

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CİSPLATİN İNDÜKLÜ BÖBREK HASARINA KARŞI PUNİCALAGİNİN
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Merve TAŞBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Asım KART

Bu Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0533-YL-18 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR – 2020

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Merve TAŞBAŞ tarafından *Prof. Dr. Asım KART* yönetiminde hazırlanan *Cisplatin İndüklü Böbrek Hasarına Karşı Punicalagin Koruyucu Etkisinin Araştırılması* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20.01.2020



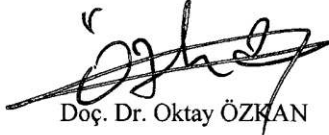
Prof. Dr. Asım KART

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Başkan



Doç. Dr. Oktay ÖZKAN

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Tıbbi Farmakoloji AD

Jüri



Doç. Dr. Fatma KOCASARI

Burdur Mehmet Akif Ersoy

Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu

14.02.2020 tarih ve 07 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa Doğan DEMİZSOYLU

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü



TEŞEKKÜR

Yükseklisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Asım KART'a, bilgileri, destekleri ve katkılarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Fatma KOCASARI'ya, çalışma esnasındaki uygulamalara ve analizlere yardımlarından dolayı Vet. Hek. Rıza YALÇIN'a, Vet. Hek. Ecem ÖZTÜRK'e ve Selinay ERDEMLİ'ye, yardım ve katkılarıyla ile çalışmamıza yön veren Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özlem Özmen'e, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı sayın hocalarıma, deneysel aşamalarda destekleri için Zeki EROL'a, beni yalnız bırakmayan ve desteklerini esirgemeyen arkadaşım Yeliz AKYOL'a, yaptığım herşeyde olduğu gibi; yüksekisans eğitimim süresince maddi manevi desteğini ve sabrını esirgemeyen aileme, uçsuz bucaksız anlayışı, her türlü desteğiyle yanımda olan, varlığıyla bana güç katan sevgili nişanlım Ramazan Çetin'e sonsuz teşekkür ediyorum.



ETİK BEYAN

“Cisplatin İndüklü Böbrek Hasarına Karşı Punicalagin Koruyucu Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Asım KART danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Merve TAŞBAŞ

Tarih: 20.01.2020

İmza:



İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nefrotoksisite	4
2.2. Cisplatin	7
2.2.1. Cisplatinin Moleküler Yapısı ve Özellikleri	8
2.2.2. Cisplatinin Farmakokinetiği	10
2.2.3. Cisplatin Toksisitesi	12
2.2.4. Cisplatin Nefrotoksisitesi	12
2.2.5. Cisplatin Nefrotoksisitesinde Mekanizmalar	12
2.3. Puniclagin	14
2.3.1. Puniclagin'in Kaynakları	15
2.3.2. Kimyasal Yapı ve Fiziksel Özellikleri	17
2.3.3. Farmakokinetik	18
2.3.4. Radikal Süpürücü ve Antioksidan Etki	20
2.3.5. Antikarsinojenik Etkisi	22
2.3.6. Diğer etkileri	24
2.3.7. Toksisite	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Hayvan Materyali	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler	29
3.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	29
3.2. Yöntem	31
3.2.1. Etik	31

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü	31
3.2.3. Örneklerin Toplanması	32
3.2.4. Dokuların Homojenizasyonu	32
3.2.5. Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Tayini	32
3.2.5.1. Total Antioksidan Status Analizi	33
3.2.5.2. Total Oksidan Status Analizi	33
3.2.5.3. Histopatoloji Yöntemi	33
3.2.5.4. İmmunohistokimyasal İnceleme Yöntemi	34
3.2.6. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. Deney Gruplarında Serum Üre ve Kreatinin Seviyeleri	36
4.2. Deney Gruplarında Serum Total Antioksidan Status Seviyeleri	37
4.3. Deney Gruplarında Serum Total Oksidan Status Seviyeleri	37
4.4. Deney Gruplarında Böbrek Doku Total Antioksidan Status Seviyeleri	38
4.5. Deney Gruplarında Böbrek Doku Total Oksidan Status Seviyeleri	38
4.6. Histopatolojik Bulgular	40
4.7. İmmunohistokimyasal bulgular	42
4.7.1. Bcl-2 İmmunohistokimyasal bulguları	42
5. TARTIşMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİş	74

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Cisplatinin moleküler yapısı	9
Şekil 2.2.	Nar meyvesi (A), nar kabuğu tozu (B), nar tanesi (C), kurutulmuş nar kabuğu (D)	16
Şekil 2.3.	Punicalagin'in kimyasal yapısı ve metabolitleri	17
Şekil 2.4.	Ürolitin A, Ürolitin B, Ürolitin C ve Ürolitin D'nin kimyasal yapısı	19
Şekil 2.5.	Ellagitanenlerin ince ve kalın bağırsakta mikrobiyal biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitleri	20
Şekil 4.1.	Cisplatin ve punicalagin uygulanan gruptan bir farenin böbrek görünümü	40
Şekil 4.2	Cisplatin ve punicalagin uygulanan gruptan bir farenin karaciğer görünümü	41
Şekil 4.3.	Bcl-2 immunoreaksiyonunu gösteren böbrek dokusundan bir görünüm	42
Şekil 4.4.	Bcl-2 immunoreaksiyonunu gösteren karaciğer dokusundan bir görünüm	43
Şekil 4.5	NF- κ B immunoreaksiyonunu gösteren böbrek dokusundan bir görünüm	44
Şekil 4.6.	NF- κ B immunoreaksiyonunu gösteren karaciğer dokusundan bir görünüm	45
Şekil 4.7.	TNF- α immunoreaksiyonunu gösteren böbrek dokusundan bir görünüm	46
Şekil 4.8.	TNF- α immunoreaksiyonunu gösteren karaciğer dokusundan bir görünüm	47

TABLÖLER

Tablo 3. 1.	Araştırmadaki gruplara verilen maddeler ve verildiği günler	32
Tablo 4.1.	Deney gruplarına göre serum Üre ve Kreatinin seviyeleri	36
Tablo 4.2.	Deney gruplarına göre serum total antioksidan status seviyeleri	37
Tablo 4.3.	Deney gruplarına göre serum total oksidan status seviyeleri	38
Tablo 4.4.	Deney gruplarına göre böbrek doku total antioksidan status seviyeleri	38
Tablo 4.5.	Deney gruplarında böbrek doku total oksidan status seviyeleri	39

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ATPaz	Adenozintrifosfataz
CAT	Katalaz
CDDP	Cisplatin
GFH	Glomerular Filtrasyon Hızı
GGT	Gama glutamil transferaz
IL-1β	İnterlökin 1 β
IκB	İnhibitör κ B
GPx	Glutasyon peroksidaz
GRx	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
CTR1	Copper transporter 1
HE	Hematoksilen eozin
i.p.	İntraperitoneal
TGF-β1	Transforme edici büyüme faktör beta 1
MDA	Malonaldehit
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTX	Metotreksat
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
ROS	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dismutaz
TAS	Total antioksidan status
TNFα	Tümör nekroz faktör alfa
TOS	Total oksidan status
GTs	Gallotanenler
KT	Kondense tanenler
ET	Ellagitanenler
HT	Hidrolize olabilen tanenler
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HO	Hemoksijenaz
Fe⁺²	Ferröz
Fe⁺³	Ferrik demir
BCPAP	Papiller tiroid karsinomu hücre hattında

ÖZET

Cisplatin İndüklü Böbrek Hasarına Karşı Punicalaginin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Bu araştırmada cisplatin indüklü böbrek hasarına karşı punicalaginin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada her grupta 8 adet fare olmak üzere 32 adet 8 haftalık BALB/c ırkı dişi/erkek fareler 4 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol grubu olarak ayrıldı ve 3 gün boyunca salin solüsyonu intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Grup 2'deki farelere punicalagin 3 gün boyunca 15 mg/kg, i.p. olarak uygulandı. Grup 3'deki farelere tek doz cisplatin 20 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandı. Grup 4'deki farelere tek doz cisplatin (20 mg/kg dozunda i.p.) ile punicalagin (15 mg/kg i.p. 3 gün süreyle s.i.d.) verildi. Çalışma sonunda deneklerden alınan serum örneklerinde üre, kreatinin, total oksidant ve total antioksidant status (TOS ve TAS) ve böbrek doku TAS ve TOS seviyeleri belirlendi. Ayrıca alınan böbrek örneklerinden histopatolojik olarak hemotoksilen-eosin boyama, immunohistokimyasal olarak Bcl-2, TNF α , NF- κ B yönünden incelenerek böbreklerde oluşan değişiklikler değerlendirildi. Deney sonunda elde edilen serum örneklerinde cisplatin grubundaki üre seviyeleri kontrol ve punicalagin gruplarında elde edilen üre seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$). Buna karşın punicalagin+cisplatin grubu üre seviyesi cisplatin grubuna göre düşük olduğu görüldü. Üre seviyesi kontrol ve punicalagin gruplarıyla karşılaştırıldığında yüksek olduğu görüldü. Kreatinin seviyesi punicalagin+cisplatin grubundaki kreatinin seviyesinde kontrol grubuna göre fark görülmedi ($p>0.05$). Cisplatin grubu serum ve böbrek doku TAS seviyeleri incelendiğinde kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşüş gösterirken, TOS seviyeleri anlamlı bir şekilde artış gösterdi ($p<0.05$). Punicalagin+ cisplatin grubu serum ve böbrek doku TAS ve TOS seviyeleri kontrol grubuna göre fark göstermediği tespit edildi ($p>0.05$). Histopatolojik incelemede cisplatin grubunda şiddetli hiperemi, tubullerin lümenlerinde proteinli sıvı birikimleri ve glomeruluslarda sklerozis dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda bulguların önemli ölçüde azaldığı görüldü. Böbreklerin Bcl-2 ekspresyonları incelendiğinde kontrol ve punicalagin gruplarında negatif reaksiyon gözlenirken cisplatin grubunda hem tubul epitellerinde hem de glomeruluslarda belirgin şekilde artmış immunoreaksiyon dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda immun reaksiyonun cisplatin grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Böbreklerde NF- κ B ve TNF- α immunoreaksiyonu incelendiğinde kontrol ve punicalagin grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda çok sayıda hücrede yoğun ekspresyon görüldü. Punicalagin+cisplatin grubunda ise cisplatin grubuna göre azalmış immunoreaksiyon görüldü. Sonuç olarak biyokimyasal ve histopatolojik bulgulara göre punicalalginin cisplatin indüklü böbrek hasarına ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği, punicalalginin cisplatin tedavisi sırasında koruyucu ve tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Cisplatin, Punicalagin, Böbrek hasarı, Koruyucu etki

ABSTRACT

The Investigation of protective effect of punicalagin on cisplatin-induced kidney damage

The aim of this study was to investigate the protective effect of punicalagin against cisplatin-induced renal injury. In this study, 32 BALB/c breed male/female mice (8 week old) were divided into 4 groups. Group 1 served as control and received saline solution intraperitoneally (i.p.) for 3 days. Group 2 (punicalagin group) mice received punicalagin 15 mg/kg for 3 days, i.p. Group 3 (Cisplatin group) mice received a single dose of 20 mg/kg cisplatin i.p. Group 4 mice (punicalagin+cisplatin group) were given a single dose of cisplatin (20 mg/kg i.p.) and punicalagin (15 mg/kg i.p. s.i.d.) for 3 days. At the end of the study, serum urea, creatinine, total oxidant and total antioxidant status (TOS and TAS), renal tissue TAS and TOS levels were determined. In addition, hematoxylin-eosin staining was performed histopathologically and immunohistochemically Bcl-2, TNF α , NF- κ B were evaluated for renal changes. At the end of the experiment, urea levels in the cisplatin group increased significantly compared to the control and punicalagin groups ($p<0.05$). In contrast, urea level in punicalagin + cisplatin group was lower than cisplatin group. Urea levels were higher than control and punicalagin groups. Serum creatinine level increased in the cisplatin group compared to the control group ($p<0.05$), while the creatinine level in the punicalagin + cisplatin group did not differ compared to the control group ($p>0.05$). Serum and renal tissue TAS levels of cisplatin group decreased significantly compared to control group, while TOS levels increased significantly ($p<0.05$). The serum and renal tissue TAS and TOS levels of the punicalagin+cisplatin group did not differ from the control group ($p>0.05$). Histopathologic examination revealed severe hyperemia in cisplatin group, protein fluid accumulation in lumens of tubules and sclerosis in glomeruli. In the punicalagin+cisplatin group, these findings decreased significantly. When Bcl-2 expressions of kidneys were examined, negative reaction was observed in control and punicalagin groups, whereas significantly increased immunoreaction in both tubular epithelium and glomeruli in cisplatin group. In the punicalagin+cisplatin group, the immune reaction was significantly reduced compared to the cisplatin group. When NF- κ B and TNF- α immunoreaction were examined in the kidneys, negative expression was observed in the control and punicalagin group, whereas intensive expression was observed in multiple cells and renal tubular epithelium in the cisplatin group, respectively. The immunoreactivity was decreased in the punicalagin + cisplatin group compared to the cisplatin group. As a result, according to biochemical and histopathological findings, it was concluded that punicalagin has protective effect against cisplatin induced kidney damage and oxidative stress, and punicalagin could be used as a protective and therapeutic agent during cisplatin treatment.

Keywords: Cisplatin, Punicalagin, Kidney damage, Protective effect

1. GİRİŞ

Nefrotoksisite yüksek morbidite, mortalite ve sağlık maliyetleri ile ilişkili küresel bir halk sağlığı sorunudur. İlaçlar nefrotoksisitenin yaygın kaynağını oluşturur (Zuk ve Bonventre, 2016). Nefrotoksisiteye neden olduğu bildirilen ilaçlar toksik etkilerini bir veya daha fazla patojenik mekanizma ile göstermektedir. Hastalarda, nefrotoksisiteye eşlik eden daha fazla ikincil hastalığın görülmesiyle birlikte, hastaların böbrek fonksiyonlarına zarar verme potansiyeli olan tanı ve tedavi yöntemlerine maruz kaldıkları gözlemlenmiştir (Naughton, 2008). Özellikle diyabet ve kardiyovasküler hastalığı olan yaşlı yetişkinler arasında, ilaca bağlı nefrotoksisite insidansında %66'ya kadar yükselme gözlemlenmiştir. Nefrotoksisiteye yol açan ilacın kesilmesi durumunda, böbrek yetmezliği genellikle geri dönüşümlüdür (Ghandi ve ark., 2000; Hoste ve Kellum, 2006; Kohli ve ark., 2000).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların böbrekte başlıca; glomerül, proksimal tubul ve distal tubul olmak üzere nefronun üç ana bölümünde fonksiyon bozukluğuna ve hasara neden olduğu bildirilmiştir (Eren ve ark., 2012). Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan ve platin bileşiği bir kemoterapotik ajan olan cisplatin (CDDP), bir çok solid tümörün tedavisinde yüksek düzeyde ve geniş bir antitümör aktiviteye sahiptir. (Çetintaş ve Eroğlu, 2013; Florea ve Büsselberg, 2011).

Cisplatinin 1960'lı yıllarda kansere karşı kullanılabilecek bir ilaç olarak keşfedilmesi ile kanser tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır (Florea ve Büsselberg, 2011).

Cisplatin testis, ovaryum, baş ve boyun, akciğer küçük hücreli tümörleri, mesane, serviks gibi birçok solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Güleç ve ark., 2004). Bununla birlikte, cisplatinin sıklıkla toksik yan etkilere neden olduğu ve bunun sonucunda ikincil malignitelere yol açan tümör direncinin eşlik ettiği bildirilmiştir (Florea ve Büsselberg, 2011).

Cisplatinin en önemli yan etkilerinden birisi doza bağlı olarak akut tubuler nekroza neden olmasıdır. Bu nefrotoksik etkisine bağlı olarak tedavi protokolüne ara verilerek ilaç tedavisi sınırlandırılabilir. Nefrotoksik etkisinde, akut böbrek hasarı, hipomagnezemi, fanconi benzeri sendrom, distal renal tübüler asidoz,

hipokalsemi, böbrek tuzu israfı ve hiperürisemi gibi çeşitli semptomlarla ortaya çıkabilir (Güleç ve ark., 2004; Oh ve ark., 2014).

Cisplatin böbrek dokusunda farklı mekanizmalarla nefrotoksik etki göstermektedir. Bunlar, oksidatif stres, inflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon ve tübüler epitel hücrelerine direkt sitotoksikite gibi mekanizmalardır. Cisplatin miyelosüpresyon, ototoksikite, gastrotoksikite ve alerjik reaksiyonlar gibi çeşitli toksik etkilere yol açar (Güleç ve ark., 2004; Oh ve ark., 2014). Antikanser ilaçların bu şekilde oluşturduğu toksik ve yan etkilerini önlemeye yönelik değişik çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında özellikle doğal bitkisel kaynaklı farklı fitokimyasalları içeren ürünler denenmiştir.

Günümüzde gıda maddelerinin biyoaktif bileşikleri olan fitokimyasallara artan oranda ilgi gelişmektedir (El Gharras, 2009). Polifenoller de bitki esaslı gıdalarda bulunan en önemli fitokimyasallardır. Polifenol bileşikler, antioksidan özelliğe sahip olan vitaminlerin ve enzimlerin fonksiyonlarını tamamlayan ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidandır (Tsao, 2010). Yüksek molekül ağırlıklı polifenoller olarak bilinen tanenler içinde ellagitanenler önemli bir yere sahiptir. Ellagitanenler doğal olarak bazı meyvelerde (nar, çilek, böğürtlen, ahududu), fındık (ceviz, badem) ve tohumlarda bulunur. Ellagitanenler anti-inflamatuvar, antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal (antibakteriyel, antifungal ve antiviral) aktiviteye sahiptir. Ellagitanenler ve bunların metabolitlerinin antikanser aktivitesi, serbest radikal süpürme yeteneği ile ilişkilidir. Bu nedenle, ellagitanenler, karsinogenezis oluşumunu, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların önemli bir nedeni olan oksidatif stresi önleyici ve azaltıcı etkileri vardır (Lipińska ve ark., 2014).

Punicalagin, başlıca nar (*Punica granatum*) meyvesinin değişik kısımlarında bulunan ve narın biyoaktif etkilerinin çoğundan sorumlu olan bir ellagitanendir (Lu ve ark., 2008). Punicalagin kimyasal olarak büyük bir molekül yapıya ve lipofilik karaktere sahip olduğundan emilimi ve biyoyararlanımı düşüktür (Vora ve ark., 2015). Punicalagin özellikle bağırsaklarda mikrobiyal ve karaciğer enzimleriyle ürolitinlere metabolize olarak idrarla atılırlar (Heber, 2011).

Grup olarak ellagitanenler ve özellikle punicalagin antikanserojen, kardiyoprotektif ve antioksidan özellikleriyle öne çıkmaktadır. Bu araştırma ile farelerde cisplatinle indüklenen böbrek hasarına karşı punicalagin koruyucu etkisinin araştırılması ve literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nefrotoksisite

Yaşayan organizmaların ilaçlara ve kimyasallara uzun süre maruz kalması sonucu sıklıkla toksisite görülmektedir. Bu ilaçlar ve kimyasalların vücudun tamamına toksik etkisi olduğu söylene de; birçok bileşiğin toksik etkisi bazı organlar üzerine daha belirgin olabilmektedir ve bu organlara hedef organlar denir. Bir bileşiğin farmakokinetiği ve hedef organın toksik maddeye karşı direnç gösterme yeteneği, bir organın toksisiteye karşı duyarlılığını belirleyen önemli faktörler arasında gösterilmektedir (Brady ve Brenner, 1995).

Böbrek, kimyasalları toksik ara ürünlere metabolize ettiği ve bu metabolitlerin atılmasında görev yaptığı için hedef organ konumundadır. Böbreğin bazı fizyolojik ve biyokimyasal (tübüler sekresyon, reabsorbsiyon ve konsantrasyon) özellikleri diğer organlarla karşılaştırıldığında onu iskemik ve toksik hasara karşı daha hassas hale getirmektedir. Nefronlar arasındaki anatomik, fonksiyonel ve biyokimyasal farklılıklar toksik ajanlara veya iskemi ya da hipoksi gibi patolojik durumlara verecekleri cevabın değişik olmasına neden olur. Böbreğin bölümlerinin ajanlara duyarlı veya dirençli olmasının nedeni nefron heterojenitesine göre değişmektedir. Fazla sayıda taşıyıcı sistem içeren proksimal nefron epitel hücreleri birçok nefrotoksik ajan için hedef bölge haline gelmekte ve enzimleri bulundurduğu için toksik hasara daha çok maruz kalmaktadır (Brady ve Brenner, 1995; Chew ve Dibartola, 1989; Guder ve Morel, 1992; Jones, 1986; Perazella, 2009; Pfaller ve Gstraunthaler, 1998).

Nefrotoksisite, akut glomerularnefritis, nefrotoksik renal yetmezlik, interstisyel nefritis, nefrotik sendrom ve nefron nefrozisi olarak tanımlanmaktadır (Davis, 1989; Pfaller ve Gstraunthaler, 1998). Nefrotoksisite sırasında meydana gelen değişiklikler (renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik) ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır (Luft ve ark., 1976; Mısıtık, 2000). İlaça bağlı toksisite, akut tübüler nekroz, intersitisyel nefritis ya da glomerülonefritis şeklinde oluşabilmektedir (Evenepoel, 2004; Maden,

1994). İlaç tedavisi gören hastaların, % 20'den fazlasında ilaç toksisitesinin akut böbrek yetmezliği ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Can ve ark., 2000; Ghaznavi ve ark., 2005).

Nefrotoksisite gelişiminde asıl belirleyici olay toksik ajana yeterli sürede ve miktarda maruz kalınmasıdır. Tübül epitellerinin büyük bir kısmının hasara karşı kendilerini yenileme yeteneği hızlıyken glomerül ve medulladaki hücreler ya kendilerini yenileyemezler ya da daha yavaş yenilenme gösterirler. İşte bu bölgedeki tekrarlayan maruziyetlerin kronik ve son dönem böbrek yetmezliği gibi hasarlara neden olabileceği bildirilmiştir (Pfaller ve Gstraunthaler, 1998).

Toksisiteye neden olan bu ajanlar ise geniş bir yelpazede incelenebilir. Evcil hayvanlarda birçok ilaç ve kimyasal maddeler nefrotoksisiteye neden olmaktadır. Bunların başlıcaları; aminoglikozidler (neomisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, tobramisin, amikasin vb.), sefalosporinler, tetrasiklinler, sülfonamidler, vankomisin, penisilinler, polimiksinler , monensin, acyclovir, amfoterisin-B, çeşitli ağır metaller (arsenik, bizmut, talyum, bakır, kadmiyum, kurşun, civa, altın tuzları, uranyum), metoksifluran, metotreksat, tanenler, klorlu hidrokarbonlar, kontrast maddeler, okzalatlara, mikotoksinler, etilen glikol , çeşitli analjezik ilaçlar (ibuprofen, naproksen, salisilatlar, fenilbutazon), anjiyotensin II reseptör antagonistleri, myoglobin ve hemoglobin gibi endotoksinler, radyokontrast maddeler gibi bazı diyagnostik amaçlı kullanılan ajanların da nefrotoksik olduğu bilinmiştir (Anderson ve Barry, 2004; Brier ve ark., 1985; Briguori ve ark., 2005; Brion ve ark., 1984; Hazıroğlu ve Milli, 1998; Kaneko ve ark., 1997; Maden, 1994).

Nefrotoksisiteye neden olabilen diğer maddeler arasında alternatif tıpta kullanılan bazı bitkisel ilaçlar ve doğal ürünlerin de bulunduğu bildirilmiştir. Alternatif tıpta kullanılan bazı ajanlar kendilerini daha çok akut böbrek yetmezliği ile gösterirken, ilaçlara ve çevresel faktörlere devamlı ve düşük dozda maruz kalınması durumunda daha çok kronik ve son dönem böbrek yetmezliği görülmektedir (Van Vleet ve Schnellmann, 2003). Kemoterapi ilaçları böbrekte başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerüller olmak üzere nefronun üç ana bölümünde yapısal hasara ve fonksiyon bozukluğuna neden olurlar (Kintzel, 2001; Vogelzang, 1991; Ikarashi ve ark., 2004).

Cisplatinin hücre içerisinde hasar oluşturabilmesi için nefrotoksik bir ajana dönüşmesi gerekmektedir (Townsend ve ark., 2003). Gama glutamil transferaz (GGT) tarafından hücre dışındaki glutatyon (GSH), glutamik asit ve sisteinilglisin olarak ayrılmaktadır. Sisteinilglisin ise diaminopeptidaz tarafından sistein ve glisin olarak ayrılır. Sistein ve glisin olarak ayrılan bu aminoasitlerin bir kısmı, hücre içerisine alınarak GSH sentezlenmesini uyardığı bildirilmiştir. Glutatyon-S-transferaz (GST) enzimi aracılığıyla cisplatin molekülü ve GSH birleşerek GSH-cisplatin konjugatlarını oluşturmakta ve GGT tarafından hücre dışında metabolize edilmektedir. Hücre içine alınan cisplatin-sistein beta liyazlar aracılığı ile reaktif tiyollere dönüştürülür (Hanigan ve Devarajan, 2003). GGT böbrekte nefrotoksisiteye neden olurken tümör hücrelerinde cisplatine karşı direnç gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Hanigan ve ark., 1999).

Böbrek hücrelerinde cisplatinin neden olduğu hasar sonucunda oluşan nefrotoksisitesinin mekanizması oldukça komplekstir. Bu mekanizmalar oksidatif stres, apoptozis, inflamasyon ve fibrinojen oluşumdur. Yüksek miktarda cisplatin proksimal tübüllerde nekroz, düşük konsantrasyonda cisplatin kaspas 9 yolu üzerinden apoptozise neden olur (Lieberthal ve ark., 1996).

Apoptozis; nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır (Kerr ve ark., 1972; Schwartzman ve Cidlowski, 1993).

Apoptozis normal ve patolojik süreçlerde tanımlanan önemli bir hücre ölüm şeklidir. Kaspaz 1, kaspaz 8 ve kaspaz 9; kaspaz 3'ü aktive eden öncü kaspazlardır. Bu süreç hücre dışı yüzey reseptörleri ve hücre içi mitokondriyal yollar üzerinden ilerlemektedir. DNA fragmanları ve oksidatif stres, mitokondriyal yolu aktive etmekte, bu yol kaspaz 9 aktivitesi ile sonuçlanmaktadır. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)'nın hücre yüzey reseptörüyle bağlanması kaspaz 8'i aktive etmektedir

(Green ve Reed, 1998;Kaushal ve ark., 2001;Tsuruya ve ark., 2003). Kaspaz 1 kaspaz 3'ü cisplatine bağılı böbrek hasarında direkt aktive etmektedir. Kaspaz 1 ayrıca interlökin-1 β (IL-1 β) seviyesini artırıp cisplatinin indüklediğı inflamasyona katılmaktadır. Cisplatine bağılı apoptozis ve akut tübüler nekroz, kaspaz 1 eksik farelerde azalmaktadır (Bonfoco ve ark., 1995; Faubel ve ark., 20003). Cisplatinin indüklediğı ve böbrek hasarına neden olan bir seri inflamatuvar değışiklik vardır. Yakın zamanda yapılan çalışmlar cisplatinin indüklediğı renal hasar oluşumunda inflamasyonun önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Cisplatin zaman bağımlı bir etki ile inhibitor κ B (IkB) yıkımını ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) bağlanma aktivitesini artırmaktadır. Bu olaylar da renal TNF- α aktivitesini artırmaktadır. TNF- α renal hasar oluşumunda merkezi bir role sahiptir. Apoptozisi indüklemekte, reaktif oksijen moleküllerinin (ROS) oluşumuna neden olmakta, kemokin ve sitokinler arasındaki yolları koordineli bir şekilde aktive etmektedir (Nithipongvanitch ve ark., 2007; Ramesh ve Reeves, 2002). Cisplatin etkilenen tübüllerin etrafında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile beraber fibrozisi de indüklemektedir. Bir rat çalışmasında 2 mg/kg dozunda cisplatin haftada bir olacak şekilde 7 hafta uygulanmış ve birinci haftadan itibaren kortikomedüler bileşkede fibrotik lezyonlar gelişmiş ve beşinci haftada maksimum dereceye ulaştığı tespit edilmiştir. Hasarın cisplatinin kesilmesinden sonra 19 haftalık bir süreçte fibrotik dokunun azalması ve yerini rejenere tübüllerin alması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Yamate, 2002). Makrofajlar Transforme edici büyüme faktör beta 1 (TGF- β 1) ve TNF- α üretimini artırarak renal interstisyel fibrozu oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Yao ve ark., 2007).

2.2. Cisplatin

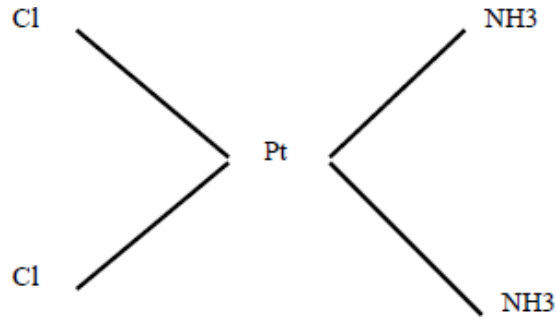
Cisplatin, 1970'li yıllardan sonra kanser tedavisinde kullanılan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. Cisplatin önemli bir sitotoksik maddedir ve insanlarda baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek gibi birçok solid tümörde etkili bir antikarsinogenik ajan olarak yaygın biçimde kullanılır (Schrier, 2005). Ayrıca çocukluk çağında nöroblastom, hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir (Sastry ve Kellie, 2005).

Peyronie'nin klorürü olarak bilinen cisplatin dünyada ilk olarak 1845 yılında Michele Peyronie tarafından sentezlenerek tanımlanmıştır. Kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmıştır. Cisplatinin biyolojik

özellikleri 1960'lı yıllarda biyofizikçi Barnett Rosenberg tarafından tesadüf eseri keşfedilmiştir. Elektromanyetik radyasyon uygulamasının bakteri ve memeli hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisini araştıran Rosenberg, *Escherichia coli* ile yaptığı ilk deneylerde büyüme alanında platin elektrodları kullanmaktaydı. Platin elektrodlarının bulunduğu bu büyüme alanında bakterinin normalden 300 kat daha uzun olan filamanlara sahip olduğunu bildirmiştir. Kısa sürede bu etkinin elektromanyetik alandan değil platin elektrodlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığını göstermiştir. Ayrıntılı kimyasal analiz sonucunda bu biyolojik etkiye yol açan bileşenin ilk olarak 1845 yılında Peyron tarafından sentezlenip tanımlanan ve Peyron kloridi olarak da bilinen ve sonradan cisplatin adını alan platinin nötral bir cis izomeri olduğu saptanmıştır. Bu bileşenin bakterinin hücre bölünmesini engellediği ancak diğer büyüme yapılarını engellemediği görülmüş ve çok uzun filamanların ortaya çıktığı gösterilmiştir. Cisplatine ait bu bulgular 1965 yılında yayınlanmış ve 1968 yılında sarkomlu bir farede intraperitoneal cisplatin uygulaması sonucunda tümör boyutunda belirgin gerileme olduğu gözlenmiştir. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlanan ilaç Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi kurumundan 1978 yılında onay almıştır (Prestayko ve ark., 1980; Rosenberg ve ark., 1965; Sastry ve Kellie, 2005).

2.2.1.Cisplatinin Moleküler Yapısı Ve Özellikleri

Cisplatin “Cisplatin-diamminedichloroplatinum (II)” açık formüllü, kare düzlemsel geometriye sahip, amonyum ve klor atomları ile çevrili ağır metal (platin) koordinasyon bileşiğidir (Şekil 2.1). Bileşiğin cis ve trans olmak üzere iki izomeri vardır. Cis formu sitotoksiktir ve suda çözünme özelliğine sahiptir. Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı ya da sarı-turuncu kristal tozudur (Becit, 2017; Wang ve Lippard,2005).



Şekil 2.1. Cisplatinin moleküler yapısı (Lewis ve ark., 2012).

Cisplatin kemoterapisi; Cisplatin'in intraperitoneal veya intravenöz uygulanmasını içerir (Markman ve ark., 2001). Cisplatin'in, uygulama sonrası hemen hemen tüm dokulara ve hücre içi organellere dağıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlar böbrek, karaciğer ve bağırsakta, en düşük konsantrasyon ise beyinde bulunmuştur (Cayir ve ark., 2009; Kart ve ark., 2010). Hücre içinde cisplatin esas olarak sitosol, mitokondri, çekirdek ve lizozomlarda birirmektedir (Kuhlmann ve ark., 1997). Plazmada, toplam platinin sadece %2'si sulandırılmış formda bulunur; bununla birlikte cisplatin hücrenin içine girdiğinde bu oran %42'ye çıkmaktadır (Chirino ve ark., 2008). Düşük moleküler ağırlığı ve değişmeyen karakteri nedeniyle, uygulandıktan 5 gün sonra cisplatin'in %27-45'i idrar ile vücuttan atılır, kalan kısmı ise vücutta 50 güne kadar tutulur (Hassan ve ark., 2013).

Cisplatin, plazma gibi klorür içeriği yüksek olan ortamlarda stabil bir yapıda kalabilmektedir. Hücre içi klorür yoğunluğunun düşük olduğu ortamlarda, klorür atomlarını kaybederek, DNA ve diğer büyük moleküllerle kovalent olarak bağlanır ve reaktif elektrofillerini verir. DNA ile oluşturulan bu çapraz bağlar sayesinde, DNA sentez ve replikasyonunda bozulma ve bunun sonucunda çeşitli sinyal iletim yollarının aktive edilerek sitotoksik etkilerinin ortaya çıkması sağlanmış olur (Scovell ve ark., 1987). Cisplatin ayrıca hücre mitokondrisine de zarar verir. Mitokondriondan kalsiyum O_2 çıkışını artırır, aynı zamanda oksijen taşınmasını da artırarak solunum hızında artışa, dolayısı ile hipoksiye sebep olur. Hücre döngüsünü duraklatır, adenozintrifosfat (ATPaz) aktivitesini engeller, transport sistemlerini değiştirir ve sonuç olarak apoptozis, inflamasyon, nekroz ve hücre ölümüne sebep olur. Makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda ilacın etkisi ile artış gözlenir ve fibroze

neden olur (Sastry ve Kellie, 2005; Wang ve Lippard, 2005).

Cisplatin, TNF- α 'nın ekspresyonunu artırır ve TNF- α hücrede inflamasyona yol açarak apoptozisi indükler ve ROS üretimine katkıda bulunur (Akşit ve Bildik, 2008).

Cisplatin'in hücre içine alınışına yönelik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan ilk çalışmalarda CİSPLATİN'nin pasif difüzyon ile hücre içine girdiği öne sürülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise bakır transport proteini olan copper transporter 1'in (CTR1) CİSPLATİN'nin hücre içine aktif olarak alınmasında etkili olduğunu göstermektedir (Holzer ve ark., 2004; Wang ve Lippard, 2005).

2.2.2. Cisplatinin Farmakokinetiği

Cisplatinin gastrointestinal kanaldan emilimi yoktur, bu nedenle sadece intravenöz yoldan kullanılabilir. Cisplatin stabil olmayan bir bileşiktir. Plazma gibi klorid yoğunluğunun daha yüksek olduğu ortamlarda doğal yapısını korur ve hücre membranını geçebilir. Hücre içerisinde ise klorid yoğunluğu düşüktür ve klorid grupları hidroksil grupları ile veya su ile yer değiştirir. Bu durumda DNA ile reaksiyona giren daha reaktif pozitif yüklü ürünlerin oluşmasına neden olur (DeConti ve ark., 1973). DNA çift-zincirinde sarmal içi çapraz bağlar oluşturur. Böylece hücrede DNA sentezini inhibe ederek antineoplastik aktivite gösterir. Cisplatinin sitotoksik etkisi, nükleer DNA'ya bağlanması sonucunda transkripsiyon ve replikasyon mekanizmalarını engellemesi ile açıklanmaktadır (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2010; Wang ve Lippard, 2005). Cisplatinin modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutta ise, hücre tarafından tolere edilemez ve hücre ölümüne neden olur (Jordan ve Carmo-Fonseca, 2000). Cisplatinin neden olduğu oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri de mitokondrial hasar ve kaspaz 9 üzerinden apoptozisi tetiklemektedir (van Geelen ve ark., 2003). Cisplatin %90 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Kandan kaybolması iki fazlı bir seyir gösterir. İlk faz cisplatinin 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 5 günde ürünün

sadece % 27-43'lük kısmı değişmeden atılır. Karaciğer, böbrek ve prostatta yüksek oranda birirmektedir. Böbrek yetmezliğinde cisplatinin yarı ömrü uzamaktadır (DeConti ve ark., 1973). En çok karaciğer, böbrek ve prostatta birikir. Cisplatin anne sütüne, plevral sıvıya ve plasentayı geçer fakat kan-beyin bariyerinden geçişi iyi olmayıp eser miktardadır. Cisplatinin merkezi sinir sistemine geçiş oranı düşüktür. İnsan ve hayvan çalışmalarında ilk 24 saatte ilacın %80'inin idrarla atıldığı tespit edilmiştir. İlacın %8'i sonraki 24 saatte atılır. Cisplatinin safra kanalı yoluyla atılım oranı %10'un altındadır. Cisplatin, klorid yoğunluğu düşük solüsyonlarla hazırlandığında daha toksik olabilmektedir. Bu nedenle klorür konsantrasyonu yüksek olan serum fizyolojik ile hazırlanmalıdır (Bouliskas ve Vougiouka, 2003; Canal, 1998; Casper ve ark., 1979; Sleijfer ve ark., 1985). İntravenöz uygulamayı takiben, hızlı bir şekilde vücuda dağılır; böbrek ve karaciğer dokusunda yüksek yoğunlukta bulunurken, kaslar, mesane, pankreas, testis ve dalakta daha düşük, barsak, akciğer adrenal, kalp, beyin ve beyincikte en düşük yoğunluklarda bulunur. Cisplatin kullanımından sonra 4 ay süre ile böbrek dokusunda platin saptanabilir. Eliminasyon ömrü 60 saat olup, uygulamadan 2 saat sonra plazma cisplatininin %90'dan fazlası irreversibl bir şekilde proteinlere bağlanır. Non-enzimatik bir reaksiyonla metabolitlerine dönüşür. 50-100 mg/m² cisplatinin intravenöz bolus şeklinde enjeksiyonundan sonra, plazma eliminasyonu bifaziktir. İnsanlarda cisplatin yarılanma ömrü yaklaşık 2-5 gündür (Emmerson, 1996; Links ve Lewis, 1999).

Cisplatinin temel atılım yeri böbrekler olup fekal atılımı ise çok azdır. Böbreklerde en fazla cisplatin atılımı intravenöz infüzyondan sonraki 1 saat içinde görülür. Cisplatin plazma proteinlerine bağlanarak taşınır ve böbreklerden değişim göstermeden atılırlar. Bu nedenle böbrekteki cisplatin miktarı diğer organlara göre çok fazladır. Böbreklerdeki cisplatin birikim miktarı oksijen kullanımına bağlı olarak değişiklik gösterir. Böbreklerin korteks tabakasındaki hücrelerin sitoplazmasında birikim gösterir. Azalmış böbrek fonksiyonu ile plazma yarı ömrü artar (Safirstein ve ark., 1984).

Çeşitli organlar üzerinde bu istenmeyen toksik etkilerinin yanında risklerden biri de üreme sisteminde özellikle over veya testis hasarına bağlı olarak steriliteye yol açmasıdır. Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de

kolayca hasar alırlar (Hassan ve ark., 2013; Kayaalp 1994; Pogach ve ark., 1989).

2.2.3. Cisplatin Toksisitesi

Başta nefrotoksisite olmak üzere cisplatinin; hepatotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, miyelosupresif etki, geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi gibi doza bağımlı olarak yan etkileri vardır (Boulikas ve Vougrouka, 2003; Rybak ve ark., 2007).

2.2.4. Cisplatin Nefrotoksisitesi

Nefrotoksisite cisplatinin en önemli doz sınırlayıcı yan etkisidir (Arany ve Safirstein, 2003). Preklinik çalışmalarda bu etki saptanmış ve cisplatin tedavisinde yoğun hidrasyonun kullanılmadığı ilk protokollerde hastalarda ciddi ve geri dönüşümsüz böbrek hasarı görülmüştür (Gonzales-Vitale ve ark., 1977; Hanigan ve Devarajan, 2003; Schaeppi ve ark., 1973). Bir çalışmada tek doz 50-100 mg/m² cisplatin verildikten sonra hastaların %28-36'sında doza bağlı nefrotoksisite geliştiği gösterilmiştir (Reis ve Klastersky, 1986). Günümüzde de yoğun profilaktik önlemlere rağmen cisplatin alan hastaların üçte birinde geri dönüşümsüz böbrek hasarı oluşmaktadır (Santoso ve ark., 2003; Taguchi ve ark., 2005).

Cisplatin nefrotoksisitesi, kan üre azotu düzeyinde artış, GFR'de azalma, nonspesifik tübüler nekroz, spesifik olarak potasyum ve magnezyum kaybının yanı sıra proksimal tübülde histopatolojik olarak dejeneratif ve nekrotik lezyonların oluşumuyla karakterizedir. Ayrıca distal tübül ve toplayıcı kanallarda akut tübüler nekroz ve dilatasyon gelişmektedir (Sabuncuoğlu ve Özgüneş, 2010).

2.2.5. Cisplatin Nefrotoksisitesinde Mekanizmalar

Cisplatin özellikle düşük klor ortamında güçlü hücresel toksindir. Hücre dışı klorür konsantrasyonunda ise stabil bir yapıya sahiptir. Cisplatin pasif difüzyon ya da CTR1 gibi taşıyıcı proteinler aracılığı ile hücre içerisine girebilmektedir. Stoplazmadaki düşük klorür konsantrasyonu ile cisplatin hidrolize olmaktadır. Son derece elektrofilik olan hidrolize cisplatin, proteinlerin sülfidril grupları ve nükleik asitlerin azot verici bölgeleri gibi nükleofilik olan moleküller ile etkileşime girerek hücresel hasara neden olmaktadır. İndirgenmiş glutatyon (GSH), metallotiyonein,

metiyonin, proteinler ve pürin bazları, cisplatinin hücre içi hedeflerindendir (Boulikas ve Vougiouka, 2003; Dasari ve Tchounwou, 2014; Galluzzi ve ark., 2012).

Cisplatin, pürinlerin N7 reaktif merkezine bağlanarak DNA'da sarmal içi ve sarmallar arası çapraz bağlar oluşturarak sitotoksik etkisini göstermektedir. Çapraz bağların büyük bir çoğunluğu 1,2 sarmal içi d(CpG) ve d(ApG) yapılarıdır. Cisplatinin oluşturduğu DNA hasarı hücre döngüsünü G2 ve S fazında durdurarak, nükleotid eksizyon onarımı ve yanlış eşleşme onarımı gibi tamir mekanizmalarının devreye sokulmasını tetikler. DNA onarılamayacak kadar hasarlı bir halde ise Fas, p53, p73 ve Chk2 proteinlerinin aktivasyonu sağlanmakta ve hücre apoptoz mekanizması aracılığı ile ölmektedir (Eastman, 1987; Sancar ve ark., 2004; Vitale ve ark., 2011).

Cisplatin tedavisine bağlı olarak mitokondrilerde solunum zincirinin devamlılığının bozulması, mitokondrilerde kalsiyum çıkışının artması, kontraktil proteinlerin inaktivasyonu, ATP üretiminin azalması, sodyum (Na)⁺ potasyum (K)⁺ - ATP'az ve kalsiyum (Ca)⁺⁺/ magnezyum(Mg)⁺ ATP'az gibi değişik ATP'azların etkileneceği ortaya çıkar. Bu enzim aktivitesinin inhibisyonu ile Na⁺/K⁺ iyonlarının akımı etkilenecek hücre içi K⁺ seviyelerinde düşme gözlemlenebilir ve bu durum hücrel toksisiteye sebep olabilir (Singh, 1989; Halabe ve ark., 1991). Mitokondrial GSH azalması mitokondri içindeki sülfidril gruplarının kaybını da beraberinde getirir (Zhang ve Lindup, 1994).

Cisplatin nefrotoksitesinde mitokondrial DNA hasarı da önemlidir. Cisplatinin indüklediği nefropatide hemodinamik faktörler de önemli rol oynamaktadır. Cisplatin tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan platelet aktive edici faktörün (PAF) arteriolar ve/veya mezangial vazokonstriksiyona neden olarak renal kan akımı ve glomerular filtrasyon hızını (GFH) azalttığı bildirilmektedir. Cisplatine 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 (Dos Santos ve ark., 1991a; Dos Santos ve ark., 1991b; Zhang ve Lindup, 1993).

Cisplatin toksisitesinde rol alan önemli mekanizmalardan biri de oluşan

oksidatif stres ve buna bağılı hücresele olaylardır. Cisplatin, özellikle potent bir serbest radikal olan hidroksil radikalının üretimini artırır. Hidroksil, glutasyon gibi hücre içi antioksidan depoları tüketir, diğere serbest radikaller gibi doğrudan lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenleri üzerinde etki gösterir ve yapılarını bozar (Masuda ve ark., 1994; Townsend ve ark., 2003). Cisplatin ile indüklenen mitokondriyal fonksiyonel hasar, bozulmuş solunum zinciri yoluyla ROS aşırı üretilmesine ve hücresele oksidatif stresin indüklenmesine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi cisplatin tedavisinin dozu ve süresine bağılıdır (Yanez ve ark., 2003). Cisplatinin yapılan çalışmalarda böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu oluşturarak oksidan ve antioksidan parametrelerde anlamlı ($p < 0,05$) değışiklere yol açtığı bildirilmiştir (Söğüt ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2003).

2.3. Punicalagin

Gıda maddelerinin biyoaktif bileşikleri olan fitokimyasallara günümüzde artan oranda ilgi gelişmektedir (Doig ve ark., 1990). Polifenoller de bitki esaslı gıdalarda bulunan en önemli fitokimyasallardır (Viladomiu ve ark., 2015). Polifenoller genelde birçok bitkide bulunmasının yanı sıra yenilebilir bitkilerde daha fazla bulunduğu ortaya konmuştur. Diyetle tüketilen polifenoller kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi dejeneratif hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Polifenollerin sağık üzerindeki etkileri, birçok faktöre (miktarına ve biyoyararlanımına) bağılı olarak değışir (Manach ve ark., 2004). Diyetledeki polifenoller, basit moleküllerden (monomerler ve oligomerler) polimerlere kadar geniş bir yapı çeşitliliğine sahiptir. Yüksek moleküler ağırlıklı yapılar genellikle taninler olarak adlandırılır ve proteinlerle etkileşime girme kabiliyetine sahiptir. Yoğunlaştırılmış tanenler, bitkilerde geniş dağılım gösterir ve gıda kalitesine etki ettiği için önemlidir (El Gharras, 2009).

Tanenler hayvan organizması tarafından sentezlenemeyen bitki kaynaklı polifenollerdir. Bununla birlikte, bitkilerde zararlı dış etkenlere karşı koruyucu maddeler olarak da bulunurlar. Tanenler, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu; oksijen radikallerinin temizlenmesi; Fe ve Cu gibi pro-oksidatif metallerin bağlanması ve inaktivasyonu ve proteinlerin enzimatik aktivitelerinin bastırılması ile bağlanması (proteaz inhibisyonu) gibi etkiler gösterirler. Bu indirgeyici faaliyetlerle, kendileri okside olurlar. Tanenler meyve ve sebzelerin kabuğunda yoğunlaşan diyetin

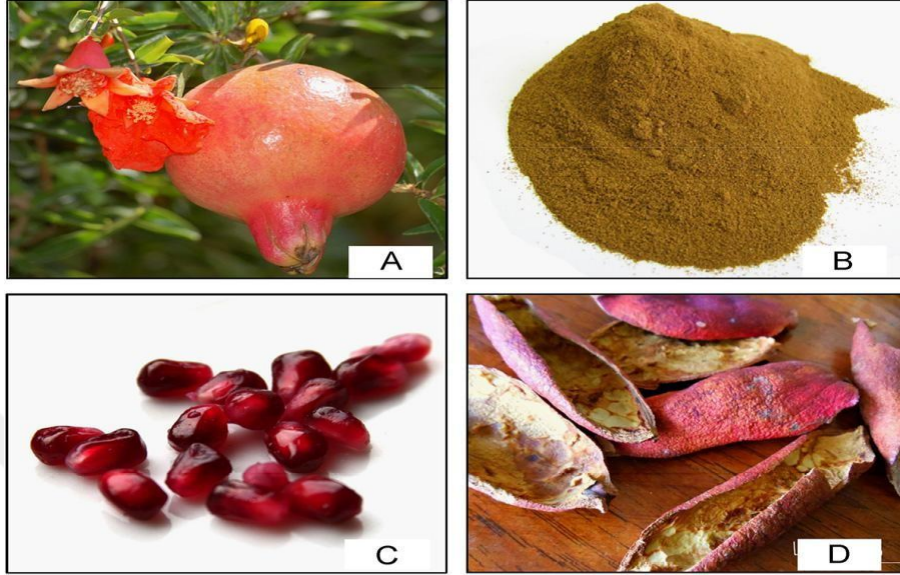
önemli bileşenlerindendir. Diyetle aşırı miktarda bulunan tanen, gastrointestinal sistemdeki proteinler ile kompleksler oluşturarak bitki temelli proteinlerin enzimatik parçalanmasını önler (Hassig ve ark., 1999). Bitki sekonder bileşiklerinin önemli bir grubunu oluşturan tanenler; hidrolize edilebilir tanenler (gallotanenler ve ellagitanenler), kompleks tanenler ve kondense tanenler (KT) olarak 3'e ayrılırlar. Gallotanenler (GTs) ve ellagitanenler (ET) kimyasal olarak hidrolize olabilen tanenler (HT)'dir (Adamczyk ve ark., 2017; Khanbabaee ve van Ree, 2001). Gallotanninler, bir polifenolik ve bir poliol kalıntısı içeren en basit hidrolize olabilen tanendir. Ellagitanenler de en az iki galloil biriminin oksidatif bağlanmasıyla gallotanenlerden oluşurlar. Ellagitanenler şimdiye kadar bilinen tanenlerin kimyasal yapı olarak en büyük grubunu oluşturur (Khanbabaee ve van Ree, 2001). Ellagitanenler özellikle nar meyvesinde bulunan biyoaktif polifenollerdir. Bütün meyveyi sıkarak elde edilen nar suyu, yaygın olarak tüketilen meyve suyundan daha yüksek konsantrasyonda ET içerir. Ellagitanenler içinde ise bilinen en büyük molekül ağırlığına sahip polifenol grubu bileşiği punicalagindir (Heber, 2011) .

2.3.1. Punicalagin'in Kaynakları

Punicalagin, başlıca nar (*Punica granatum*) meyvesinin (Şekil 2.2) değişik kısımlarında bulunan ve narın biyoaktif etkilerinin çoğundan sorumlu bir ellagitannindir. Nar kabuğu, geleneksel Çin tıbbında antibakteriyel, anti-inflamatuar ve hemostatik bir ajan olarak kullanılmıştır (Lu ve ark., 2008). Bununla beraber punicalagin *Terminalia* ve *Combretum* cinsleri de dahil olmak üzere *Combretaceae* ailesinin üyelerinde de bulunmuştur. *Terminalia* cinsinden; *Terminalia catappa*, *Terminalia oblongata* ve *Terminalia myriocarpa* da bulunurken *Combretum* cinsinden; *Combretum molle*'de bulunur. Ayrıca *Anogeissus leiocarpus* bitkisinde de bulunduğu bildirilmiştir. *Anogeissus leiocarpus* ve *Terminalia catappa* bitkilerinin yapraklarında bulunur (Anand ve ark., 2015; Gill ve ark., 2000; Heber, 2011; Waterman ve ark., 2015).

Punicalagin nar bitkisinde en fazla bulunan polifenoldür (Lu ve ark., 2008). Punicalagin *P. granatum*, *Terminalia mollis* ve *Terminalia brachystemma*'dan da *Candida albicans*'a karşı antifungal etkili olarak tanımlanmıştır (Foss ve ark., 2014). *Terminalia* türleri çeşitli hastalıkların tedavisinde tropik ve subtropik bölgelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Afrika'da *Terminalia mollis* ishal, gonore, sıtma ve

HIV tedavisinde yardımcı ilaç olarak kullanılmaktadır, *T. brachystemma* da şistozomiyaz ve gastrointestinal bozuklukların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır (Liu ve ark., 2009).



Şekil 2.2. Nar meyvesi (A), nar kabuğu tozu (B), nar tanesi (C), kurutulmuş nar kabuğu (D) (İsmail ve ark., 2012).

Punicalaginın nar kabuğundaki seviyesi, yetiştiği bölgeye bağlı olarak farklılık gösterirken, işleme ve depolama koşulları da kabuktaki punicalagin miktarını etkiler (Lu ve ark., 2008; Gomez-Caravaca ve ark., 2013). Nar suyunda yüksek oranda bulunan punicalagin ticari meyve sularında bütün nar meyvesinin preslenmesiyle meyve suyuna geçer ve 2 g/L düzeyine kadar ulaşır (Adams ve ark., 2006; Gill ve ark., 2000). Narın preslenmesi ile elde edilen nar suyunun antioksidan aktivitesinin % 92 sinin nar kabuğunda bulunan ve hidrolize olabilen tanenlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (Tzulker ve ark., 2007).

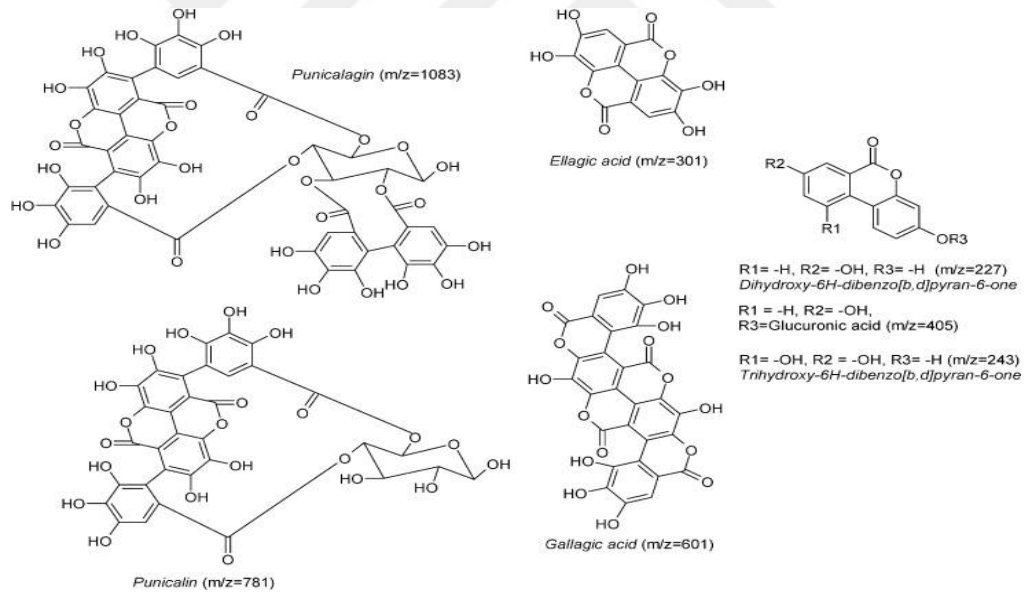
Punicalagin nar kabuğunun haricinde nar suyundan ve ağaç kısmının kök ve kabuk kısmından izole edilmiştir. Nar bitkisinde bulunan meyve, kabuk, septa gibi bitki kısımlarından elde edilen ekstratlar antioksidan özellik gösterir. Nar suyunun bu güçlü antioksidan aktivitesinin %50'sinden daha fazlası punicalaginden kaynaklanır (Adams ve ark., 2006; Bell ve ark., 2008).

Bir bardak nar suyu (200 mL) yaklaşık 1g, ahududu püresi (100 g ahududan elde edilen) yaklaşık 300 mg, 1 adet çilek 70 mg ve 4 adet ceviz yaklaşık 400 mg ellagitanen sağlayabilir (Larossa ve ark., 2010).

2.3.2. Kimyasal Yapı ve Fiziksel Özellikleri

Punicalagin, özellikle nar kabuğunda bulunur ve nar kabuğuna sarı rengini verir. İşleme esnasında meyve suyuna geçer ve ellagik asite hidrolize olabilir. Punicalagin, bir polifenolik bileşik olarak oldukça büyük bir moleküler yapıya sahiptir (Cerde ve ark., 2003; Heber, 2011).

Yapısal olarak, punicalagin, bir gallagik asit kısmı ve glikoza bağlı bir ellagik asit kısmından oluşur (Şekil 2.3). Punicalaginın yapısı 2 reversibl anomer formunda bulunur. Bunlar punicalagin A ve punicalagin B'dir (Doig ve ark., 1990).



Şekil 2. 3. Punicalagin'ın kimyasal yapısı ve metabolitleri (Cerde ve ark., 2003).

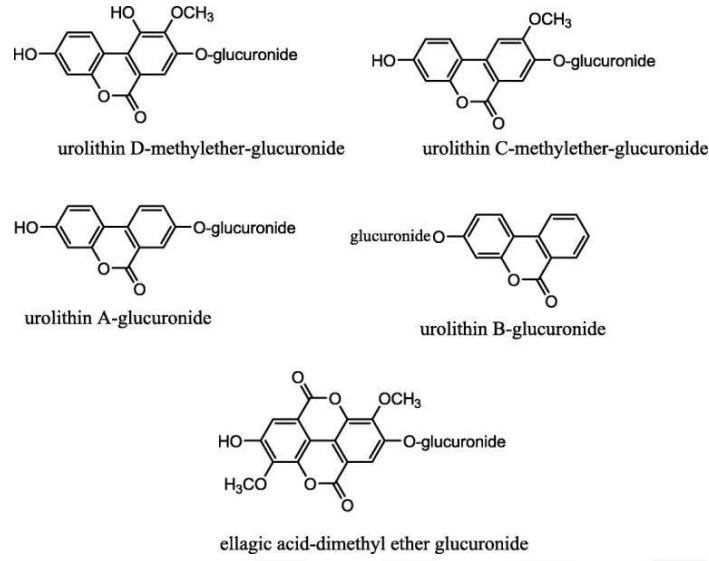
Punicalaginın moleküler formülü $C_{48}H_{28}O_{30}$, moleküler ağırlığı 1084.722 g/mol'dür. Sarı toz halinde bulunur. Metanolde, 5 mg / mL berrak bir çözelti oluşturur (Sohrab ve ark., 2014). Punicalagin yüksek antioksidan etkisinden sorumlu 16 ayrışabilir -OH grubuna sahiptir (Shin ve ark., 2017).

Punicalagin A ve B formları, 2,3- (S) -heksahidroksidifenil-4, 6-(S,S)-

gallagil-d-glikozun polifenolik hidrolize olabilen tanenleri ve izomerleridir. Suda çözünebilen punicalagin, normal fizyolojik koşullar altında ince bağırsakta polifenolik bileşikler halinde hidrolize olur. Hidroliz sonrasında gallik asit ve ellagik asit salınır (Larossa ve ark., 2010; Lei ve ark., 2007).

2.3.3. Farmakokinetik

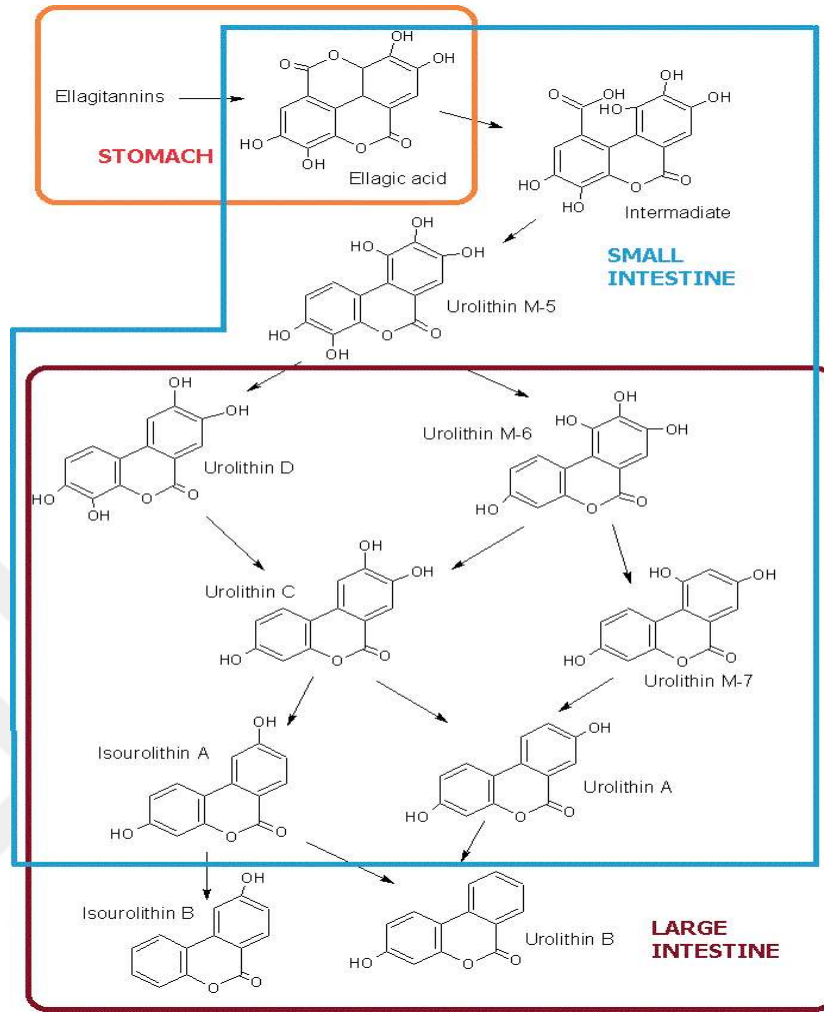
Ellagitanenler genel olarak iyi emilmezler. Asidik koşullar (HCl, pH 1.8-2.0) ve mide enzimleri ellagitaneni hidrolize etmez. Midenin serbest ellagik asit emilimi için ilk önemli yer olduğu düşünülmektedir (Larossa ve ark., 2010). Ellagitanenler bağırsakta ellagik asiti serbest bırakarak büyük oranda bakteriler tarafından metabolize edilerek dibenzopiranonlara (ürolitinlere) dönüşür (Heber, 2011). Mikrobiyal transformasyon ince bağırsaklarda anaerobik bakteriler aracılığıyla başlar, daha sonra hidroksil gruplarının ürolitin A (3,8- dihydroxydibenzopyran-6-one) ve ürolitin B (monohydroxydibenzopyran-6-one)'ye ayrılmasıyla kolonun distal kısımlarında tekrar biyotransformasyona uğrar. Bunun yanında ürolitin C ve D olmak üzere üç ve dört fenolik hidroksi gruplara sahip ürünler ince bağırsaklarda bulunur (Şekil 2.4-2.5). Emilen metabolitler glukuronik asit ile konjuge edilip daha sonra bir metil grup eklenerek atılır. Bu konjugatlar idrar veya safradan atılmadan önce karaciğerde metabolize olur (Espin ve ark., 2007). Ürolitin A ve B konjugatları plazma ve idrarda tespit edilen ana metabolitlerdir. Ellagitaninlerin mikrobiyal transformasyon sonucu oluşan metabolitleri daha sonra faz I (hidroksilasyon) ve/veya faz II (metilasyon, glukuronidasyon ve sülfasyon) enzimleri ile metabolize edilip idrarla daha kolay atılabilen ve suda çözünebilir bileşikler haline dönüştürülür. Mikrofloranın transformasyon ürünleri olan ürolitin metabolitleri potansiyel endokrin bozucu moleküllerdir. Bunlar enterofitoöstrojen olarak tarif edilen ürünlere benzer ve potansiyel östrojenik ve antiöstrojenik etkilere sahip olabilir (Aqil ve ark., 2011; Cerda ve ark., 2003; Larossa ve ark., 2010; Quideau, 2009). Yapılan bir çalışmada punicalagin'in farmakokinetik incelemesinde biyotransformasyon tepkimesinde rol alan sülfat konjugasyosununu inhibe ettiği dolayısıyla diğer ilaçlarla birlikte kullanılırken bu ilaçların biyoyararlanımını değiştirebileceği rapor edilmiştir (Saruwatari ve ark., 2008).



Şekil 2.4. Ürolitin A, Ürolitin B, Ürolitin C ve Ürolitin D'nin kimyasal yapısı (Larossa ve ark., 2010).

Punicalagin hem ratlarda hem de insanlarda düşük oranda bir biyoyararlanıma sahiptir. Punicalaginın düşük biyoyararlanımı büyük moleküler yapıda olması ve lipit su partisyon katsayısının düşük olmasından kaynaklanır. Bu durum punicalaginın gastrointestinal sistemden emilimini sınırlandırır. Ayrıca, punicalagin sağlıklı insanların kolonik mikrofloraları tarafından metabolize edildiğinde biyoyararlanımı artarken, nispeten zayıf antioksidan formu olan oksijen- 6-hidroksibenzopiran-6-one türevlerine metabolize olurlar (Vora ve ark., 2015).

Punicalagin içeren diyetle beslenen ratlarda punicalagin saf halde %3-6 oranında idrar ve dışkıda 37 gün boyunca tespit edilmiştir. Alınan punicalaginın büyük çoğunluğu ellagik asit türevleri metaboliti 6H-dibenzo- [b,d]pyran-6-one şeklinde atılır. Plazmada punicalagin direkt olarak tespit edildiği gibi ayrıca ellagik asidin metil eter türevlerinin glukuronidleri şeklinde de tespit edilmiştir. Dışkıda, punicalagin sıçan mikroflorası tarafından hidroliz ürünlerine ve kısmen metabolitleri olan 6H-dibenzo- [b, d] piran-6-on türevlerine dönüştürülür. İdrarda gözlenen temel metabolitler, aglycones veya glukuronid olarak 6H-dibenzo [b, d] piran 6-one türevleri şeklinde bildirilmiştir (Cerde ve ark., 2003).



Şekil 2.5. Ellagitanenlerin ince ve kalın bağırsakta mikrobiyal biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitleri (Lipinska ve ark., 2014).

2.3.4. Radikal Süpürücü ve Antioksidan Etki

Punicalagin'in antioksidan etkilerini bildiren birçok çalışma mevcuttur. Punicalagin'in antioksidan etkisini bildiren çalışmalar genellikle nar meyvesinin çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktların çalışılmasıyla ortaya konulmuştur. Punicalagin'in sahip olduğu antioksidan kapasite, yapısındaki hidroksil (OH) gruplarından kaynaklanmaktadır (Kulkarni ve ark., 2007).

Punicalagin, süperoksit anyonu, singlet oksijeni ve hidroksil radikal temizleme aktivitesine ve lipit peroksidasyonunu inhibe edici aktiviteye sahip olan güçlü bir serbest radikal süpürücüdür (Vora ve ark., 2015).

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikal süpürücü aktivite testi standart olarak farklı polifenollerin serbest radikal süpürme etkinliğini ölçmek için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda punicalagin doza bağlı olarak güçlü bir DPPH radikal süpürücü aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu radikali inhibe etme yüzdesi 0.05, 0.1 ve 0.15 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla %12.5 %23.9 ve %30.8 olarak tespit edilmiştir. Bu oranda radikal süpürücü etki BHT= butylated hydroxytoluene (sentetik antioksidan)'ye eş değer bulunurken, trolox (doğal antioksidan) ile karşılaştırıldığında bir miktar düşük olduğu tespit edilmiştir. Radikal süpürücü etki, (DPPH[•] radikalinin non-radikal formu olan DPPH-H formuna dönüşümü) punicalagin DPPH[•] radikaline bir hidrojen atomu vererek DPPH-H'e indirgemesiyle gerçekleştirir. Punicalagin serbest radikal süpürme aktivitesi, serbest radikallere bir elektron vererek bu radikalleri nispeten daha kararlı bileşiklere dönüştürmesiyle ortaya çıkar (Lei ve ark., 2007). Hidrojen peroksit (H₂O₂) süpürücü aktivitesi bakımından incelendiğinde punicalaginde bulunan fenolik grupların varlığı H₂O₂'e bir elektron vererek bu radikali H₂O'ya dönüştürme esasına dayanır. Punicalagin 0.05, 0.1 ve 0.15 mg/ml konsantrasyonlarda sırasıyla H₂O₂ yi süpürme yüzdesi %11, %17 ve %18 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermektedir ki doza bağlı olarak punicalagin H₂O₂'i süpürücü etkisi artmaktadır. Punicalagin H₂O₂'i süpürücü etkisi BHT ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunurken trolox ile karşılaştırıldığında ise herhangi bir istatistikî fark bulunamamıştır. Ferröz demir (Fe⁺²) H₂O₂ ile şelat oluşturarak daha etkin olan HO (hemoksijenaz)'ın ortaya çıkmasına neden olur. Fe⁺² değerli demir iyonu hücrede yüksek derecede reaktif bir iyon olup fenton reaksiyonu ile serbest radikal oluşumunu indükleyebilir. Reaksiyon sonucu oluşan •OH radikali hücrede lipid peroksidasyonuna sebep olabilir. Punicalagin ferröz (Fe⁺²) şelasyon yapıcı etkisi incelendiğinde yapısında bulunan fenolik bileşiklerdeki hidroksil grupların varlığına bağlı olarak Fe⁺² ve Cu⁺² gibi metal iyonlarını bağlayarak serbest radikal oluşumunu önler. Antioksidan aktivitenin ölçümünde kullanılan indirgeme gücü testi (reducing power assay) biyoaktif bir bileşiğin elektron verebilme kapasitesini ölçen testtir. Bu test ferik demir (Fe⁺³)'in Fe⁺² tiyosiyanat formuna indirgenmesini ölçer. Punicalagin indirgeme gücü testinde Fe⁺³→Fe⁺² doza bağlı olarak artan bir şekilde indirgeme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Her bir punicalagin molekülünün 16 adet fenolik hidroksil grubu taşıması punicalagin yüksek indirgeme kabiliyetini gösterir (Aloqbi ve ark., 2016; Sun ve ark., 2017).

Lin ve arkadaşları (2001), asetominofen ile indüklenmiş karaciğer hasarıyla ilgili bir çalışmada, Asetominofen uygulamasının ardından serum AST ve ALT düzeylerinde artış görülmüştür. Punicala ve Punicalagin uygulamasıyla ALT ve AST değerlerinin düştüğü kaydedilmiştir. Hasarın önlenmesinde punicalagin antioksidan etkisinin rol aldığı bildirilmiştir.

Aqil ve ark. (2012), akciğer dokusunda tespit ettikleri vücudun kendi ürettiği güçlü antioksidanlardan biri olan glutatyon düzeyini yem ile verilen punicalagin, belirgin olarak arttırdığını bildirmişlerdir.

Punicalagin'in insan trofoblastlarında anti-apoptoz ve anti-oksidatif etkileri olduğu bildirilmiştir. Oksidatif strese duyarlı hale gelen villus hücrelerinin punicalagin ile maruziyeti sonucu proliferasyon ile sitotrofoblastların arttığı görülmüştür. Punicalagin trofoblast farklılaşmasını arttırdığını ve plasental fonksiyon bozukluğu riski taşıyan gebeliklerde punicalagin terapötik olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Punicalagin gelişmiş otofaji, azalmış apoptoz ve diferansiyel gen ekspresyonu ile trofoblastları ve embriyoları oksidatif stresten koruduğunu bildirmişlerdir (Chen ve ark., 2016; Chen ve ark., 2012).

2.3.5. Antikarsinojenik Etkisi

Nar ürünleri içerisinde bulunan ellagitanenler özellikle punicalagin son yıllarda güçlü antitümörjenik aktiviteleri ile öne çıkan biyoaktif moleküller olarak rapor edilmiştir. Punicalagin akciğer, göğüs, prostat ve servikal hücrelerde güçlü bir anti-kanser aktivitesi sergilediği bilinmektedir. Narın polifenol fraksiyonu bir dizi kanser hücre hattında antiproliferatif ve proapoptotik etkilere sahiptir. Karsinogenezin oluşumuna aracılık eden vasküler endotelial büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörleri ve sitokin ile uyarılmış NF- κ B gibi çeşitli mediyatörler *in vitro* olarak narın içinde bulunan ellagitanen ve punicalagin tarafından engellenmektedir (Lei ve ark., 2007; Vlachoianis ve ark., 2015).

Adaramoye ve ark. (2017), punicalagin prostat kanser modeli olan Pca hattı hücrelerinde apoptozis indüksiyonu ve antianjiojenik etki ile antiproliferatif etkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Punicalagin'in konsantrasyona bağlı olarak DPPH radikalini süpürdüğünü ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.

Nar suyunda bulunan polifenoller arasında, punicalagin, daha önce bildirildiği gibi, nar suyunun gözlemlenen antioksidan özelliklerine büyük ölçüde katkıda bulunan en güçlü antioksidan bileşen olduğunu rapor etmişlerdir (Seeram ve ark., 2005). Ayrıca, punicalagin, prostat kanser hücre hattı PC-3 ve LNCaP'da hücre canlılığını inhibe ederken normal prostat hücre hattı olan BPH-1'deki canlılığı etkilemediğini göstermişlerdir. Punicalagin prostat kanser modelinde normal hücreleri etkilemezken seçici olarak kanser hücrelerinin canlılığını önlemektedir (Adaramoye ve ark., 2017).

Punicalagin, çeşitli tümör tiplerinde etkili bir anti kanser ajan olarak bilinmektedir. Punicalagin, apoptozun indüklenmesi yoluyla prostat kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde hücre büyümesini engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, son zamanlarda punicalagin papiller tiroid karsinomu hücre hattında (BCPAP) apoptozdan bağımsız olarak otofajik hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Punicalagin'in BCPAP hücrelerinde DNA hasarını indüklediği gösterilmiştir (Yao ve ark., 2017).

Punicalagin, kolon kanser hücre hattı olan Caco-2 hücrelerinde hücre döngüsünü S evresinde durdurduğu ve hücre apoptozunu indüklediği buna karşın punicalagin normal kolon hücre hattında (CCD-112CoN) bu etkilerin görülmediği bildirilmiştir (Larossa ve ark., 2006).

Seeram ve ark. (2005), nar suyu, nardan ekstrakte edilen punicalagin, ellagik asit ve total nar tanenleri ile yaptıkları karşılaştırmalı bir çalışmada insan oral, prostat ve kolon tümör hücrelerinde canlı hücre sayısını azalttığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, saf nar suyu ile daha üstün etkinlik elde edildiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, nar suyu, punicalagin, ellagitaneoller ve toplam nar tanenleri HT-29 (kolon kanser hücre hattı) hücrelerinde apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur.

Aqil ve ark. (2012), punicalagin akciğer kanseri, meme kanseri ve serviks kanseri hücrelerinde ve hücre hatlarında doza bağımlı bir şekilde hücre üremesini engellediğini bildirmiştir. Akciğer kanseri hücrelerinin punicalagine en duyarlı hücreler olduğunu servikal kanser hücre serisinin ise en dirençli hücreler olduğunu gözlemlemişlerdir. Punicalagin doğrudan DNA ile etkileşime girmese de, hidroliz

ürünü ellagik asitin DNA ile kovalent bağ yaparak oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir.

Diğer bir çalışmada Aqil ve ark. (2012) punicalaginin Benzo [a] piren (BP) uygulanmış ratların akciğer dokusunda BP'nin metabolizmasında rol alan başlıca enzimler olan CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 ve GSTM (glutatyon S transferaz μ)'nin ekspresyonunun inhibisyonuyla DNA adüktlerini inhibe ettiğini bildirmiştir. Uygulama yolu farketmeksizin punicalagin uygulamasının CYP1A1 ekspresyonunda %20-30 azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Punicalagin BP tarafından indüklenen DNA adüktleri P450 enzim aktivitesini veya faz II enzimlerini inhibe ederek veya alternatif olarak da benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide (anti-BPDE) ile direkt konjugasyon yoluyla inhibe etmektedir.

2.3.6. Diğer etkileri

Punicalagin, *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia*' ya karşı antiplazmodiyal aktiviteye (Foss ve ark., 2014), bağırsak florasındaki *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* ve bunların yanı sıra *Vibrio cholerae* gibi enterik patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelere sahiptir (İsmail ve ark., 2012). Ayrıca punicalaginin patojenik *Klostridia*, *Staphylococcus aureus* gelişimini inhibe ettiği (Bialonska ve ark., 2009) ve dış çürüklerine neden olan *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* gibi karyojenik bakteriler üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Millo ve ark., 2017).

Nar ekstresinin, norovirüs, influenza virüsü, HIV-1 ve poksvirüslere karşı antiviral etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Seeram ve ark., 2005). Punicalagin, önemli bir sitotoksik etki göstermeden μ M konsantrasyonlarda insan sitomegalovirüsü (HCMV), hepatit C virüsü (HCV), dang virüsü (DENV), kızamık virüsü (MV) ve solunum sinsityal virüsü (RSV) ile oluşturulan enfeksiyonları yok etmede etkili bulunmuştur (Lin ve ark., 2013).

Nar kabuğu ekstraktı ve çinko sülfat (ZnSO₄) kombinasyonunun *Herpes simplexvirus-1* (HSV-1), *Herpes simplex virus-2* (HSV-2) ve aciclovir-resistant HSV-1 viruslarına karşı güçlü antiviral etkinlik gösterdiğini bildirmiştir (Houston ve ark., 2017).

Punicalaginın enterovirüs 71 üzerindeki antiviral etkisini araştırılmış ve punicalaginın rabdomiyosarkom hücrelerinde enterovirus 71 virusünü doza bağımlı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 2012).

Punicalaginın hücre yüzeyi glikozaminoglikanları ile herpes simplex 1 virüsü glikoproteinleri arasındaki etkileşimi bloke ederek herpes simplex 1 virusunun hücre içine girişini ve yayılmasını engellediği gözlemlenmiştir (Lin ve ark., 2011).

Punicalagin, fitopatojenik funguslara karşı aktiftir. Foss ve ark (2014) nar kabuğunun ekstresi ve punicalaginın, *Trichophyton rubrum*'a ve *Microsporum*'a karşı yüksek derecede antifungal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (2009), Punicalaginın *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei*'ye (MIC = 6.25 µg / mL) karşı ve *C. albicans*'a (MIC = 12.5 µg / mL) karşı çok yüksek antifungal aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Punicalagin, tümör nekroz faktör α (TNF- α), interlekin 6 (IL-6) gibi inflamatuvar genlerin transkripsiyonunda azalmaya neden olur. Ayrıca yapılan bir çalışmada pro-inflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu düzenleyen faktörleri inhibe ederek inflamasyonu engellediği bildirilmiştir (Patel ve ark., 2008).

Punicalagin, antioksidan etkisinden ötürü LDL oksidasyonunu inhibe etme ve böylece arteriyel köpük hücre seviyelerinin belirgin bir azalması ile aterosklerozun ilerlemesini geciktirme veya durdurma potansiyeline sahiptir (İsmail ve ark., 2012).

Ratlarda asetaminofen ve karbon tetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı punicalaginın koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Lin ve ark., 1998).

Siklofosfamid ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlarda punicalaginın karaciğer koruyucu etkisi araştırılmıştır. Punicalagin, siklofosfamid uygulamasıyla aynı günden başlanarak, 7 gün boyunca 15 ve 30 mg/kg/gün olarak iki doz halinde verilmiştir. Punicalagin, AST, NF- κ B, p65, TNF- α , IL-1 β , malondialdehit, nitrik oksit, Bax/Bcl-2 oranı, indüklenabilir nitrik oksit sentaz ve kaspaz 3 ve 9'un gibi parametrelerde görülen artışları doza bağımlı olarak azalttığı bildirilmiştir (Fouad ve ark., 2016).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, farelere başlangıçta *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* (*S. typhimurium*) verilmiş ve sonra da punicalagin ile tedavi edilmiştir. Enfeksiyondan 8 gün sonra, farelerin dokulardaki patojen sayıları, hematolojik parametreleri, sitokin seviyeleri ve histolojik değişiklikleri incelenmiştir. Sadece *S. typhimurium* ile enfekte olan farelerle karşılaştırıldığında, punicalagin ile tedavi edilen farelerin daha fazla gıda tüketimi ve daha az kilo kaybı olduğu gözlemlenmiştir. Karaciğerdeki TNF- α , IL-6, IL-10 ve IFN- γ düzeylerinin punicalagin ile azaltıldığını rapor etmişlerdir. Punicalagin ile tedavi edilen farelerde daha fazla nötrofil ve daha yüksek nötrofil-mononükleer hücre oranları gözlemlenmiştir. Histolojik incelemede karaciğerdeki ve dalaktaki hemorajik nekrozlu hücreleri punicalagin koruduğu görülmüştür (Li ve ark., 2015).

Tip II diabetli hastalarda yapılan bir çalışmada 1561 mg/l punicalagin içeren nar suyunun tüketimi sonrası diyabetik parametrelere bakılmıştır. Diyabetik hastalarda kan Hb A1c düzeyinin kontrol gruplarına göre %59 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Rosenblat ve ark., 2006). Punicalagin hipertansif ve tip 2 diyabetli hastalarda lipid peroksidasyonunu, sistolik kan basıncını ve serum anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesini düşürmektedir (Basu ve Penugonda., 2009).

Punicalagin, lipopolisakkarit kaynaklı nöroinflamasyon ve amiloidogenezi azaltan etkisiyle Alzheimer Hastalığının tedavisinde kullanılabilecek bir adaydır. Nöroinflamasyon ve amiloidogenez (anormal proteinin birikmesi) Alzheimer hastalığının başlıca semptomlarıdır. Punicalagin, NF- κ B'ye doğrudan bağlanarak aktivasyonunu inhibe eder. Hücrede bulunan NF- κ B'nin aktivasyonu iltihaplanma ve amiloidogenez yollarını indükleyebildiğinden punicalagin Alzheimer Hastalığının tedavisinde kullanılabilecek bir fitokimyasaldır (Kim ve ark., 2017).

Oral olarak etanol ile muamele edilen ratlarda punicalagin gastroprotektif özelliğinin incelendiği bir çalışmada punicalagin etanol ile indüklenen serbest radikal oluşumundaki artışı ve antioksidan aktivitede görülen azalmayı önlemiştir. Punicalagin TNF- α gen ekspresyonu ve inflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α , IL-1 β , IFN γ mukozal seviyelerinde düşüşe yol açarken IL10'un mukozal düzeyini artırmıştır. Punicalagin etanol kaynaklı mide ülseri üzerindeki gastroprotektif etkisi nitrik oksit ve münin içeriğinin yenilenmesinin yanı sıra, mukozal oksidatif stresin ve

inflamasyonun NFκB yolağının baskılanmasıyla oluştuğu tespit edilmiştir (Katary ve Salahuddin, 2017).

2.3.7. Toksisite

Punicalagin, olası toksik etkileri farklı çalışmalarda incelenmiştir. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada diyetlerinde ortalama % 6 punicalagin bulunacak şekilde 37 gün boyunca beslenmişlerdir. Punicalagin ile beş hafta tekrarlanan oral uygulamaların sonucunda ratlar için toksik olmadığını belirlenmiştir (Cerde ve ark., 2003) .

% 30 punicalagin içeren 600 mg/kg nar ekstraktının etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, nar ekstresinden 180 mg/kg/gün punicalagin alımı olacak şekilde verilmiştir. Nar ekstraktının oral gavaj uygulamasını takiben elde edilen bulgular, nar ekstraktı uygulamasının herhangi bir yan etki oluşturmadığı göstermiştir (Patel ve ark., 2008).

Gebelikte nar suyunun güvenliği konusunda kontrollü bir çalışma bulunmamakla birlikte, gebe olmayan insan çalışmalarında 1.400 mg'a kadar nar polifenolü özleri güvenli olarak tanımlanmıştır (Khateeb ve ark., 2010).

Punicalagin'in sitotoksitesini belirlemek için, bir çalışmada Mel-Ab hücreleri 24 saat boyunca punicalagin ile inkübe edilmiştir. Hücre canlılığı, kristal mor renkli tahlil kullanılarak ölçülmüş ve punicalagin'in Mel-Ab hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (Shin ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda ratlar tarafından tekrarlanan punicalagin tüketiminden sonra toksik etkilere rastlanmamış ve organlarda histopatolojik analizler yapılarak teyit edilmiştir. Akut veya subkronik yaklaşımdaki nar suyu uygulaması sıçanlarda olumsuz etkilere neden olmamıştır (Viladomiu ve ark., 2013). Wistar ırkı ratlarda yapılan subkronik bir çalışmada, gavaj yolu ile sırasıyla 60, 240 ve 600 mg/kg dozlarında 90 gün boyunca nar ekstresi uygulanmıştır. Ekstraktın uygulanması, klinik gözlemlerde vücut ağırlığı artışında, yem tüketiminde, klinik patoloji değerlendirmelerinde ve organ ağırlıklarında toksikolojik bir değişikliğe neden olmadığa kaydedilmiştir. Aynı çalışmada nar ekstraktının subkronik oral LD₅₀

dozunun sıçan ve farelerde vücut ağırlığı başına 5 g/kg olduğu bildirilmiştir. Intraperitoneal LD₅₀ dozu sıçanlar ve fareler için sırasıyla 217 mg/kg ve 187 mg/k olarak belirlenmiştir. Böylelikle sağlıklı bir insan için risk taşımayan nar suyunun tüketebileceği gösterilmiştir (Patel ve ark., 2008).

Nar çekirdeği yağı ile yapılan akut oral toksisite çalışmasında 2000mg/kg dozda herhangi bir etki oluşturmadığı gözlenmiştir. 0, 10.000, 50.000 ve 150.000 ppm dozlarında diyetle alınan nar çekirdeği yağı 28 gün boyunca Wistar ratlara diyetle verildiğinde sadece 150.000 ppm doz grubunda serum AST ve ALT enzimlerinde ve karaciğer/vücut ağırlığı oranında artış gözlenmiştir. NOEL seviyesi 50.000 ppm yani 4.3g olarak belirlenmiştir (Meert ve ark., 2009). Punicalagin ile yapılan yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda açık bir şekilde görülmektedir ki punicalagin biyolojik olarak oldukça aktif bir madde olup farmakolojik açıdan cisplatin benzeri ilaçların oluşturduğu toksik ve yan etkileri önleyebilecek potansiyele sahip bir fitokimyasal moleküldür. Bu çalışmada farelerde cisplatin ile deneysel olarak oluşturulan nefrotoksisite üzerine punicalagin koruyucu ve yararlı etkileri, biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hayvan Materyali

Araştırmada hayvan materyali olarak kullanılan fareler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi ve deneysel uygulamalar aynı yerde gerçekleştirildi.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Dimetil sülfoksit (DMSO) (Tekkim 201790.01000),
Formaldehit (Merck 103999),
Punicalagin (TRC Canada $\geq 95\%$)
Cisplatin (Sigma $\geq 95\%$)
Fosfat tamponu
İsofluran (Adeka),
Serum fizyolojik (Polifarma)
Total Antioksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye)
Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye)

3.1.3. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Analitik terazi (Shimadzu AY-220)
Hassas terazi (BX 4200H),
Homojenizatör (IKA),
Işık Mikroskobu (Olympus CX21),
Kamera (Olympus DP26),
Magnetik karıştırıcı (IKA-RH Basic 2),
Mikroplaka spektrofotometre (Biotek Epoch),
Mikrotom (Leica 2155 rotary),
Otoanalizör (gesanChem-200),
Ototeknikon (Leica ASP300S),
pH metre (Metrohm 704),
Soğutmalı santrifüj (Eppendorf-5810R),

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)

Vorteks (Yellowline TTS2)



3.2.YÖNTEM

3.2.1. Etik

Araştırma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 19/07/2018 tarihli toplantısında alınan 370 sayılı karar doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deney Protokolü

Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık siklusu ayarlanabilir odalarda % 60-80 nem ve 21-23 °C ısıda bakıldı. Tüm hayvanlara *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Deneme süresi boyunca hayvanlara % 24 ham protein, % 6.19 ham selüloz ve 3.100 kcal/kg metabolik enerji içeren fare pelet yemi kullanıldı.

Tez araştırma konusunun uygulanması için 32 adet 8 haftalık BALB/c ırkı dişi/erkek fare Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilerek her grupta 8 adet fare olmak üzere 4 gruba ayrıldı (Tablo 3.1). Grup 1 kontrol grubu olarak ayrıldı ve 3 gün boyunca salin solüsyonu intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Grup 2 deki farelere punicalagin 3 gün boyunca 15 mg/kg, i.p. olarak uygulandı. Grup 3'deki farelere tek doz cisplatin 20 mg/kg dozunda i.p. olarak uygulandı. Grup 4 deki farelere Cisplatin (20 mg/kg dozunda i.p.) tek doz olarak verildi. Cisplatin uygulamasından 1 saat önce 15 mg/kg dozda punicalagin uygulandı. Daha sonra 2 gün daha punicalagin aynı dozda uygulanarak toplamda 3 doz olacak şekilde verildi. Tüm gruplar, cisplatin uygulamasını takiben 72 saat sonra kan örnekleri alınıp izofloran anestezisi altında servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi. Deneklerden alınan serum örneklerinde üre kreatinin düzeyleri, böbrek doku, total oksidant ve total antioksidant seviyeleri (TOS ve TAS) belirlendi. Ayrıca alınan böbrek örneklerinden histopatolojik olarak incelemeler için hemotoksilen-eosin boyama ile böbreklerde oluşan değişiklikler değerlendirildi.

Tablo 3.1. Araştırmadaki deney gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler (n: 8).

Deney Grupları	Verilen maddeler- Verildiği günler
Kontrol	%0.1'lik DMSO p.i (2ml/kg c.a./gün) – 3 gün
Cisplatin(Cis)	20 mg/kg/c.a/gün cisplatin tek doz p.i.-1. gün (fizyolojik NaCl içinde)
Punicalagin(Pun)	15 mg/kg/c.a/gün punicalagin p.i (%0.1'lik DMSO)- 3 gün
Pun+Cis	15 mg/kg/c.a/gün punicalagin p.i.- 3 gün + 20 mg/kg/c.a/gün cisplatin p.i.tek doz-1.gün

3.2.3. Örneklerin Toplanması

Çalışma 4. günde sonlandırıldı, hayvanların tamamı %2-3 oranında izofluran (inhalasyon) ile anesteziye alınarak kalpten kan alma işlemi gerçekleştirildi ve hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Kan, karaciğer ve böbrek örnekleri alındı.

3.2.4. Dokuların Homojenizasyonu

Hayvanlardan elde edilen böbrek örneklerinin ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü. Her bir farenin böbreğinden 0.5 gr doku alındı. Bu dokulara ağırlıklarının 4 katı pH değeri 7.4 olan fosfat tamponu (m/v) eklendi. Daha sonra homojenizatör ile homejenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Deney tüplerine alındıktan sonra 4.000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj cihazında santrifüj işlemi yapıldı. Elde edilen süpernatantlar ependorf tüplere mikropipet yardımıyla aktarıldı. böbrek homojenatlarını antioksidan ve oksidan seviye analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.5. Total Oksidan ve Antioksidan Seviyelerinin Tayini

Total antioksidan ve total oksidan statüsü ticari kit kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlendi (Rel Assay Diagnostics, Türkiye).

3.2.5.1. Total Antioksidan Status (TAS) Analizi

TAS kiti ile toplam antioksidan durumu ölçüldü (Erel, 2004). Yöntem, renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikalin, örnekte bulunan antioksidanlar tarafından renksiz indirgenmiş form oluşmasına dayanır. Renkteki bu değişim 660 nm'de absorbansda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Metot, E vitamini analogu Trolox ile kalibre edildi ve veriler mmol Trolox eq./L olarak ifade edildi.

3.2.5.2. Total Oksidan Status (TOS) Analizi

TOS kiti ile toplam oksidan durum ölçüldü (Erel, 2005). Yöntemin ana ilkesi örnekteki oksidanların, şelatöre bağlı ferrik demir iyonlarını ferroz demir iyonlarına okside etmesidir. Asidik ortamda bu ferrik iyonlar, kromojen ile renkli kompleks oluşturdu. Spektrofotometrik olarak renk yoğunluğu, 530 nm dalga boyunda ölçüldü. Deney, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edildi ve sonuçlar $\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ eq./L}$ olarak ifade edildi.

3.2.5.3. Histopatoloji Yöntemi

Çalışma sonunda ötenazisi gerçekleştirilen farelerden nekropsi sırasında alınan karaciğer ve böbrek örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. İki gün tespit edildikten sonra trimlenen doku parçaları takip kasetlerine alındı. Ardından rutin doku takibine başlandı ve gece boyunca otomatik takip cihazında düşük oranlı alkollerden yüksek oranlı alkollere geçirilerek suları alınan dokular, daha sonra iki adet ksilolden geçirilerek yağı alınıp sıcak parafinden geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Rutin patolojik takip işlemi için tam otomatik Leica ASP300S model ototeknikon kullanıldı. Gece boyu takipte tutulan dokular ertesi gün sabah parafine gömülerek blokaj işlemi yapıldı. Bloklardan 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için kesitler normal lamlara ve immunohistokimyasal inceleme için polilizinli lamlara alındı. Bir gece oda ısısında kurutulan kesitler ertesi gün boyamaya alındı. Normal lamlara alınan doku kesitleri hematoksilin-eozin boyaması için 30'ar dakika süreyle 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek parafin tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik olmak üzere alkol serisinden geçirilerek dokulara su verildi. Ardından dokular

hematoksilenle (15 dakika) ve eozinle (3 dakika) boyandı. Boyama işleminin ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilerek dokuların suyu alındı. Parlatmak için ksilolden geçirilen dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Olympus CX21 model ışık mikroskopunda incelenen preparatlar Olympus DP26 model kamera ile mikroskopik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.2.5.4. İmmunohistokimyasal İnceleme Yöntemi

Doku kesitleri immunperoksidaz yöntem için polilizinli lamlara çekilerek hazırlan 3 ayrı seri kesitte streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulandı. Abcam (UK) firmasının hazır kitlerinin kullanıldığı incelemede, kesitler TNF- α [Anti-TNF alpha antibody (ab6671), 1/100 dilüsyon], NF- κ B [Anti-NF- κ B p65 antibody (ab16502), 1/100 dilüsyon] ve Bcl-2 [anti-Bcl-2 antibody (ab18210), 1/100 dilüsyon] ile boyandı. Sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak DAB (3,3-diaminobenzidine) (Abcam, UK) kullanıldı. Bu amaçla ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, alkol serisinden geçirilerek rehidre edildikten sonra 10 dakika süre ile suda yıkandı. Testin tüm aşamaları nemli kamarada gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra lamalar, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla metanolde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 20 dakika inkübe edildi. 10'ar dakika süreyle iki defa fosfat tamponlu solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkanan dokular, nonspesifik antijenik boyamaları önlemek için 45 dakika boyunca ticari normal keçi serumunda tutuldu. Daha sonra dokular yıkama yapılmaksızın primer antikorları ile kaplandı ve bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün dokular aynı şekilde PBS ile yıkandı akabinde 30 dakika süreyle streptavidin ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra iki defa 10'ar dakika olmak üzere PBS ile yıkandı. Dokular 30 dakika boyunca biotinli serum ile inkübe edilip aynı şekil ve süreyle yıkandı. Yıkama işlemini takiben hazırlanmış olan DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) substratı 15 dk süreyle uygulandıktan sonra harris hematoksilen ile karşıt boyama yapılarak işlem sonlandırıldı. Alkol serilerinden geçirilen dokular dehidre edildikten sonra ksilolde şeffaflaştırılıp yapıştırıcı (Entellan- Merck) ile lamel kapatıldı. Aynı şartlarda aynı prosedüre uyularak boyanan dokular ışık mikroskopunda (Olympus CX41) değerlendirildi.

Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak mikrofotografi ve morfometrik inceleme yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin öncelikle parametrik olup olmadığı Kolmogrov-Smirnov testi ile test edildi. Veriler parametrik bulunduğu için gruplar arasında fark bulunup bulunmadığı One-way ANOVA testi ile belirlendi. Gruplar arasında fark olduğu ve hangi gruplar arasında fark olduğunu post-hoc test yardımıyla (Tukey Testi) belirlendi. Bu amaçla SPSS v.16 paket programı kullanıldı. Bu veriler ortalama±standart hata olarak gösterildi ve $p<0,05$ değeri anlamlılık değeri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarında Serum Üre ve Kreatinin Seviyeleri

Deney sonunda elde edilen serum örneklerinde üre seviyeleri karşılaştırıldığında cisplatin grubundaki üre seviyesi kontrol, punicalagin ve punicalagin+cisplatin gruplarında elde edilen üre seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Fakat punicalagin+cisplatin üre seviyesi kontrol ve punicalagin gruplarıyla karşılaştırıldığında yüksek olduğu görüldü. Diğer taraftan punicalagin+cisplatin grubunun üre seviyesi cisplatin grubundan düşük olarak bulundu. Kontrol ve punicalagin grupları arasındaki karşılaştırmalarda üre seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi. ($p>0,05$). Gruplardaki serum üre seviyeleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Serum örneklerinde kreatinin seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak cisplatin grubu, kontrol ve punicalagin grubuna göre anlamlı şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol, punicalagin ve punicalagin+cisplatin grupları ikili olarak karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülemedi ($p>0,05$). Cisplatin ve punicalagin+cisplatin grupları arasında kreatinin açısından değerlendirildiğinde istatistiksel fark olmamasına rağmen punicalagin+cisplatin grubundaki kreatinin seviyeleri kontrol ve punicalagin gruplarıyla istatistiksel olarak anlamlı bir fark yine tespit edilemedi. Gruplardaki serum kreatinin seviyeleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Deney gruplarına göre serum Üre ve Kreatinin seviyeleri

Gruplar	ÜRE(mg/dl)	KREATİNİN(mg/dl)
Kontrol	81,26±5,21 ^a	0,65±0,01 ^a
Punicalagin	90,82±6,27 ^a	0,61±0,02 ^a
Cisplatin	325,17±31,16 ^c	1,00±0,11 ^b
Punicalagin+Cisplatin	216,91±40,50 ^b	0,85±0,07 ^{ab}

a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

4.2. Deney Gruplarında Serum TAS Seviyeleri

Cisplatin grubu total antioksidan status (TAS) seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşüş gösterirken punicalagin grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında TAS seviyesinin punicalagin grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Serum TAS seviyeleri incelendiğinde kontrol ve punicalagin+cisplatin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. Diğer taraftan serum TAS seviyesi cisplatin ve punicalagin+cisplatin grupları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak bir fark görülmedi. Gruplardaki serum TAS seviyeleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Deney gruplarına göre serum Total Antioksidan Status (TAS) seviyeleri

Gruplar	TAS (mmol Trolox eq./L)
Kontrol	0,96±0,09 ^b
Punicalagin	1,14±0,10 ^c
Cisplatin	0,32±0,05 ^a
Punicalagin+Cisplatin	0,75±0,06 ^{ab}

a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

4.3. Deney Gruplarında Serum TOS Seviyeleri

Serum örnekleriyle yapılan TOS analiz verileri cisplatin grubunun diğer gruplara (kontrol, punicalagin, punicalagin+cisplatin) göre anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi ($p<0,05$). Kontrol, punicalagin ve punicalagin+cisplatin grupları ikili olarak karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Gruplardaki serum TOS seviyeleri Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Deney gruplarına göre serum Total Oksidan Status (TOS) seviyeleri

Gruplar	TOS (mmol Trolox eq./L)
Kontrol	12,37±2,16 ^a
Punicalagin	11,27±3,45 ^a
Cisplatin	39,53±3,83 ^b
Punicalagin+Cisplatin	16,69±3,96 ^a

a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

4.4. Deney Gruplarında Böbrek Doku TAS Seviyeleri

Böbrek dokularından hazırlanan homejenatlar ile yapılan TAS analiz seviyeleri karşılaştırıldığında Cisplatin grubu kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşüş gösterirken punicalagin grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında TAS seviyesinin punicalagin grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Böbrek doku TAS seviyeleri incelendiğinde kontrol ve punicalagin+cisplatin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. Diğer taraftan böbrek doku TAS seviyesi cisplatin ve punicalagin+cisplatin grupları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak bir fark görülmedi. Gruplardaki böbrek doku TAS seviyeleri Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.4. Deney gruplarına göre böbrek doku örneklerinde Total Antioksidan Status (TAS)

Gruplar	TAS (mmol Trolox eq./L)
Kontrol	2,37±0,27 ^b
Punicalagin	4,29±0,49 ^c
Cisplatin	0,99±0,22 ^a
Punicalagin+Cisplatin	1,98±0,27 ^{ab}

a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

4.5. Deney Gruplarında Böbrek Doku TOS Seviyeleri

Böbrek dokusu total oksidan status (TOS) seviyesinde kontrol ve punicalagin grupları arasında anlamlı bir fark görülmedi. Cisplatin grubunda tespit edilen TOS seviyesi kontrol ve punicalagin gruplarına göre anlamlı bir artış gösterdi. Punicalagin+cisplatin grubu böbrek dokusunda tespit edilen TOS seviyesi kontrol grubunda elde edilenlerle aynı düzeyde bulundu. Punicalagin+cisplatin grubundaki a böbrek doku TOS seviyesi yalnızca punicalagin verilen gruba göre anlamlı bir şekilde yüksek tespit edildi. Gruplardaki böbrek doku TOS seviyeleri Tablo 4.5’de verilmiştir.

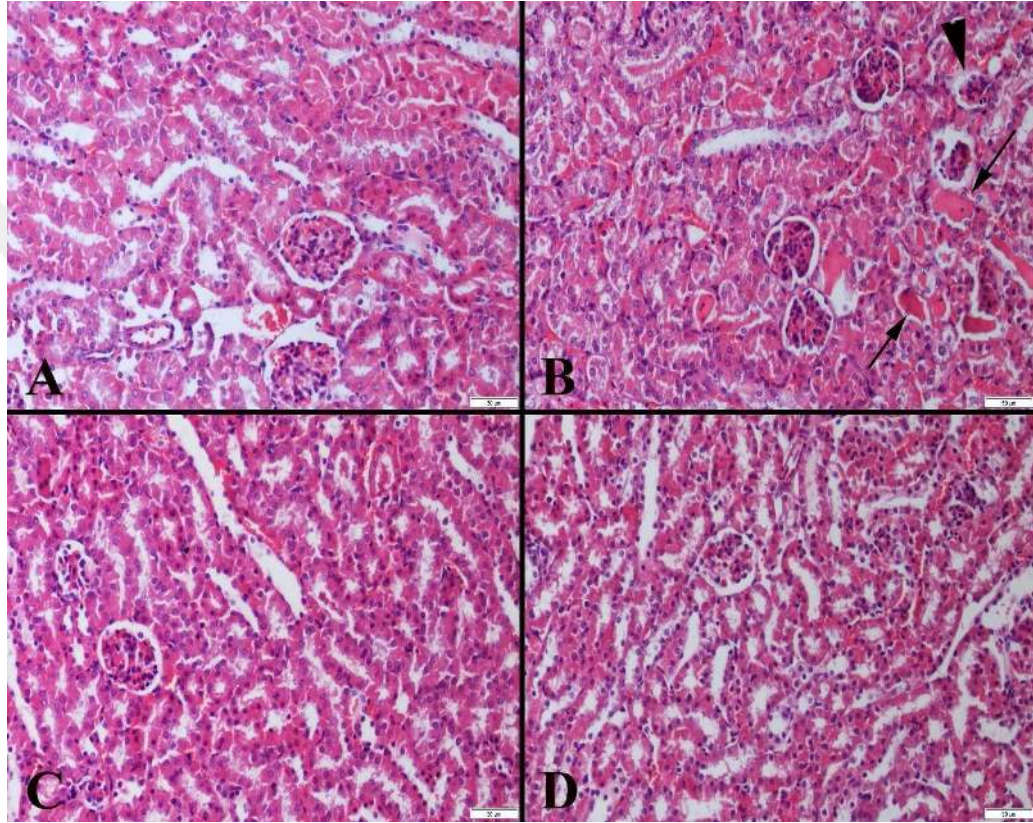
Tablo 4.5. Deney gruplarına göre böbrek doku örneklerinde Total Oksidan Status (TOS) seviyeleri

Gruplar	TOS (mmol Trolox eq./L)
Kontrol	11,95±0,53 ^{ab}
Punicalagin	9,65±0,76 ^a
Cisplatin	15,88±0,96 ^c
Punicalagin+Cisplatin	13,39±0,86 ^{bc}

a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir.

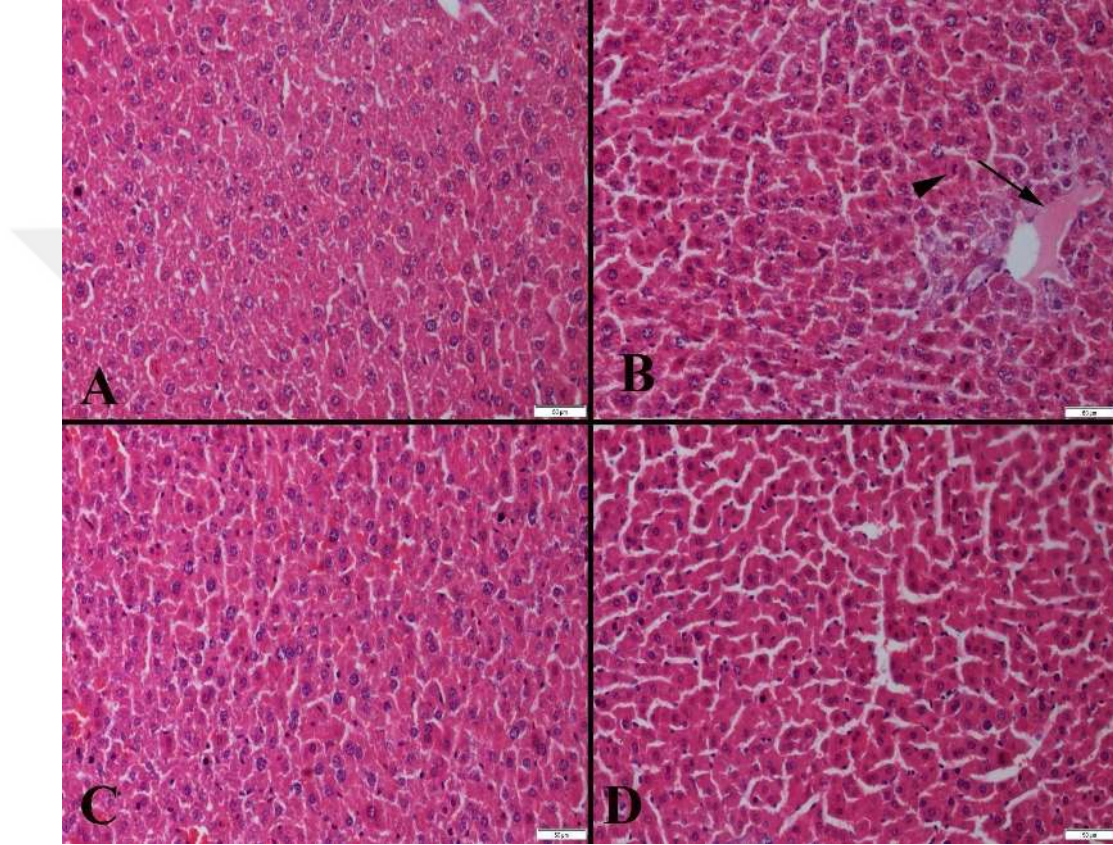
4.6. Histopatolojik Bulgular

Böbreklerin histopatolojik incelemesinde kontrol grubundaki tüm böbreklerin normal görünüm de oldukları gözlemlendi. Cisplatin grubunda şiddetli hiperemi, tubullerin lümenlerinde proteinli sıvı birikimleri ve glomeruluslarda sklerozis dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda bulguların önemli ölçüde azaldığı görüldü. Punicalagin grubunda histopatolojik bulgu saptanmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. (A) Kontrol grubunda normal görünümde böbrek histolojisi, (B) Cisplatin grubunda tubül lümenlerinde proteinli sıvı birikimi (oklar) ve glomeruluslarda sklerozis (ok başı), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda normal görünüm, (D) Punicalagin grubunda mikroskopik olarak normal görünümde böbrek yapısı, HE, Barlar=50µm.

Karaciğerlerin histopatolojik incelemesinde kontrol grubunda patolojik bir bulgu saptanmazken cisplatin grubunda hiperemi ve ödem dikkati çekti. Bazı hepatositlerde piknozla karakterize tek hücre nekrozları gözlemlendi. Punicalagin+cisplatin ve punicalagin gruplarında karaciğerlerde normal histoloji saptandı (Şekil 4.2).

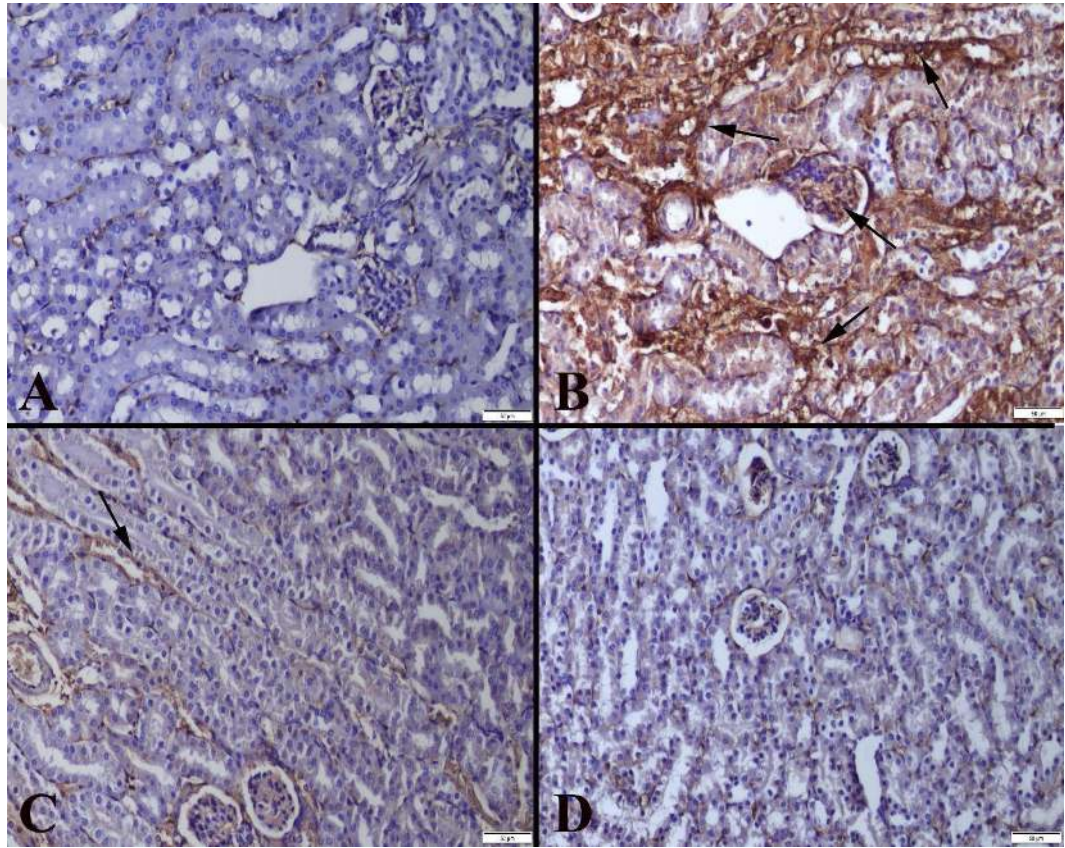


Şekil 4.2. (A) Kontrol grubundaki normal bir karaciğerin görünümü, (B) Cisplatin grubunda ödem (ok) ve tek hücre nekrozları (ok başı), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda normal bir karaciğer, (D) Punicalagin grubunda mikroskopik olarak normal görünümde karaciğer yapısı, HE, Barlar=50µm.

4.7. İmmunohistokimyasal bulgular

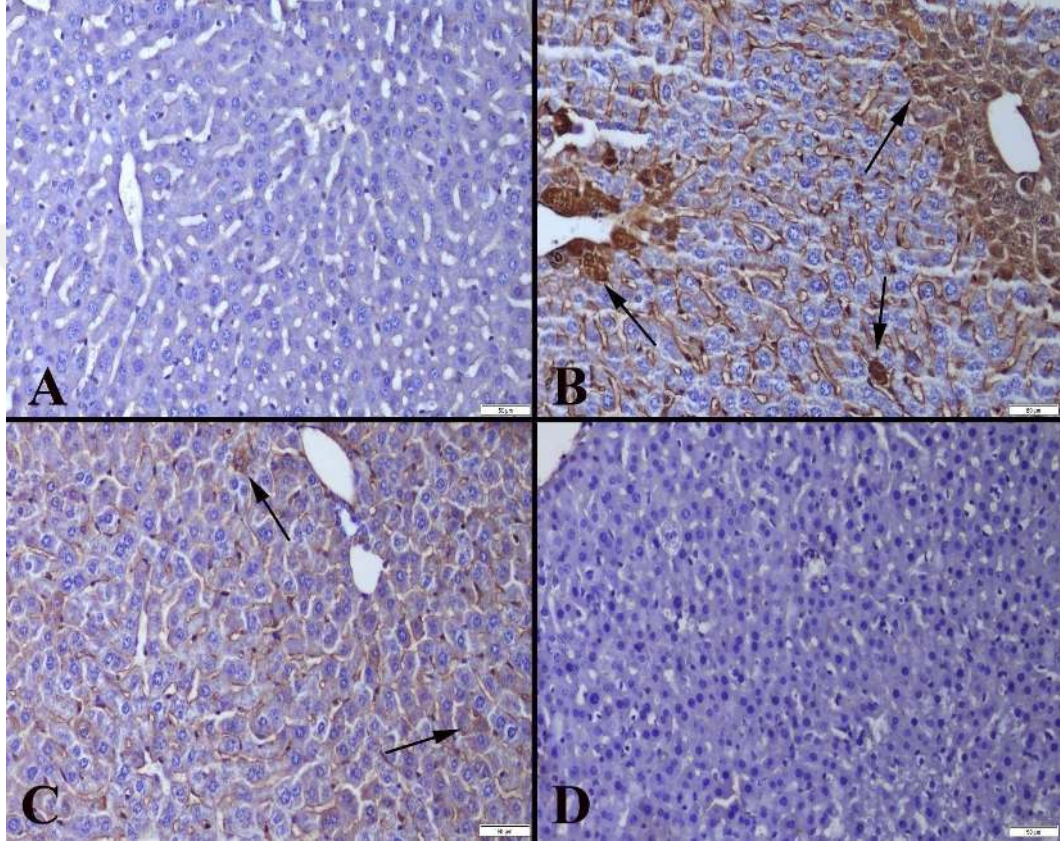
4.7.1. Bcl-2 İmmunohistokimyasal bulguları

Böbreklerin Bcl-2 ekspresyonları incelendiğinde kontrol ve punicalagin gruplarında negatif reaksiyon gözlenirken cisplatin grubunda hem tubul epitellerinde hem de glomeruluslarda belirgin şekilde artmış immunoreaksiyon dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda immün reaksiyonun cisplatin grubuna göre önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.3).



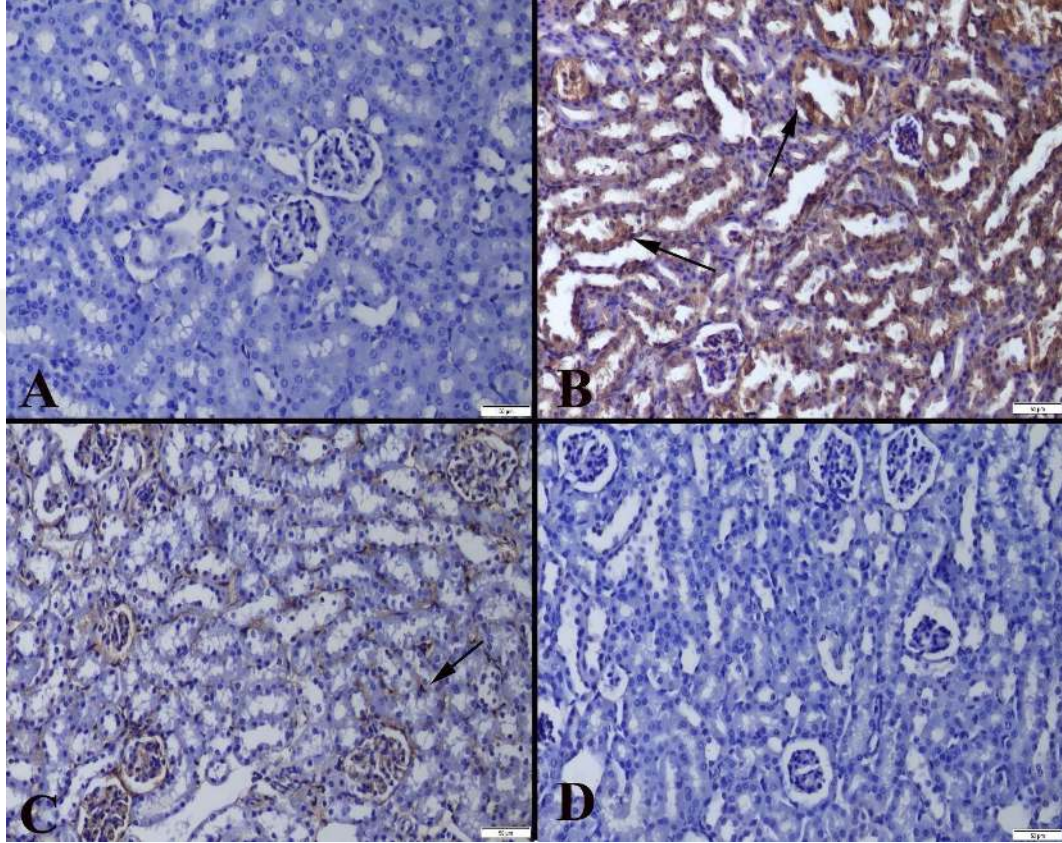
Şekil 4.3. Bcl-2 immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki böbreklerde negatif immunoreaksiyon, (B) Cisplatin grubunda tubüllerde ve glomerulus hücrelerinde şiddetli pozitif reaksiyon (oklar), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Punicalagin grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Karaciğerlerin Bcl-2 immunreaksiyonu incelendiğinde kontrol grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda hepatositlerde immunoreaksiyonun belirgin bir şekilde arttığı dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda azalmış bir ekspresyon gözlenirken punicalagin grubunda negatif immunoreaksiyon görüldü (Şekil 4.4).



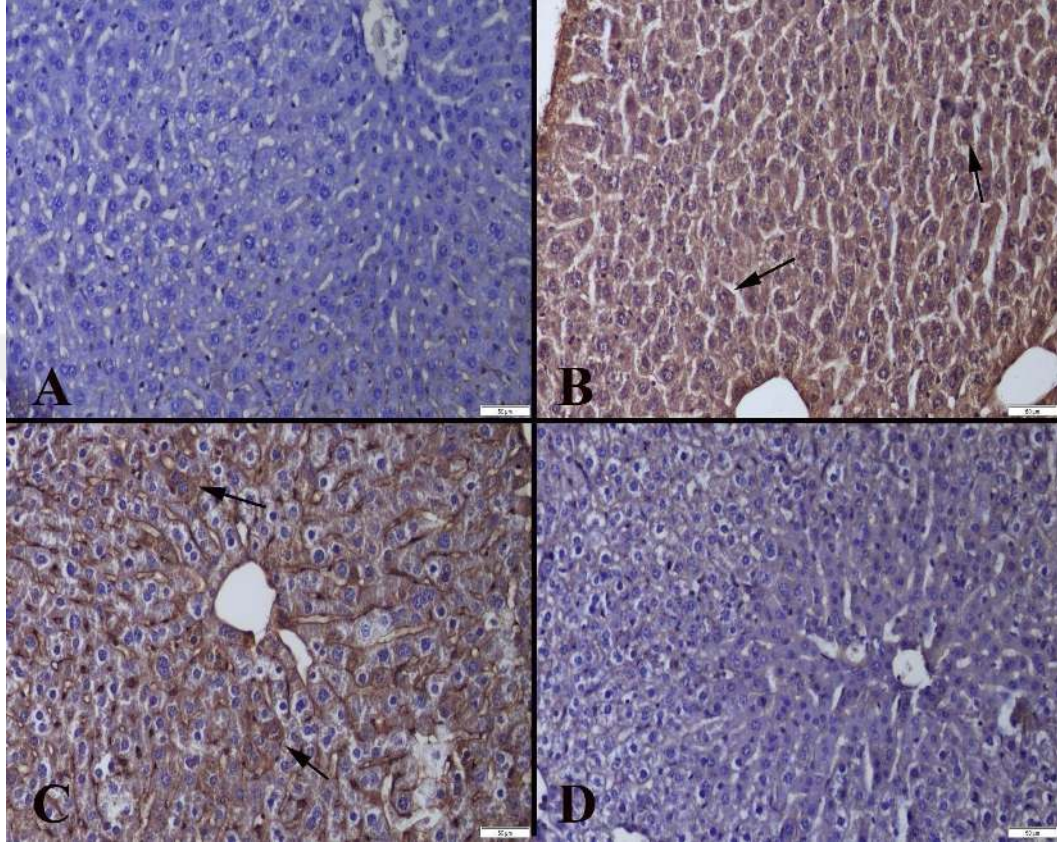
Şekil 4.4. Bcl-2 immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki karaciğerlerde negatif immunoreaksiyon, (B) Cisplatin grubunda hepatositlerde şiddetli pozitif reaksiyon (oklar), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Punicalagin grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Böbreklerde NF- κ B immunoreaksiyonu incelendiğinde kontrol ve punicalagin grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda çok sayıda hücrede yoğun ekspresyon punicalagin+cisplatin grubunda ise cisplatin grubuna göre azalmış immunoreaksiyon görüldü (Şekil 4.5).



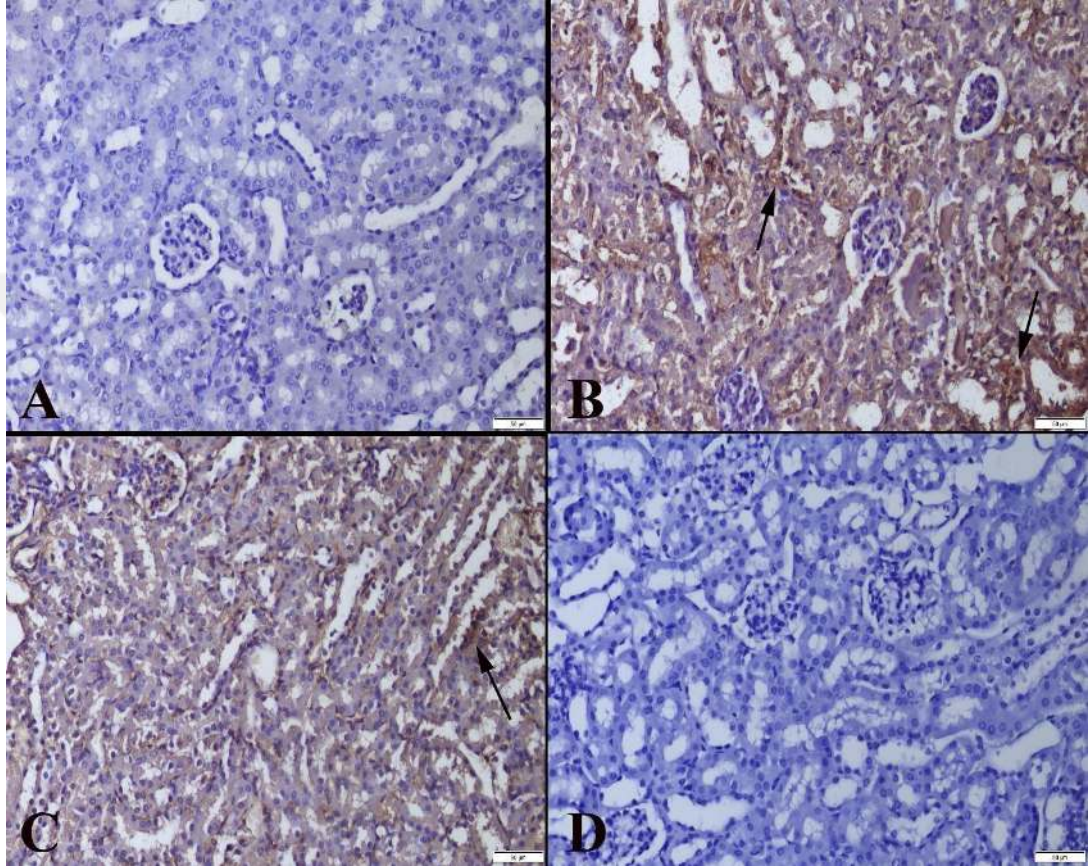
Şekil 4.5. NF- κ B immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki böbreklerde negatif immunoreaksiyon, (B) Cis grubunda tubul epitellerinde şiddetli pozitif reaksiyon (oklar), (C) C+P grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Pun grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

Karaciğerde NF- κ B immunoreaksiyonlarının incelenmesinde kontrol ve punicalagin grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda yoğun, punicalagin+cisplatin grubunda ise azalmış immunoekspresyon gözlemlendi (**Şekil 4.6**).



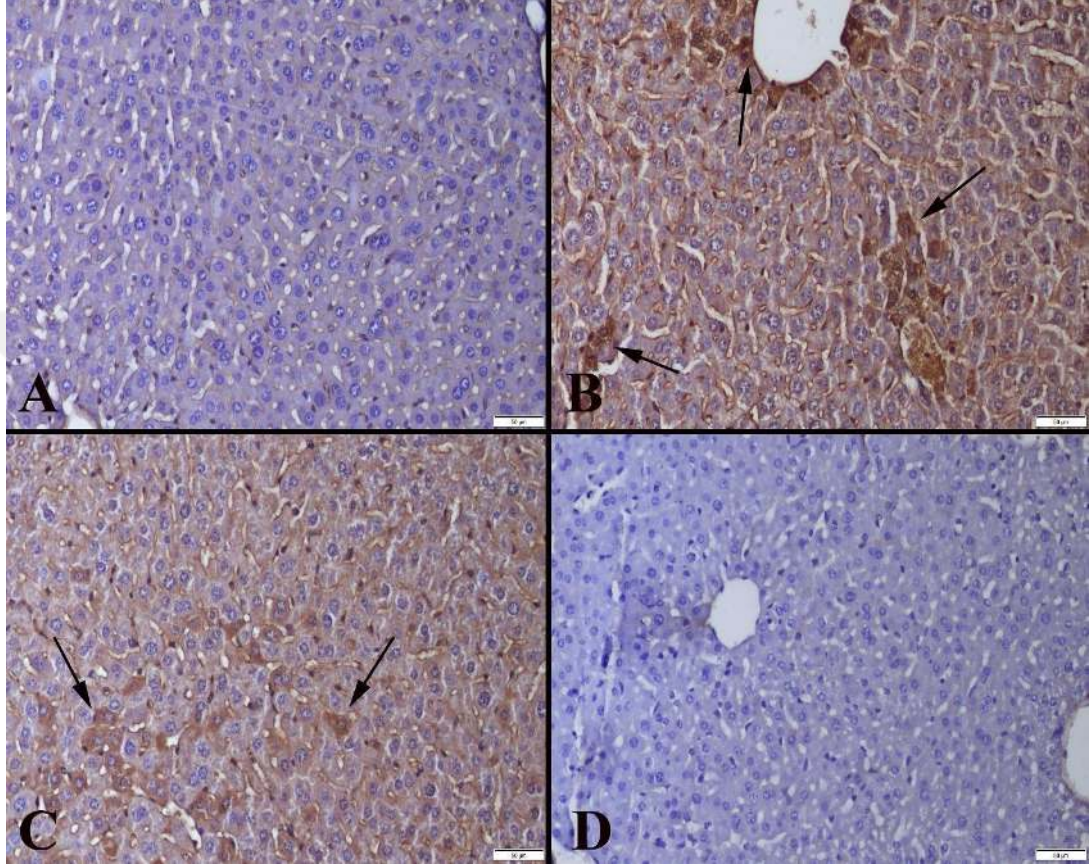
Şekil 4.6. NF- κ B immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki karaciğerlerde negatif ekspresyon, (B) Cisplatin grubunda hepatositlerde şiddetli ve yoğun pozitif reaksiyon (oklar), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Punicalagin grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

Böbreklerde TNF- α immunoreaksiyonu incelendiğinde kontrol ve punicalagin grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda özellikle böbrek tubul epitellerinde yoğun ekspresyon Punicalagin+cisplatin grubunda ise cisplatin grubuna göre azalmış immunoreaksiyon görüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. TNF- α immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki böbreklerde negatif immunoreaksiyon, (B) Cisplatin grubunda tubül epitellerinde şiddetli pozitif reaksiyon (oklar), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Punicalagin grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

Karaciğerde TNF- α immunoreaksiyonlarının incelenmesinde kontrol ve punicalagin grubunda negatif ekspresyon gözlenirken cisplatin grubunda yoğun, punicalagin+cisplatin grubunda ise azalmış immunoekspresyon gözlemlendi (**Şekil 4.8**).



Şekil 4.8. TNF- α immunoreaksiyonu. (A) Kontrol grubundaki karaciğerlerde negatif ekspresyon, (B) Cisplatin grubunda hepatositlerde şiddetli ve yoğun pozitif reaksiyon (oklar), (C) Punicalagin+cisplatin grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyon (ok), (D) Punicalagin grubunda negatif ekspresyon, Streptavidin Biotin Peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

5. TARTIŞMA

Cisplatin değişik kanser türlerinde sıklıkla antineoplastik bir ajan olarak kullanılan platin bazlı bir ilaçtır. Geniş bir yelpazede yer alan malignant tümörlere karşı potent antitümör özelliğe sahiptir. Diğer taraftan cisplatinin yol açtığı ciddi yan etkilerden dolayı (başlıca nefrotoksisite, nörotoksisite ve ototoksisite) klinik kullanımı kısıtlanabilmekte ve sonlandırılabilir (Schrier, 2002).

Cisplatin toksisitesine karşı pek çok strateji geliştirilmiş, koruyucu ajan takviyesiyle cisplatin yan etkilerini önleyici pek çok çalışma yapılmıştır. Özellikle cisplatinin neden olduğu serbest oksijen radikallerinin artışına karşın, serbest radikal temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren çalışmalardan özellikle önemi anlaşılan antioksidanlar son zamanlarda en yaygın yapılan çalışmalar arasına girmiştir (Delibaş, 1995). Bu çalışmalar arasında antioksidan etkisinin yüksek olduğu bildirilen ve başlıca nar (*Punica granatum*) meyvesinin değişik kısımlarında bulunan punicalagin, narın biyoaktif etkilerinin çoğundan sorumlu bir ellagitannin olarak bilinmektedir. Aynı şekilde nar suyunun da güçlü antioksidan aktivitesinin %50'sinden daha fazlasının punicalaginden kaynaklandığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Adams ve ark., 2006; Bell ve ark., 2008; Tzulker ve ark., 2007).

Bu çalışmada, BALB/c farelerde tek doz i.p. cisplatin (20mg/kg) uygulamasıyla oluşturulan nefrotoksisite modelinde punicalagin uygulamasının böbrek üzerinde koruyucu etkisi araştırılmıştır. Cisplatin grubundaki üre seviyesi kontrol, punicalagin ve punicalagin+cisplatin gruplarında elde edilen üre seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Punicalagin+cisplatin grubu serum üre seviyesi kontrol ve punicalagin gruplarıyla karşılaştırıldığında yüksek olduğu görüldü. Ancak punicalagin+cisplatin grubunun üre seviyesi cisplatin grubundan düşük olarak bulundu. Bu durum göstermektedir ki cisplatin kaynaklı serum üre artışı punicalagin uygulamasıyla normalize olarak kontrol grubu değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Cisplatin grubu serum kreatinin seviyeleri, kontrol ve punicalagin grubuna göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol, punicalagin ve punicalagin+cisplatin grupları ikili olarak karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,05$). Cisplatin ve

punicalagin+cisplatin grupları arasında serum kreatinin seviyelerinde istatistiksel bir fark bulunmadı. Diğer taraftan punicalagin+cisplatin grubundaki kreatinin seviyeleri kontrol ve punicalagin gruplarındaki serum kreatinin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yine tespit edilemedi.

Serum kreatin ve üre seviyeleri punicalagin+cisplatin grubunda kontrol ile cisplatin grupları arasındaki bir seviyeye getirdiği, buna bağlı olarak hem kontrol hem de cisplatin grubundan istatistiksel olarak farklı bir değere sahip olmadığı görülmektedir. Bu da punicalaginın böbrek fonksiyolarını cisplatin grubuna göre olumlu yönde düzelttiğini göstermektedir.

Üre ve kreatinin, metabolizmanın azotlu son ürünleridir. Üre, diyet proteini ve doku proteini döngüsünden elde edilen birincil metabolittir. Kreatinin, kas kreatin katabolizmasının ürünüdür. Her ikisi de toplam vücut suyuna dağılmış olan nispeten küçük moleküllerdir (Walker ve ark., 1990).

Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan parametreler arasında bulunan ve protein olmayan bir azotlu (NPN) atık ürünü olan kreatinin, kreatin ve fosfokreatinin parçalanmasından üretilir. Kreatinin; kreatin, arginin, glisin ve metiyonin amino asitlerinin transaminasyonu ile karaciğer, pankreas ve böbreklerde sentezlenir. Protein metabolizmasının bir ürünü olan üre ise genelde kan üre azotu (BUN) olarak adlandırılmakta ve NPN atık ürünü olarak kabul edilmektedir. Vücudun üre salgılamak için böbrek sistemine bağımlılığı, böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için yararlı bir parametre haline getirir (Salazar, 2014).

Kreatinin atılımı sadece böbrekler yoluyla olmakta ve reabsorbsiyon görülmemektedir. Kreatininin plazmada bulunan miktarı atılımın göstergesi olduğundan, yüksek kreatinin düzeyi renal fonksiyondaki bozuklukları göstermektedir. Fonksiyonel nefronların yarısının kaybında ancak kısmi bir kreatinin artışı ($180 \mu\text{mol/l} = 2 \text{ mg}$) görülmektedir. Ancak nefronların 3/4 kayıp oluşması durumunda kreatinin düzeyinde belirli bir artış olduğu tespit edilmiştir (Coles, 1986; Mert, 1996). Cisplatin verilen farelerde serum üre ve kreatinin seviyeleri ve böbrek fonksiyonlarındaki azalmanın, punicalagin verilen gruba oranla belirgin biçimde yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Glomerular filtrasyon ile ekstre edilen üre ve

kreatinin, glomerular filtrasyon oranının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Chew ve Dibartola, 1989; Coles, 1986).

Ajith ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada 10 mg/kg dozda uygulanan cisplatin kullanılan grubun kontrol grubuna göre üre ve kreatinin seviyesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Shimeda ve ark., (2005) ratlarda yaptığı bir çalışmada tek doz intraperitoneal olarak uygulanan cisplatinin (5 mg/kg), kontrol grubundaki ratlara kıyasla idrar hacmi, serum kreatinin ve üre seviyelerinde önemli artışlara neden olduğunu bildirmişlerdir ($p<0.05$). Wang ve ark., (2015) tarafından yapılan çalışmada intraperitoneal olarak 20 mg/kg tek dozda verilen cisplatinin oluşturduğu nefrotoksisite sonucunda, kontrol grubuna göre kan üre azotu, kreatinin, protein nitasyonu ve kaspaz 3/7 aktivitesi ve DNA fragmantasyonu gibi hücre ölüm belirteçlerinin belirgin bir şekilde artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Sayed-Ahmed ve ark. (2004) tek doz olarak uygulanan cisplatin (7 mg/kg) ile oluşturdukları nefrotoksisite grubunda serum üre ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 2.5 ile 3.3 kat arttığını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar, yaptığımız çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmalardan farklı olarak Parlakpınar ve ark. (2002) 5mg/kg dozda cisplatin kullanarak oluşturdukları böbrek hasarında serum üre ve kreatinin seviyelerinin kontrol grubuna göre biraz artış gösterdiğinin bildirmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmadığını tespit etmişlerdir ($p<0.05$).

Astuti (2013) yaptığı çalışmada 80 mg/kg intraperitoneal gentamisin ile oluşturduğu akut böbrek yetmezliğine karşı nar ekstratının koruyucu etkisini araştırmıştır. Akut böbrek yetmezliği olan ratlarda nar ekstratının serum BUN ve kreatinin seviyelerinin azalmasında etkisinin bildirmiştir. Patel ve ark. (2008) yaptığı bir toksisite çalışmasında, dişi ve erkek ratlara 90 gün boyunca 600 mg/kg/gün nar ekstratını oral (gavaj) uygulama ile vermişlerdir. Nar ekstrakt uygulanan erkek sıçanlarda trigliserit, potasyum, fosfor, kalsiyum ve kolinesterazın ortalama değerlerinde anlamlı artış ve üre, kreatinin, BUN ve toplam bilirubin seviyesinde ise azalma kaydetmişlerdir. Dişi ratlarda ise üre, BUN ve kreatinin seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit etmişlerdir. Boroushaki ve ark., (2014) ratlarda gentamisine bağlı

nefrotoksisiteye karşı punicalagin içeren nar çekirdeği yağının (PSO) koruyucu etkisini araştırmışlardır. PSO ile ön uygulama yapılan grubu ile gentamisin grubu karşılaştırıldığında serum kreatinin ve üre seviyelerinde önemli ve doza bağlı bir azalma olduğunu görmüşlerdir. Yapılan bu çalışmada PSO'nun gentamisine bağlı nefrotoksisiteyi açıkça zayıflattığını bildirmişlerdir. Akça ve ark. (2018) ratlarda astaksantinlerin cisplatin (i.p. olarak tek doz 16 mg/kg) kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisini araştırdıkları bir çalışmada verdikleri cisplatinin BUN, serum kreatinin seviyelerini artırdığını bildirmişlerdir. Bulunan bu sonuçlar çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Cisplatin grubunda böbrek fonksiyonlarında meydana gelen bozukluğun nefronlarda hücresel düzeyde cisplatin kaynaklı oluşan değişikliklerin bir sonucu olarak görülen üre ve kreatinin seviyelerindeki artış olarak karşımıza çıkmaktadır. Böbreklerde oluşan cisplatin kaynaklı bu hücresel bozukluklar çeşitli mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Bu mekanizmalardan en önemlilerinden birisi artan serbest radikal yüküne bağlı olarak oluşan oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.

Çalışmamızda, cisplatin grubu serum ve böbrek doku TAS seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşüş gösterirken punicalagin grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında TAS seviyesinin punicalagin grubunda daha yüksek olduğu tespit edildi. Serum ve böbrek doku TAS seviyeleri incelendiğinde kontrol ve punicalagin+cisplatin grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. Diğer taraftan serum ve böbrek doku TAS seviyesi cisplatin ve punicalagin+cisplatin grupları karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak bir fark görülmedi. TAS seviyesi incelenen vücut sıvısı veya dokusunda tek tek bireysel enzimatik ve nonenzimatik antioksidanların incelenmesi yerine tüm antioksidanların toplam etkisini yansıtmaktadır (Aslan ve ark., 2014). Bulgular göstermektedir ki punicalagin uygulamasının cisplatin kaynaklı doku ve serum antioksidan seviyelerini normal (kontrol grubu değerleri) seviyelere yaklaştırarak punicalagin antioksidan sistemini desteklediği görülmüştür. Diğer taraftan cisplatinin ise böbrek dokusunda ve serumda antioksidan savunma mekanizmalarını etkileyip hücresel antioksidan durumu zayıflattığına işaret etmektedir.

Cisplatin toksisitesinde reaktif oksijen türleri üretiminde artma, antioksidan enzim düzeylerinde azalma ve TNF- α seviyesinde yükselme görülmektedir. Bu değişiklikler dolayısıyla nefrotoksik etki görülmekte ve apoptozis indüklenmektedir (Ramesh ve Reeves, 2002; Tsuruya ve ark., 2003).

Oksidatif stres, cisplatin toksisitesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biridir. Mitokondri, cisplatin kaynaklı oksidatif stresin birincil hedefi olup, mitokondriyal protein sülfhidril grubunun kaybı, kalsiyum alım inhibisyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile sonuçlanır (Saad ve ark., 2004). Cisplatin, özellikle potent bir serbest radikal olan hidroksil radikalının üretimini artırır. Hidroksil, glutatyon gibi hücre içi antioksidan depoları tüketir, diğer serbest radikaller gibi doğrudan lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenleri üzerinde etki gösterir ve yapılarını bozar (Masuda ve ark., 1994; Townsend ve ark., 2003). Cisplatin hücre DNA'sında meydana getirdiği sitotoksik etkilerin yanı sıra, mitokondriyal DNA'ya 4-6 kat daha yüksek oranda toksik etkisi yapmaktadır (Jamieson ve Lippard, 1999). Mitokondriyal DNA (mtDNA) ile etkileşime girerek mtDNA replikasyonu ve mitokondriyal gen transkripsiyonunu inhibe etmektedir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Değiştirilmiş mtDNA, elektron taşıma zincirinde yer alan anormal ve/veya fonksiyonel olmayan proteinlerin sentezine yol açarak mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır. Cisplatin ile indüklenen mitokondriyal fonksiyonel hasar, bozulmuş solunum zinciri yoluyla ROS aşırı üretilmesine ve hücrel oksidatif stresin indüklenmesine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi Cisplatin tedavisinin dozu ve süresine bağlıdır (Yanez ve ark., 2003). Cisplatin aracılığıyla oluşturulmuş reaktif oksijen türleri kaspazların aktivasyonunu indükleyerek apoptozun uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Tüm kaspaz üyeleri arasında, kaspaz-3 özellikle hücre iskeletinde bozulmaya, nükleer ölüme ve diğer hücre değişikliklerine neden olan önemli bir apoptotik efektördür (Khan ve ark., 2012).

Cisplatinin ROS oluşumunda rol oynadığı, tümör baskılayıcı protein p53'ü etkilediği, tümör nekroz faktörü etkileşimi ve intrinsik kaspazlar yoluyla apoptozisi indüklediği ve mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, cisplatin apoptozisi teşvik eden sitokrom c ve kaspazların mitokondriyal salınımına neden olmaktadır (Canta ve ark., 2015; Florea ve Büsselberg, 2011). p53 ve p38

proteinlerinin ve ekstraselüler regüle edici kinaz 1/2 (ERK1/2) sinyal yollarının aktivitesini de arttırmaktadır (Scuteri ve ark., 2009). Mitokondrinin yanı sıra endoplazmik retikulum (ER) üzerindeki stres yoluyla hücrede kalsiyum sinyalizasyonunu etkilemektedir (Florea ve Büsselberg, 2011).

Hem anti-apoptotik (esas olarak Bcl-2) hem de pro-apoptotik (esas olarak Bax) faktörleri Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından kontrol edilir ve bunlar hücre yaşamı ve ölümü üzerinde kontrolü sağlar. Mitokondriyal dış zar bütünlüğü Bcl-2 ile korunurken, Bax tarafından artan membran geçirgenliği, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive eden sitosolde apoptojenik faktörleri serbest bırakır (Fouad ve ark., 2016a).

Cisplatinin yapılan çalışmalarda böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu oluşturarak oksidan ve antioksidan parametrelerde anlamlı ($p<0.05$) değişikliklere yol açtığı ve antioksidanlar ile bu değişikliklerin vücut için olumlu olacak şekilde düzeltildiği gösterilmiştir (Söğüt ve ark., 2004; Yıldırım ve ark., 2003). Benzer şekilde yaptığımız çalışmada biyokimyasal bulgular incelendiğinde cisplatin grubunun serum ve böbrek dokusunda TAS seviyesi anlamlı ($p<0.05$) olarak azalmış, TOS seviyesi ise anlamlı ($p<0,05$) olarak artış göstermiştir. Punicalagin+cisplatin grubunda serum ve böbrek dokuda TAS seviyesi anlamlı ($p<0.05$) olarak artarken, TOS seviyesi kontrol grubunda elde edilenlerle aynı, punicalagin verilen gruba göre yüksek düzeyde bulundu. Bu sonuçlar punicalagin gruplarında antioksidan kapasiteni artırdığına işaret etmektedir. Sonuçlarımıza göre cisplatin ile artan TOS ve azalan TAS hücrede oksidatif strese yol açarak histopatolojik derlendirmelere göre hücre harabiyetine neden olduğu düşünülebilir. Punicalagin bu hasarı önlemede güçlü bir antioksidan molekül olarak oksidatif stresin etkisini azaltıp koruyucu etkisi ile hücresel hasarı minimize etmiş olabilir.

Punicalagini tek başına farmakolojik ve koruyucu etkisini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Daha çok çalışmalar punicalagini içerdiği bilinen nar, nar kabuğu, nar çekirdeği veya nar suyu ile yapılmış olup nar meyvesinin etkileri araştırılmıştır.

Fouad ve ark. (2016b) punicalagin, siklofosfamid (20 mg/kg/gün, i.p., 7 gün boyunca) uygulanan ratlarda olası karaciğer koruyucu etkisini araştırmışlardır.

Punicalagin uygulamasının, serum alanin aminotransferaz ve karaciğer NF- κ B p65, TNF- α , IL-1 β , MDA, nitrik oksit (NOS), Bax/Bcl-2 oranını, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve kaspazların yüksekliklerini önemli ölçüde ve doza bağlı olarak azalttığını kaydetmişlerdir. iNOS, kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri ve hepatik TAS seviyelerinin azalmasını önlediğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Fouad ve ark. (2016a), ratlarda lipopolisakkarit (LPS 5 mg/kg iv) ile indüklenen akut böbrek hasarına karşı punicalagin potansiyel nefroprotektif etkisini araştırmışlardır. LPS uygulamasından 1 saat önce ve 1 saat sonra punicalagin (50 mg/kg, ip) uygulanmıştır. LPS uygulamasıyla, serum kreatinin düzeyinde önemli artışa neden olduğunu tespit etmişlerdir. LPS ayrıca interlökin-18, tümör nekroz faktörü- α , interlökin-6, malondialdehit, nitrik oksit, Bax/Bcl-2 oranı ve miyeloperoksidaz, iNOS, kaspaz 3, 8 ve 9 aktivitelerinde ve böbrek dokularında TAS seviyelerinde önemli azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Punicalagin, ölçülen parametrelerdeki değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirdiğini bildirmişlerdir. Punicalagin, sıçanlarda oksidatif stres ve apoptoz ile mücadele ederek endotoksemik akut böbrek hasarını iyileştirdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmaların sonuçları çalışmamıza benzer olarak punicalagin antioksidan ve koruyucu etkileri açısından benzerlik göstermektedir. Narın kısımlarında bulunan güçlü antioksidan aktivitenin %50'sinden daha fazlası punicalaginden kaynaklandığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (Adams ve ark., 2006; Bell ve ark., 2008; Tzulker ve ark., 2007). Uzar ve ark. (2012) ratlarda streptozotosin kaynaklı diyabet oluşturmuşlar ve punicalagin yapısında bulunan ellagik asit ile beyin ve siyatik sinir dokularındaki olası etkilerini araştırmışlardır. Ellagik asit verilen diyabetik sıçanlarda katalaz, paraoksonaz enzimi (PON-1) ve TAS değerleri, ellagik asit verilmeyen gruplara göre normal seviyelerde olduğunu bildirmişlerdir. ($p < 0.05$). Beyin ve siyatik sinir dokularındaki MDA ve TOS düzeyleri, ellagik asit uygulanmamış diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksekti ($p < 0.05$). Bununla birlikte, MDA ve TOS düzeylerinin, ellagik asit uygulanan diyabetik grupta, uygulanmayan diyabetik gruba göre önemli ölçüde azaldığını bulmuşlardır ($p < 0.05$). Sonuç olarak, ellagik asidin diyabetik sıçanlarda oksidatif hasara karşı nöroprotektif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

Al-Hadidy ve ark. (2014) erkek beyaz Yeni Zelanda tavşanlarında ateroskleroz gelişimini önlemek için nar (punica granatum) ve paraoksonaz enzimi arasındaki ilişkileri araştırdıkları çalışmada ateroskleroza başlatmak için diyetle

%0.26 kolesterol vermişlerdir. Nar suyu (6 ml) verilen grupla kolesterol verilmiş grup karşılaştırılmış ve nar suyu verilen grubun serum TAS seviyesinde önemli bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Kolesterol+ nar suyu grubunun, serum TAS seviyesi ile kontrol grubunun TAS seviyesinin benzer konsantrasyonda olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada narın (POM) sıçanlarda metotreksat (MTX) kaynaklı toksisiteye karşı nöroprotektif etkilerini araştırmışlardır. Kontrol grubuna kıyasla MTX grubunda TAS düzeylerinde azalma ve TOS, MDA, IL-1 β ve TNF- α düzeylerinde artış gözlemlemişlerdir. MTX grubuna kıyasla, MTX + POM grubunda MDA, IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde anlamlı bir düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, MTX'in sıçanların siyatik sinir dokusunda önemli bir oksidatif strese ve inflamatuvar yanıtı neden olduğunu ve POM'un pro-inflamatuvar yanıtı azalttığını kanıtlamışlardır (Çelik ve ark., 2013) . Sancaktutar ve ark. (2014) deneysel olarak böbrek iskemi-reperfüzyon (I / R) hasarı oluşturulan ratlarda nar özünün (PE) koruyucu etkisini aratmışlar ve I / R'den önce PE ile tedavi edilen ratlarda serum malondialdehit (MDA) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görmüşlerdir. ($p=0.016$). Serum TAS düzeylerinin I / R grubunda laparoskopik olarak I / R oluşturulan rat grubuna göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir ($p= 0.001$). Böbrek dokusunda TOS düzeyleri ve OSI indeksi, I / R hasarından sonra, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz dahil düşük TAS seviyeleri veya düşük antioksidan enzim aktivitesi bildiren önceki çalışmalara göre I / R hasarına bağlı oksidatif stres gösteren önemli ölçüde artmıştır. TAS düzeyleri bu çalışmada I/R grubunda daha düşük olarak ölçülmüştür. Sıçan böbrek dokularında, I/R hasarından sonra TOS düzeylerinin anlamlı olarak arttığını TAS seviyelerinin ise azaldığını tespit etmişlerdir. I/R + PE grubunda nar özünün, oluşan I/R hasarının olumsuz etkilerini tersine çevirdiğini bildirmişlerdir. Böbrek dokusunda oluşan tübüler nekrozun PE ön tedavisi ile azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Diyabetik ratlarda çalışan Aboonabi ve ark. (2014) i.p streptozotosin enjeksiyonu (60 mg/kg) ile oksidatif stresi indüklemişlerdir. Nar çekirdeği suyu ile 21 gün boyunca oral tedavi yaptıklarını bildirmişlerdir. Nar suyu uygulanan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında TAS, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığını, gama-glutamil transferaz (GGT) ve MDA gibi oksidatif stresin biyobelirteç seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, narın oksidatif stres kaynaklı diyabetik sıçanlara karşı potansiyel koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Yaptığımız literatür araştırmamızda ve bilgimiz dahilinde cisplatin kaynaklı böbrek hasarı üzerine direkt punicalaginin etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Ratlarda yapılan bir çalışmada, ilk üç gruba i.p. olarak normal salin, L-karnitin (500 mg/kg) ve D-karnitin (750 mg/kg) uygulamışlardır. Diğer gruplara ise tek doz cisplatin (7 mg/kg) uygulamışlar ve cisplatin uygulanan bu gruplarda 6. Günün sonunda böbrek dokuda total oksidan status TOS belirteci olan MDA seviyesinde önemli bir artış gözlemlenmiştir (Sayed-Ahmed ve ark., 2004). Akça ve ark. (2018) yaptığı çalışmada da yine aynı şekilde cisplatin (i.p. olarak tek doz 16 mg / kg) kaynaklı nefrotoksisitede böbrek doku TAS seviyesinin düştüğü, böbrek doku TOS seviyesinin ise arttığını bildirmişlerdir. Koyuncu (2018), ratlarda cisplatin ile oluşturulan nefrotoksisite çalışmalarında böbrek dokusundaki bazı biyokimyasal parametreleri araştırmıştır. Cisplatin tek doz (7 mg/kg/i.p.) olarak uygulanmış ve cisplatin grubundaki böbrek TOS, oksidatif stres indeksi, MDA ve ileri oksidasyon protein ürünleri düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığını ($p<0.05$), böbrek TAS ve GSH düzeylerinin anlamlı ($p<0.05$) olarak azaldığını tespit etmiştir. Ratlara i.p. olarak tek dozda cisplatin (10 mg/kg) uygulanan bir çalışmada böbrek dokularında oksidan (oksidasyona duyarlılık, ksantin oksidaz enzimi ve malondialdehit seviyesi) ve antioksidan (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri ve antioksidan potansiyel değeri) parametrelerini ölçmüşlerdir. Kontrol grubuna kıyasla TAS seviyelerinde önemli azalma TOS seviyelerinde ise önemli bir artış gözlemlenmiştir (Çetin ve ark., 2006). Bir diğer çalışmada cisplatin i.p. olarak tek dozda (5 mg/kg) uygulamışlar ve uygulamadan 24 saat sonra, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerinde önemli bir azalma, böbrek doku malondialdehit (MDA) seviyelerinde ise önemli bir artış tespit etmişlerdir (Durak ve ark., 2002). Somani ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada cisplatin (16 mg/kg dozda i.p.) ile nefrotoksisite oluşturmuşlardır. Deneyin sonucunda böbrek dokuda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH peroksidaz) ve glutatyon redüktaz aktivitelerinin cisplatin uygulamasını takiben kontrol grubuna göre (sırasıyla %62, %75, %62 ve %80) azaldığını bildirmişlerdir. MDA seviyesinin ise kontrol grubuna göre %204 oranında arttığını tespit etmişlerdir.

Elde ettiğimiz histopatolojik sonuçlara göre kontrol grubundaki tüm

böbreklerin normal görünümde oldukları gözlemlendi. Cisplatin grubunda şiddetli hiperemi, tubullerin lümenlerinde proteinli sıvı birikimleri ve glomeruluslarda sklerozis dikkati çekti. Punicalagin+cisplatin grubunda bulguların önemli ölçüde azaldığı görüldü. Punicalagin grubunda histopatolojik bulgu saptanmadı. Karaciğerlerin histopatolojik incelemesinde kontrol grubunda patolojik bir bulgu saptanmazken cisplatin grubunda hiperemi ve ödem dikkati çekti. Bazı hepatositlerde piknoza karakterize tek hücre nekrozları gözlemlendi. Punicalagin+cisplatin ve punicalagin gruplarında karaciğerlerde normal histoloji saptandı.

Fouad ve ark. (2016a) Sıçanlarda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen akut böbrek hasarına karşı punicalagin potansiyel nefroproteksiyonu araştırıldıkları bu çalışmada LPS'nin tübüler dilatasyon, epitelyal hücrelerin deskuamasyonu, interstisyel nötrofilik infiltrasyon ve pıhtılaşan nekroz şeklinde böbrek dokusunda belirgin histopatolojik hasara neden olduğunu göstermişlerdir. Punicalagin histopatolojik böbrek dokusu hasarını en aza indirmiş ve LPS tehdidine maruz kalan ratlarda tübüler nekroz skorunun önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir. Aboonabi ve ark. (2014) Yüksek antioksidan seviyesine sahip nar çekirdeği suyu ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda histopatolojik değişikliklerin azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca histopatolojik gözlem, narın önemli oranda antioksidan enzim ürettiğini ve diyabetik sıçanlarda hepatik dokuyu koruduğu fikrini desteklediğini bildirmişlerdir. Ratlarda cisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin etkilerini araştırmayı amaçlayan başka bir çalışmada histopatolojik inceleme sonucunda proksimal ve distal tübüllerde dilatasyon, vakuolizasyon ve tübüler epitel hücrelerinde kayıp meydana gelmiş ve böbrek dokusunda glomerüler dejenerasyon ile ödem tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Akça ve ark., 2018). Cisplatin (tek doz 7 mg/kg) kaynaklı nefrotoksisite çalışmasında (Ateşşahin ve ark., 2005), cisplatinin histopatolojik olarak tübüllerde şiddetli nekroz ve hafif dejeneratif değişikliklere neden olduğunu göstermişlerdir. Kanter ve ark.'nın (2007) yaptığı çalışmada cisplatin uygulanan sıçanlara E vitamini enjeksiyonu yapılmış, sıçanların böbrekleri ışık ve elektron mikroskopunda incelenmiştir. Uygulanan cisplatin ile renal tübüller ve Bowman kapsülünün bazal membranında kalınlaşma, Bowman aralığında genişleme ve glomerül büyüklüğünde değişiklik, kortikomedüller bölgedeki tübüllerde genişleme, fırçamsı kenarlarda bozulma, mitokondriyal şişme ve interstisyel alanda infiltrasyon sahası tespit edilmiştir. Francescato ve ark. (2007)

cisplatin nefrotoksisitesinde proapoptotik Bax proteininde artış, anti-apoptotik Bcl proteininde azalma olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Wei ve ark. (2007) yaptığı başka bir çalışmada cisplatin nefrotoksisitesinde, renal tübüler hücre mitokondrilerinde Bax gen aktivasyonu ve birikiminin akut böbrek hasarına eşlik ettiği gösterilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son yıllarda ilaçların yan etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak adına fitokimyasallarla pek çok çalışma yapılmıştır. Önemli fitokimyasallardan olan polifenoller kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi dejeneratif hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Böbrek dokusunda farklı mekanizmalarla nefrotoksik etki gösteren cisplatin, oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve tübüler epitel hücrelerine direkt sitotoksikite gibi olumsuz etkilere neden olmaktadır. Yaptığımız çalışma önemli bir polifenol olan punicalaginın cisplatininin neden olduğu nefrotoksikitede, böbrek fonksiyonları üzerindeki koruyucu etkisini göstermiştir. Cisplatin ile birlikte uygulanan punicalagin, oksidatif strese yol açan parametrelerde önemli bir düzelmeye neden olmuştur.

Sonuç olarak, punicalagin uygulamalarının, cisplatinin vücutta meydana getirdiği olumsuz etkilere karşı serum ve böbrek dokuda koruyucu özelliğe sahip olduğu görülmektedir. Bundan dolayı punicalagin cisplatin kemoterapisi sırasında destekleyici bir fitokimyasal olarak tedavi protokolüne eklenebilir. Punicalaginın birçok biyoaktif özelliğinden dolayı gelecekte farklı mekanizmalar üzerine çalışmalar yapılması ve farklı etkilerinin araştırılmasının gerektiği kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Aboonabi A, Rahmat A, Othman F (2014).** Antioxidant effect of pomegranate against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats. *Toxicol Rep.*, **1**, 915-922.
- Adamczyk B, Simon J, Kitunen V, Adamczyk S, Smolander A (2017).** Tannins and their complex interaction with different organic nitrogen compounds and enzymes: old paradigms versus recent advances. *ChemistryOpen.*, **6(5)**, 610-614.
- Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D (2006).** Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *J Agric Food Chem.*, **54(3)**, 980-985.
- Adaramoye O, Erguen B, Nitzsche B, Höpfner M, Jung K, Rabien A (2017).** Punicalagin, a polyphenol from pomegranate fruit, induces growth inhibition and apoptosis in human PC-3 and LNCaP cells. *Chem Biol Interact.*, **274**, 100-106.
- Ajith TA, Usha S, Nivitha V (2007).** Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clinica Chimica Acta*, **375(1-2)**, 82-86.
- Akca G, Eren H, Tumkaya L, Mercantepe T, Horsanali MO, Deveci E, Yilmaz A (2018).** The protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **100**, 575-582.
- Aksit H, Bildik A (2008).** Apoptozis, *YYÜ Vet. Fak. Dergisi.*, **19(1)**, 55-63.
- Al-Hadidy AA, Al-Kattan MM, Jankeer MH (2014).** Relationships between Pomegranate (*Punica granatum*) and Paraoxonase Enzyme to Prevent the Development of Atherosclerosis in Male White New Zealand Rabbits. *Int J Enh Res Sci Tech Eng.*, **3(5)**, 2319-7463
- Aloqbi A, Omar U, Yousr M, Grace M, Lila MA, Howell N (2016).** Antioxidant activity of pomegranate juice and punicalagin. *Nat Sci.*, **8(06)**, 235.
- Anand AV, Divya N, Kotti PP (2015).** An updated review of Terminalia catappa. *Pharmacogn Rev.*, **9(18)**, 93.
- Anderson RJ, Barry DW (2004).** Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.*, **18(1)**, 1-20.
- Aqil F, Munagala R, Vadhanam MV, Kausar H, Jeyabalan J, Schultz DJ, Gupta RC (2012).** Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Res Int.*, **49(1)**, 345-353.

Aqil F, Vadhanam MV, Gupta RC (2012). Enhanced activity of punicalagin delivered via polymeric implants against benzo [a] pyrene-induced DNA adducts. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.*, **743(1)**, 59-66.

Arany I, Safirstein RL (2003). Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol.*, **23**, 460-464.

Aslan R, Kutlu R, Civi S, Tasyurek E (2014). The correlation of the total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and paraoxonase activity (PON1) with smoking. *Clinical biochemistry*, **47(6)**, 393-397.

Astuti CP (2013). Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Delima (*Punica Granatum* Linn) Terhadap Kadar Blood Urea Nitrogen (Bun) Dan Kreatinin Serum Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Dalam Proses Gagal Ginjal Akut (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga).

Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A (2005). Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, **212(2-3)**, 116-123.

Basu A, Penugonda K (2009). Pomegranate juice: A heart-healthy fruit juice. *Nutr Rev.*, **67(1)**, 49-56.

Becit M (2017). *Piknogenol ve Kurkuminin Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Cisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi*. Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.

Bell C, Hawthorne S (2008). Ellagic acid, pomegranate and prostate cancer a mini review. *J Pharm Pharmacol.*, **60(2)**, 139-144.

Bialonska D, Kasimsetty SG, Schrader KK, Ferreira D (2009). The effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) byproducts and ellagitannins on the growth of human gut bacteria. *J Agric Food Chem.*, **57(18)**, 8344-8349.

Borouhaki MT, Asadpour E, Sadeghnia HR, Dolati K (2014). Effect of pomegranate seed oil against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Journal of food science and technology*, **51(11)**, 3510-3514.

Boulikas T, Vougiouka M (2003). Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep.*, **10**, 1663-1682.

Brady HR, Brenner BM (1995). Acute Renal Failure. *Harrison's Principles of Internal Medicine 13th Ed. Vol.2*, (Eds) Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, et al. New York, St. Louis, San Francisco, Colorado Springs, Auckland, Bogota

Briguori C, Colombo A, Airoidi F, Morici N, Sangiorgi GM, Violante A, Focaccio A, Montorfano M, Carlino M, Condorelli G, Ricciardelli B (2005). Nephrotoxicity of low-osmolality versus isoosmolality contrast agents: Impact of N-acetylcysteine. *Kidney Int.*, **68(5)**, 2250-2255.

Can C, Şen S, Neşe B, Işık T (2000). Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur J Pharmacol.*, **390**, 327-334.

Canal P (1998). Platinum compounds: pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: Grochow LB, Ames MM (eds). *A Clinician's Guide to Chemotherapy Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. Baltimore Williams & Wilkins, 1998: 345-373.

Canta A, Pozzi E, Carozzi V (2015). Mitochondrial dysfunction in chemotherapy induced peripheral neuropathy (CIPN). *Toxics*, **3(2)**, 198-223.

Casper ES, Kelsen DP, Alcock NW, Young CW (1979). Platinum concentrations in bile and plasma following rapid and 6-hour infusions of cisplatindiamminedichloroplatinum (II). *Cancer Treat Rep.*, **63**, 2023–2025.

Cayir K, Karadeniz A, Yildirim A, Kalkan Y, Karakoc A, Keles M, Tekin S (2009). Protective effect of L-carnitine against cisplatin-induced liver and kidney oxidant injury in rats. *Open Med.*, **4(2)**, 184-191.

Celik F, Gocmez C, Bozkurt M, Kaplan I, Kamasak K, Akil E, Dogan E, Guzel A, Uzar E (2013). Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, **17(22)**, 2988-93.

Cerdá B, Cerón JJ, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2003). Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *J AOAC Int.*, **51(11)**, 3493-3501.

Cerdá B, Llorach R, Cerón JJ, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur J Nutr.*, **42(1)**, 18-28.

Cetin R, Devrim E, Kiliçoğlu B, Avci A, Candir O, Durak I (2006). Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol.*, **26(1)**, 42-46.

Chen B, Longtine MS, Costa ML, Nelson DM (2016). Punicalagin promotes human villous trophoblast differentiation. *Placenta*, **44**, 80-82.

Chen B, Tuuli MG, Longtine MS, Shin JS, Lawrence R, Inder T, Nelson DM (2012). Pomegranate juice and punicalagin attenuate oxidative stress and apoptosis in human placenta and in human placental trophoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **302(9)**, 1142-1152.

Chew DJ, Dibartola SP (1989). Diagnosis and pathophysiology of renal disease. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine-Diseases of The Dog and Cat*, Third Edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia, Ed. S.J.Ettinger, 1893-1961.

Chirino YI, Sánchez González DJ, Martínez Martínez CM, Cruz C, Pedraza Chaverri J (2008). Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology*, 245(1-2): 18-23.

Coles EH (1986). Veterinary Clinical Pathology. Fourth Edn. W.B. Saunders Co, Philadelphia.

Çetintaş VB, Eroğlu Z (2013). Cisplatin direncinde etkili moleküler mekanizmalar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(2), 72-79.

Dasari S, Tchounwou PB (2014a). Cisplatin in cancer therapy : molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.*, 5 (0), 364–378.

Dasari S, Tchounwou PB (2014b). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 740(5), 364-378.

Davis LE (1989). Adverse drug reactions diseases of the dog and cat. Ed. Ettinger SJ. Textbook of veterinary internal medicine, 3rd Edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

DeConti R, Toftness B, Lange R, Creasey W (1973). Clinical and pharmacological studies with cisplatin-Diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Res.*, 33, 1310-1315.

Delibaş N , Özçankaya R (1995). Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2(3): 11-17.

Doig AJ, Williams DH, Oelrichs PB, Baczynskyj L (1990). Isolation and structure elucidation of punicalagin, a toxic hydrolysable tannin, from *Terminalia oblongata*. *J Chem Soc Perkin I.* (8), 2317-2321.

Dos Santos OFP, Boim MA, Barros EJG, Pirotzky E, Braquet P, Schor N (1991a). Effect of platelet activating factor antagonist BN52063 nephrotoxicity of cisplatin. *Lipids.*, 26, 1324–1328.

Dos Santos OFP, Boim MA, Barros EJG, Schor N (1991b). Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.*, 40, 742–747.

Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS (2002). Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol.*, 25(1), 1-8.

Eastman A (1987). The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther.*, 34 (2), 155–166.

El Gharras H (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *Int J Food Sci Technol.*, 44(12), 2512-2518.

Emmerson BT. Oxford Textbook of Medicine. Wearherall, DJ, Ledingham, JGG, Warrell DA (Eds) Toxic Nephropathy Oxford. 3rd ed. New York: Tokyo, Oxford University Press, 1996:3258-3267.

Eren E, Ata A, Arıcan A (2012). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve nefrotoksisite. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **26(3)**, 229-235.

Espín JC, González-Barrio R, Cerdá B, López-Bote C, Rey AI, Tomás-Barberán FA (2007). Iberian pig as a model to clarify obscure points in the bioavailability and metabolism of ellagitannins in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **55(25)**, 10476-10485.

Evenepoel P (2004). Acute toxic renal failure. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.*, **18**, 37-52.

Florea AM, Büsselberg D (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, **3(1)**, 1351-1371.

Foss SR, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Cortez DA, Endo EH, Dias Filho BP (2014). Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, **13(1)**, 32.

Fouad AA, Qutub HO, Al-Melhim WN (2016a). Nephroprotection of punicalagin in rat model of endotoxemic acute kidney injury. *Toxicol Mech Methods.*, **26(7)**, 538-543.

Fouad AA, Qutub HO, Al-Melhim WN (2016b). Punicalagin alleviates hepatotoxicity in rats challenged with cyclophosphamide. *Fundam Toxicol Sci.*, **45**, 158-162.

Francescato HD, Costa RS, Scavone C, Coimbra TM (2007). Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology*, **30**, 64–75.

Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp, Castedo M, Kroemer G (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, **31(15)**, 1869-1883.

Gandhi TK, Burstin HR, Cook EF, Puopolo AL, Haas JS, Brennan TA, Bates DW (2000). Drug complications in outpatients. *Journal of general internal medicine*, **15(3)**, 149-154.

Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, Shams S, Khastar H (2005). Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J Nephrol.*, **18(5)**, 548.

Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem.*, **48(10)**, 4581-4589.

Gómez-Caravaca AM, Verardo V, Toselli M, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Caboni MF (2013). Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC–DAD–ESI-MS. *J Agric Food Chem.*, **61(22)**, 5328-5337.

Gonzales-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E (1977). The renal pathology in clinical trials of cisplatin-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer*, **39**, 1362-1371.

Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281(5381)**, 1309-1311.

Güleç M, Yılmaz HR, Mustafa IRAZ, Ağlamış S, Söğüt S (2004). Sisplatin Nefrotoksitesisi Oluşturulan Sıçanların Plazma Glutasyon Peroksidaz, Süperoksit Dismutaz, Adenozin Deaminaz Aktiviteleri ve Nitrik Oksit Seviyelerine Ginkgo Biloba Ekstraktının Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **24(6)**, 585-591.

Halabe A, Wong NLM, Sutton RAL (1991). Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. *Nephron*, **57**, 197-200.

Hanigan MH, Devarajan P (2003). Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.*, **1**, 47-61.

Hassan I, Chibber S, Naseem I (2013). Vitamin B2: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management. *Food Chem Toxicol.*, **59**, 715-723.

Hässig A, Linag WX, Schwabl H, Stampfli K (1999). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses.*, **52(5)**, 479-481.

Heber D (2011a). Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. Pomegranate Ellagitannins. Lester Packer. Ph.D. **201**; PMID: 22593938.

Holzer AK, Samimi G, Katano K (2004). The Copper Influx Transporter Human Corper Transport Protein 1 Regulates the Uptake of Cisplatin In Human Ovarian Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol.*, **66**, 817-823.

Hoste EA, Kellum JA (2006). Acute kidney injury: epidemiology and diagnostic criteria. *Current opinion in critical care*, **12(6)**, 531-537.

Houston DM, Robins B, Bugert JJ, Denyer SP, Heard CM (2017). In vitro permeation and biological activity of punicalagin and zinc (II) across skin and mucous membranes prone to Herpes simplex virus infection. *Eur J Pharm Sci.*, **96**, 99-106.

Ismail T, Sestili P, Akhtar S (2012). Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol.*, **143(2)**, 397-405.

Jamieson ER, Lippard SJ (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.*, **99(9)**, 2467-2498.

Jones DP (1986). Renal metabolism during normoxia, hypoxia, and ischemic injury. *Annu Rev Physiol.*, **48(1)**, 33-50.

Jordan P, Carmo-Fonseca M (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci.*, **57**, 1229-1235.

Kanter M, Tarladaçalışır YT, Uuygun M (2007). Cisplatin nefrotoksitesinde E vitamininin koruyucu etkileri: Işık ve elektron mikroskopik çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, **5(3)**, 83-90.

Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H (2010). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Exp Toxicol Pathol.*, **62(1)**, 45-52.

Katary MA, Salahuddin A (2017). Gastroprotective Effect of Punicalagin against Ethanol-Induced Gastric Ulcer: the Possible Underlying Mechanisms. *Biomark J.*, **3**, 3.

Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV (2001). Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.*, **60(5)**, 1726-1736.

Kayaalp O (1994). *Tıbbi Farmakoloji*, Cilt 4, Vol. **1047**, Feryal Matbaası, Ankara.

Kelland L (2007). The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.*, **7**, 573-584.

Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Ali F, Sultana S (2012). Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **258(3)**, 315-329.

Khanbabaee K, van Ree T (2001). Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep.*, **18(6)**, 641-649.

Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, Aviram M, Fuhrman B (2010). Paraoxonase 1 (PARAOKSONAZ 1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR- γ pathway. *Atherosclerosis*, **208(1)**, 119-125.

Kim YE, Hwang CJ, Lee HP, Kim CS, Son DJ, Ham YW, Hong JT (2017). Inhibitory effect of punicalagin on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, oxidative stress and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB. *Neuropharmacology*, **117**, 21-32.

Kohli HS, Bhaskaran MC, Muthukumar T, Thennarasu K, Sud K, Jha V, Sakhuja V (2000). Treatment-related acute renal failure in the elderly: a hospital-based prospective study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, **15(2)**, 212-217.

Koyuncu İ (2018). Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Nefrotoksisite Üzerine Naringenin Koruyucu Etkisinin İncelenmesi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **7(1)**, 119-125.

Kuhlmann, MK, Burkhardt G, Köhler H (1997). Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant.*, **12(12)**, 2478-2480.

Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM (2007). In vitro studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. *J Agric Food Chem.*, **55(4)**, 1491-1500.

Kyama CM, Overbergh L, Debrock S (2006). Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*, **85**, 1667–1675.

Larrosa M, García-Conesa MT, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Mol Aspects Med.*, **31(6)**, 513-539.

Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2006). The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Exerc Nutrition Biochem.*, **17(9)**, 611-625.

Lei F, Zhang XN, Wang W, Xing DM, Xie WD, Su H, Du LJ (2007). Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International J Obes.*, **31(6)**, 1023-1029.

Lewis, JE, Gavey EL, Cameron SA, Crowley JD (2012). Stimuli-responsive Pd 2 L 4 metallosupramolecular cages: towards targeted cisplatin drug delivery. *Chemical Science*, **3(3)**, 778-784.

Li G, Feng Y, Xu Y, Wu Q, Han QA, Liang X, Xia X (2015). The anti-infective activity of punicalagin against *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium in mice. *Food Funct.*, **6(7)**, 2357-2364.

Liira J, Verbeek JH, Costa G, Driscoll TR, Sallinen M, Isotalo LK, Ruotsalainen JH(2014). Pharmacological interventions for sleepiness and sleep disturbances caused by shift work. *Cochrane Database Syst Rev.*, **12(8)**, CD009776

Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu FL, Hsu HY (1998). Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Punicalagin and Punicalin on Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. *J Pharm Pharmacol.* **50(7)**, 789-794.

Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY (2001). Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytother Res.*, **15(3)**, 206-212.

Lin LT, Chen TY, Chung CY, Noyce RS, Grindley TB, McCormick C, Richardson CD (2011). Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit *herpes simplex virus 1* entry and cell-to-cell spread. *J Virol.*, **85(9)**, 4386-4398.

Lin LT, Chen TY, Lin SC, Chung CY, Lin TC, Wang GH, Richardson CD (2013). Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiol.*, **13(1)**, 187.

Links M. Lewis C (1999). Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs*, **57**, 293-308.

Lipińska L, Klewicka E, Sójka M (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.*, **13(3)**, 289-299.

Lipińska L, Klewicka E, Sójka M (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Sci Pol Technol Aliment.*, **13(3)**, 289-299.

Liu M, Katerere DR, Gray AI, Seidel V (2009). Phytochemical and antifungal studies on *Terminalia mollis* and *Terminalia brachystemma*. *Fitoterapia*, **80(6)**, 369-373.

Lu J, Ding K, Yuan Q (2008). Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk. *Chromatographia.*, **68(3-4)**, 303-306.

Luft FC, Patel V, Yum MN, Kleit SA (1976). Nephrotoxicity of cephalosporin-gentamicin combinations in rats. *Antimicrob Agents Chemother.*, **9(5)**, 831-839.

Maden M (1994). *Deneysel gentamisin nefrotoksisitesinde üriner enzim aktivitelerinin önemi.* Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.

Manach C, Scalbert A, Morand C, R m sy C, Jim nez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.*, **79(5)**, 727-747.

Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark Pearson DL, Carson LF, Wadler S, Sickel J (2001). Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol.*, **19(4)**, 1001-1007.

Masuda H, Tanaka T, and Takahama U (1994). Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochem Biophys Res Commun.*, **203**, 1175-1180

Meerts IATM, Verspeek-Rip CM, Buskens CAF, Keizer HG, Bassaganya-Riera J, Jouni ZE, Van de Waart EJ (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food Chem Toxicol.*, **47(6)**, 1085-1092.

- Mert N (1996).** Veteriner Klinik Biyokimya, UÜ Güçlendirme Vakfı, Yayın no: 12.
- Mıstık R (2000).** Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klinik Derg*, **13**, 43-45.
- Millo G, Juntavee A, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Peerapattana J, Chatchiwiwattana (2017).** Antibacterial Inhibitory Effects of *Punica Granatum* Gel on Cariogenic Bacteria: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.*, **10(2)**, 152.
- Minami SB, Sha SH, Schacht J (2004).** Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.*, **198(1-2)**, 137-143.
- Naughton CA (2008).** Drug-induced nephrotoxicity. *American family physician*, **78(6)**.
- Oh GS, Kim HJ, Shen A, Lee SB, Khadka D, Pandit A, So HS (2014).** Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. *Electrolytes & Blood Pressure*, **12(2)**, 55-65.
- Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet, A (2002).** Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *Journal of pineal research*, **33(3)**, 161-166.
- Patel C, Dadhaniya P, Hingorani L, Soni MG (2008).** Safety assessment of pomegranate fruit extract: acute and subchronic toxicity studies. *Food Chem Toxicol.*, **46(8)**, 2728-2735.
- Perazella MA (2009).** Renal Vulnerability to Drug Toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.*, **4**, 1275–1283.
- Pfaller W, Gstraunthaler G (1998).** Nephrotoxicity testing in vitro : what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect.*, **106**, 559-569.
- Pogach LM, Lee Y, Giglio W, Naumoff M, Huang HF (1989).** Zinc acetate pretreatment ameliorates cisplatin-induced Sertoli cell dysfunction in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **24**, 177-180.
- Prestayko AW (2013).** Cisplatin: current status and new developments. Academic Press.
- Quideau, S (2009).** *Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. World Scientific. 289-292.
- Ramesh G, Reeves WB (2002).** TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*, **110**, 835–842.
- Ries F, Klastersky J (1986).** Nephrotoxicity induced by chemotherapy with special emphasis on cisplatin toxicity. *Am J Kidney Dis.*, **8**, 368-379.
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T (1965).** Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205(4972)**, 698-699.

Rosenblat M, Hayek T, Aviram M (2006). Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, **187**(2), 363-371.

Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM (1999). Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci.*, **47**(2), 195-202.

Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V (2009). Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **219**: 177–186.

Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V (2007). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. *Hearing Research*, **226**, 157-167.

Sabuncuoglu S, Ozgunes H (2010). Cisplatin toksisitesi: Oksidatif stresin önemi ve antioksidanların etkisi. *İst tıp fak derg.*, **74**(1), 18-25.

Saad SY, Najjar TA, Alashari M (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, **31**(12), 862-867.

Safirstein R, Miller P, Guttenplan JB (1984). Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. *Kidney Int.*, **25**, 753–758.

Salazar JH (2014). Overview of urea and creatinine. *Laboratory Medicine*, **45**(1), e19-e20.

Sancaktutar AA, Bodakci MN, Hatipoglu NK, Soylemez H, Basarılı K, Turkcu G (2014). The protective effects of pomegranate extracts against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. *Urol Ann.*, **6**(1), 46.

Santoso JT, Lucci JA 3rd, Coleman RL, Schafer I, Hannigan EV (2003). Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: a randomized trial. *Cancer Chemother Pharmacol.*, **52**(1), 13-18.

Saruwatari A, Okamura S, Nakajima Y, Narukawa Y, Takeda T, Tamura H (2008). Pomegranate juice inhibits sulfoconjugation in Caco-2 human colon carcinoma cells. *J Med Food.*, **11**(4): 623-628.

Sastry J, Kellie SJ (2005). Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol* 2005; **22**, 441-445.

Sayed-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA, Mostafa N, Calvani M, Osman AM (2004). Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Chemotherapy*, **50**(4), 162-170.

Schaeppi U, Heyman IA, Fleischman RW, Rosenkrantz H, Ilievski V, Phelan R, Cooney DA, Davis RD (1973). cis-Dichlorodiammineplatinum(II) (NSC-119 875): preclinical toxicologic evaluation of intravenous injection in dogs, monkeys and

mice. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **25(2)**, 230-241.

Schrier RW (2002). Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest.*, **110(6)**, 743-745.

Schrier RW (2002). Cancer therapy and renal injury. *J Clin Invest*, **110**: 743-745.

Scovell WM, Muirhead N, Kroos LR (1987). cisplatin-Diamminedichloroplatinum (II) selectively cross-links high mobility group proteins 1 and 2 to DNA micrococcal nuclease accessible regions of chromatin. *Biochem Biophys Res Commun.*, **142**, 826–835.

Scuteri A, Galimberti A, Maggioni D, Ravasi M, Pasini S, Nicolini G, Bossi M, Miloso M, Cavaletti G, Tredici G (2009). Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology*, **30(2)**, 312-319.

Seeram NP, Adams LS, Henning SM, Niu Y, Zhang Y, Nair MG, Heber D (2005). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J Nutr Biochem.*, **16(6)**, 360-367.

Shimeda Y, Hirotani Y, Akimoto Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T, Tanaka K (2005). Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28(9)**, 1635-1638.

Shin JS, Cho JH, Lee H, Jeong HS, Kim MK, Yun HY, Kim DS (2017). Dual hypopigmentary effects of punicalagin via the ERK and Akt pathways. *Biomed Pharmacother.*, **92**, 122-127.

Singh GA (1989). Possible cellular mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology*, **58**, 71–80.

Sleijfer DT, Meijer S and Mulder NH (1985). Cisplatin: A Review of Clinical Applications and Renal Toxicity. *Pharm Weekbl Sci.*, **7**, 237-244.

Sohrab G, Nasrollahzadeh J, Zand H, Amiri Z, Tohidi M, Kimiagar M (2014). Effects of pomegranate juice consumption on inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. *J Res Med Sci.*, **19(3)**, 215.

Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP (2000). Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol.*, **86(5)**, 234-241.

Söğüt S, Kotuk M, Yilmaz HR, Ulu R, Ozyurt H, Yildirim Z (2004). In vivo evidence suggesting a role of purine-catabolizing enzymes in the pathogenesis of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats and effect of erdosteine against this toxicity. *Cell Biochem Funct.*, **22(3)**: 157-62.

Sun Yq, Tao X, Men Xm, Xu Zw, Wang T (2017). In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *J Integr Agric.*, **16(8)**, 1808-1818.

Taguchi T, Nazneen A, Abid MR (2005). Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol.*, **148**: 107-121.

Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH (2003). Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *JASN*, **14**, 1-10.

Tsao R (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.*, **2(12)**, 1231-1246.

Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda, K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M (2003). Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin induced renal tubular cell death, *Kidney Int*, **63**, 72–82.

Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R (2007). Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. *J Agric Food Chem.*, **55(23)**, 9559-9570.

Uzar E, Alp H, Cevik MU, Fırat U, Evliyaoglu O, Tufek A, Altun Y (2012). Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurol Sci.*, **33(3)**, 567-574.

van Geelen CM, de Vries EG, Le TK, van Weeghel RP, de Jong S (2003). Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines. *Br J Cancer.*, **89**, 363-373.

Van Vleet TR, Schnellmann RG (2003). Toxic nephropathy: Environmental chemicals. *Semin Nephrol.*, **23**, 500– 508.

Viladomiu M, Hontecillas R, Lu P, Bassaganya-Riera J (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *J Evid Based Complementary Altern Med.*, 2013.

Vitale I, Galluzzi L, Castedo M, Kroemer G (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **12**, 385.

Vlachoianis C, Zimmermann BF, Chrubasik-Hausmann S (2015). Efficacy and safety of pomegranate medicinal products for cancer. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015.

Vora A, Londhe V, Pandita N (2015). Herbosomes enhance the in vivo antioxidant activity and bioavailability of punicalagins from standardized pomegranate extract. *Foods.*, **12**, 540-548.

Walker HK, Hall WD, Hurst JW (1990). Headache--Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. Chapter 193

Wang D, Lippard SJ (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.*, **4**(4), 307-320.

Wang Y, Luo X, Pan H, Huang W, Wang X, Wen H, Jin B (2015). Pharmacological inhibition of NADPH oxidase protects against cisplatin induced nephrotoxicity in mice by two step mechanism. *Food and Chemical Toxicology*, **83**, 251-260.

Waterman C, Patel Z, Kim S, Rivera A, Pontiggia L, Grace MH, Smith R (2015). Anthelmintic Activity of Punicalagin from *Leiocarpus*. *Uni J Plant Sci.*, **3**(4), 67-71.

Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z (2007). The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int.*, **72**, 53–62.

Yáñez JA, Teng XW, Roupe KA, Fariss MW, Davies NM (2003). Chemotherapy induced gastrointestinal toxicity in rats: involvement of mitochondrial DNA, gastrointestinal permeability and cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Sci.*, **6**(3) 308-314.

Yang Y, Xiu J, Zhang L, Qin C, Liu J (2012). Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, **20**(1), 67-70.

Yao X, Cheng X, Zhang L, Yu H, Bao J, Guan H, Lu R (2017). Punicalagin from pomegranate promotes human papillary thyroid carcinoma BCPAP cell death by triggering ATM-mediated DNA damage response. *Nutr Res.*, **47**, 63-71.

Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K, (2007). Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.*, **334**, 115-124.

Yıldırım Z, Söğüt S, Odacı E (2003). Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. *Pharmacol Res*, **47**: 149-156.

Zhang JG, Lindup WE (1993). Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol.*, **45**, 2215–2222.

Zhang JG, Lindup WE (1994). Cisplatin nephrotoxicity: Decrease in mitochondrial protein sulphydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol.*, **47**, 1127–1135.

Zuk A, Bonventre JV (2016). Acute kidney injury. *Annual review of medicine*, **67**, 293-307.

ÖZGEÇMİŞ



Adı ve Soyadı : Merve TAŞBAŞ

Doğum Yeri ve Yılı : TOKAT-1993

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Uyruğu : T.C.

Telefon No : 0543 273 61 23

Elektronik Posta : mervetasbas03@gmail.com

İletişim Adresi : Altinkum Mah. Karşıyaka Sk. 45/1
Eğirdir/ ISPARTA

Eğitim Durumu

Lisans : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi-2016

Yüksek Lisans : Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner
Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

- Isparta Barida Veteriner Kliniği (Şubat 2019-Ocak 2020)
- Konyaaltı Hayvan Hastanesi- Antalya (Şubat 2020-Halen)

