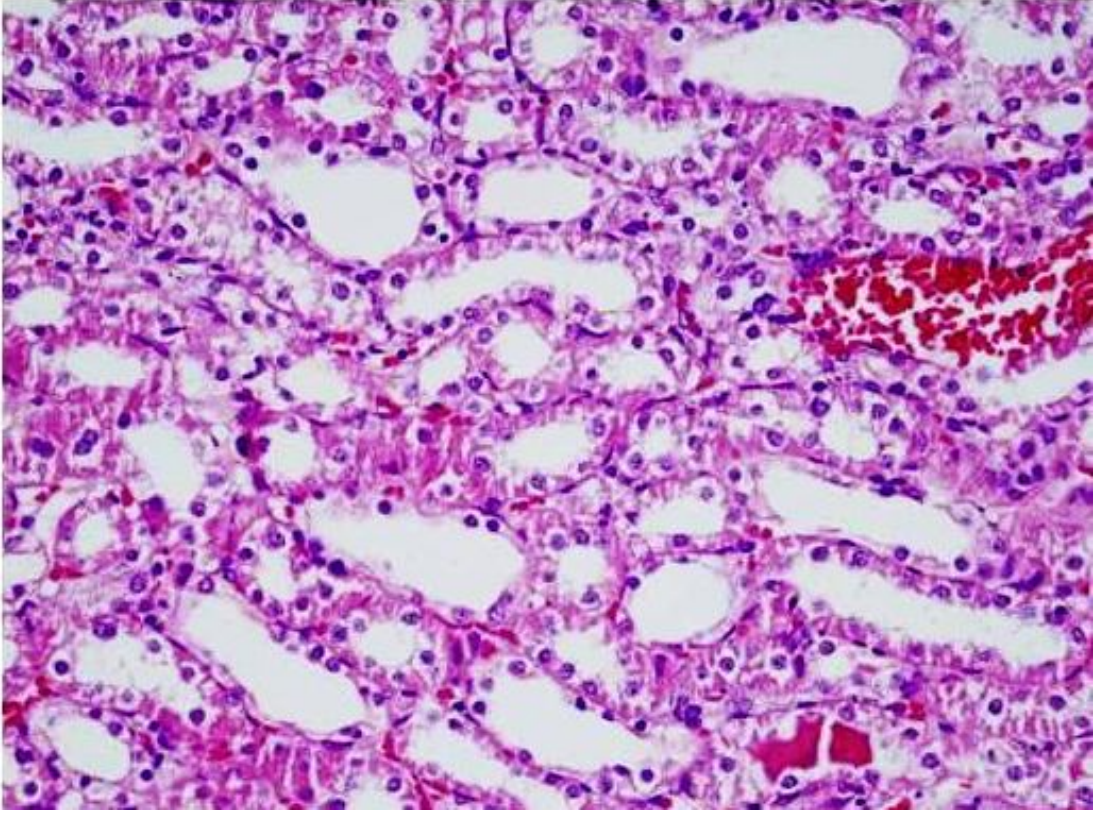
Tablo 4. Sisplatin nefrotoksitesinde TQ uygulamasının rat böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler üzerine etkisi (n=7).

Morfolojik Değerlendirme	Gruplar			
	Kontrol	TQ	Sisplatin	TQ+sisplatin
Tübüler Rejenerasyon	-	-	+	-
Tübüler Dilatasyon	-	-	++	+
Tübüler Vakuolizasyon	+	+	++	+
İnterstisyel İnflamasyon	-	-	+	-
Tübüler Nekroz	-	-	++	+

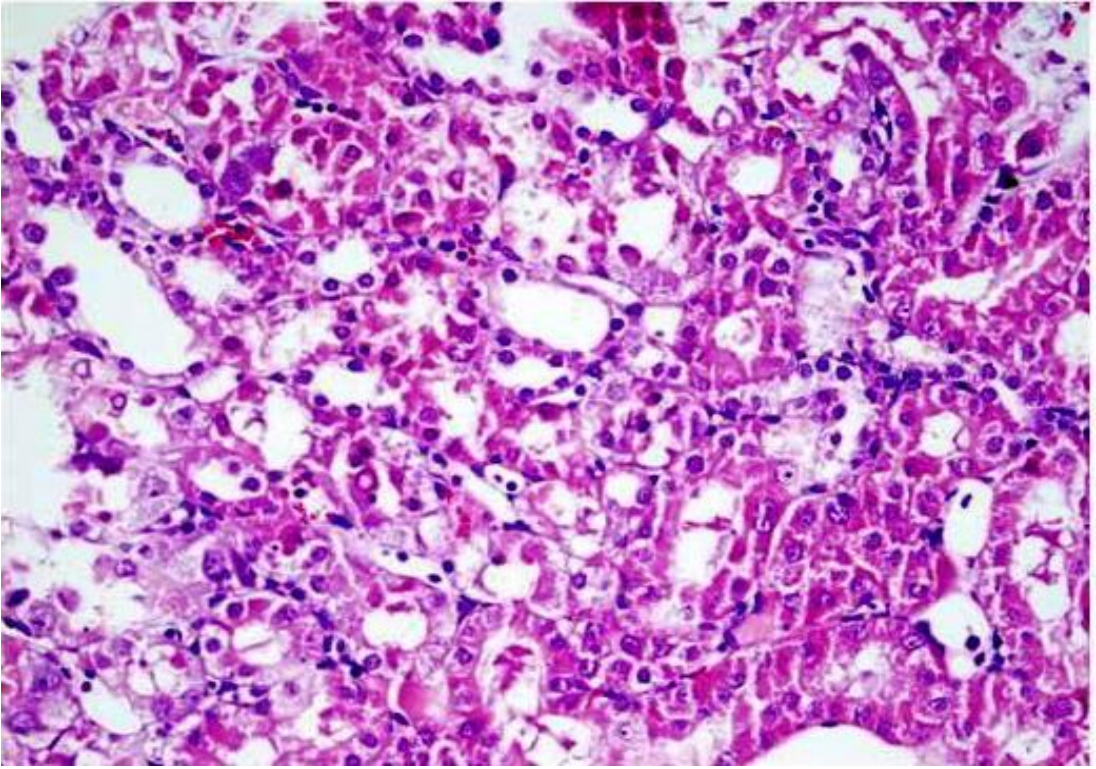
- : Yok, + (Hafif) : < % 25, ++ (Orta) : % 25-50 arası, +++ (Şiddetli) : % 50'den fazla



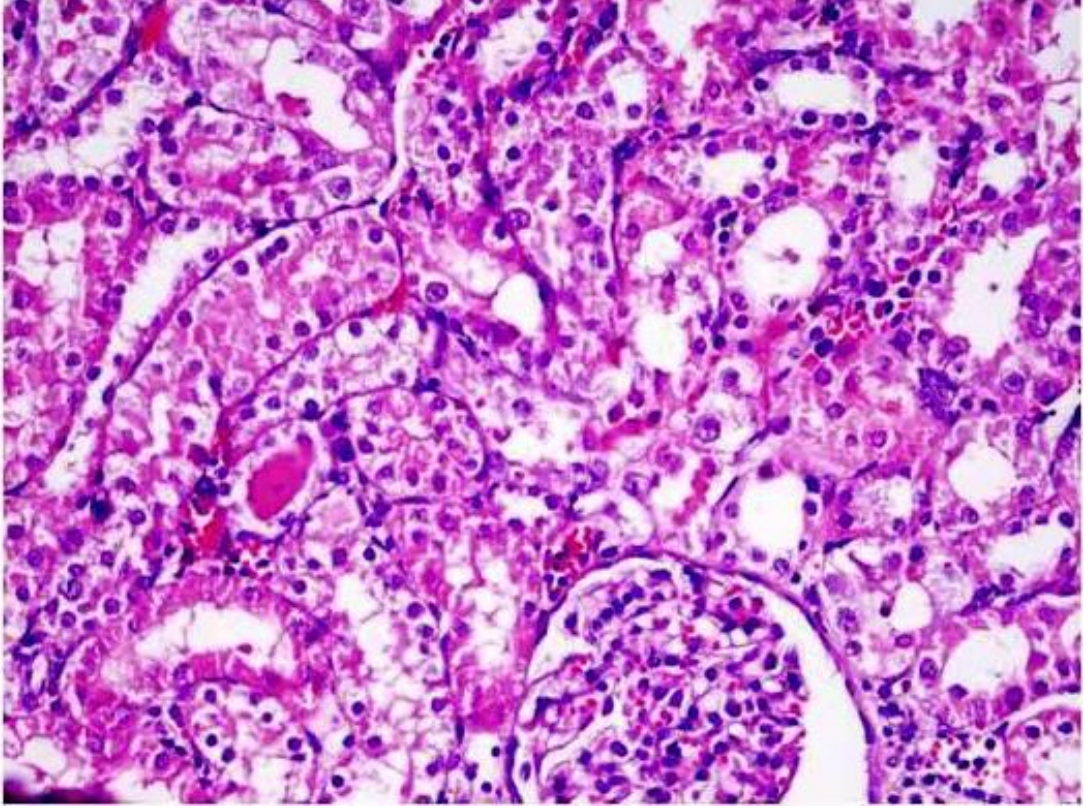
Şekil 4. Kontrol grubu normal görünüm (HE, x400)



Şekil 5. TQ grubu normale yakın böbrek histolojisi (HE, x400).



Şekil 6. Sisplatin grubu, tübüslarda yaygın dejenerasyon, nekroz ve rejeneratif değişiklikler (HE, x400).



Şekil 7. Sisplatin+ TQ grubu tübülus epitel hücrelerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ve tübüler hasar (HE, x400).

4. TARTIŞMA

Günümüzde solid tümör tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatinin kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi nefrotoksisitedir. Yoğun intravenöz hidrasyona rağmen nefrotoksisite gelişebilmekte ve ilerleyici böbrek yetersizliği gelişmesi durumunda geriye tek seçenek olarak ilacın kesilmesi kalmaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesinde çeşitli mekanizmalar suçlanmakla beraber son dönemlerde patofizyolojide daha çok oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Oksidatif hasar, organizmanın antioksidan kapasitesinin üzerinde SOR üretimi veya antioksidan mekanizmaların yetersizliğinde oluşur. Sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın rolü çeşitli yayınlarda bildirilmektedir (1, 34, 64). Kemoterapi ajanları tümoral hücelere spesifik olmamakla birlikte yüksek bölünme hızına sahip hücelere daha fazla etkili olmaktadır. Bu özellikleri ile kontrolsüz bir şekilde bölünmeye uğrayan tümoral hücelere etki etmekte, ancak aynı zamanda fizyolojik olarak yüksek bölünme hızlarına sahip normal hücelere de (saç ve bağırsak epiteli gibi) etki etmektedirler. Böbrek hüceleri yüksek bölünme hızına sahip olmamasına rağmen yüksek kan akım hızı ve volümü nedeni ile kemoteropatik ajana daha fazla maruz kalması ve tübül hücelesindeki transport mekanizmaları aracılığı ile kemoteropatik ajanın tübül hücelesinde ve medüller interstisyumda birikmesi sonucu böbrek hüceleri de etkilenmektedir. Sisplatin uygulamasının tübül hücelesinde bulunan OKT2 transport proteinini azalttığı ve tekrarlayan uygulamalarda sisplatinin tübül hücelerin alımının azalması, sisplatinin OKT2 taşıyıcı protein ile atıldığını göstermektedir (12). Sisplatin, medullanın dış kısmında yerleşmiş olan tübüllerin S3 bölgesinde plazmadan 5 kat daha fazla birikmesi nedeni ile tübüllerin bu bölgesi sisplatinden en çok etkilenen kısımlar olmaktadır (3). Sisplatin nefrotoksisitesinde suçlanan çeşitli mekanizmaların sonucu gelişen lipid peroksidasyonu tübül hücelesinde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmakta ve bütün bu değişikliklerin kliniğe yansması ile böbrek fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesini azaltmaya yönelik olarak çinko picolinat, pravastatin, sistein ve E vitamini gibi çeşitli antioksidanlar deneysel çalışmalarda kullanılmış ve kısmen koruyucu etkilerinin olduğu yayınlarda belirtilmiştir (34, 65, 66).

Antioksidan özelliğinden dolayı çeşitli deneysel araştırmalarda çalışılmış ajanlardan biri de, Hindistan, Arap ülkeleri, Afrika ve Avrupa'da yıllardır yemek yapımında ve halk arasında bazı tıbbi rahatsızlıklarda (astım, hipertansiyon, diyabet, inflamasyon, öksürük, bronşit, başağrısı, ekzema, ateş, baş dönmesi ve gripal enfeksiyonlar gibi) doğal ilaç olarak kullanılmakta olan *N. sativa* bitkisinden elde edilen TQ'dur. Houghton ve ark. (38) hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada TQ'nun non-enzimatik lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Meral ve ark. (56) tarafından diyabet oluşturulmuş tavşanlarda *N. sativa* ekstresinin lipid peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmada kan MDA düzeyleri; diabetik grupta (11.85 ± 2.4 nmol/ml), kontrol grubunda (2.05 ± 0.18 nmol/ml) ve *N. sativa* ekstresi uygulanan grupta ise kontrol grubuna benzer sonuçlar (1.96 ± 0.22 nmol/ml) elde edilmiş ve sonuçların anlamlı olduğu belirtilmiştir ($P \leq 0.05$). Antioksidan glutatyon düzeyi ise kontrol grubunda 42.25 ± 5.26 mg/dl iken diabetik grupta belirgin olarak azalmış (18.27 ± 3.04 mg/dl) olarak bulunmuş. *Nigella sativa* ekstresi uygulanan grupta bu değerlerin kontrol grubuna yakın düzeylere (36.26 ± 5.63 mg/dl) geldiği görülmüş ve aradaki fark anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.05$). Araştırmacılar sonuç olarak *Nigella sativa* ekstresinin diabetik tavşanlarda SOR düzeyini azalttığını, zayıflamış olan antioksidan sistemi güçlendirdiğini ve lipid peroksidasyonunu azalttığını ifade etmişlerdir.

Gentamisin nefrotoksik etkisi olduğu bilinen ajanlardandır ve patofizyolojide suçlanan mekanizmalardan bir tanesi de oksidatif hasara neden olan artmış SOR'lerdir (67). Sayed ve ark. (68) ratlarda oluşturulmuş gentamisin nefrotoksisitesinde TQ'nun koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, katalaz ve lipid peroksidasyon göstergesi olan tiyobarbutirikasit-reaktif substance (TBARS) değişimini incelemişlerdir. Sonuçlar glutatyon, glutatyon peroksidaz ve katalaz açısından sırasıyla kontrol grubunda; 3.39 ± 0.20 μ mol/g, 45.2 ± 1.5 U/g ve 22.1 ± 2.3 U/g, gentamisin grubunda 2.45 ± 0.05 μ mol/g, 23.5 ± 1.5 U/g ve 9.9 ± 0.8 U/g, TQ+gentamisin grubunda ise 3.12 ± 0.13 μ mol/g, 43.4 ± 2.0 U/g ve 19.4 ± 0.5 U/g olarak bulunmuştur. Gruplar karşılaştırıldığında gentamisin ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre glutatyon, glutatyon peroksidaz ve katalaz değerlerinde sırasıyla %28,48 ve 55

oranında azalma gözlenmiş ve anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Tedaviye TQ eklenmesinin bu değerleri normal düzeylerine yaklaştırdığı ve bu sonuçların da gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu belirtilmiştir ($P<0.05$). Lipid peroksidasyon göstergesi olan TBARS'ın serum ve böbrek dokusundaki değişimleri incelendiğinde gentamisin grubunda kontrol grubuna göre serum ve doku düzeylerinde sırasıyla %113 ve %41 oranında artma olduğu ($P<0.05$), gentamisine TQ eklenmesi ile TBARS düzeylerinde gentamisin grubuna göre anlamlı azalma olduğu ($P<0.05$) ancak normal düzeylerine gerilemediği gözlenmiştir. Araştırmacılar bu değişiklikleri TQ'nun oksidatif stresi azaltma ve antioksidan enzim aktivitesini koruyucu etkisine bağlamışlardır (68). Thymoquinonenin antioksidan etkinliğinin değerlendirildiği bir başka rat çalışmasında merkurik klorid ile oluşturulmuş nefrotoksisitede antioksidan enzim aktivitelerinin yanı sıra lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyleri de incelenmiştir. Sonuç olarak kontrol grubunda böbrek dokusunda MDA düzeyleri 0.21 ± 0.08 nmol/mg iken merkurik klorid kolunda 0.48 ± 0.11 nmol/mg olarak bulunmuştur ($P<0.001$). Merkurik klorid+TQ kolunda ise 72 saat sonunda doku MDA düzeylerinde merkurik klorid koluna göre belirgin azalma gözlenmiştir ($P<0.05$) (49). Bu çalışmada da oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonunu TQ'nun kısmen önleyebileceği anlaşılmıştır (51).

Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ'nun koruyuculuğunu araştırdığımız bu çalışmada ratlarda tek doz İP 7 mg/kg sisplatin uygulaması ile nefrotoksisitenin geliştiği biyokimyasal ve sitopatolojik değerlendirme ile ortaya kondu. Kontrol ve TQ kolunda üre değerleri sırasıyla 53.5 ± 15.8 mg/dl ve 55.1 ± 2.4 mg/dl, kreatinin değerleri ise 0.43 ± 0.08 mg/dl ve 0.43 ± 0.01 mg/dl olarak bulundu. Gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Sisplatin uygulaması ile bu parametrelerde belirgin yükselmeler tespit edildi. Bu kolda üre ve kreatinin değerleri sırasıyla 152.1 ± 10.5 mg/dl ve 1.46 ± 0.18 mg/dl olarak ölçüldü. Bu değerler kontrol kolu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık bulundu ($P<0.001$). Sisplatin+TQ kolunda üre (104.1 ± 2.71 mg/dl) ve kreatinin (0.71 ± 0.18 mg/dl) değerlerinde normale dönüş olmamakla birlikte könemli oranda gerileme sağlandığı görüldü. Sisplatin ve kontrol grubu karşılaştırıldığında aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0.05$). Ancak yine de bu değerlerin kontrol grubunun iki katı kadar olduğu dikkate değerdir.

Histopatolojik değerlendirmede kontrol ve TQ grubunda normal böbrek histolojisi gözlendi. Sisplatin grubunda tbluslarda yaygın dejerasyon, nekroz ve rejeneratif değişiklikler görüldü. Sisplatin+TQ grubunda ise bu patolojilerin önemli oranda düzeldiği gözlendi. Patolojik değişikliklerin daha çok kortiko-medüller bileşkede olması sisplatinin daha çok PT S3 segmentinde yoğunlaştığı şeklindeki bilgi ile uyumlu bulunmuştur (3). Hafif bir tübüler vakuolizasyon dışında değişiklik gözlenmezken sisplatin grubunda orta düzeyde morfolojik değişiklikler tespit edildi. Thymoquinone eklenmesi bu değişikliklerin şiddetini azaltmıştır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar thymoquinonunun sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif stres aracılığı ile olan hasarın şiddetini azalttığını göstermektedir. Böbrek dokusunda MDA sonuçlarını (Tablo 3) incelediğimizde; kontrol ve TQ verilen grupta benzer sonuçlara ulaşılırken sisplatin kolunda 2 kata ulaşan belirgin artış gözlendi ($P<0.001$). Thymoquinone eklenmesi ile doku MDA düzeylerinde azalma saptandı ve bu azalma sisplatin grubuna göre anlamlı idi ($P<0.05$). Sonuçlar önemli derecede bir düzelmeyi gösterir tarzda kontrol grubuna göre yüksekti.

Bir diğer lipid peroksidasyon son ürünü olan 8-iso-PGF₂ α düzeylerine bakıldığında MDA'ya benzer şekilde sisplatin verilen ratlarda kontrol ve TQ uygulanan ratlara göre oldukca yüksek seviyeler tespit edildi ($P<0.001$). Thymoquinone+sisplatin grubunda yine önemli derecede bir düzelmeyi gösterir tarzda anlamlı bir düşüş gözlendi ($P<0.05$).

Bu sonuçlar sisplatin nefrotoksisitesinde daha önceki yayınlarda belirtildiği gibi oksidatif hasar mekanizmasının rol aldığını göstermektedir (34, 64). Oksidatif stres durumunda artan serbest oksijen radikalleri sonucunda meydana gelen lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA artışının antioksidan enzimlerdeki azalmanın sonucu olduğu belirtilmektedir (69). Lipid peroksidasyonu sonucu araşidonik asitten non-enzimatik olarak üretilen 8-iso-PGF₂ α 'nın oksidatif stres biyobelirteci olabileceği araştırmalarla ortaya konmuştur (35-70). 8-iso-PGF₂ α 'nın periferal venden (5 μ g/kg/dk) veya intrarenal (0.5-2.0 μ g/kg/dk) infüzyonunun renal kan akımında ve glomerül filtrasyon hızında belirgin düşüşe yol açtığı tespit edilmiştir. Yazarlar bu maddenin oksidatif hasarın patofizyolojik mediatrlerinden biri olabileceğini ileri sürmüşlerdir (70).

Thymoquinonenin antioksidan etkinliği bir çok çalışmada değerlendirilmiştir. *N. sativa*'dan elde edilen etken maddelerden *N. sativa* yağı, carvacrol, thymoquinone, quercetin, 4-terpinol ve L-anetholun antioksidan etkinliğinin sığır beyin fosfolipidi kullanılarak araştırıldığı çalışmada en potent antioksidan *N. sativa* yağından sonra TQ olarak bulunmuştur. *N. sativa* yağı 0.0011μg konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu %50 oranında azaltarak çok gcľl bir antioksidan etkinlik gösterirken ikinci sırada 1.84μg konsantrasyonu ile TQ yer almıştır (37). Thymoquinonenin koruyuculuğunun değerlendirildiği farelerde karbontetraklorür ile indüklenen hepatotoksisite çalışmasında hepatotoksisite oluşturulmadan önce içme suyu ile TQ (16 mg/kg/gün) uygulamasının karaciğer enzim düzeylerinde azalmaya, karaciğer doku MDA düzeylerinde belirgin azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Yazar TQ'nun etkinliğinin muhtemel mekanizması olarak, lipid peroksidasyonuna yol açan SOR üretimini azaltması ile açıklanmıştır (49). Benzer şekilde ratlarda yapılan bir başka çalışmada karbontetraklorür uygulaması ile hepatotoksisite oluşturulmuş ve tedavi grubuna *N. sativa* ekstresi 800 mg/kg/gün olarak dört hafta boyunca oral olarak verilmiştir. Çalışma sonunda hepatotoksisite kolunda artan serum AST, ALT ve MDA düzeylerinin ekstre uygulanan grupta kontrol grubuna yakın dzeyele indiği ve yine hepatotoksisite kolunda belirgin olarak azalmış olan eritrosit içi antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz düzeylerinin tedavi grubunda yine kontrol grubuna yakın dzeyele çıktığı belirtilmiştir (P<0.05). Araştırmacılar *N. sativa* ekstresinin ratlarda karbontetraklorür hepatotoksisitesini lipid peroksidasyonunu azaltarak ve antioksidan enzim sistemini güçlendirerek önleyebileceğini belirtmişlerdir (71). Çalışmamızda literatür ile uyumlu sonuçlar elde edildi. Sisplatin nefrotoksisitesinde yayınlarda belirtildiği gibi oksidatif stresin rolünü kanıtlayacak şekilde doku MDA ve 8-iso-PGF₂α düzeyleri yüksek bulundu. Thymoquinone eklenmesi ile bu parametrelerde belirgin düzelmeler sağlandı. Bu olumlu katkı serum üre, kreatinin düzeyleri ve böbreğin sitopatolojik incelemesi ile de teyid edildi. Bu sonuç, TQ'nun antioksidan özelliği ile sisplatinin böbrek üzerindeki olumsuz etkilerine karşı önemli oranda koruyucu olabileceğini göstermektedir.

Tübüler transport sistemlerinden OKT1 ve OKT2 sonuçlarına bakıldığında sisplatin uygulanan grupta belirgin azalma görülmüştür. Thymoquinone+sisplatin

grubunda ise MDA ve 8-iso-PGF₂ α da olduğu gibi TQ'nun önemli oranda koruyucu olduğu görülmüştür.

Canlı organizmalar yaşadıkları ortamlarda çevresel toksinlere, endojen üretilen metabolik toksinlere ve özellikle de insanlarda tedavi amaçlı alınan ilaçlara maruz kalmaktadır. Memeli canlılarda bu toksinler başlıca böbrek ve karaciğer yolu ile atılır. Organik katyon transport ailesinden (SLC22A) olan OKT1 ve OKT2'nin PT bazolateral membranda yerleştiği gösterilmiştir. Organik katyon transporter 1, S1 ve S2 segmentlerinde daha yoğun bulunurken S3 segmentinde daha az bulunmaktadır. Organik katyon transporter 2 ise tersi bir şekilde S2 ve S3'te yoğun bir şekilde bulunurken S1 segmentinde çok zayıf olarak bulunmaktadır (23). Sisplatinin katyonik transport proteinleri üzerine olan etkileri ile az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yonezawa ve ark. (27) yaptıkları çalışma sonuçlarına göre sisplatin böbrekte başlıca OKT2 ile transport edilmektedir. Organik katyon transporter 2 yoğunluklu olarak böbrekte, OKT1 ise daha çok karaciğer, böbrek ve bağırsakta bulunduğundan sisplatinin karaciğerden ziyade böbreğe olan toksisitesini açıklamaktadır. Bu çalışmada ilginç bir şekilde erkek ratlarda OKT2 ekspresyonunu dişi ratlara göre daha fazla olduğu ve sisplatinin erkek rat böbreğinde daha fazla biriktiği bildirilmektedir. Yazarlar bu durumun testosteronun etkisi ile olduğunu, normal erkek ratlarda nefrotoksisite oluşturan sisplatin dozunun kastrasyon uygulanan ratlarda herhangi bir nefrotoksisiteye yol açmadığını bildirmektedir (27). İnsandaki OKT2'nin doku ve böbrek dağılımı rat OKT2'si ile aynı olduğundan rat sisplatin nefrotoksisitesi ile ilgili bulguların insanlara yansıtılabileceği belirtilmektedir (72).

Sisplatin nefrotoksisitesinde TQ'nun koruyucu etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada TQ sisplatin nefrotoksisitesine karşı önemli oranda koruyucu olabileceğini göstermiştir. Daha önceki araştırmalardan da elde edilen veriler ışığında TQ'nun umut verici olduğunu ve sisplatin OKT2 aracılığı ile böbrek tübül hücrelerinde yüksek konsantrasyonlara ulaşarak toksisiteye yol açtığından spesifik OKT2 antagonistlerinin bu konuda araştırılması gerektiği söylenebilir.

5. KAYNAKLAR

1. Schrier RW. Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest* 2002; 110: 743-745.
2. Cooley M, Davis LE, Stefano M, Abraham J. Cisplatin: a clinical review. Part 1-Current uses of cisplatin and administration guidelines. *Cancer Nurs* 1994; 17: 283-293.
3. Kuhlmann M.K. Burkhardt G, Kohler H. Insight into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478-2480.
4. DeConti R, Toftness B, Lange R, Creasey W. Clinical and pharmacological studies with cis-Diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res* 1973; 33: 1310-1315.
5. Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int* 1984; 25: 753-758.
6. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1-10.
7. Sleifer DT, Meijer S, Mulder NH. Cisplatin: a review of clinical applications and renal toxicity. *Pharm Weekbl Sci* 1995; 7: 237-244.
8. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10: 1663-1682.
9. Zhang JG, Lindup WE. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2215-2222.
10. 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.

11. Kim SW, Lee JU, Nah MY, Kang DG, Ahn KY, Lee HS, et al. Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 875-882
12. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167: 1477-1484.
13. Jackson AM, Rose BD, Graff LG, Jacobs JB, Schwartz JH, Strauss GM, et al. Thrombotic microangiopathy and renal failure associated with antineoplastic chemotherapy. *Ann Intern Med* 1984; 101: 41-44.
14. Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Christensen S, Jonassen T, Daugaard G. Magnesium and potassium homeostasis during cisplatin treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 231-236.
15. Lajer H, Kristensen M, Hansen H, Nielsen S, Fokjaer J, Ostergaard LF, et al. Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 535-542.
16. 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.
17. 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.
18. Wood PA, Hrushesky WJ. Cisplatin-associated anemia: an erythropoietin deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1995; 95: 1650-1659.
19. Fritsch G, Rumrich G, Ullrich KJ. Anion transport through the contraluminal cell membrane of renal proximal tubule. The influence of hydrophobicity and molecular charge distribution on the inhibitory activity of organic anions. *Biochim Biophys Acta* 1989; 978: 249-256.

20. Shimada H, Moewes B, Burckhardt G. Indirect coupling to Na⁺ of p-aminohippuric acid uptake into rat renal basolateral membrane vesicles. *Am J Physiol* 1987; 253: 795-801.
21. Sekine T, Miyazaki H, Endou H. Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: 251-261.
22. Sekine T, Cha SH, Tsuda M, Apiwattanakul N, Nakajima N, Kanai Y, Endou H. Identification of multispecific organic anion transporter 2 expressed dominantly in the liver. *FEBS Lett* 1998; 429: 179-182.
23. Wright SH, Dantzer WH. Molecular and cellular physiology of renal organic cation and anion transport. *Physiol Rev* 2004; 84: 987-1049.
24. Somgyi A, Heinzow B. Cimetidine reduces procainamide elimination. *N Engl J Med* 1982; 307: 1080.
25. Deguchi T, Ohtsuki S, Otagiri M, Takanaga H, Asaba H, Mori S, et al. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int* 2002; 61: 1760-8.
26. Karbach U, Kricke J, Meyer-Wentrup F, Gorboulev V, Volk C, Loffing-Cueni D. Localization of organic cation transporters OKT1 and OKT2 in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 679-687.
27. Yonezawa A, Masuda S, Nishihara K, Yano I, Katsura T, Inui K. Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOKT2 (slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 1823-1831.
28. Urakami Y, Okuda M, Saito H and Inui K. Functional characteristics and membrane localization of rat multispecific organic anion transporters, OKT1 and OKT2, mediating tubular secretion of cationic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 287: 800-805.

29. Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OKT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem* 1998; 273: 15971-15979.
30. Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M. Novel membrane transporter OKTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 768-773.
31. Wagner CA, Lükewille U, Kaltenbach S, Moschen I, Bröer A, Risler T, et al. Functional and pharmacological characterization of human Na (+)-carnitine cotransporter hOKTN2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: 584-591.
32. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Brit Med Bull* 1993; 49: 481-493.
33. Freeman Ba, Crapo JD. Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-26.
34. Tuzcu M, Sahin N, Dogukan A, Aslan A, Gencoglu H, Ilhan N, et al. Protective role of zinc picolinate on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ren Nutr* 2010; 20: 398-407.
35. Chu X, Ageishi Y, Nishimura K, Jisaka M, Nagaya T, Shono F, et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for 8-iso-prostaglandin F2alpha, a biomarker of oxidative stress in vivo, and its application to the quantification in aged rats. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 911-916.
36. Sayed MD. Traditional medicine in health care. *J Ethnopharmacol* 1980; 2: 19-22.
37. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res* 2000; 14: 323-328.

38. Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* 1995; 61: 33-36.
39. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection. *Pharmacol Res* 2000; 41: 283-289.
40. F- Mansour MA, Ginawi OT, El-Hadiyah T, El-Khatib AS, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA. Effects of volatile oil constituents of *Nigella sativa* on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice: evidence for antioxidant effects of thymoquinone. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001; 110: 239-251.
41. Abdel Fatah M, Matsumoto K, Watanake H. Antinociceptive effect of *Nigella sativa* oil and its major components in mice. *Eur J Pharmacol* 2000; 400: 89-97.
42. Houghton PJ, Zarka R, las Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med* 1995; 61: 33-36.
43. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Abufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 839-847.
44. Ivankovic S, Stojkovic R, Jukic M, Milos M, Milos M, Jurin M. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo. *Exp Oncol* 2006; 28: 220-224.
45. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activities in mice. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 135-142.
46. Badary OA, Gamal El-Din AM. Inhibitory effects of thymoquinone against 20-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma tumorigenesis. *Cancer Detect Prev* 2001; 25: 362-368.

47. Aboul-Ela EI. Cytogenetic studies on *Nigella sativa* seeds extract and thymoquinone on mouse cells infected with schistosomiasis using karyotyping. *Mutat Res* 2002; 516: 11-17.
48. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicol Lett* 1998; 95: 23-29.
49. Mansour MA Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice. *Life Sci* 2000; 66: 2583-2591.
50. Badary OA, Nagi MN, al Shabanah OA, al Sawaf HA, al Sohaibani MO, al Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1356-1361.
51. Fouda AM, Daba MH, Dahab GM, Sharaf El-Din OA. Thymoquinone ameliorates renal oxidative damage and proliferative response induced by mercuric chloride in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 109-118.
52. Gilani AH, Aziz N, Khurram IM, Chaudhary KS, Iqbal A. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. *J Pak Med Assoc* 2001; 51: 115-120.
53. Chakravarty N. Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Ann Allergy* 1993; 70: 237-242.
54. Haq A, Abdullatif M, Lobo PI, Khabar KS, Sheth KV, al-Sedairy ST. *Nigella sativa*: effect on human lymphocytes and polymorphonuclear leukocyte phagocytic activity. *Immunopharmacology* 1995; 30: 147-155.
55. Al-Hader A, Agel M, Hasan Z. Hypoglycemic effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog* 1993; 31: 96-100.

56. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2001; 48: 593-599.
57. el Tahir KE, Ashour MM, al-Harbi MM. The cardiovascular actions of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in rats: elucidation of the mechanism of action. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 1123-1131.
58. Enomoto S, Asano R, Iwahori Y, Narui T, Okada Y, Singab AN et al. Hematological studies on black cumin oil from the seeds of *Nigella sativa* L. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 307-310.
59. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 299-304.
60. Kanter M, Demir H, Karakaya C, Ozbek H. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World J Gastroenterol* 2005 14; 11: 6662-6666.
61. Agrawal R, Kharya MD, Shrivastava R. Antimicrobial and antihelmintic activity of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol* 1979; 17: 1264-1265.
62. Mahmoud MR, El-Abhar HS, Saleh S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 1-11.
63. Badary OA, Al-Shabanah OA, Nagi MN, Al-Bekairi AM, Almazar MMA. Acute and subchronic toxicity of thymoquinone in mice. *Drug Develop Res* 1998; 44-61.
64. Nakano S, Gemba M. Potentiation of cisplatin-induced lipid peroxidation in kidney cortical slices by glutathione depletion. *Jpn J Pharmacol* 1989; 50: 87-92.

65. Fujieda M, Morita T, Naruse K, Hayashi Y, Ishihara M, Yokoyama T, et al. Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2010; 22.
66. el Daly ES. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. *J Pharm Belg* 1998; 53: 87-93.
67. Walker PD, Barri Y, Shah SV. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Renal Fail* 1999; 21: 433-442.
68. Sayed –Ahmed MM, Nagi MN. The thymoquinone supplementation prevents the development of gentamicin-induced acute renal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 399-405.
69. Nagwani S, Tripathi YB. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2253-2258.
70. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 9383-9387.
71. İlhan N, Seçkin D. Protective effect of *Nigella sativa* seeds on CCL₄-induced hepatotoxicity. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 19: 175-179.
72. Motohashi H, Sakurai Y, Saito H, Masuda S, Urakami Y, Goto M, et al. Gene expression levels and immunolocalization of organic ion transporters in the human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 866-874.

6. ÖZGEÇMİŞ

Adıyaman 1972 doğumluyum. İlkokulu 1982 yılında bitirdikten sonra ortaöğrenime Malatya Akçadağ Öğretmen Okulunda başladım. Lise 2. sınıfa kadar bu okulda okudum ve daha sonra Adıyaman lisesinde eğitimime devam ettim. Erciyes Tıp Fakültesinden 1995 yılında mezun oldum. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesinde İç Hastalıkları ihtisasımı tamamladım. Halen 2008 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesinde İç Hastalıkları Nefroloji yan dal eğitimine devam etmekteyim. Evli ve 3 çocuk babasıyım.