

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSPLATİN VE RADYOTERAPİ
OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI ASETİL-L-
KARNİTİNİN HOUSE EAR INSTITUTE-ORGAN
CORTİ 1 (HEI-OC1) HÜCRE DİZİSİ VE HTB-186
MEDULLOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970161

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSPLATİN VE RADYOTERAPİ
OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI ASETİL-L-
KARNİTİNİN HOUSE EAR INSTITUTE-ORGAN
CORTİ 1 (HEI-OC1) HÜCRE DİZİSİ VE HTB-186
MEDULLOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

**TEMEL ONKOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

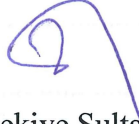
AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

(Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2012.KB.SAG.107 (2012289) sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2012970161

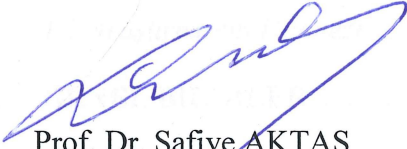
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayça PAMUKOĞLU KAYNAR **SİSPLATİN VE RADYOTERAPİ OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI ASETİL-L-KARNİTİNİN HOUSE EAR INSTITUTE-ORGAN CORTİ 1 (HEI-OC1) HÜCRE DİZİSİ VE HTB-186 MEDULLOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ** konulu Yüksek Lisans Tezini 26.04.2019 tarihinde başarılı olarak tamamlanmıştır.



Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN

BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü)



Dr. Öğr. Üye. Ayşe Banu DEMİR

ÜYE

(İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Doç. Dr. Nüket ELİYATKIN

YEDEK ÜYE

(Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Dr. Öğr. Üye. Yüksel OLGUN

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....	V
ŞEKİL DİZİNİ.....	V
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	X
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi.....	3
1.2 Araştırmanın Amacı.....	4
1.3 Araştırmanın Hipotezi	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Medulloblastom	5
2.1.1 İnsidans.....	6
2.1.2 Medulloblastomun Oluşum Mekanizmaları	6
2.1.3 Semptomlar.....	6
2.1.4 Tanı.....	7
2.1.5 Tedavi	7
2.1.6 Cerrahi	8
2.1.7 Radyasyon.....	8
2.1.8 Kemoterapi	8
2.1.9 Yan Etkiler	8
2.1.10 Nüks	9
2.1.11 Prognoz.....	9
2.2 Kulak.....	10
2.2.1 Kulak Anatomisi	10
2.2.1 Kulak Histolojisi.....	12
2.3 Radyasyon.....	15
2.3.1 Radyoterapi Hakkında Genel Bilgiler	15

2.3.2 Radyasyon ve Türleri.....	16
2.3.3 Radyoterapi Etki Mekanizması.....	17
2.3.4 Radyasyonun Moleküler Düzeyde Etkileri	18
2.3.5 Radyasyonun Hücresel Düzeyde Etkileri	19
2.4 Ototoksisite	19
2.5 Sisplatin	20
2.5.1 Sisplatinin Kimyasal Özellikleri	20
2.5.2 Sisplatinin Farmakokinetik Özellikleri.....	20
2.5.3 Sisplatinin Yan Etkileri.....	21
2.5.4 Deneyisel Çalışmalarda Toksik Etkilere Neden Olan Mekanizmalar	21
2.5.5 Sisplatin Ototoksisitesi	23
2.5.6 Sisplatinin Ototoksik Etkisi Mekanizması	24
2.6 Serbest Radikaller	25
2.6.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	26
2.6.2 Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	27
2.6.3 Oksidatif Stres	28
2.6.4 Hücre ve Doku Hasarlarında Serbest Radikallerin Rolü.....	28
2.7 Antioksidanlar	29
2.7.1 Kaynaklarına Göre Antioksidanlar	31
2.7.2 Yapılarına Göre Antioksidanlar	32
2.7.3 Etki mekanizmalarına Göre Antioksidanlar	33
2.8 Nrf2 ve Hedef Genler.....	34
2.9 Karnitin.....	37
2.9.1 Karnitin Biyosentezi ve Fizyolojik Rolü	37
2.9.2 Asetil-L-Karnitin 'nin Mekanizması	38
2.9.3 Asetil L-Karnitin Biyosentezi ve Fizyolojik Rolü.....	38
2.9.4 Farmakokinetik.....	40
2.9.5 Karnitinin Antioksidan ve Anti Apoptotik Etkisi	40
2.9.6 Asetil-L-Karnitin Metabolizmasının Nöroprotektif Etkisi	41
2.9.7 Dozaj / Toksisite	41
2.10 Apoptoz	42
2.10.1 Apoptoz Mediatorleri.....	42

2.10.2 Apoptozun İndüklenmesi.....	44
2.10.3 Apoptozda Mitokondrinin Rolü	45
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1 Araştırmanın Tipi	46
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	46
3.3 Araştırmanın Çalışma Grupları	46
3.4 Çalışma Materyali	46
3.4.1 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücre Hatları	46
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	47
3.6 Veri Toplama Araçları	47
3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	47
3.6.2 Kullanılan Kitler.....	49
3.6.3 Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması	49
3.6.4 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin Çoğaltılması.....	49
3.6.5 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin Sayımı ve Pasajlanması	50
3.6.6 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Belirlenmesi	50
3.6.7 Sisplatin Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	51
3.6.8 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerine Radyasyon Uygulaması	52
3.6.9 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi	52
3.6.10 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi.....	53
3.6.11 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyelinin Belirlenmesi.....	54
3.6.12 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Hücre İçi Reaktif Oksijen Ürün Oluşumun Ölçülmesi.....	54
3.6.13 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Örneklerin Protein Düzeyinin Belirlenmesi	55
3.6.14 RT-PCR Analizi	55
3.6.15 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Aktivasyonunun Ölçülmesi	59
3.6.16 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyonunun Ölçülmesi.....	61
3.6.17 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde MDA Analizi.....	63
3.6.18 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Total Glutasyon (GSSG/GSH) Analizi.....	64
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	65

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	65
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	65
3.10. Etik Kurul Onayı.....	66
4. BULGULAR	67
4.1 HEI-OC1 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Bulguları	67
4.2 HTB-186 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Bulguları	67
4.3 HEI-OC1 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü Bulguları	68
4.4 HTB-186 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü Bulguları	69
4.5 HEI-OC1 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Bulguları.....	69
4.6 HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Bulguları	70
4.7 HEI-OC1 Hücrelerinde MDA Analizi Bulguları	70
4.8 HTB-186 Hücrelerinde MDA Analizi Bulguları.....	71
4.9 HEI-OC1 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivitesi Bulguları.....	71
4.10 HTB-186 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivitesi Bulguları	72
4.11 HEI-OC1 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Bulguları	73
4.12 HTB-186 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Bulguları	74
4.13 HEI- OC1 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Bulguları.....	74
4.14 HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Bulguları.....	75
4.15 HEI-OC1 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Bulguları	75
4.16 HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Bulguları.....	76
4.17 HEI-OC1 Hücrelerinde GSSG/GSH Analiz Bulguları	77
4.18 HTB-186 Hücrelerinde GSSG/GSH Analiz Bulguları.....	77
4.19 HEI-OC1 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Bulguları	78
4.20. HTB-186 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Bulguları.....	79
4.21. Verilerin Analizi	80
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89
7. KAYNAKLAR.....	90
8. EKLER	109

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Mevcut Cihazlar	47
Tablo 2. Kullanılan Sarf Malzemeler	48
Tablo 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	48
Tablo 4. Kullanılan Kitler.....	49
Tablo 5. RT-PCR’da Gerekli Olan Bileşiklerin Hazırlanması	57
Tablo 6. RT-PCR’da Gerekli Olan Mix Karışımının Hazırlanması	57
Tablo 7. RT-PCR’da Gerekli Olan Primer ve Örnek Karışımının Hazırlanması	58
Tablo 8. HTB-186 İçin Analiz Edilecek Genler ve Primerler	58
Tablo 9. HEI-OC1 İçin Analiz Edilecek Genler ve Primerler.....	59
Tablo 10. Real Time-PCR Reaksiyon Aşaması.....	59
Tablo 11. Araştırma Planı ve Takvimi	65
Tablo 12. HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin p Değerleri.....	80

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Serebral Sıvı Akışı.....	7
Şekil 2. Çocuklarda MRI Görüntüsünde Medulloblastom Gelişimi	7
Şekil 3. Hipotalamus ve Hipofiz Bezi	9
Şekil 4. Kulak Yapısı.....	10
Şekil 5. İç Kulak Anatomisi	11
Şekil 6. Kulak Histolojisi	12
Şekil 7. Korti Organı	13
Şekil 8. İyonize Radyasyonun Dokudaki Etkileri	17
Şekil 9. Sisplatinin Moleküler Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri.	21
Şekil 10. Platin Bazlı Kemoterapötik lerin Etkisi	22
Şekil 11. Antioksidanların Sınıflandırılması	31
Şekil 12. Nrf2 aracılı ilaç metabolize edici enzimlerin indüksiyonu.	35
Şekil 13. Asetil-L-Karnitin Biyosentezi	39
Şekil 14. Asetil-L-Karnitin Molekülünün Kimyasal Yapısı.....	40
Şekil 15. HEI-OC1 Hücrelerine Ajanların Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği. .	67
Şekil 16. HTB-186 Hücrelerine Ajanların Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği. .	67

Şekil 17. HEI-OC1 Hücreleri TUNEL Apoptoz Grafiği.	68
Şekil 18. HTB-186 Hücreleri TUNEL Apoptoz Grafiği.	69
Şekil 19. HEI-OC1 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Grafiği.....	69
Şekil 20. HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Grafiği.....	70
Şekil 21. HEI-OC1 Hücrelerinde MDA (lipid peroksidasyon indüksiyon) Analiz Grafiği.	70
Şekil 22. HTB-186 Hücrelerinde MDA (lipid peroksidasyon indüksiyon) Analiz Grafiği.	71
Şekil 23. HEI-OC1 Hücreleri Kaspaz 3-8-9 Aktivite Grafiği.	71
Şekil 24. HTB-186 Hücreleri Kaspaz 3-8-9 Aktivite Grafiği.	72
Şekil 25. HEI-OC1 Hücreleri Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Grafiği.	73
Şekil 26. HTB-186 Hücreleri Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Grafiği.	74
Şekil 27. HEI- OC1 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Grafiği.....	74
Şekil 28. HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Grafiği.....	75
Şekil 29. HEI-OC1 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Grafiği.	75
Şekil 30. HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Grafiği.	76
Şekil 31. HEI-OC1 Hücrelerinde GSSG/GSH Analizi Grafiği.	77
Şekil 32. HTB-186 Hücrelerinde GSSG/GSH Analizi Grafiği.	77
Şekil 33. HEI-OC1 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Grafiği.	78
Şekil 34. HTB-186 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Grafiği.	79

KISALTMALAR

AKR	:	Aldo-Keto Redüktaz
ALC	:	Asetil-L-Karnitin
AIF	:	Apoptosis-Inducing Factor
AP	:	Alkalın Fosfataz
Apaf-1	:	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARE	:	Antioxidant Response Element
Ark	:	Arkadaşları
BCA	:	Bicinchoninic Acid
Bzip	:	Bazık Lösün Fermuar
CAD	:	Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CDDP	:	Sisplatin
DCF	:	2,7-Dichloro Fluorescein
DCFDA	:	5-(And6)-Carboxyl-2=,7=Dichlorodihydro Fluorescein Diacetate
DISC	:	Death Inducing Singnaling Complex
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
FADD	:	Fas Associated Death Domain
FBS	:	Fetal Bovine Serum
FDA	:	U.S. Food And Drug Administration
GCL	:	Glutamat Sistein Ligaz
GCLC	:	Glutamat Sistein Ligaz Katalitik
Ggs	:	G-Glutamilsistein
Gpx	:	Glutathione Peroxidase
Gpx2	:	Glutathione Peroxidase 2
GR	:	Glutasyon Redüktaz
GSH	:	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	:	Oksitlenmiş Glutasyon
GSS	:	Glutatiyon Sentetaz
GSR1	:	Glutasyon Redüktaz-1
GST	:	Glutasyon-S-Transferaz
GSTP	:	Glutasyon-S-Transferaz Pi

Gy	:	Gray
HEI-OC1	:	House Ear Institute-Organ Corti 1
HO·	:	Hidroksil Radikali
HO-1/HMOX1:		Heme Oksijenaz-1
H ₂ O ₂	:	Hidrojen Peroksit
HPLC	:	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HRP	:	Yabancıturpu-Peroksidaz
HTB-186	:	Desmoplastic Cerebellar Medulloblastoma
IAP	:	Inhibitors Of Apoptosis
ICAD	:	Inhibitor Of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
JC-1	:	Mitokondrial Membran Potansiyeli
Keap 1	:	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
Koa	:	Koenzim A
µM	:	Mikro Molar
MDA	:	Malondialdehit
MRI	:	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NAD	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NO·	:	Nitrik Oksit
NO ₂	:	Azot Dioksit
NQO1	:	NAD(P)H:Kinon Oksidoredüktaz 1
Nrf2	:	Nuclear Factor E2-Related Factor 2
O ₂ ·	:	Süperoksit
O ₂ ^{·-}	:	Süperoksit Radikali
OH·	:	Hidroksil
ONOO-	:	Peroksinitritler
Oxo8gd	:	8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin
Örn.	:	Örneğin
PBS	:	Fosfat Tamponu Tuz Solusyonu
PCR	:	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
PRDX	:	Peroksiroksin
Pt-GSH	:	Glutasyon Konjugatları

RNA	:	Ribonükleik Asit
RNT	:	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RT	:	Radyasyon Tedavisi
SD	:	Standart Deviasyon
-SH	:	Aktif Sülfidril
SHH	:	Sonic Hedgehog
SOD2	:	Süperoksit Dismutaz 2
SOD3	:	Süperoksit Dismutaz 3
SSS	:	Santral Sinir Sistemi
TBA	:	Tiyobarbütirik Asit
TXN	:	Tioredoksin

TEŞEKKÜR

Yetişmemde emeği geçen tez danışmanım Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN'a, desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, Onkoloji Enstitü müdürümüz Prof. Dr. Nur OLGUN'a, Akım Sitometri cihazındaki engin bilgisini paylaşmakta çekinmeyen ve yardımını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Halil ATEŞ'e teşekkür ederim.

Her zaman desteğini hissettiğim ve tezimi hazırlama sürecimde yanımda olan Dr. Pınar ERÇETİN'e, uzakta olsalar da destek ve katkılarıyla yanımda hissettiğim arkadaşlarım Mahdi AKBARPOUR, Meral AYLA, Merve AKSOY ve Dr. Öğr. Üye. Ayşe Banu DEMİR'e teşekkür ederim. Efe Serinan ve Öğr. Gör. Dr. Faize YÜKSEL'e, Dr. Memduh BÜLBÜL'e teşekkür ederim.

HEI-OC1 hücre hattı teminini sağladığımız Amerika Birleşik Devletleri House Ear Institute'den Prof. Dr. Kalinec'e ve projede maddi desteği sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kuruluna teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, sabır gösteren anneme, eşime ve babama sonsuz teşekkürler.

Ayça Pamukoğlu Kaynar

SİSPLATİN VE RADYOTERAPİ OTOTOKSİSİTESİNE KARŞI ASETİL-L-KARNİTİNİN HOUSE EAR INSTITUTE-ORGAN CORTİ 1 (HEI-OC1) HÜCRE DİZİSİ VE HTB-186 MEDULLOBLASTOM HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayça PAMUKOĞLU KAYNAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı

Balçova, İzmir

ÖZET

Radyoterapi ve sisplatin gibi kemoterapötik ajanlar tek başına ya da kombine kanser tedavilerinde toksik etkiler oluşturabilir. Çalışmamızda *in vitro* koşullarda kohlea ve medulloblastom hücrelerine uygulanan radyoterapi (RT) ve sisplatinin (CDDP) oluşturduğu olası hasara karşı Asetil-L-Karnitinin etkisinin biyokimyasal ve moleküler olarak incelemesi amaçlanmıştır.

HEI-OC1 kohlea ve HTB-186 medulloblastom hücrelerine kemoterapi, radyoterapi ve kemoradyoterapi uygulanarak hücre canlılığı, apoptoz, MDA, kaspaz 3-8-9, mitokondri membran potansiyeli, ROS, GSSG/GSH, Nrf2 ve ilişkili genlerin ekspresyonları incelenmiştir. Bulguların, SPSS22 programında parametrik t-testiyle istatistik analizi yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlı kabul edilmiştir. HEI-OC1 (72saat) ve HTB-186 (24saat) hücrelerinde IC_{50} dozları; 5 Gy RT, 50 μ M CDDP (HEI-OC1), 75 μ M CDDP (HTB-186), 50 μ M ALC (HEI-OC1) ve 25 μ M ALC (HTB-186) olarak belirlendi. HEI-OC1 hücreleri kontrol grubuna göre; ALC+CDDP’de apoptoz, MDA, ROS, Nrf2 aktivasyonu ve Nrf2, GR, NQO1, GST genlerinin ekspresyonlarıyla ALC+RT’de apoptoz, MDA, ROS, HO-1 ve Nrf2 aktivasyonlarıyla NQO1, SOD3 genlerinin ekspresyonları, ayrıca ALC+CDDP+RT apoptoz, MDA, ROS, HO-1 aktivasyonu ve Nrf2, GR, HO-1, NQO1, SOD2, SOD3, GPx, GST, Gclm ve katalaz genlerinin ekspresyonları artmıştır.

HTB-186 hücreleri kontrol grubuna göre; ALC+CDDP+RT apoptoz, MDA, ROS, HO-1 ve Nrf2 aktivasyonları, GR, Gclm, NQO1, katalaz genlerinin ekspresyonlarıyla ayrıca CDDP+RT apoptoz, MDA, kaspaz 3-8-9, ROS, HO-1 aktivasyonu artmış ve GR, NQO1, Gclm, katalaz genlerinin ekspresyon ifadesi azalmıştır.

Çalışmamızda kulak hücrelerinde özellikle kemoradyoterapi+ALC uygulandığında Nrf2, antioksidan ve faz II detoksifiye edici genlerin ekspresyon seviyelerinin indüklendiği görülmüştür. Medulloblastom hücrelerine kemoradyoterapi+ALC uygulandığında Nrf2 oksidatif stres ilişkili genleri indüklerken, antioksidan ve faz II detoksifiye edici genlerin ekspresyon seviyelerini azalttığı saptanmıştır.

Anahtar Kelime: Kohlea, Medulloblastom, Asetil-L-Karnitin, Sisplatin, Radyasyon

THE EFFECTS OF ACETYL-L-CARNITINE ON HOUSE EAR INSTITUTE- ORGAN CORTI 1 (HEI-OC1) AND HTB-186 MEDULLOBLASTOMA CELLS AGAINST CISPLATIN AND RADIOTHERAPY OTOTOXICITY

Ayca PAMUKOGLU KAYNAR

Dokuz Eylul University Graduate School of Health Science Department of Oncology
Balcova, Izmir, Turkey

ABSTRACT

Radiotherapy and Chemotherapeutic agents such as cisplatin (CDDP) may produce toxic effects either alone or in combination in cancer treatments. The aim of this study was to investigate in *in-vitro* models the protective effects of Acetyl-L-Carnitine (ALC) against radiotherapy (RT) and CDDP on the cochlea and medulloblastoma cells. The possible side effects were deciphered in biochemical and molecular levels.

Chemotherapy, radiotherapy and chemoradiotherapy were used on HEI-OC1 cochlea and HTB-186 medulloblastoma cells to investigate cell viability, apoptosis, MDA, caspase3-8-9, mitochondrial membrane potential, ROS, GSSG/GSH as well as Nrf2 and related genes expressions were investigated. In the SPSS22 program for statistical analysis parametric t-test was performed and $p < 0.05$ was considered statistically significant. IC50 doses were in HEI-OC1 (72h) and HTB-186 (24h) cells; 5 Gy RT, 50 μ M CDDP (HEI-OC1), 75 μ M CDDP (HTB-186), 50 ALC (HEI-OC1) and 25 μ M ALC (HTB-186). In HEI-OC1 cells in comparison to control group; by using ALC+CDDP, apoptosis, MDA, ROS, Nrf2 activation and expressions of Nrf2, GR, NQO1, GST genes and in ALC+RT apoptosis, MDA, ROS, HO-1 and in Nrf2 activations NQO1, SOD3 genes expression as well as in ALC+CDDP+RT apoptosis, MDA, ROS, HO-1 activation and expression of Nrf2, GR, HO-1, NQO1, SOD2, SOD3, GPx, GST, Gclm and catalase genes were increased.

HTB-186 cells in comparison to control group; ALC+CDDP+RT apoptosis, MDA, ROS, HO-1 and Nrf2 activations and GR, Gclm, NQO1, catalase genes expressions also in CDDP+RT apoptosis, MDA, caspase 3-8-9, ROS, HO-1 activation increased and the expression levels of GR, NQO1, Gclm and catalase genes levels were down-regulated.

In our study especially in chemotherapy+ALC group it was observed that the expression levels of Nrf2, antioxidant and phase II detoxifying genes were induced in the ear cells. When chemoradiotherapy+ALC was applied to medulloblastoma cells, induced oxidative stress related genes like as Nrf2 however at the same time antioxidant and phase II detoxifying genes expressions levels were decreased.

Key Words: Cochlea, Medulloblastoma, Acetyl-L-Carnitine, Cisplatin, Radiation

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Medulloblastom santral sinir sisteminin (SSS) primitif nöroektodermal tümörüdür. Serebellumdan köken alır ve 4. ventriküle kadar uzanabilir (1). Tüm çocukluk çağı malign tümörlerinin %16'sını, çocukluk çağı beyin tümörlerinin %20-30'unu ve tüm posterior fossa tümörlerinin %40'ını oluşturur (10-14 yaş gruplarındaki çocuklarda en sık görülen klinik belirtilerin görülme yüzdesi yaş ilerledikçe azalır. 0-20 yaş %74, 20-25 yaş %23, > 45 yaş %3'tür. Pediatrik medulloblastomların %70'den fazlasına 10 yaş altında teşhis konulur. Tanı anında hastaların ortalama yaşı 5-7 arasındadır. Erkeklerde görülme sıklığı kızlara oranla iki kat daha fazladır. (Türkiye Birleşik Veri Tabanı, 2013) (2). Medulloblastom tedavisinde cerrahi yanı sıra radyoterapi ve sisplatin temelli tedavi rejimleri uygulanabilmektedir. Çocukluk çağında sık görülen medulloblastom tedavisinde bu tedaviler sonucu işitme kaybı oluşturabilen ototoksisiteler ortaya çıkabilmekte bu durumda çocukların eğitim ve öğrenme süreçlerini önemli bir şekilde etkileyebilmektedir.

Ototoksisite, kemoterapilerde sıklıkla karşılaşılan bir yan etkidir. İlaçların dışında bazı kimyasal maddelerin etkileriyle iç kulakta hasar ve toksik etkisiyle de kohlea ve/veya vestibül etkileyerek işitme kaybı ve dengenin bozukluğu ortaya çıkabilmektedir. Birçok ajan ototoksisiteye neden olabilir bu nedenle iç kulak dokuları hem geçici hem de kalıcı olarak zarar görebilir (3,4).

Sisplatin kohleada dış tüylü hücrelerin harabiyetiyle işitme kaybına neden olmaktadır. Sisplatin, kemoterapötik ajanların alkilleyici grubundan olup hem pediatrik hem de yetişkin tümörlerin tedavi protokollerinde yer almaktadır. Güçlü bir alkilleyici antineoplastik ajan olan sisplatin (cis-diamminedchloroplatinum II), antitümoral spektrumu oldukça geniştir. Yetişkinlerde; testis tümörleri, over tümörleri, serviks tümörleri, mesane, prostat, akciğer, baş ve boyun kanserlerinin yanında çocuklarda; beyin tümörleri, nöroblastom, hepatoblastom, osteosarkom, Wilms tümörleri, germ hücre tümör malignitelerinin kemoterapi protokollerinde yer alan temel tedavi ajanlarından biridir (5,6).

Kanser tedavisinde cerrahi ve/veya kemoterapi tedavisinin yanında radyoterapi de sıklıkla kullanılmaktadır. Radyasyonda asıl hedef DNA'dır. DNA'nın tek veya çift zincirli sarmalının kırılmasına neden olur. Hasarın oluşumu iki yolla meydana gelebilir. Radyasyonun etkisi direkt olarak DNA'daki bazların kırılmasına, ikinci etkisi de indirekt olarak gerçekleşir. Bu etki ise subletal ve potansiyel hasar oluşturarak su molekülleri ile reaksiyona girer ve reaktif oksijen ürünlerini oluşturarak DNA'da hasar oluşmasına neden olur (7).

Hücre sitoplazmasındaki uzun zincirli serbest yağ asitleri beta-oksidasyon için hemen mitokondri içerisine taşınmaz. Bir aminoasit türevi olan L-karnitin, uzun zincirli serbest yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişini sağlar. Yağ asidi oksidasyonu sonucunda veya sentezinin başlangıcında oluşan ürün Asetil-KoA'dır (8). Karnitin ailesinin bir üyesi olan Asetil-L-karnitin (ALC), KoA ve açıl-KoA oranını dengeleyen Asetil-L-Karnitin mitokondriyal metabolizmada önemi büyüktür (8,9).

1.2 Araştırmanın Amacı

Çocukluk çağında sık görülen medulloblastom tedavisinde özellikle radyasyon ve sisplatin temelli tedaviler sonucu işitme kaybı oluşturabilen ototoksisiteler ortaya çıkabilmektedir. Bu çalışmada radyasyon ve sisplatin'in medulloblastom ve işitsel kohlea hücrelerinde oluşturduğu hasara karşı Asetil-L-Kartin'in olası koruyucu etkisinin biyokimyasal ve moleküler olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

1.3 Araştırmanın Hipotezi

Çalışmanın hipotezi, radyasyon ve sisplatin'in neden olduğu oksidatif hasara karşı Asetil-L-Kartinin medulloblastom hücrelerinde hücre çoğalması/ölümü üzerine etkisi olmazken işitsel kohlea hücrelerde oksidatif strese karşı koruyucu etkisi vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Medulloblastom

Medulloblastom, beyinin arka kısmında bulunan serebellumda büyüme ve gelişme gösteren bir tümördür. Ayrıca 'posterior fossa' olarak da adlandırılan bu alan denge, duruş, el hareketleri, konuşma ve yutkunma gibi kompleks motor fonksiyonlarının kontrol bölgesidir. Çocuklarda en sık serebellumun iki yanını birbirine bağlayan dar solucan benzeri köprülerin yanında görülürken, yetişkinlerde ise serebellum gövdesinde ve özellikle kenarlarında tümör oluşumu gözlenmektedir. Medulloblastom embriyonel dönemlerde ortaya çıkan, embriyonel tümörlerin en yaygın olanıdır. İlk 1925 yılında tanımlanmış ve bu zamana kadar prevalansında değişim gözlenmemiştir. Cerrahi müdahale sırasında embriyonel tümörün görünümü pembemsi veya morumsu gri bir kitle olarak görünür (10).

Dünya Sağlık Örgütü'nün medulloblastomu histopatolojik olarak sınıflandırması: (1) *Klasik Medulloblastom*, çekirdeği koyu renkli merkeze sahip yoğun paketlenmiş, küçük yuvarlak hücre tabakalarına sahiptir. (2) *Desmoplastik Nodüler Medulloblastom*, belirgin olarak gözlenen diğer doku modelleri, gevşek, daha az hücresel alanlarla dağılmış ada yoğun paketlenmiş tümör hücreleri içerir. (3) *Yoğun Nodüler Medulloblastom*, daha belirgin nodularite dışında desmoplastik nodulere benzerdir. (4) *Büyük Hücreli Medulloblastom*, geniş yuvarlak çekirdekli tümör hücrelerinden oluşur. (5) *Anaplastik Medulloblastom*, belirgin artmış proliferasyon ve anormal şekilli çekirdekleri olan tümör hücreleri içerir. Diğer iki varyant olan *Medullomyoblastom* ve *Melanotik medulloblastom* çok nadirdir görülür ve belirtilen primer varyantlarla bağlantılı olarak ortaya çıkar (11,12)

Dünya Sağlık Örgütü'nün medulloblastomu genetik olarak sınıflandırması: (1) WNT medulloblastom, WNT yolağının aktivasyonu ile oluşur. (2) SHH (*Sonic Hedgehog*) medulloblastom, kesintisiz SHH sinyali sonucunda oluşur. (3) WNT ve SHH dışı (Grup 3 ve Grup 4 medulloblastom) WNT medulloblastomun alt tiplerinden olduğu için benzer aktivasyonlar sonucu oluşur. Moleküler çalışmaların gelişmesiyle farklı histopatolojik alt tipler belirlenerek medulloblastomanın tek bir hastalık olmasından ziyade kompleks bir

tümör olduğu anlaşılmıştır. Farklı alt tiplere sahip olduğundan uygulanan tedaviler de medulloblastomun alt tiplerine göre uygulanmaktadır (11, 13).

2.1.1 İnsidans

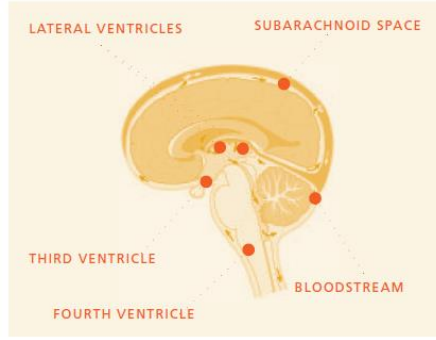
Çocuklarda görülme sıklığı yetişkinlere oranla daha fazla ve erkeklerde görülme sıklığı bayanlara göre daha fazladır. Medulloblastom, tüm pediatrik tümörlerin %18-20'sini, tüm primer beyin tümörlerinin ise yaklaşık %2'sini oluşturur. Dört yaşından küçük çocuklarda en sık görülen malign beyin tümörüdür (14).

2.1.2 Medulloblastomun Oluşum Mekanizmaları

Medulloblastom, hücre büyümesi ve hücre ölümü kontrolü sırasında meydana gelen hatalar nedeniyle oluşur. Net bir belirtisi yoktur. Tümör gen ve kromozomlarında değişiklikler tespit edilmiştir. Tüm pediatrik medulloblastomların yarısı 17. kromozomu değiştirirken tümörlerin yaklaşık %10'unda yalnız kromozom 6 delesyonu gözlenir. 1, 7, 8, 9, 10q, 11 ve 16 kromozomlarındaki benzer değişiklikler farklı histopatojik medulloblastom alt tiplerine sebep olur. Medulloblastom, klinikte kalıtsal olarak nadir karşılaşılmına rağmen tümörün gelişmesine neden olan nadir de olsa kalıtsal sendromlar vardır (Örn. Gorlin sendromu, PTCH1) (11,13).

2.1.3 Semptomlar

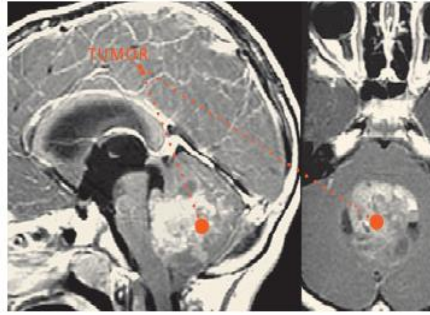
Spesifik bir semptomla karşılaşılmaz. Tümörün belirlendiği bölgeye göre farklı semptomlarla karşılaşılabilmektedir. Tümör serebellumda ise, denge ve hareket merkezi etkilenir. Beynin dördüncü ventrikülüne yakın bir yerde büyüyen tümörler o boşluğa kadar genişleyebilir ve beyin omurilik sıvısının normal akışı engellenebilir. Bu hidrosefali beyindeki boşluklardaki beyin omurilik sıvısının birikmesine neden olabilir. Bu birikim baskısı; sabah baş ağrısı, mide bulantısı, kusma ve letarji semptomları tetikler (Şekil 1) (1).



Şekil 1. Serebral Sıvı Akışı (14)
(American Brain Tumor Association. Medulloblastoma)

2.1.4 Tanı

Semptom öyküsü ve nörolojik muayene tanı için ilk adımdır. Beyindeki tümör varlığını tanımlamak için kontrast boya olsun veya olmasın manyetik rezonans görüntüleme (MRI) uygulanır (Şekil 2).



Şekil 2. Çocuklarda MRI Görüntüsünde Medulloblastom Gelişimi (15)
(American Brain Tumor Association. Medulloblastoma)

Tanının doğrulanması için biyopsi veya tümörün çıkarılması gibi cerrahi operasyonlarla doku patolojik olarak incelenerek tümörün alt grupları belirlenir (17).

2.1.5 Tedavi

Tümörün medulloblastom olduğu tespit edildiğinde cerrahi olarak mümkünse kitle en iyi şekilde çıkartılır. Hastanın yaşına bakılır, ameliyattan sonra kalan tümör miktarı ve metastazların veya tümör yayılımının miktarına göre risk grubu sınıflandırılması belirlenerek beyin ve omuriliğe radyasyon ve/veya kemoterapi uygulanır (18).

2.1.6 Cerrahi

Beyin cerrahisinin uygulanmasının üç temel amacı vardır; tümörün veya şişmenin neden olduğu beyin omurilik sıvısının oluşumunu gidermek, bir doku örneği ederek tanıyı doğrulamak ve mümkün olduğunca çok sayıda tümörü çıkararak minimal veya hiçbir nörolojik hasara neden olmamaktır. Amaç tümörün tümünü çıkarmak olsa da bazı medulloblastomlar tamamen çıkartılamaz.

Hastaların üçte birinde tümör beyin sapı içinde büyür ve potansiyel nörolojik hasar nedeniyle tümörün tamamının çıkartılması güçleşir. Bu durumda tümörün çoğunu rezeke etmek için kitlenin bir kısmı alınır, tanı onaylanır ve daha sonrasında cerrahi müdahale için yapılması gerekenler planlanır (19).

2.1.7 Radyasyon

Tümör çıkartıldıktan sonra çevre dokusunda tümör hücreleri kaldığından cerrahi müdahaleden sonra radyoterapi şarttır. Hastanın yaşı, tümörün yeri, kalan tümör miktarı ve tümör yayılımı radyasyon tedavi planlanmasında önemlidir.

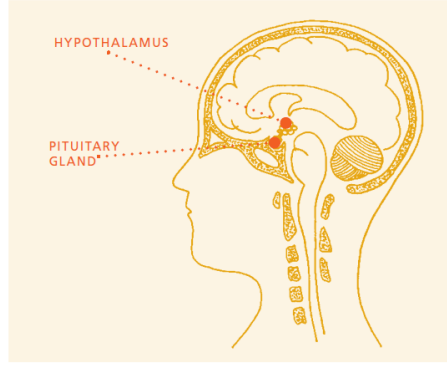
Gelişmekte olan bir beyin için beyin ve merkezi sinir sistemine yayılması, zararlı olabileceğinden radyoterapi genellikle yaşını almamış çocuklarda ertelenir bu nedenle başlangıç tedavisi olarak kemoterapi uygulanması tedavini ilk basamağıdır (20).

2.1.8 Kemoterapi

Uygulanan kemoterapi, tümör hücrelerinin omurilik sıvısına yayılma riskini ve tümörün tekrarlama riskini azaltır. Birçok araştırmada medulloblastomlu hastaların kemoterapi almayanlara göre daha iyi olduğunu düşündürmektedir. Medulloblastom yayılmış veya tip agresif olan küçük çocukların hayatta kalması zayıftır (21).

2.1.9 Yan Etkiler

Radyoterapi hem hipotalamus hem de hipofiz bezi üzerinde uzun vadeli etkilere sahip olabilir ve her ikisinde vücut fonksiyonu ve büyümesi için önemli hormonları düzenler (Şekil 3). Öğrenme bozuklukları, dikkat eksikliği, hafıza kaybını tetikleyebilir.



Şekil 3. Hipotalamus ve Hipofiz Bezi (22)
(American Brain Tumor Association. Medulloblastoma)

Kulağı içeren bölgenin ışınlanması sonucunda işitme kaybına neden olan ototoksisite ortaya çıkabilir. Özellikle sisplatin ve radyoterapinin kombine uygulanması durumunda bu hasar daha da erken ve belirgin şekilde gözlenebilir. Ayrıca obezite ve hipotiroidizm, boy kısalığı veya omurga eğriliği gibi sorunlarla da karşılaşılabilir.

Kemoterapinin kısa vadede; tüy dökülmesi, mide bulantısı, kusma, yorgunluk ve güçsüzlük gibi belirtiler gösterir. Kemoterapinin uzun vadeli etkileri; kalıcı hastalarda erken kalp, akciğer, böbrek hastalıkları da görülebilir. Alkilleyici ajan olan sisplatinin kullanımıyla çocuklarda işitme kaybı ortaya çıkabilir. İşitme kaybı, radyasyon ışınlarının kulak yakınından geçmesi durumunda da etkilenebilir (23).

2.1.10 Nüks

Çocuklarda, tümör hücreleri omurilik sıvısına tohum atma eğilimindedir. Bu hücreler omurgada tümör büyümesine neden olabilir. Bu tip yayılma, serebellumda tümör büyümesine eşlik edebilir. Yetişkinlerde tümör, serebellumda ilk önce yeniden büyüme eğilimi gösterir. Bazen, tümör merkezi sinir sisteminin başka bir yerinde ve dışında yayılabilir. Tekrarlayan medulloblastomlarda tekrar cerrahi, mümkünse tekrar radyoterapi ve kemoterapi ile agresif tedavi edilir. Daha önce kemoterapi alan hastalara rekürrens için farklı ilaçlar verilebilir ve yeni tedavileri araştıran bir klinik araştırmalar yapılabilir (24).

2.1.11 Prognoz

Hastanın tedaviye iyi cevap vermesi genel olarak teşhis anındaki yaşları ile doğru orantılıdır. Tümörün boyutu ve derecesi güvenli bir şekilde çıkarılması, kütle miktarı ve

metastatik seviyesi moleküler alt grup bilgisi ile belirli alt grup hastalarının diğerlerine kıyasla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (25).

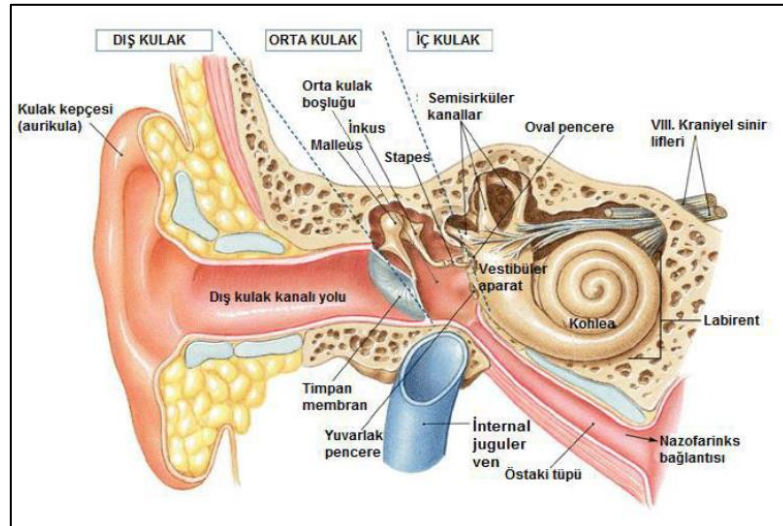
2.2 Kulak

Kulak, seslerin algılandığı auditorar (işitsel) sistem hem de denge için vestibular sistem olarak iş gören üç bölümlü duysal bir organdır. Bu bölümler; dış kulak, orta kulak ve iç kulak olarak isimlendirilir, her üç bölüm de işitme ve vestibular sistem için gereklidir.

Dış ve orta kulak ses enerjisini toplayarak iç kulağa iletirken iç kulaktaki işitsel ve duysal reseptörler de bu enerjiyi elektriksel impulslara çevirirler. Vestibular sistemde bulunan duysal reseptörler ise denge algısından sorumludurlar. Yerçekimi ve başın hareketlerine bağlı olarak baş-göz hareketlerini koordine etmeye yardım ederler (34).

2.2.1 Kulak Anatomisi

İşitme ve dengenin periferik organı olan ve canlının çevresiyle uyumunda önemli rol alan kulağın büyük bir kısmı temporal kemik içine yerleşmiştir. Anatomik olarak üç kısımdan oluşmuştur. Bunlar: Dış kulak, orta kulak ve iç kulaktır (Şekil 4) (27,28).

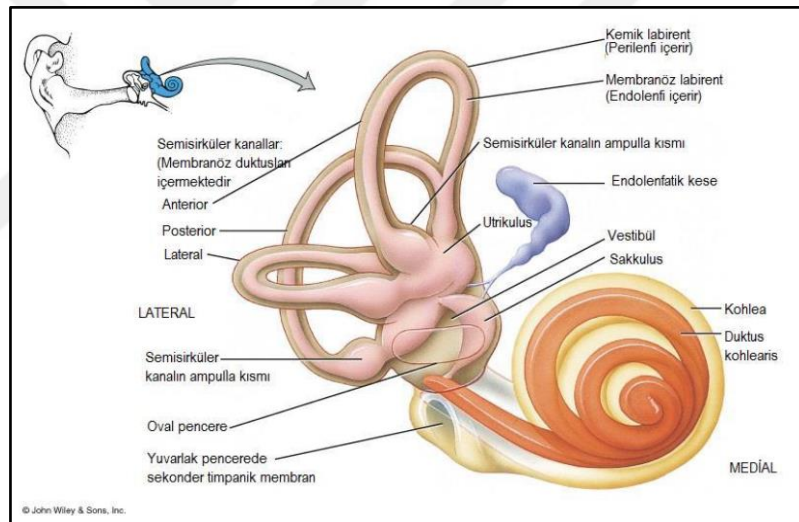


Şekil 4. Kulak Yapısı (35)
(Eroğlu S. İletim Tipi İşitme Kayıplarının Kohlea Üzerindeki Etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2018.)

Dış kulak; kulak kepçesi (auricula), dış kulak yolu (meatus acusticus externus) ve timpanik membranın lateral yüzünden meydana gelir (Şekil 4) (28).

Orta kulak boşluğu yani timpanik kavite; timpanik zar ile iç kulak arasında kalan, yüzeyi mukoza ile örtülü, hava içeren düzensiz bir boşluktur. Dış ortam ile bağlantısını östaki borusu ile sağlarken, aditus aracılığıyla da orta kulak ile mastoidin havalı boşlukları arasında bağlantı sağlar (Şekil 4) (29).

İç kulak; işitme ve denge ile ilgili reseptörlerin bulunduğu kısımdır ve temporal kemiğin petröz parçası içerisinde yer alır. Akuaduktus vestibüli ve akuaduktus kohlea ile intrakraniyal bağlantılıken, yuvarlak ve oval pencere aracılığıyla da orta kulak ile bağlantılıdır (Şekil 4) (Şekil 5) (29,30,31).



Şekil 5. İç Kulak Anatomisi (35)
(Eroğlu S. İletim Tipi İşitme Kayıplarının Kohlea Üzerindeki Etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2018.)

İç kulak, membranöz labirent ve kemik labirent olarak ikiye ayrılır:

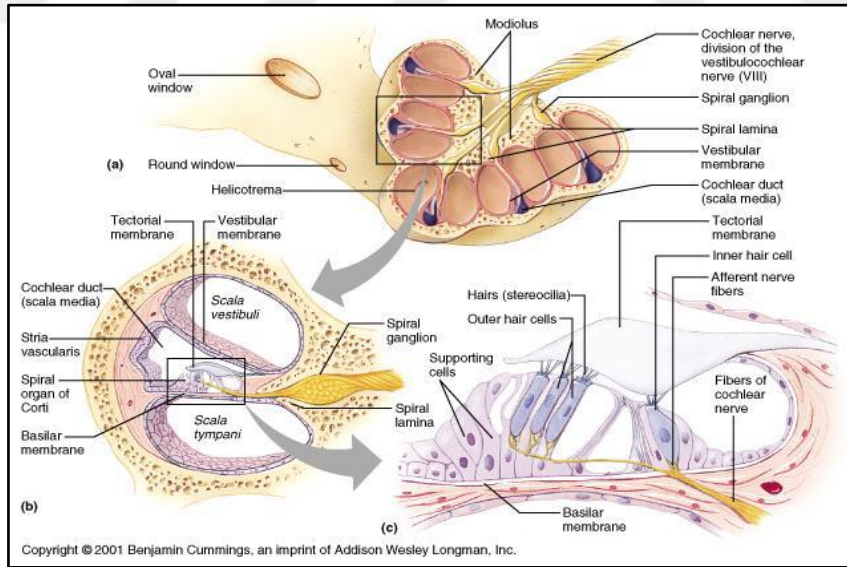
- *Kemik (osseöz) Labirent;* otik kapsül denen sert kompakt kemik dokusundan oluşmuştur ve vücudun en sert kemiğidir. Kemik labirentin içerisinde zar labirent yer alır ve ikisinin arasında ‘perilenf sıvısı’ bulunur. Kemik labirent; vestibulum, kemik semisirküler kanallar, akuaduktus vestibuli, akuaduktus kohlea yapılarından oluşur.

- *Zar (membranöz) Labirent*; kemik labirent içerisinde ve onunla aynı şekildedir. Ancak kemik labirentin 1/3 kadarını doldurur. Zar labirent; utrikulus sakkulus, duktus semisirkularis, duktus endolenfatikus, duktus perilenfatikus, korti organı (Şekil 7), duktus kohlearis yapılarından oluşur (29,32).

2.2.1 Kulak Histolojisi

Kohlea: İç kulağın ön kısmına yerleşik, salyangoz benzeri kemik bir tüptür. İşitme organı olan korti organı kohleadaki baziller membran üzerinde bulunmaktadır. Ayrıca kohleanın en önemli ve duysal reseptör hücrelerinin bulunduğu yer olan duktus kohlearis üç bölüme ayrılır (Şekil 2) (33).

- a. Reissner Membranı:** Kohlea Modiolus düzeyinde üç bölüme ayrılır skala vestibuli, skala media ve skala timpani. Reissner membranı ise skala vestibuli ile skala mediyı birbirinden ayıran birer sıra hücre arasına yerleşmiş ince bazal laminadır.



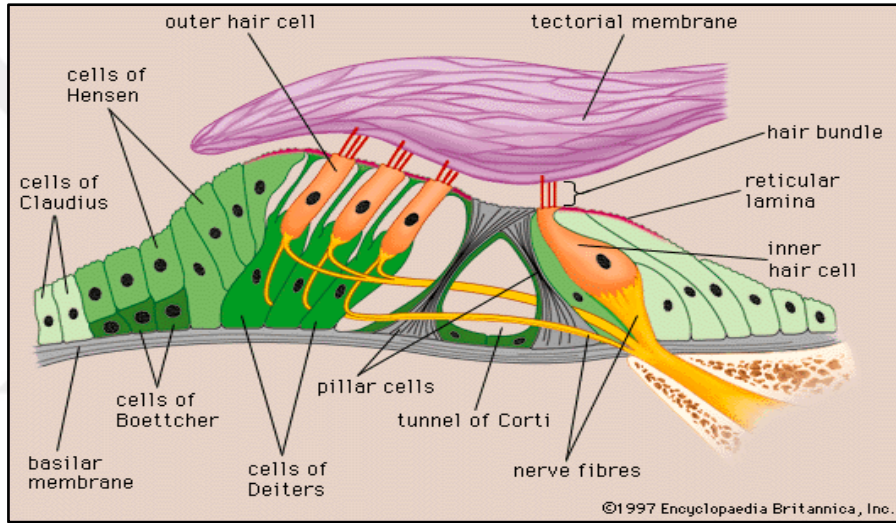
Şekil 6. Kulak Histolojisi (26)

(Yılmaz S. Rat Modelinde Topikal Rifamisin Uygulamasının Ototoksik ve Orta Kulak Mukozası Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Adana. 2016.)

- b. Lateral Duvar:** Duktus kohlearisin yan ve dış duvarlarını oluşturur. Marjinal hücreler, Intermediate hücreleri ve Bazal hücreleri içerir.

c. Baziller Membran: Bağ dokusundan meydana gelmiştir. Membranın dış tarafında Cladius hücreleri bulunurken bu hücreler ile baziller membran arasına yerleşmiş Boettcher hücreleri bulunmaktadır (32,34).

Korti Organı: İşitme fonksiyonunda görev alan en önemli yapıdır (Şekil 7). Baziller membran ve perilenfteki mekanik titreşimleri elektrik akımlarına dönüştürerek sinir liflerini uyaran, transdüksiyon işlemini gerçekleştiren iki tip sensoriyel hücre görülür; iç ve dış tüylü hücreler (35). Bunun dışında destek hücreleri, afferent ve efferent sinir sonlanmaları, iç ve dış pillar hücreler ve falangeal hücreleri bulunur (29).



Şekil 7. Korti Organı (34)

(Bünyamin T. Amikasinin Ototoksik Etkisinin ve E Vitamininin Ototoksisteki Olası Protektif Etkisinin, Sıçan Kokleasında Otoakustik Emisyon ile Araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2008.)

İç tüylü hücreler; kohlear duktusun 2,75 dönüşü boyunca uzanan tek bir hücre dizisi iç tüy hücreleridir. Vestibüler tüylü hücrelere benzerler. Bu hücreler destek hücrelerinin sıkıca sardığı yassı görünümlü tek tabaka oluştururlar. İç tüylü hücrelerin taban kısmında birçok sinaptik sinir sonlanması görülür (29,33).

Dış tüylü hücreler; retikuler lamina içinde medialden laterale doğru dizilmişlerdir ve Korti organı içinde yer alan Deiters hücrelerine apikal ya da bazal uçlardan bağlanır. İç tüylü hücrelerin aksine dış tüy hücreleri dizisi kesintisizdir ve hücrelerin sayısı değişkendir (33,36).

Falangeal hücreler; tüy hücrelerini destekleyen falangeal hücreler, iç tüy hücrelerini tamamen sararken dış tüy hücrelerinin sadece bazal kısımlarını çevrelerler. Tüy hücrelerinin apikalinde yassılaşılarak tüy hücrelerini çevreleyen plak oluştururlar (34).

Pillar hücreler; geniş apikal ve bazal yüzeyleri vardır ve plaklar oluşturur. İki tipdir iç ve dış pillar hücreler. İç pillar hücreler spiral laminada yer alırken dış pillar hücreler baziler membrandan bulunur (34).

Stereosilia; aynı zamanda sensorial hücrelerdir. İç ve dış tüylü hücrelerin, hücre iletimini sağlayan apikal stereosiliaları bulunur. Tabandan tepeye ve içten dışa doğru uzunlukları artar. Stereosilialar yatay ve dikey bağlantılarla birbirlerine bağlanmışlardır (37).

Sisplatinin Kulak Üzerindeki Ototoksisitesi

Sisplatinin ototoksisite mekanizmaları hücresel ve moleküler düzeyde olmak üzere iki ana başlıkta sınıflandırılır:

Hücresel düzeydeki mekanizmaların etkileri

- ✓ Dış tüylü hücre hasarı; sisplatin ilk olarak kohleanın bazal kısmındaki dış tüylü hücreleri etkiler. Daha sonra kohleanın apeksine ve iç tüylü hücrelere doğru hücre hasarı yayılır.
- ✓ Destek hücre hasarı
- ✓ Stria vasküleriste marjinal hücre hasarı sonucunda potasyumun geri alımı ve salgılanması bozulur.
- ✓ Spiral ligament hasarı
- ✓ Spiral ganglion hücre hasarı.

Moleküler düzeydeki mekanizmaların etkileri

- ✓ Reaktif oksijen radikali artışı ise Sisplatin'in etkisi ile salgılanan NADP oksidaz artar
- ✓ Serbest oksijen radikalleri artışı ile aktive olur

- ✓ Glutasyon ve antioksidan enzimlerin azalması: Kohlear dokular oluşan oksidatif streten glutasyon, glutasyon redüktaz, superoksit dismutaz ve katalaz enzimleri ile korunmaya çalışır
- ✓ Lipit peroksidasyon artışı
- ✓ Proteinlerin oksidatif modifikasyonları
- ✓ Caspas aktivasyonu ile nükleik asit hasarı
- ✓ Kohlear proteinlerin S-Nitrosilasyonu (38).

Tüm bu etkiler sonucunda işitme kaybının ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İşitme kaybında öncelikle kohleanın bazal kıvrımı etkilendiği için yüksek frekanslarda başlar sisplatinin verilen doz miktarı arttıkça (>100mg/m²) da kohleadaki hasar apekse doğru ilerler ve orta frekanslarda da işitme kaybı ortaya çıkar. Bu hasar mekanizmaları üzerinden çeşitli tedavi modaliteleri denenmiştir. Uygulanacak tedavinin hem sisplatinin antitümoral etkisini bozmaması hem de insanlar üzerinde uygulandığında toksik yan etkilerinin olmaması gerekir. Bunun için sistemik tedavi ile iç kulağa yeterli miktarda geçişin sağlanamadığı ajanlar intratimpanik yolla uygulanmışlardır. Bu tedavi yöntemlerinin bazıları ototoksisiteden korumak bazıları da ototoksisiteyi düzeltmek amacıyla uygulanmıştır. Yapılan araştırmaların bazıları sadece hayvan deneyleriyle sınırlı kalmış bazıları ise klinik uygulamalar ile desteklenmiştir.

2.3 Radyasyon

2.3.1 Radyoterapi Hakkında Genel Bilgiler

Radyasyon, enerji verebilen radyant (ışın yayan) enerjinin türlerinden biridir. Radyoterapide yüksek enerji veren X ışınları ya da partikülleri kullanarak hastalıkların tedavisi amaçlanır. Kanser tedavisi için uygulanan radyoterapinin ana ilkesi kanserli hücreleri tahrip etmektir. Radyasyon ile DNA'ya kalıcı zararlar verilir ya da serbest oksijen radikalleri oluşturarak hücre içi hasar ile kanserli hücrelerin öldürölmesi amaçlanır. Radyoterapinin uygulanmasıyla hücrede oluşan hasara bağlı olarak hasarı tamir ederek hücre yaşamına devam edebilir veya hücre ölümü gerçekleşebilir.

Kanser hastalarına uygulanan cerrahi ve kemoterapi tedavi yöntemlerinin yanında radyoterapi tedavisi tek başına uygulanabileceği gibi cerrahi ve/veya kemoterapi ile kombine olarak da uygulanabilir. Kanser hastalarının %50'sinin fazlasında küratif veya palyatif olarak radyoterapi uygulanmaktadır (7,39).

2.3.2 Radyasyon ve Türleri

Radyasyon, madde içine işleyebilen ışınlar için kullanılan terimdir. Bir atom çekirdeğinin kararsız durumdan daha kararlı bir hale geçerken elektromanyetik dalga ya da parçacık şeklinde enerjisinin yayılmasına radyasyon denir.

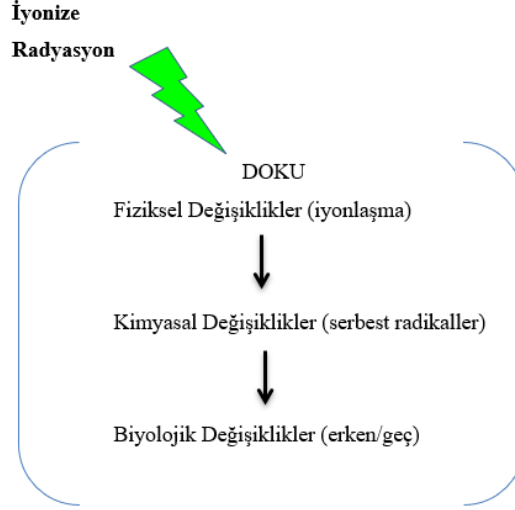
Dokuların x-ışınları ve gama-ışınları gibi yüksek enerjili fotonlarla etkileşimi sonucunda biyolojik moleküllerle reaksiyona girdiklerinde reaktif iyonlar oluştururlar. Baz hasar ve kaybına, tek veya çift zincir kırıklarına (rekombinasyonu uyarır, baz delesyonu, kromozom kayıpları görülür), DNA kendisiyle ya da proteinlerle çapraz bağlar oluşturarak moleküler yapıyı bozar (7). Radyasyon türleri iki başlıkta incelenir:

a. İyonize (iyonlaştırıcı) Radyasyon: Madde içerisinden geçerken enerjisini ortama aktarmak yoluyla, ortamdaki atomları doğrudan veya dolaylı olarak iyonlaştıran radyasyon türüdür. İyonize radyasyon, doku ile etkileşime girerek fiziksel, kimyasal ve biyolojik değişikliklere neden olarak hücre içerisindeki molekülleri ve atomları iyonize eder. İyonize radyasyon UV, alkilleyiciler veya kansere karşı kullanılan kemoterapötikler pürin veya pirimidine bağlanarak çapraz bağ veya zincir kırıkları oluşturabilir (Şekil 10).

İyonize radyasyonlar içinden enerjilerini aktararak geçtiği hücre ve dokular içerisinde absorbe edildiğinde uyarılmaya ve iyonizasyon görülür. Elektronlar ve protonlar gibi yüklü parçacıklar direkt iyonizasyona yol açar. X ışınları, gamma ışınları ve nötronlar ise indirekt olarak iyonizasyon yaparlar (39). İyonize radyasyonun dokuyla temasından itibaren fiziksel, fiziko-kimyasal, kimyasal ve biyolojik olarak farklı etkilerde cevap oluşur (Şekil 8) (7).

b. İyonize (iyonlaştırıcı) Olmayan Radyasyon: Radyo dalgaları, kızıl ötesi ışık, mor ötesi ışık (ultraviyole), görünür ışık, baz istasyonları, cep telefonları, elektrik iletim hatları,

trafo merkezleri ve elektrikli ev aletleri iyonlaştırıcı olmayan radyasyon grubuna girerler (39).



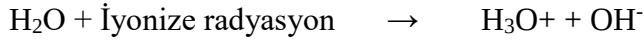
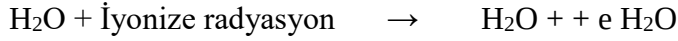
Şekil 8. İyonize Radyasyonun Dokudaki Etkileri

2.3.3 Radyoterapi Etki Mekanizması

Radyoterapi ile hücreler çoğalma kabiliyetlerini kaybederler. Radyoterapi ile hücrede mitotik aktivite, protein ve DNA sentezi devam etse de hücre bölünüp çoğalabilme yeteneğini kaybetmişse ölü kabul edilir. Tümör radyoterapisi için başlıca amaç ya malign hücreleri tümü ile tahrip etmek ya da bu hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarına son vermektir (40).

Radyasyon nükleusa olan duyarlılığı sitoplazmaya oranla 1000 kat daha fazladır. Hücre içindeki asıl hedef DNA'dır. Hücresel peptidler, lipidler ve DNA hücre sıvısı ile iyonize radyasyonun direkt veya indirekt reaksiyona girmesi ile etkileşerek geri dönüşsüz reaksiyon oluşumuna neden olur. Dokudaki oksijenlenme iyonize radyasyonun daha çok biyolojik hasar oluşturmaya neden olur. Oksijen varlığında radyasyon alan hücreler, anoksik ortamda radyasyon alan hücrelere göre yaklaşık üç kat daha radyosensitiftir. Hipoksik ortamdaki canlı tümör hücreleri radyasyon tedavisine daha dirençlidir (40).

Radyasyon hedef hücre üzerine hem direkt etki ile hasar verir hem de hücre içi su ile reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ve hücre için toksik etkiye sahip olan serbest oksijen radikalleri ile hücre hasarına neden olur. Su, en önemli serbest radikal kaynağıdır (7).



Serbest radikal, hidroksil (OH^-) bağlarını ayrıştırarak farklı biyolojik ve kimyasal etki oluşturur. Oluşan hasarların çoğu tamir edilirken ortamdaki O_2 , serbest radikal ile birleşerek peroksidaz oluşuma neden olur (7,39).

Radyasyonun hücreye verdiği hasar 3 ayrı kategoride sınıflandırılabilir:

a. Lethal hasar: Geriye dönüşümsüz, tamir edilemez hücre ölümü

b. Sublethal hasar: İkinci doz eklenmediğinde normal şartlarda kısa sürede hücrenin kendini tamir edebileceği hasar

c. Potansiyel olarak lethal hasar: Hızlı olarak bölünen dokular tarafından ve yüksek radyasyon uygulamasından sonra tamir edilemez bir hücre hasarı meydana gelir.

Radyasyonunun direkt veya indirekt etkileri hücreyi öldürebilir ya da fonksiyonunu bozabilir. Hücrenin tamir edici mekanizmaları özellikle radyasyona karşı hassas ve duyarlıdır. DNA içeriğindeki kayıp ve/veya hasar hücrenin fonksiyonel değişimine sebep olur. Bu gibi durumlar sonucunda hücrede ayrılma olmaksızın bölünme, çok nükleuslu hücre gelişimine veya kontrol edilemeyen çoğalmalara neden olur (40).

2.3.4 Radyasyonun Moleküler Düzeyde Etkileri

Direkt veya indirekt olarak iyonize radyasyonun moleküler etkisi görülmektedir. Direkt olarak değişikliğe uğrayan molekül direkt iyonize radyasyona maruz kalarak uyarılır. İndirekt olarak da iyonize radyasyon sonucu oluşan bazı ara ürünler farklı bir dizi kimyasal reaksiyona girerek diğer moleküllerin değişmesine neden olur. Hücredeki etkileşimlerin çoğu su molekülleriyle etkileşime girmiş reaktiflerdir. Bunun nedeni

hücrelerimizin %70'nin su olmasından kaynaklanır. Oluşan radikallerle stabil maddeler oluşur (40).

Hidrojen ve hidroksil grupları kısa ömürlü ve reaktif radikallerdir. Bu radikaller iyonizasyon sonucunda en dış elektron yörüngelerindeki boşlukları doldurabilecek farklı atomlar ararlar ve yüksek reaktif özelliklerinden dolayı tekrar birbirlerine bağlanırlar. Bu bağlanma sonucunda oluşan kuvvetli oksitleyici ürünler hücrede fonksiyonel görevi olan önemli moleküllerle reaksiyona girerek yapısını ve fonksiyonunu bozar (39).

2.3.5 Radyasyonun Hücresel Düzeyde Etkileri

Radyasyonun en çok etkisi nükleusadır. Hücrenin bölünme aşamasında kromozomların radyasyona olan duyarlılığı sitoplazmadan daha fazladır, büyüme baskılanır. Radyasyon hasarı sonucunda oluşan değişiklikler mutasyonla sonuçlanabilir veya hücrenin ölümüne neden olabilir (7,40).

2.4 Ototoksisite

İç kulak gürültü, enfeksiyon veya ilaç gibi çeşitli dış etkilerin etkisiyle zarar görebilir (38). Günümüzde ototoksisiteye neden olduğu bilinen sisplatin başta olmak üzere antineoplastik ajanlar (nitrojen mustard, vincristin), antibiyotikler, antienflamatuarlar (salisilatlar, naproksen), bazı loop diüretikler (bumetanid, furosemid, etakrinik), bazı antiseptik solüsyonlar, aminoglikozidler (streptomisin, kanamisin, neomisin), şelat yapıcı ajanlar (desferoxamine), antimalaryal ilaçlar dışında birçok ilaç ve kimyasal maddenin ototoksik etkileri bilinmektedir. Ototoksik ajanların uygulanmasıyla öncelikle iç kulakta belirli bir bölge etkilenir sonrasında da artan toksik süreç ile diğer bölgeler de bu etkilere maruz kalır (4,41,42). Çeşitli terapötik ajanlar ve kimyasal maddelerin uygulanması sonucunda kokleya tüylü hücrelerini, kohlea ve vestibüler organa toksik etkisi hasara neden olduğundan geçici veya kalıcı hasar görebilir. İç kulağın çeşitli kimyasal maddelere karşı duyarlılık göstermesi ototoksisitenin neden olduğu semptomlar tinnitus (çınlama), işitme kaybı, baş dönmesi ve dengesizliktir. Sensörinal işitme kaybı gözlenir. Bu kayıp kalıcı da olabilir geçici de olabilir (41,43).

Ajanların oluşturduğu (örn. sisplatin) ototoksisite çocuklarda ve prematüre bebeklerde daha belirgindir (3). İlaçların ototoksik etkilerini önlemek için araştırmalar daha çok gentamisin ve sisplatin ototoksisitesi üzerinedir. Bu ajanların toksik etkilerini de önlemek için çeşitli koruyucu ajanlar uygulanarak oluşan hasarları engellemek veya aza indirmek amaçlanmaktadır.

2.5 Sisplatin

1970’li yıllara sıvı ortamda platin elektrolitler ile oluşturulan elektriksel alanın *Escherichia coli* bakterinin çoğalması üzerindeki etkisini incelemek üzere yapılan deneyler sırasında tesadüfen antibakteriyel ve antineoplastik etkisi olduğu fark edilmiştir (44,45). 1978 yılında FDA tarafından platin grubu kemoterapötik ajanların kanser tedavisinde kullanımı onaylanmıştır (6,46).

Sisplatin, antimitotik aktivitesi ve antineoplastik özellikleri olan; erişkinlerde solid tümörlerde, SSS malignitelerinde, over, serviks, testis, prostat, akciğer, baş boyun skuamöz hücreli karsinomda, beyin mesane kanser gibi malign tümör ve çocukluk çağı dönemindeki birçok farklı kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. Erişkinlerde görülen kanser tedavilerinin dışında çocukluk çağı kanserlerinde de kullanılır (6,46).

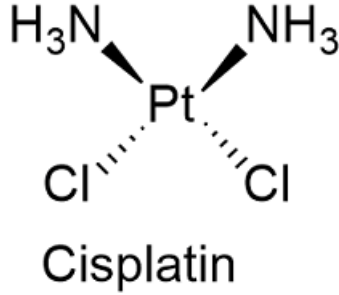
2.5.1 Sisplatinin Kimyasal Özellikleri

Güçlü bir alkillayıcı ajan ve platin içeren ilaç olan sisplatinin kimyasal adı cis-diamminedchloroplatinum II ($\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}^{+2}$, CDDP), neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçtır. Yatay düzlemde cis pozisyonunda platin atomuna bağlı klor ve amonyum içeren inorganik suda çözünen bir moleküldür. Cis- izomeri sitotoksik etki gösterirken, trans izomerinin antineoplastik etkisi yoktur (Şekil 9) (5,44).

2.5.2 Sisplatinin Farmakokinetik Özellikleri

Sisplatin, gastrointestinal sistemte absorbe olmadığı için intraperitoneal ve intravenöz olarak uygulanır. Sisplatin, intravenöz uygulamayla plazma proteinlerine bağlanır. Sisplatinin intravenöz uygulanması vücut sıvılarına ve dokulara hızlı bir şekilde dağılır. Özellikle prostat, karaciğer ve böbreklerde yüksek konsantrasyonlarda dağılır. *In*

vivo çalışmalar sisplatinin ve onun platin içeren ürünlerinin sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (47,48).



Kimyasal İsim: cis-diamminedichloroplatinum

Moleküler Formül: $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}^{+2}$

Kısaltma: CDDP

Moleküler Ağırlık: 301.1 g/mol

Renk: Berrak Çözelti / Koyu Sarı Kristal Toz

Erime Noktası: 270 °C

Suda Çözünürlük: 2.53 g/L (25 °C)

Sentezi: Hegzakloroplatinat tuzunun hidrazin ile redüksiyonu sonucu elde edilen potasyum tetrakloroplatinat, amonyum klorür ve amonyum hidroksit ile nötralizasyonu sonucunda elde edilir.

Şekil 9. Sisplatinin Moleküler Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri.

2.5.3 Sisplatinin Yan Etkileri

Sisplatin tedavide kullanılmasının yanında şiddetli bulantı, kusma, nefrotoksisite, ototoksisite, nörotoksisite, miyelosupresyon, gastrointestinal toksisite, kemik iliği toksisitesi, kardiyovasküler hasar gibi sınırlayıcı yan etkileri de vardır (6,49,50,51).

2.5.4 Deneyisel Çalışmalarda Toksik Etkilere Neden Olan Mekanizmalar

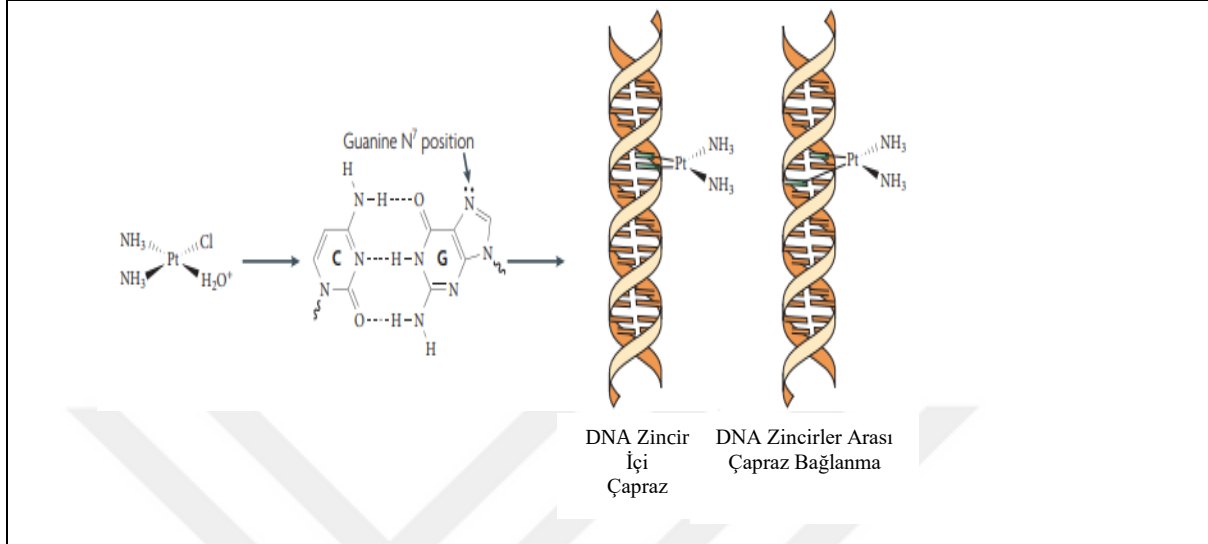
a) Membran Taşıyıcılarının Rolü

Sisplatinin nefrotoksik etkiye neden olduğu düşünülen iki farklı membran taşıyıcı sistem belirlenmiştir. Bunlardan ilki kolaylaştırılmış difüzyon ile taşınarak hedef organlarda orantısız olarak birikerek nefrotoksisiteye yol açmasıdır, ikinci taşıyıcı sistemde bakır transport proteini ‘copper transport 1’dir (52,53,54).

b) Sisplatinin Toksik Metabolitlere Dönüşümü

Sisplatin renal tübüler hücrelerde glutatyon-S-transferaz Pi (GSTP) enziminin katalizlemesiyle glutatyon konjugatlarına (Pt-GSH) dönüşür. Oldukça kararsız yapıdaki bu

konjugatlar farklı metabolik aktivitelerden geçerek yüksek reaktif sistein tiyollere dönüşmesi toksik etkiye neden olur (52,55).



Şekil 10. Platin Bazlı Kemoterapötik lerin Etkisi (60)
(Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nat Rev Cancer. 2007; 7(8): 573-84.)

c) Nüklear ve Mitokondriyal DNA Hasarı

Mitokondriyal DNA, RNA ve diğer hücrel bileşenler platin yapılar için güçlü reaktanlar içerirler. Sisplatin hücre içine girdikten sonra klorür iyonları ile su molekülleri yer değiştirir. Bu reaksiyon sonucu pozitif yüklü olan platin kompleksleri DNA'nın nükleofilik kısımlarına kovalent bağlarla bağlanarak DNA çift zincirinde zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlanma yaparak DNA, RNA ve protein sentezlerini baskımlarken bazı sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptozu tetikler. Sisplatin, sitotoksik etkisini DNA'nın bütün bazlarına özellikle de guanin ve adeninin N7 pozisyonuna bağlanarak DNA'nın yapısını bozarak kanser hücrelerinin replikasyonunu ve transkripsiyonunu baskılar (Şekil 6) (5,44,53,56,57,58). Sisplatin, tümör hücrelerinde DNA onarım mekanizmasında interferasyona ve DNA hasarına neden olarak kanser hücrelerinde apoptozu indükler (46) ve toksisiteye neden olur (59).

d) Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Fonksiyon Bozukluğu

Sisplatine bağlı serbest oksijen radikal oluşumu özellikle karaciğer ve böbrekte lipid peroksidasyonun arttırmasına ve oksidatif stres ile indüklenen DNA hasarına sisplatin toksisitesi neden olur (52,61). Reaktif oksijen türleri oluşumu sisplatin konsantrasyonuna

ve sisplatine maruz kalma süresiyle ilişkilidir. Reaktif oksijen türleri hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarla apoptozu indükler (62,63).

Lipid peroksidasyonu ile membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmaya neden (Şekil 10) olan mutajenik, genotoksik ve karsinojen bileşik olan malondialdehit (MDA) ekspere olur. Lipit peroksidasyonu zarın yapısını ve akışkanlığını bozar, iyon transportuna ve enzim fonksiyonlarına zarar verir (64).

e) Apoptoz Aktivasyonu

Sisplatin ile indüklenen tümör hasar mekanizması apoptozun indüklenmesiyle gerçekleşir. Hücrenin apoptoza girmesi DNA onarım mekanizması ve apoptotik sinyal yollarının inaktivasyonu ile ilişkilidir (65). Sisplatin düşük dozlarda uygulandığında apoptoz kaspaz bağımlı yollarla indüklenirken, daha yüksek sisplatin dozlarında nekroza neden olur (59). Sisplatin aracılı reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres apoptozu indükler.

Sisplatin, mitokondride elektron transport zincirini negatif yönde etkileyerek hücrede ATP kaybına neden olur. Doz artışı olduğunda ATP'nin hızla azalarak metabolik işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne neden olur (61,66,67).

f) İnflamatuvar Yanıtın Artması

Proinflamatuvar sitokin olan TNF-alfa, serbest oksijen radikallerinin üretimi birçok sitokini tetikleyerek apoptozu indükler ve toksisiteye neden olur (68). Farklı sitokin ve kemokinlerin sisplatinin sitotoksik ve toksik etkilerini artırır (52,68).

2.5.5 Sisplatin Ototoksitesi

Sisplatinin ototoksik etkisi genellikle bilateral geri dönüşümsüz, bilateral, progresif, sensorinal işitme kaybı ve tinnitusa neden olur. Siplatinin kullanılması tinnitusa neden olur. Vestibülotoksite etkisi ise nadirdir (69). Sisplatin, kohlear dokular ile etkileşime girerek stria vaskularis dejenerasyonuna neden olur ve spiral ganglion hücrelerinin sayısını azaltır. Stria vaskularis, alt kıvrımdaki tüylü hücrelerde ve kohlear sinirde hasar oluşur (70).

Ototoksisite genellikle tedavinin ikinci günü ortaya çıkar ve tedavi kesildikten yedi gün sonraya kadar sürebilir. Sisplatin hipertonic solusyonlarla birlikte uygulandığında ototoksik etki azalmaz. Sisplatinin veriliş yolu, yaş diyet, serum protein düzeyi, genetik faktörler veya kranial radyoterapi öyküsü dahil toksisite insidansını etkiler (71,72,73).

2.5.6 Sisplatinin Ototoksik Etkisi Mekanizması

Sisplatin ototoksisitesinin etki mekanizması *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sisplatin stria vaskülaris ve korti organında hasara neden olduğu bildirilmiştir. Sisplatinin ototoksik etkisi; kohleanın bazal kıvrımındaki dış tüylü hücrelerden apikaldeki iç tüylü hücrelere doğru hasara neden olur. Sisplatine bağı ototoksisite iyon kanalı blokajı ve lipid peroksidasyonu olarak iki ayrı mekanizmayla gerçekleşir. İyon kanalı blokajı; dış tüylü hücre membranlarında hiperpolarizasyonuna ve işitme eşiğinin de yükselmesine neden olan iyon transdüksiyon kanallarının blokajıdır. Sisplatin uygulandıktan sonra kohleada oksijen radikalleri oluşur. Oluşan serbest radikaller intraselüler glutatyon düzeyini azaltır, hücrenin savunma sistemini bozarak lipid peroksidasyonuna neden olur. Buna bağı olarak da tüylü hücrelerde, destek hücrelerinde, stria vaskulariste ve odituar sinirlerde apoptoz indüklenir (70,74,75,76). Düşük sisplatin dozunda sterosilialarda, yüksek sisplatin dozunda mitokondri ve endoplazmik retikulum hasarı, korti organı destek hücre hasarı ve dış tüy hücrelerinde kayıp gözlenmektedir (49,71,77,78).

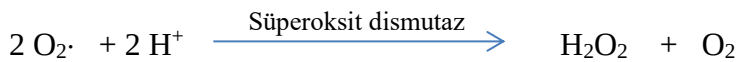
Sisplatin süperoksit iyonları veya hidroksil radikalleri gibi farklı oksijen türlerini üretebilir. Normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir, lipid peroksidasyonu indikatörü olan malondialdehit oluşumunu indükler. Reaktif oksijen türleri (ROS) temizleyen ve modifiye eden antioksidan enzimler, vitamin E ve glutatyon gibi küçük moleküller hücresel hasarı sınırlandırmada rol oynayarak (79,80) eşlenmemiş elektronları olan serbest radikallere bağlanır ve hasara karşı koruma sağlarlar. Üretilen ROS kontrol edilmezse protein, DNA veya doymamış yağlar gibi çeşitli hücresel komponentlerle reaksiyona girerek hücre ölümlerine, kimyasal modifikasyonlara, metabolik yapısal değişikliklere neden olur (71,81).

2.6 Serbest Radikaller

Serbest radikal, atomik orbitalinde eşleşmemiş elektronu (e^-) bulunduran atom veya molekül olarak tanımlanır. Serbest radikaller reaktif, kararsız, moleküler ağırlıkları düşük ve yarı ömürleri de kısadır. Kararlı hale geçmeleri için elektron verip yükseltgenir veya elektron alarak indirgenirler. Oksidatif stres vücudun antioksidan savunması ile oluşan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizliktir (82,83). Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi tetikler ve böylece antioksidan enzim sistemi de aktive olur. Hücrenin fonksiyonel yapısı ve savunma sistemi bozulduğundan hücre savunma yapamaz. Bu nedenle DNA, protein, karbonhidratlar ve lipitlerde hasar görülür (83,84). Radyoterapi ve bazı kemoterapötik ajanlar, serbest radikaller oluşturarak hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Böyle bir durumda hücre savunma mekanizmasında görevli antioksidanları devreye sokarak ROS ve serbest radikalleri nötralize etmeye çalışır (85,86).

Oksijen, bir radikal olarak hidrojen atomlarını koparabilir. Biyolojik sistemlerde oksijen elektron alıcıdır ve moleküler oksijen bir elektron aldığı anda süperoksit (O_2^-) adı verilen bir radikal anyonuna dönüşür. En önemli serbest radikal, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir (87).

Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevrilir. Süperoksitten daha az etkili olan H_2O_2 , katalazların etkisiyle farklı ürünlere dönüştürülerek etkisiz hale gelir. Bazı moleküller SOD'un etkinliğini azaltırken, bazıları da tam tersi lipid peroksidasyonu hızlandırır (88).



SOD enzimi, süperoksit düzeyini düzenler. Bunu da süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyerek gerçekleştirir. $HO^\cdot$, H_2O_2 ürettiği için toksik etki yapar. Katalaz enzimi devreye girerek H_2O_2 su ve oksijene parçalanmasını katalizler (82,83,89).

Canlı organizada, *in vivo* ve aerobik koşullarda reaktif oksijen metabolitleri oluşur. Kaynakların tümü yerine reaktif oksijen ve reaktif nitrojen metabolitlerinden önemli olanlar ve sıklıkla araştırmalarda yer alanlar alt başlıklarda açıklanacaktır.

2.6.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest radikallerin çoğu oksijenden oluşan radikallerdir ve ROS olarak ifade edilirler. Normal şartlarda aerobik metabolizmada yaklaşık %1 oranında ROS oluşur. (8,90). Normal hücre fonksiyonunda veya immun savunma sisteminde belirli seviyede ROS gereklidir. ROS hücre proliferasyonu, apoptoz, immun yanıtlar, antioksidan sistem veya sinyal ileti yolları gibi çeşitli fonksiyonel görevlerde yer alır (91,92). ROS sıklıkla kanser, kardiyovasküler komplikasyonlar, akut ve kronik inflamasyon ve nörodejeneratif durum gibi hastalıklarda indüklendiğinden ROS seviyesini kontrol etmek ve birikmelerini önlemek için hücrel savunma mekanizmaları gereklidir. NADPH: kinon oksidoredüktaz 1 (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST) ve heme oksijenaz-1 (HO-1) gibi birçok antioksidan ve/veya detoksifikasyon enzimleri ROS'a karşı hücrel savunma sistemlerine katkıda bulunur (93).

Somatik veya kanser hücrelerinin yeniden programlanması sırasında, ROS metabolik stres ile tetiklenir ve artan ROS seviyeleri DNA hasarına, hücre yaşlanmasına ve apoptoza yol açar. ROS, hipoksi sırasında artan induced pluripotent kanser hücreleri oluşumunu gözlemleyerek yeniden programlanmış hücrelerin hayatta kalmasını engelleyebilir (93).

2.6.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Dış orbitalinde paylaşılmamış iki elektron içeren moleküler oksijenin indirgeyiciden bir elektron alarak indirgenmesi ile oluşur.



Süperoksit radikali, kolaylıkla oluşabilen, yarı ömürleri uzun ve lipofilik özellikteki moleküllerdir. Süperoksit bazı molekülleri oksitlerken, bazılarını da indirgeyebilir. Süperoksit radikalinin kompleks oluşturduğu yapılar lipid peroksidasyonu veya DNA'da hasar gibi ciddi toksik etkilere neden olur (82,84).

2.6.1.2 Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

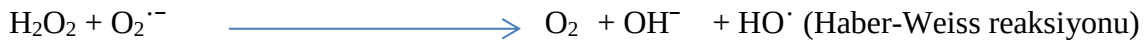
Süperoksit radikali çevresinden bir elektron veya moleküler oksijenin çevresinden iki elektron alarak oluşturdıkları peroksit molekülünün iki hidrojen atomunun birleşmesiyle oluşur.



H₂O₂, süperoksit dismutasyonu ile oluşmaktadır. SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun sonucunda H₂O₂ ve moleküler oksijen açığa çıkar. H₂O₂, süperoksit radikali veya demirle reaksiyona girmesi moleküler düzeyde oldukça etkili toksisiteye neden olur (82,83,94,95).

2.6.1.3 Hidroksil Radikali (OH[·])

Serbest radikaller arasında en reaktif olanı hidroksil radikali. Yarılanma ömrü çok kısadır. H₂O₂, süperoksit radikali ile (Haber-Weiss reaksiyonu) veya Fe⁺² ile (Fenton reaksiyonu) reaksiyonu sonucunda hidroksil radikali ortaya çıkar.



Normalde Ferritinden dolayı hücreler arası sıvıda serbest demir bulunmaz. Hücrede süperoksit radikal artışı serbest demir (II) salınımına neden olur. Fenton reaksiyonun tetiklenmesi hidroksil radikallerini oluşturur (83). Mutajenik ve sitotoksik olan OH[·], pürin veya pirimin ile kompleks oluşturarak DNA kırıklarına, lipid peroksidasyonuna gibi ciddi hasarlara neden olur (82,94,95,96).

2.6.2 Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)

Serbest nitrojen radikallerine reaktif nitrojen türleri (RNT) denir. Serbest azot radikallerinden nitrik oksit (NO[·]), radikal nitrojen türü olarak kabul edilirken; azot dioksit (NO₂) ve peroksinitritler (ONOO⁻) reaktif olmayan nitrojen türleri sınıfına girmektedir.

Hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun artması $\text{NO}^{\cdot}$ üretimine neden olur. $\text{NO}^{\cdot}$ konsantrasyonunun düşmesi hücrede hasarlara, temel düzenleyici görevindeki ONOO^- ve NO^- konsantrasyonundaki değişiklik doku ve hücresel düzeyde hasara sebep olabilir. $\text{NO}^{\cdot}$, ortamdaki fazla ROS ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna, DNA sentezini inhibisyonuna, DNA'da kırılmalara, enzim aktivitelerinde değişikliklere ve serbest demir salınımının indüklemesine neden olmaktadır (96,97,98,).

2.6.3 Oksidatif Stres

ROS ve RNT organizmadaki metabolik reaksiyonlar sonucu endojen veya ekzojen olarak gerçekleşebilirler. Solunum zinciri reaksiyonları, nötrofil ve makrofaj salınımı, sitokrom P450 ve ksantin oksidaz enzimlerinin aktiviteleri gibi mekanizmaları endojen kaynaklıdır. Kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, bağımlılık yapan maddeler, stres, hava kirliliği, sigara ekzojen kaynaklıdır (94,96). ROS ve RNT oluşumundaki artış oksidan ve antioksidan dengenin bozulmasına neden olur. ROS ve RNT'deki artış antioksidan savunma sistemleri tarafından baskılanmazsa oksidatif stres meydana gelmektedir (64). Oksidatif stres nükleik asit, protein, lipid ve karbonhidratlarda hasarlara neden olarak moleküler hasarlanmayı ve tümör oluşumunu indükler (8,95).

2.6.4 Hücre ve Doku Hasarlarında Serbest Radikallerin Rolü

Serbest radikallerin oluşumu enzim aktivitelerinde değişikliklere, protein oksidasyonuna, hücre ölüm mekanizmasındaki değişikliklere, DNA mutasyonlarına, membran transportunun bozulmasına, kanser ve kanserde kötü prognoza, nörodejeneratif veya otoimmün hastalıklarda dahil olmak üzere farklı insan hastalıklarına neden olur. GSH, GPx lipid hidroperoksitlerin karşılık gelen alkollere ve hidrojen peroksitin suya indirgenmesi için katalizeli indirgesi katalize eden serbest radikal oluştuğunda etkili olan ana doku antioksidanlarıdır (110).

a) Serbest Radikallerin Hücre Membranına Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu: Malondialdehit (MDA)

Malondialdehid (MDA), hidroksil radikalının etkisi ile başlayan lipid peroksidasyonun son ve en önemli ürünü MDA'dır. Hücre zarlarının fosfolipit tabakasında bulunan üçten fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonudur. Membran

permeabilizasyonunu bozarak membran transportunu etkiler. Hücredeki fonksiyonel etkilerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik özellik gösterebilir (99,100).

b) Serbest Radikallerinin proteinlere etkileri

Oksidatif stresten direkt olarak etkilenen proteinlerin aminoasit yapılarının değişmesine, protein-protein bağlarının oluşması ve peptid zincirlerinin kırılmasına, protein-lipit çapraz bağ oluşumuna, reseptörlerin inaktivitesine, membran transportunda hasara neden olabilir (64,94). Reaktif oksijen türleri ile proteinlerin reaksiyonu sonucunda protein oksidasyonu oluşur. Serbest radikaller bazı antioksidanların aktivitelerini baskılayarak nükleik asitlere hasar verebilir. Proteinlerin oksidasyonu ve redüksiyonu serbest radikal oluşumunun hızı ve yapısı için önemli rol oynar (96,110).

c) Serbest Radikallerinin Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri

Serbest oksijen radikalleri, deoksiriboz iskeletinde modifikasyonlara, DNA-DNA ve DNA-protein etkileşimlerinde çapraz bağlarının kırılmasına, pürin ve pirimidinin hasarlanmalarına veya DNA'da kırık oluşumu gözlenebilir (94,96). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren moleküller veya molekül fragmanları olarak da tanımlanır (110). DNA oluşan mutasyonlar karsinogeneze neden olur. Serbest radikaller, DNA'da guanin-timin bazlarının trans oluşuma neden olarak tümör oluşumuna neden olur (101). Serbest azot veya nitrojen türleri DNA yapısını bozarak hasar oluşturur. (102). Bazı antioksidanlar (Örn. GSH) serbest radikallere karşı hücrel ve moleküler düzeyde koruma sağlar (103). Serbest radikal oluşumu DNA addukt oluşturarak DNA yapısını bozarak tümör oluşumuna neden olur (104).

2.7 Antioksidanlar

Antioksidanlar, toksik etkilerin oluşturduğu serbest radikal oluşturan veya serbest radikalleri nötralize eden moleküllerdir. ROS, oksijen merkezli serbest radikaller ve serbest radikallerin indirgenmesiyle oluşan ürünlerdir. Süperoksit anyonu, HO, H₂O₂ normal metabolizma süresince üretilirler. Fakat iyonize radyasyon, oksitleyici ajanlar, hücreye yabancı olan maddeler, hiperoksi, inflamasyon, hava kirliliği, kanser, diyabet veya yaşlanma gibi durumlarda ROS üretimi artarak hücrel hasara neden olabilir. Bu etkiler sonucunda sitoplazma ve hücre içi organel membran lipidlerinin peroksidasyonuna ve

membran permeabilitesinin artmasına, enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksitlenmesi, çapraz bağların oluşması, enzim inaktivasyonu, antiproteazların inhibisyonu sonucu dirençli proteolitik enzimlerin aktivasyonu, DNA yapısının bozulması ve polisakkarit depolimerizasyonunu indükler. Lipid peroksidasyonu sonucunda membran yapısı bozulur. Oluşan lipid peroksitler immün savunma hücrelerine karşı kemotaktik oldukları için bu hücreleri dokuya çekerek inflamatuvar reaksiyon oluştururlar. Radikaller proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinde de oksidatif hasara neden olurlar. Hücrede iyon transportunu ve transmembranal potansiyeli bozarlar. Farklı hücre türleri ve bunların özelliklerine göre reaktif oksijen radikallerinin toksisite duyarlılıkları da farklıdır (89,94).

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarı tamir eden, engelleyen veya sınırlayan farklı antioksidan mekanizmaları vardır. Hücre, normal şartlarda oluşan serbest radikalleri nötralize eder ancak hiperoksijenasyon, iskemi ve sonrası reperfüzyon, radyasyon, stres, dokularda reaktif oksijen radikallerini oluşturan ksenobiyotiklere (asbest, sigara dumanı, ozon) maruziyet sonucunda oluşan radikallerin, nötrofil, eozinofil ve makrofajların dokuda toplanması gibi durumlarda oksidan ve antioksidan dengesi bozulur. Sitotoksik radikallerin oluşumunu artırarak hücrenin hasarlanmasına veya ölümüne kadar gidecek sürece neden olurlar (89). Oksidatif stresinin önlenmesinde organizma ve hücreler antioksidan savunma sistemi ile sağlanır. Bu sistem hem endojen hem de eksojen savunma moleküllerini içerir. Her iki sistem birlikte harekete geçer ve hücrede oluşan hasara karşı çıkarlar (105).

Endojen Antioksidanlar

Glutasyon (GSH)
Superoksit dismutaz (SOD)
Katalaz
Biluribin
Peroksiredoksin
Ürik asit
Melatonin
L-karnitin
Koenzim Q10
Tioeredoksin
Glutasyon peroksidaz (GPx)
Albumin
Ferritin, albumin, transferrin gibi
metal bağlayılar
Glukoz
Metallotiyonein



Ekzojen Antioksidanlar

Vitamin E
Vitamin C
Karotenoitler
Ubikinol
 α -lipoik asit
Flavonoidler,
Polifenoller
Selenyum, çinko

Şekil 11. Antioksidanların Sınıflandırılması (82,106)

Antioksidan savunma mekanizmaları kaynaklarına, yapılarına ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılır:

2.7.1 Kaynaklarına Göre Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar ve ekzojen antioksidanlar (Şekil 11) olarak iki başlık altında toplanırlar (82,106). Endojen antioksidanlar, proteinlerin düşük molekül ağırlıklı moleküllerin ve enzimlerin yanında şekildeki gibi diğerler kaynakları da içerir. Antioksidanların ekzojen kaynakları hayvansal ürünler, meyveler, sebzeler ve tahıllardır. Endojen antioksidan sistemi, enzimatik antioksidanlar tiol peroksidazlar, süperoksit dismutazlar, katalaz veya glutasyon gibi enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşur. Ekzojen antioksidan sistemi, lipid ve suda çözünen vitaminlerin yanı sıra eser elementler çinko ve selenyum gibi mikro nitruentleri içerir (105).

2.7.2 Yapılarına Göre Antioksidanlar

2.7.2.1 Enzimatik Antioksidanlar

Serbest radikaller enzimatik aktivasyon sonucunda detoksifiye olurlar. Antioksidan mekanizmalar enzimatik yollarla ROS birikimini modüle edebilen moleküllerin gelişiminin ifadesini içerir. GSH, hücrelerde serbest radikal temizleyici ve detoksifikasyon maddesi olarak işlev gören bir antioksidandır. Enzimatik antioksidan yanıtları, süperoksit dismutaz veya katalaz bolluğunu artırır (203).

2.7.2.2 Süperoksit Dismutaz (SOD)

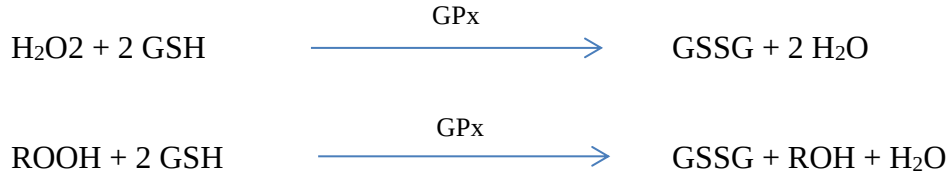
SOD, süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Sitoplazmada (Cu-Zn-SOD), mitokondri ve peroksizomlarda (Mn-SOD) ve ekstrasellüler (EC-SOD) olarak 3 farklı yapıda bulunurlar. SOD enzimi, hücreleri süperoksit radikalinin oluşturabileceği yapısal veya fonksiyonel hasarlara karşı korur. Ayrıca aktivitesi fazla olan SOD'un oksidatif strese karşı toleransı artar (108,109).

2.7.2.3 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Antioksidan mekanizmalar enzimatik olmayan yollarla ROS birikimini modüle edebilen moleküllerin gelişiminin ifadesini içerir (106).

2.7.2.4 Glutatyon (GSH)

Ökaryotik hücrelerde bol miktarda bulunan düşük seviyedeki glutatyon (GSH) serbest tiyol grubu içeren bir tripeptittir (γ -glutamilsisteinilglisin). Mitokondriyal GSH oksidasyonu ölümle ilgili moleküler sinyallerin salınımını kolaylaştırır. GSH, nekroz ve otofaji de dahil olmak üzere diğer kanser hücresi ölümü türlerinin düzenlenmesinde rol oynar. GSH, glutatyon peroksidaz (GPx) için lipit hidroperoksitlerin karşılık gelen alkollere ve hidrojen peroksitin suya indirgenmesi için katalizeli indirgeme sağlayan ana antioksidanlardandır. Ayrıca GSH'deki artış, ilaçlara bağlanarak veya bunlarla reaksiyona girerek, ROS ile etkileşime girerek, proteinlere veya DNA'ya zarar gelmesini önleyerek veya DNA onarım işlemlerine katılarak ilaç direncine önemli bir katkıda bulunur (110,111).



GSH'nin ve sülfhidril grupları redoks tepkimeleri düzenlenir. GPx katalizli reaksiyonlarda, iki GSH molekülü arasında bir disülfid bağının oluşması okside glutatyon (GSSG) oluşturur. Glutatyon redüktaz (GR) enzimi, SS-nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (β -NADPH₂) aynı anda oksidasyonu ile GSSG'yi GSH'ye geri dönüştürür (110).

2.7.3 Etki mekanizmalarına Göre Antioksidanlar

- **Katalitik etkili antioksidanlar:** Katalaz, SOD ve GPx katalitik etkiye sahiptirler ve enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırmırlar.
- **Giderici etkili antioksidanlar (quencher):** Serbest radikallere bağlanarak kararlı hale getirirler. Karotenoidler bu gruptadır.
- **Süpürücü etkili antioksidanlar (scavenge):** GSH, vitamin E, vitamin C, melatonin, flavonoidler ve polifenollerin redükleyici fonksiyonları ile serbest radikaller ortamdı uzaklaştırılır. Antioksidanlar hidroksil, süperoksit ve lipit peroksit radikalleriyle direk etkileşimi veya zincirleme reaksiyonları kırarak kendilerine bağlar ve aktiviteleri engellenir.
- **Önleyici etkili antioksidanlar:** Ferritin, transferrin, albümin gibi metal bağlayıcı özellikteki proteinler, yapısında serbest metal bulunduran reaktif oksijen türlerinin oluşumu engellenir.

Antioksidan koruyucu sistem, sitozolik ve membran bağı küçük moleküllerden, oksidasyon-redüksiyon proseslerine katılan değışik enzimlerden, hidrojen peroksiti ve serbest radikalleri temizleyen veya modifiye eden gama-glutamil siklusundan oluşur. Sisplatin otoksisitesinin moleküler mekanizmalarını açıklayan teorilerden birisi de ATPaz, adenilat siklaz, sitokrom P-450 mikrozomal enzimleri ve glukoz 6-fosfat dehidrogenaz gibi bazı kilit enzimlerin inhibisyonudur. Ayrıca lizozomal enzim aktivitelerinde değışiklikler,

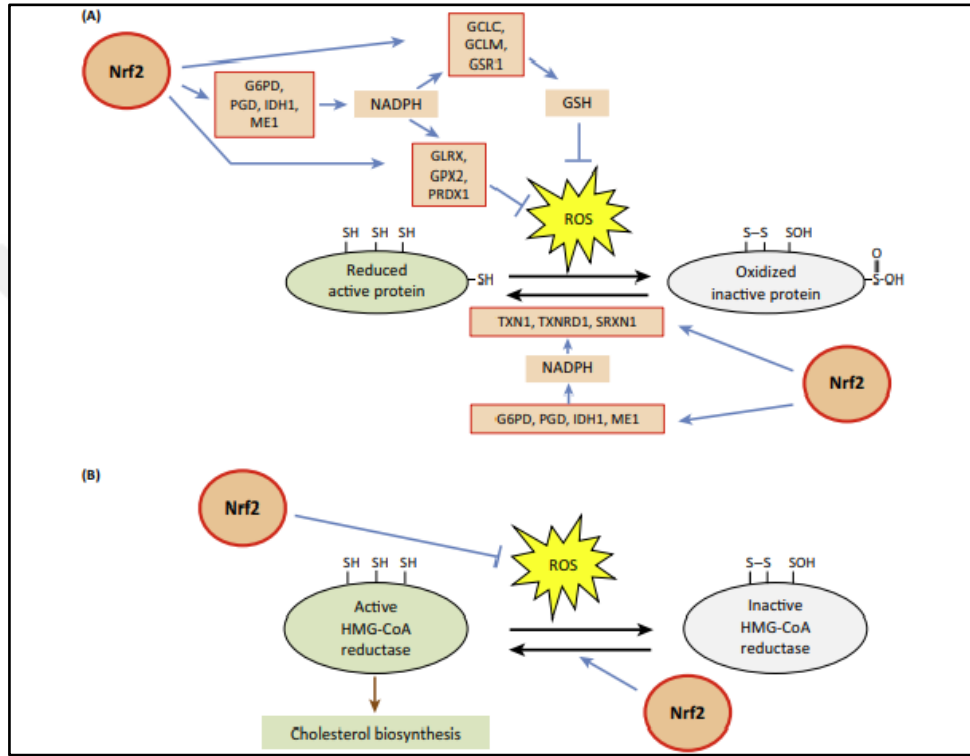
mitokondrial oksijen transportunda ve/veya kalsiyum homeostazisinde bozulmalar görülür (115,116).

2.8 Nrf2 ve Hedef Genler

Nrf2, oksidatif strese karşı doğal direnci güçlü bir şekilde etkileyen ve çeşitli çevresel stresörlere karşı adaptif tepkileri kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür, inflamasyonu inhibe eder ve dejeneratif hastalıklarla mücadele eder. E3 ubiquitin ligaz substrat adaptörü olan Keap1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1) tarafından baskılanan Nrf2, somatik mutasyonlarla ilişkilidir. Nrf2, Keap1 aracılı proteasomal degradasyonu kontrol eder. Nrf2'nin bazal aktivitesinin yanı sıra strese karşı oluşan cevaplarda etkilidir. Hücre homeostatik (hücrenin kendi metabolizmasını koruma eğilimi) koşullarında, Nrf2-Keap 1 ile kompleks halde düşük bir seviyededir. Elektrofillerin ve oksidanların Nrf2'nin proteasomal bozunmasını engeller böylece CNC-bZIP proteininin hızlı bir şekilde birikmesini ve hücre adaptasyonunun strese adapte olmasını sağlamak için genetik bir program tetiklenir (93).

Nrf2 ile ilgili yapılan çeşitli araştırmaların sonunda lipidlerin, karbonhidratların, nükleotitlerin ve amino asitlerin metabolizmasını etkilediği gösterilmiştir. NADPH, lipidlerin ve nükleotitlerin biyosentezi için gereklidir ve Nrf2'nin yukarı yönde regüle edildiği tümörlerde artan hücre proliferasyonuna katkıda bulunabilir. Nrf2 endojen olmayan antioksidan sistemlerinin ana bileşenlerini kontrol etmesi dışında, ilaç metabolize eden enzimlerin bazal ve indüklenabilir ekspresyonunun düzenlenmesinde katkı sağlar, peroksitlerin indirgenmesi sırasında GSSG üreten GPx2 ve GSSG'yi azaltan glutatyon redüktaz GSR1'in ekspresyonunu kontrol eder. Böylece GSH'nin seviyesini ideal yani düşük seviyede tutar. Nrf2'nin düzenlediği, lipid metabolizması ve gen transkripsiyonunda, doğrudan ya da dolaylı olarak anahtar metabolik genlerin düzenlenmesinde rol oynar. Nrf2 aracılı ilaç metabolize edici enzimlerin indüksiyonu, genotoksinlere duyarlılığı azaltır. Ayrıca dolaylı olarak redoks duyarlı metabolik enzimlerin aktivitesini değiştirebilir. Özellikle metabolik yollarda önemli enzimleri düzenleyerek karbonhidratların, nükleik asitlerin, lipidlerin ve amino asitlerin sentezini etkiler (93,117,118).

Nrf2, redoks bağımlı enzimlerin inaktivasyonunu antagonize eder ve oksitlenmiş protein tiyollerinin tamirini destekler. Nrf2 oksidatif stresle savaşır çünkü hem antioksidan tarafından hem de NADPH'nin rejenerasyonu için gerekli olan GSH bağımlı ve tioredoksinin (TXN) bağımlı antioksidan sistemlerinin kritik bileşenlerini kodlayan genlerin redoks bağımlı indüksiyonuna aracılık eder (Şekil 12) (93).



Şekil 12. Nrf2 aracılı ilaç metabolize edici enzimlerin indüksiyonu (119)
(Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. Molecular Aspects Medicine. 2009; 30: 42-59.)

Nrf2, ilaç detoksikasyonunun, glutatyon homeostazının ve NADPH rejenerasyonunun oksidatif stres ile düzenlenmesini koordine eder. Birçok ilaç metabolize eden enzim, ilaç taşıyıcılar, glutatyon biyosentetik enzim ve NADP⁺ 'den NADPH'yi yeniden üreten enzimler, GST, GSR1, NQO1, GCL (GCLM), GPx2; Nrf2 tarafından düzenlenen genler tarafından kodlanırlar. Bununla birlikte, aldo-keto redüktaz (AKR) ve NAD(P)H: kinon oksidoredüktaz-1 (NQO1), NADH / NADPH gerektiren reaksiyonlarda kinonların indirgenmesini katalize ederek redoks döngüsünü önler. Sırasıyla, NADPH, glikoz-6 fosfat dehidrojenaz, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz ve malik enzim enzimleri tarafından üretilir. Alternatif olarak, epoksit, hücreden çoklu ilaç direnci ile

ilişkili proteinler ile taşınmalarından önce GST izoenzimleri tarafından katalize edilen düşük GSH ile konjüge edilebilir. Tripeptit GSH, Cys'den, glutamat-sistein ligaz GCL ile katalize edilen Glu ile sıralı konjugasyon yoluyla oluşturulur ve ortaya çıkan glutamilsistein (gGS), Gly ile konjüge edilir, glutatyon sentetaz (GSS) ile katalize edilir. Ksenobiyotiklerle konjugasyona ek olarak, GSH, GPx ve peroksiroksin (PRDX) tarafından katalize edilen ve oksitlenmiş glutatyonun (GSSG) oluşmasıyla sonuçlanan H_2O_2 'nin azaltılması için gereklidir. Buna karşılık, GSSG, hücreden çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler ile elimine edilebilir veya glutatyon redüktazın (GSR1) NADPH'ye bağlı bir şekilde hareketleriyle GSH'ye geri döndürülebilir. Bu nedenle, glutatyon metabolizmasında yer alan enzimlerle detoksifikasyonda yer alan enzimlerin ve taşıyıcıların Nrf2'sinin ortak düzenlemesi, bu yolların oksidatif stres sırasında birlikte indüklenmesini sağlar (93).

Faz II detoksifikasyonunu ve antioksidan enzimleri kodlayan genlerin koordineli olarak indüklenmesi, gen düzenleyici bölgelerinde bulunan, çekirdekte yer alan ARE (Antioxidant Response Element=antioksidan duyarlı eleman) tarafından yönetilir. ARE, çekirdekte Nrf2'ye bağlanmadan sorumlu anahtar faktördür. Bu bazik lösin fermuar (bZIP) transkripsiyon faktörü, protein ailesine (Nrf1, Nrf2, Nrf3 ve p45 NF-E2'yi kapsayan) aittir ve küçük bir Maf proteini ile heterodimer kompleksleri oluşturur ve ARE'lere yüksek afiniteli bağlanma sağlar. Nrf2-ARE, antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerini kodlayan genlerin indüklenmesi için kesinlikle önemlidir ve oksidatif stres sonrası hücre büyümesinin, farklılaşmanın ve hayatta kalmanın düzenlenmesine katkıda bulunur (93).

GCLM, glutatyon sentezinin ilk hız sınırlayıcı basamağını katalize eden glutamat sistein ligazın modülatör alt birimidir (119). GCLC (glutamate-cysteine ligase catalytic) ve modifiye GCLM alt birimleri, GSR1 ve NADPH'nin yenilenmesine katılan enzimlerin ekspresyonunun kontrol edilmesinin bir sonucu olarak, Nrf2'nin aktifleştirilmesi, GSH'ye bağlı katalitik ve katalitik olmayan ROS ve RNS temizlemesini teşvik eder (120).

Hem HMOX1 hem de GCLM, hücrede önemli antioksidan roller oynamaktadır. Hücre sağkalımına yardımcı olan bu antioksidan genlerin yukarı regülasyonu, hücrelerin oksidatif stres altında olduğunu gösterir. HMOX1, hem degradasyon sürecinde yer alan bir antioksidan enzimdir hem de stres kaynaklı hücre hasarına karşı direnç sağlar (121,122).

GSH, hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksitleri azaltarak redüksiyon ve konjugasyon reaksiyonları yoluyla hücrelerin toksik maddelere ve reaktif bileşiklerin metabolizmasına karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Konjugasyon ve redüksiyon reaksiyonları ile GSH'nin tükenmesi, GSH üretiminin artmasına neden olur. GSH seviyelerindeki bir artış, hücrenin kendisini streslere karşı savunması için uyarlamalı bir cevap olarak hizmet eder (122,123).

2.9 Karnitin

Antioksidan özellikte vitamin benzeri olan karnitin, enerji üretimini sağlayan beta-oksidasyon yoluna girebilmek için uzun zincirli yağ asitlerinin sitozolden mitokondri matriksine geçişine katkı sağlar, asetillenmiş koenzim A miktarını düzenler, farklı metabolik olaylarda rol alır. Vücutta L izoformunda bulunur. Bunun haricinde karnitinin L-Karnitin, Asetil L-Karnitin (Şekil 14) ve Propiyonil L-Karnitin türevleri bulunmaktadır (8,124).

2.9.1 Karnitin Biyosentezi ve Fizyolojik Rolü

20. yy başlarında ilk olarak kas dokusunda keşfedilen karnitin (4-N-trimetilamonyum-3 hidroksibütirik asit) esansiyel olmayan bir amin türevidir (125,126). Lizin ve metiyonin aminoasitleri karnitin sentezinde görev alan iki esansiyel aminoasittir. Endojen karnitin sentezinde görev alan (örn. magnezyum, demir) farklı kofaktörler de vardır. İskelet ve miyokard kasları L-karnitin ana tüketicileridir. Karnitin öncüsü olan γ -bütirobetain iskelet kası, kalp, karaciğer, böbrek ve beyinde sentezlendikten sonra hidrolize edilerek bu dokularda karnitine dönüşür. Karnitin, yetişkinlerde %75'i diyetle, %25'lik kalan kısım endojen olarak sentezlenir (127). Endojen kaynaklı olan karnitin L- izoformlu; et, süt gibi hayvansal ürünlerden tüketilir (126,127). L-karnitin aktif transport ve pasif difüzyon yoluyla barsaklardan emilir. Plazmada ve dokularda serbest veya yağ asitlerine bağlı açilkarnitin türevi olarak bulunabilir. L-karnitin kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrekler ve epididimiste özel taşıma sistemi bulunur ve bu dokularda yoğunlaşmış durumdadır (124). Vücutta yüksek depoları içerir; çoğunluğu kalp ve iskelet kasındadır. Karnitin kan yoluyla taşınır, homeostaz ve endojen yoluyla korunur ve vücuttan atılımı böbrekler aracılığıyla (126,128,129).

Karnitin, hücresel enerji metabolizmasının önemli elemanlarından biridir. Beta-oksidasyonda kofaktör görevindeki L-karnitin, beta oksidasyonu hızlandırarak Asetil-KoA miktarını artırır, toksik Asetil-KoA metabolitlerini tamponlar ve Asetil-KoA/KoA oranını dengeler. Bu oran yağ asit oksidasyonu, glukoneogenez, sitrik asit döngüsü ve üre döngüsünde rol alan birçok mitokondriyal enzim aktivitesi için önemlidir (126,130). Bunların dışında karnitin, dallı zincirli aminoasit metabolizması, keton kullanımı, peroksizomal beta oksidasyonu, eritrosit zarında yağ asidi fosfolipid dönüşümü gibi farklı görevleri de vardır (124,127). Karnitin türevleri de içerdikleri asetil grubu nedeni ile L-karnitin gibi mitokondriyal fonksiyonlarda enerji metabolizması ve anabolik reaksiyonlarda fonksiyonel öneme sahiptir (9).

2.9.2 Asetil-L-Karnitin'in Mekanizması

Asetil-L-karnitin (ALC), kolinerjik sinir iletim etkinliği ve mitokondrideki nöronal metabolizma yeteneği ile ilişkilendirilmiştir. ALC, yağ asidi oksidasyonunda Asetil-KoA'nın mitokondriye geçişini hızlandırır, asetilkolin üretimini destekler ve protein ve fosfolipid sentezini indükler (8,131). Mitokondride artmış hücresel enerji için ALC sfingomiyelin seviyelerinin regülasyonu yoluyla hücre zarı akışkanlığını stabilizasyonu, hücresel enerji üretimi için bir substrat rezervuarı sağladığı ve böylece aşırı nöronal hücre ölümünün önlendiğini, glikokortikoidlerin ve sinir büyüme faktörünün hipokampal bağlanmasını arttırdığı belirlenmiştir (132,133,134).

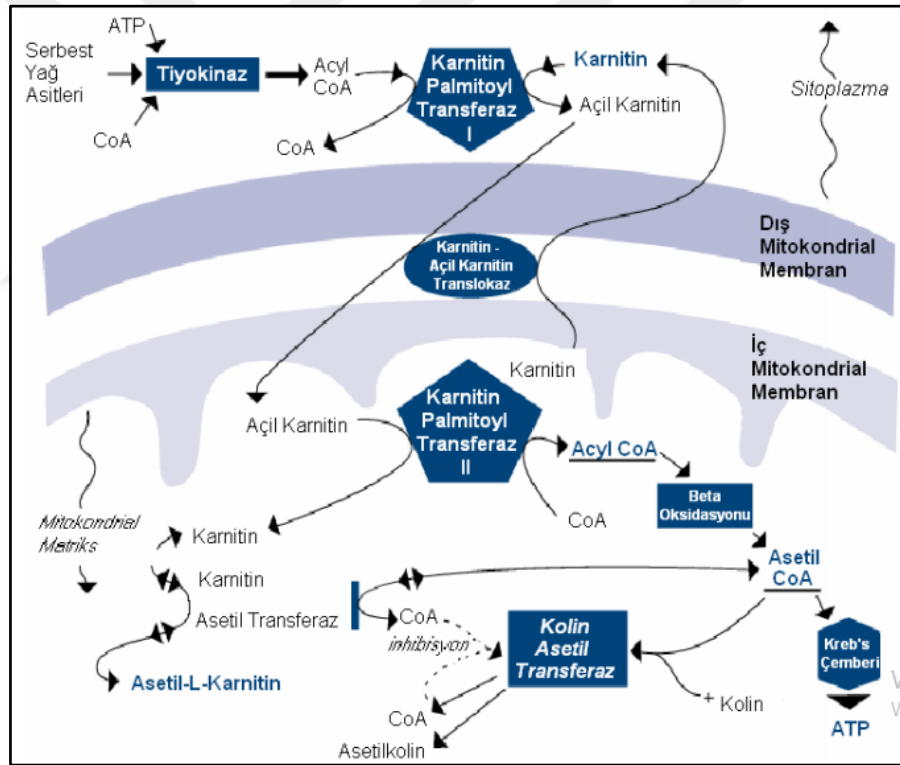
2.9.3 Asetil L-Karnitin Biyosentezi ve Fizyolojik Rolü

ALC, trimetillenmiş amino asit olan L-karnitin bir esteridir ve ALC transferaz enzimi ile insan beyinde, karaciğer ve böbrekte sentezlenir. ALC, yapısal olarak asetilkoline benzer etki yapar. ALC, Alzheimer demansı, yaşlılarda depresyon, HIV enfeksiyonu, diyabetik nöropatileri, beyin iskemi tedavisinde fayda sağlayabileceği gösterilmiştir (131,135,136,137).

Hücre sitoplazmasındaki uzun zincirli serbest yağ asitleri beta-oksidasyon için hemen mitokondri içerisine taşınmaz. L-karnitin, uzun zincirli serbest yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişini sağlar. Yağ asidi oksidasyonu sonucunda veya sentezinin başlangıcında oluşan ürün Asetil-KoA'dır (Şekil 13). Asetil-KoA, yağ asitlerinin sentezi, kolesterol,

steroid hormonlar ve keton cisimlerinin biyosentezinde başlangıç ürünüyken, glikoz yıkımı, yağ asidi oksidasyonu ve amino asitlerin neredeyse yarısının da son ürünüdür. Beta-oksidasyonu sonucu oluşan Asetil-KoA, sitrik asit döngüsüne girer (138,139).

Yağ asitlerinin ATP ve KoA kullanmalarıyla açıl KoA sentezleyen sitoplazmik tiokinaz ile ALC sentezinin ilk adımı başlamış olur. Açıl KoA, karnitin palmitoil transferaz-I ile birleşerek açilkarnitin oluşur. Oluşan kompleks yapı mitokondrial matrikse karnitin-açilkarnitin translokaz ile taşınır. İç mitokondriyal membrandan transfer olan her bir açilkarnitin molekülü için bir karnitin dışarı atılır. İç mitokondriyal membrandaki karnitin, palmitoil transferaz-II, açilkarnitini karnitine çevirerek açıl KoA'yı serbest bırakır. Mitokondriyal matrikste bulunan karnitin asetil transferaz, karnitin ve asetil-KoA'dan Asetil l-karnitin ve KoA'yı üretir (Şekil 13).



Şekil 13. Asetil-L-Karnitin Biyosentezi (140)

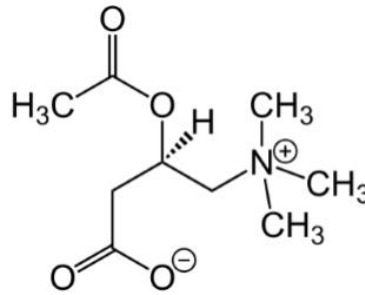
(Akın H. Farelerde Asetil-L-Karnitin Uygulamasının Deneysel Ağrı Modelleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Edirne. 2005.)

Karnitin ve esterleri, yağ asitleri ve açıl KoA'nın sitoplazma ve mitokondride oluşabilecek toksik birikimi engeller, mitokondriyumlara enerji üretimi için asetil-KoA sağlar ve KoA

ve açıl-KoA oranını dengeleyen Asetil-L-Karnitinin mitokondriyal metabolizmada önemi büyüktür (138,141).

2.9.4 Farmakokinetik

L-karnitin ve asetil L-karnitin oral ya da intravenöz yolla uygulanır. Jejunumdan basit difüzyon ile absorbe edilir. Eksojen olarak uygulanan asetil L-karnitin plazmadan hızla çıkarılır ve böbrek, bağırsak, kalp, beyin ve karaciğer gibi birçok doku tarafından alınır. Asetil L-karnitin ve L-karnitin plazma konsantrasyonlarının karnitin asetil transferaz aktivitesi ile dengede kalır ve hücresel dokuya aktif transport ile taşınır (142). Hem intravenöz hem de oral uygulamalarda Asetil-L-karnitin kan beyin bariyerinden kolaylıkla geçer. L-karnitin ve esterleri, az miktarda metabolizma geçirirler ve daha sonra renal tübüler absorpsiyon yoluyla idrarda atılır (138).



Şekil 14. Asetil-L-Karnitin Molekülünün Kimyasal Yapısı (142)
(Rebouche C. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. Ann N Y Acad Sci. 2004 Nov;1033:30-41.)

2.9.5 Karnitinin Antioksidan ve Anti Apoptotik Etkisi

L-karnitinin, mitokondri transportunda önemi büyüktür. Ayrıca nöroprotektif, antioksidan, serbest radikal bağlayıcı, apoptoz, oksidatif stres ve ROS üzerinde etkili olmasının dışında, hücre membran geçirgenliğindeki farklılıklara, lipid peroksidasyonuna, fosfolipid yıkımına ve serbest yağ asidi miktarının artışına neden olur. L-karnitin, serbest uzun zincirli yağ asitleri hidrofobik anyonudur. Doku düzeyindeki bu anyonların artışı hem mitokondri hem de hücre membran yapı ve fonksiyonlarında değişikliğe neden olur (135,138,143,144,145).

L-karnitin, oksidatif hasara karşı koruma kalkanı olarak katalaz ve SOD gibi enzimlerin aktivitesini düzenleyerek peroksidatif hasar oluşumunu engeller, mitokondriyal toksik

ajana karşı koruyucu etkisi sağlar, farklı antioksidan sistemleri devreye sokarak antioksidan savunma sistemini artırır ve nöronlarda peroksidatif hasarda etkili olan molekülleri azaltan güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücüsüdür. Propionil-L-Karnitin de süperoksit süpürücüsü ve DNA'yı kısmen koruyan bir antioksidandır (138,146,147,148).

L-karnitin, ALC ve propionil-L-karnitin güçlü nöroprotektif ve antiapoptotik özellikleri kanıtlanmıştır. Antioksidan veya antiapoptotik genlerle ilişkili olarak katkı sağlar (149). ALC kaspaz 3 ve 9 yolaklarını baskılayarak apoptozu engellediği bildirilmiştir (149,150).

2.9.6 Asetil-L-Karnitin Metabolizmasının Nöroprotektif Etkisi

Hem klinik hem de hayvan çalışmalarında erişkin beyindeki ALC nöroprotektif etkisi olduğuna dair kanıtlar bildirilmiştir (131,151). ALC ve L-karnitin serbest yağ asitlerinin taşınması ve metabolizmasını kolaylaştırdığında metabolik bozuklukları olan çocuklarda faydalı etkisi olduğu bilinmektedir. L-karnitin, beyin gelişimini hipoksitaskemiden ve anesteziyenin sonrasındaki hücre yaralanmalarından koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Farklı çalışmalarda intravenöz ALC uygulanmasının beyine enerji metabolizmasını modüle ettiğini ve erişkin sıçanlarda serebral glukoz metabolizmasının artmasına neden olduğunu ve iskemi sonrasında beyin laktatının azaldığını göstermiştir. Farklı çalışmada glikoz, asetat ve 3-hidroksibutirat substratları gibi ALC, asetil kısmı oksidatif enerji üretimi için kullanılmakta ve nörotransmitter glutamat ve GABA'nın karbon iskeletine dahil edildiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada piruvat geri dönüşüm yoluyla vasıtasıyla karbonun ALC aktif metabolizması da ortaya çıkarak gelişmekte olan beyindeki ALC metabolizması, nörotransmitterlere ve diğer beyin metabolitlerine dahil edildiği bildirilmiştir (152).

2.9.7 Dozaj / Toksikite

ALC, genellikle bölünmüş dozlar halinde günde 13 gram değişen dozajda oral, 1500-2000 mg intravenöz olarak uygulanır. ALC bu dozajlarda ve uzun süreli (bir yıl) uygulamalarda dahil önemli yan etkiler gözlenmez. En yaygın olası yan etki mide bulantısı ve kusmadır (135).

Farklı metabolik süreçleri yaşayan kanserli hastalarda karşılaşılan eksikliklerden biri de L-karnitin eksikliğidir. Bu nedenle kanser hastalarına kemoterapi, immünoterapi tedavilerinin yanında L-karnitin ve türevlerinin de verildiği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda kemoterapinin toksik etkilerine karşı karnitinin profilaktik faydalarını göstermiş olmakla birlikte, radyoterapi alan kanser hastalarının homeostasisine, prognoz ve tedavisinde karnitinin rolü hakkında araştırmalar netlik kazanmamıştır (153-157).

Yapılan araştırma ve çalışmalar L-karnitin formu üzerinedir. Bu çalışma ile *in vitro* koşullarda kemoterapi ve radyoterapi tedavileriyle birlikte uygulanan ALC moleküler açıdan koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

2.10 Apoptoz

Apoptoz, çok iyi düzenlenmiş bir morfolojik olay dizisinde meydana gelir. Bu işlem genellikle zarla kaplı parçacıklara parçalanan, apoptotik gövdeler olarak adlandırılan, sağlam organellerin yanı sıra çekirdeğin kısımlarını içeren plazma zarının kabarcıklaşması ile başlar. Bu apoptotik cisimler fagositler veya komşu hücreler tarafından hızla tanınır, yutulur ve yenir. Fizyolojik koşullar altında apoptotik hücrelerde ‘beni ye’ sinyalleri olarak görevli ve fagositik hücreler tarafından tanınmasını sağlayan plazma zarında bazı değişiklikler meydana gelir. Apoptozda kromatin yoğunlaşması ve parçalanması, hücre büzülmesi, plazma zarının bozulmasıyla nüklear veya sitoplazmik yapıyı içeren apoptotik cisimlerin oluşumuyla morfolojide karakteristik değişiklikler gözlenir ve hücre kendini yok etmek için biyokimyasal ve fizyolojik değişiklik yoluna girerler. Apoptozda hücreler diğer hücre ölüm formlarında görülmeyen oldukça belirgin bir olay olan daha küçük parçalara bölünür. (159,160).

Apoptoz, embriyonik gelişim, doku homeostazı ve immün düzenleme sırasında istenmeyen ve zararlı hücrelerin temiz veya sessiz bir şekilde çıkarılması için ana hücre ölüm yoludur. Ayrıca çoğu kanser karşıtı tedaviler apoptotik yolların aktivasyonuna dayanır.

2.10.1 Apoptoz Mediatorleri

Mediatorler biyokimyasal aktivasyondan, morfolojik değişikliklerden, mitokondrial hasarlardan, çekirdek zarı kırılmalarından, DNA fragmentasyonundan, kromatin

kondansasyonundan ve apoptotik cisimciklerin şekillenmesinden sorumludur. Apoptoz iyonlar, moleküller, genler, proteinler, mitokondri gibi farklı mediatör tarafından düzenlenir (161).

Bcl-2: Ailesinden pro-apoptotik proteinler (Bax, Bad, Bid, Bak, Bim, Puma, Noxa, Bcl-X_s) sitozolde bulunur ve apoptozu indüklerken, anti-apoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-X_L) de mitokondri dış membranı, çekirdek zarı ve endoplazmik retikulumde bulunurlar ve apoptozu inhibe ederler. Aile üyeleri kendi aralarında homo veya heterodimerler oluştururlar. Hücrenin hayatta kalması pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden baskın olana bağlıdır. Pro-apoptotik proteinler baskınsa apoptoz görülür, anti-apoptotik proteinler baskınsa apoptoz engellenir. Apoptotik uyarıda Bax, mitokondri membranına bağlanır, por oluşumu indüklenir, membrandaki iyon geçirgenliği bozulur, sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör-AIF (Apoptosis-Inducing Factor) mitokondriden sitozole salınarak apoptoz indüklenir (162,163).

p53: Hücrede radyasyon, kemoterapi veya çevresel faktör gibi etkiler sonucunda DNA'da hasar oluşur, hücre siklusunu G1-S fazında askıya alınır, Bax, Apaf-1 ve Fas ekspresyonunu arttırır, pro-apoptotik olan Bcl/2Bax'ın artışıyla da apoptoz indüklenir. p53 kaybında ise hücre tamir mekanizma kaskadları çalışamaz, malign transformasyon veya hücre ölümü gerçekleşir (40,164).

Sitokrom C: Elektron transportunda görevli bir proteindir ve oksidatif fosforilasyon için mitokondri iç membranında elektron taşınmasından sorumludur. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımı apoptoz yoluna geri dönüşümsüz olarak girildiğinin göstergesidir. Mitokondri iç membranından sitoplazmaya salınan sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) ve ATP ile bileşerek apoptozom kompleksini oluşturur. Apoptozomun oluşması kaspaz-9 aktive eder. Kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease)'ı inaktive ederek CAD'ı (Caspase Activated Deoxyribonuclease) serbestleştirir. Bu mekanizma kaspaz-bağımlı apoptoz yani intrinsek apoptoz mekanizmasıdır. Kaspaz-bağımsız apoptoz, mitokondriden salınan AIF ile gerçekleşir. Başlatıcı kaspazlar ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler (164).

Kaspazlar: Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Sitoplazmada zimojen olarak bulunurlar ve birbirlerini aktifleştirerek preteolitik kaskada neden olurlar. Kaspaz 2, 8, 9, 10 başlatıcı kaspazlardır. Kaspaz 3, 6, 7 efektör kaspazlardır. Efektör kaspazlar, ölüm sinyallerinin başlatıcı kaspazlardan alarak aktive edilen konstrüktif homodimerlerdir (160).

Zimojen formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşir ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerizasyonu ile indüklenir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden salınımıyla gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Hücrede gerçekleşen olaya göre aktiflenen veya inaktive olan kaspazlar farklıdır. Kaspaz inhibitör ailesinden olan IAP (Inhibitors Of Apoptosis), kaspazları selektif olarak inhibe ederek veya hücre siklusunu etkileyerek apoptozu baskılar. Malign hücrelerde IAP ekspresyonu fazladır (163,164).

Perforin ve Granzim: Patojenlerle enfekte edilmiş hücrelerin yok edilmesinde etkilidir. Perforinler ve granzimler sitotoksik lenfositlerin ve nature killer hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. Sitotoksik lenfositlerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranına bağlanarak membranda porlar oluştururlar. Salgılanan Granzim bu porlardan geçerek hücreye girer, hücre içinde prokaspaz-8'i aktive ederek kaspaz kaskadının başlatır ve hücre apoptozuna gider (165).

2.10.2 Apoptozun İndüklenmesi

Hücre yüzeyinde bulunan DR3, DR4, DR5, TNFR1, Fas gibi hücre ölüm reseptörlerinin, uygun ligandlara bağlanmasıyla trimerik yapı oluştururlar ve FADD (Fas Associated Death Domain) ile interaksyona girerler ve prokaspazlarla birleşerek DISC (Death Inducing Singnaling Complex) kompleks yapısını oluştururlar. Ekstremsel yolla gelen ölüm sinyalleri nin aktivasyonu ile oluşan DISC prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspaz 3'ü aktive ederek CAD aktivasyonu ile apoptozu neden olur (166,167).

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforilasyonu ile aktif hale gelerek mitokondriden sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması yoluyla da apoptoz gerçekleşir. Apoptozu başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz kaskadının aktivasyonudur (165). Hücrede iç ve dış etkilere kaynaklı DNA'da oluşan hasar sonucunda p53 aktivitesiyle pro-apoptotik Bax indüklenerek apoptoza neden olur (168,169).

2.10.3 Apoptozda Mitokondrinin Rolü

Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımı apoptotik sürecin geri dönüşümsüz olarak başladığının göstergesidir. Mitokondrinin aktivasyonuna neden olan pro-apoptotik veya anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin baskınlığına göre sitokrom c sitoplazmaya salınabilir veya salınımı baskılanabilir (164).

Pro-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımını indükler, anti-apoptotikler ise sitokrom c salınımını baskılar. Anti-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri, intrinsic sitokrom c'nin salınımını baskılama özelliğine sahiptir. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptoz baskıladığı, pro-apoptotik üyelerin de aşırı ekspresyonu sonucunda ise hücre ölümü görülmektedir (163,164). Mitokondriyal DNA mutasyonlarının kansere neden olduğu farklı çalışmalarda göstermiştir. Mitokondriyal DNA, nükleer DNA'ya göre hasara daha duyarlıdır (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu çalışma hücre kültüründe yapılmış deneysel *in vitro* laboratuvar çalışmasıdır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Aralık 2013 tarihinde literatür taraması ile başlayarak 26.04.2019 tarihinde tez savunması ile sonlandırılmıştır. Laboratuvar çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.3 Araştırmanın Çalışma Grupları

Çalışmamızda HEI-OC1 iç kulak ve HTB-186 medulloblastom hücre hatları kullanılmıştır.

- 1-Kontrol,
- 2-Sadece Radyasyon (RT) uygulanan hücre grubu,
- 3-Sadece Sisplatin (CDDP) uygulanan hücre grubu,
- 4-Sisplatin sonrasında radyasyon (CDDP+RT) uygulanan hücre grubu,
- 5-Sadece Asetil-L-Karnitin (ALC) uygulanan hücre grubu,
- 6-Asetil-L-Karnitin sonrasında radyasyon (ALC+RT) uygulanan hücre grubu,
- 7-Asetil-L-Karnitin ve Sisplatin (ALC+CDDP) uygulanan hücre grubu,
- 8-Asetil-L-Karnitin ve Sisplatin sonrasında radyasyon (ALC+CDDP+RT) uygulanan hücre grubu olmak üzere 8 farklı çalışma grubu oluşturulmuştur.

3.4 Çalışma Materyali

3.4.1 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücre Hatları

Daha önce Amerika Birleşik Devletleri House Ear Institute'den Prof. Dr. Kalinec'den hediye olarak temin edilen fare kökenli immortalize *House Ear Institute Organ Of Corti* (HEI-OC1) hücre hattı ile çalışılmıştır. HEI-OC1 hücreleri sinir hücresi benzeri hücrelerden köken almaktadır. HTB-186, desmoplastik serebellar medulloblastom kökenli olan bu hücre hattı 4 yaşındaki bir çocuğun posterior fossa tümöründen alınan biyopsi

materyalinden üretilerek çoğaltılmıştır. Ticari satışa sunulan insan kökenli HTB-186 medulloblastom hücreleri, ATCC'den temin edilmiştir.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişkenler: Asetil-L-Karnitin, Sisplatin, Radyasyon dozlarıdır.

Bağımlı değişkenler: HEI-OC1 ve HTB-186 hücre hatlarına yapılan % canlılık, % apoptoz, MDA, HO-1, Nrf2, GSSG/GSH, belirlenen genlerin ekspresyonları, kaspaz 3-8-9, mitokondriyal membran potansiyeli ve ROS deneyleridir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

3.6.1.1 Kullanılan Cihazlar

Tablo 1. Mevcut Cihazlar

Akım Sitometri (BD Accury C6)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Hassas Terazi (Sartorius BP221S)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Işık Mikroskobu (Nikon)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Nano-Real time PCR (Roche)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Laminar Akışlı Biyogüvenlik Sınıf II Kabinet (Nüve)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
pH-metre (Hanna HI 9321)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Saf Su Sistemi	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Invert Mikroskop (Olympus bx50)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Derin Dondurucu (Sanyo)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Sıvı Azot Tankı	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Laminar Air Flow (Nüve)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
ELISA Reader (Thermo Scientific)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Mikrosantrifüj (Thermo Scientific)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı

CO ₂ İnkübatör (Thermo Scientific)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Pastör Fırın (Thermo Scientific)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
-80°C Derin Dondurucu (Thermo Scientific)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
4 °C Buzdolabı (Arçelik 450 lux)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Otoklav (Hirayama)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Soğutmalı Santrifüj Cihazı (Beckman J6-MI Centrifuge)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Çalkalayıcı (KA HS 260 Basic)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Hemositometre	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
Motorlu Pipet (Isolab)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
-196 °C sıvı azot tankı (Heraus)	DEÜ Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji AD Laboratuvarı
HPLC (CTO-10AS VP, Shimadzu)	DEÜ Tıp Fakültesi Ar-LAB
6-MV Siemens Primus Lineer Aksalator	DEÜ Tıp Fakültesi Radyasyon AD

3.6.1.2 Kullanılan Sarf Malzemeler

Tablo 2. Kullanılan Sarf Malzemeler

6 kuyucuklu plak (Greiner)	Flow sitometri tüpleri
96 kuyucuklu plak	HPLC vialleri
Hücre kültür flaskları (25 ve 75 cm ²)	Steril Pastör Pipeti
Steril pipetler (2, 5, 10 ve 25 ml) (Greiner)	Pipet ucu (mavi, sarı) (Ependorf)

3.6.1.3 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tablo 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 41965 (Gibco)	Steril PBS-Ca ⁺² ve Mg ⁺² içermeyen (Sigma)
DMEM F12 (Gibco)	Sisplatin (Koçak)
İnaktif Fetal Bovine Serum (Gibco)	Asetil-L-Karnitin (Sigma A6706-Aldrich)

L-Glutamine (Gibco)	Tripan Mavisi (Biochrome)
Trypsin-EDTA (Gibco)	Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma)
Penicillin-Streptomycin (Biochrom)	Etanol (Sigma)
Deiyonize Su	

3.6.2 Kullanılan Kitler

Tablo 4. Kullanılan Kitler

Human/Mouse Total HO-1/HMOX1 Immunoassay (R&D Systems)
TransAM Nrf2 (Active Motif)
TriPure RNA Isolation Reagent (Roche)
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)
GenScript TUNEL Apoptosis Detection Kit, for adherent cells, FITC-labelled POD, USA, Piscataway, NJ (BD)
JC-1 (Molecular Probes)
Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents (Invitrogen)
Flow Cytometry Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit (BD)
WST-1 kit (Roche)
OxiSelect™ Total Glutathione (GSSG/GSH) Assay Kit (Cell Biolabs, Inc)
Primerler (NRF2, GR SOD2,SOD3,NQO1,GST,GPx,HO-1,GCLS, CATALASE)
Protein ölçüm kiti BCA (Thermo-Fisher)

3.6.3 Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Sisplatin (Koçak) medium içinde çözülerek, O-Acetyl-L-Carnitine Hydrochloride (Sigma-A6706) 100 mg/ml distile su içinde ortam ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Reaktifler çalışma öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

3.6.4 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin Çoğaltılması

HEI-OC1, DMEM ortamı %10 inaktif Fetal Bovine Serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren ortamda 33°C’de, %10 CO₂ ve %95 nemli ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler %95 konfluent olduğunda 1/3-1/4 oranında pasajlanmıştır. HTB-186, DMEM F12 ortamı, %10 inaktif Fetal Bovine Serum, %1 L-Glutamin ve %1

Penisilin/Streptomisin içeren ortamda 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortamında kültüre edilmiştir. Hücreler %95 konfluent olduğunda 1/2 oranında pasajlanmıştır.

3.6.5 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin Sayımı ve Pasajlanması

Tripan mavi boyası iki azo kromoforu içeren mavi renkli bir asit boyadır. Ölü hücrelerdeki membranın hasarlanarak bozulması ve negatif yüklenmesi sebebiyle tripan mavi ölü hücre membrandan içeriye kolayca girebilir ancak canlı hücrelerin yarı geçirgen membran özellikleri nedeniyle hücre içerisine giremezler. Mavi renkte olan hücreler ölü rengi alırlarken, canlı hücreler açık ve parlak görünümündedir.

Tripan mavi ile homositometrede hücre sayımı her bir hücre hattı için pasajlama işleminden önce uygulanarak hücrelerin canlılık ve ölüm oranları gözlemlenmiştir. Kullanılacak olan kültür ortamları ve diğer gerekli olan solüsyonlar HEI-OC1 hücre hattı için 33°C’de, HTB-186 hücre hattı için 37°C’de önceden ısıtılmıştır. Hücreler %95 konfluent olduğunda; kültür ortamı uzaklaştırılır, PBS (5 ml) ile hücreler yıkanır, PBS uzaklaştırılır, tripsin (5 ml) eklenir ve HEI-OC1 hücre hattı 33°C’de %10 CO₂, HTB-186 37°C’de %5 CO₂ olan inkübatöre 3 dk inkübasyona bırakılır. Ortamdaki tripsini inaktive etmek için 5 ml kültür ortamı flaska eklenir ve daha sonra süspanse hal almış olan hücreler (5 ml tripsin + 5 ml kültür ortamı) falkonlara aktarılır, 1200 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelletten dilue edilerek (0,5 ml de %0,4 tripan blue) toplanan hücre miktarı belirlenir. Sonrasında deney düzeneklerine ve kullanılan kültür kaplarına bağlı olarak istenen miktarlarda 10⁴- 10⁵/ml’de olacak şekilde hücre sayılarında ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.6 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Belirlenmesi

Sitotoksisite analizinde hücre büyümesinin engellenmesinin belirlendiği bir yöntemdir. Pembe renkli tetrazolyum tuzunun (WST-1), mitokondriyal solunum zincirinde yer alan ve sadece canlı hücrelerde aktif olan süksinat-tetrazolyum redüktaz enzimi aracılığıyla koyu kırmızı renkli formazan boyaya dönüşmesine dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi, canlı hücrelerin sayısı arttıkça artmaktadır. Bu nedenle, enzim aktivitesi arttıkça formazan boyanın üretimi de artmaktadır. Formazan boyanın kantititesi, direkt olarak medyumda metabolik olarak aktif olan hücre sayısı ile

ilişkilidir. ELISA okuyucusu ile ölçülen formazan boyanın absorbanası, canlı hücre sayısı ile direkt olarak orantılı olmaktadır.

Her iki hücre hattı için farklı dozlarda Asetil-L-Karnitin (ALC), Sisplatin (CDDP) ve Radyasyon (RT) ile muamele edilen hücrelerin canlılıkları WST-1 testi ile tayin edildikten sonra %50 oranında canlılığını kaybettiği RT dozu ve CDDP konsantrasyonu 24, 48 ve 72 saat (h) koşulları uygulanarak optimum şartlar ve dozlar belirlenmiştir. Bu aşamada belirlenen doz ve uygulama süreleri diğer deneylerde uygulanmıştır.

Hücre sayımı ve pasajlanma aşamasında belirtilen basamaklar izlenerek her iki hücre hattı da tripsine edilerek flakstan kaldırılmıştır. HEI-OC1 hücre hattı 200 µl'de 5000, HTB-186 hücre hattı 200 µl'de 1×10^4 yoğunluğunda olacak şekilde hesaplanarak 96 kuyucuklu plaklara ekim yapılmıştır. Gece boyu HEI-OC1 hücre hattı 33°C %10 CO₂'te ve HTB-186 37°C'te %5 CO₂ inkübasyona bırakılan hücreler %75-80 konfluent olduğunda süpernatant ortamdaki uzaklaştırılarak HEI-OC1 ve HTB-186 için RT, ALC, CDDP'nin farklı konsantrasyonlardaki dozları ve bunların kombinasyonları ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda hücre canlılığı için plaklara 10 µl/kuyucuk WST-1 reaktifi eklenerek hücreler 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra ELISA plak okuyucuda 450/630 nm'de absorbanaları okutulmuştur. Kontrol grubundaki hücre canlılığı %100 kabul edilerek ALC, CDDP, RT ve kombinasyon uygulamalarının % hücre canlılıkları hesaplanmıştır. HEI-OC1 hücre hattı için 50 µM ALC ve 5 Gy RT'de %50 hücre canlılığı için 72 saat olarak çalışılmaya karar verilirken, HTB-186 hücre hattı için 25 µM ALC ve 5 Gy RT ise 24 saat olarak belirlenmiştir.

3.6.7 Sisplatin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Hücre kültürlerinde ALC ve radyasyon ile muamele edilen hücrelerin HEI-OC1 hücre hattı için % 50 oranında canlılığını kaybettiği CDDP (50 µM) konsantrasyonu ve 5Gy RT, HTB-186 hücre hattı için CDDP (75 µM) belirlenmiştir. ALC'nin %50 oranında hücre canlılığını değiştirmeyen dozları deneylerde kullanılmıştır.

3.6.8 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerine Radyasyon Uygulaması

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkoloji Anabilim Dalı'nda Siemens Primus Lineer Aksalator cihazı, 6MV-X enerjisi ile katı su fantomu kullanılarak 20x20cm'lik alanlarda hücrelere 5 Gy dozda tek fraksiyonda radyoterapi uygulanmıştır. Hücrelere radyasyon uygulaması, ajanlar uygulandıktan 20-25 dk sonrasında gerçekleşmiştir.

3.6.9 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Hücrelerde apoptotik hücre ölümünün tesbiti için TUNEL kit (GenScript TUNEL Apoptosis Detection Kit, for adherent cells, FITC-labelled POD, USA, Piscataway, NJ) prosedürüne uygun bir şekilde aşağıda belirtildiği şekilde çalışılmıştır.

1. Hücreler PBS içinde 1250 rpm de 5 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant uzaklaştırılır. Hücre peleti 200 µl PBS de resüspanse edilerek lam üzerine alınır.
2. Hücreler %0,2 lik Triton X-100 ile PBS-Tween 20 içinde 30 dk inkübe edilir.
3. PBS-Tween 20 içinde 2 dk olmak üzere 2 defa yıkanır.
4. Endojen peroksidaz aktivitesinin bloklaması için lamlar %3 H₂O₂ içeren PBS içinde 10 dk bekletilir. PBS-Tween 20 içinde 2 dk olmak üzere 3 defa yıkama yapılır.
5. TdT reaksiyon tamponu içinde 10 dk inkübasyon ardından TdT reaksiyon karışımı içinde 37-40 °C de 1-2 saat inkübasyona bırakılır.
6. Durdurma tamponu ile 10 dk yıkanarak reaksiyon durdurulur.
7. PBS-Tween 20 içinde 2 dk olmak üzere 3 defa yıkama yapılır.
8. Streptavidin-HRP içeren PBS solusyonunda oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonun ardından PBS-Tween 20 içinde 2 dk olmak üzere 3 defa yıkama yapılır.
9. DAB ile 2 dk muamele yapıldıktan sonra musluk suyu ile yıkama yapılır.
10. 30 saniye hematoksilende bekletildikten sonra lamlar musluk suyunda 5 dk yıkanır. %95 'lik etanolde dehidrasyonun ardından lamlar 3 dk %100 lük etanolde 2 defa bekletilir.
11. Ksilen içinde 5 dk 2 defa muamele edildikten sonra lamlar ksilen bazlı mounting medium ile kapatılır.

3.6.10 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

3.6.10.1 Kaspaz-3 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Pellet konsantrasyonu $1-5 \times 10^6$ hücre süspanse edildi.
2. Cell Lysis Buffer ile 50 μ l içinde süspanse edildi.
3. Hücreler 10 dakika süreyle buz üzerinde inkübe edildi.
4. 1 dakika boyunca santrifüj (10,000 x g) edildi (Protein konsantrasyonu ölçüldü).
5. Her örnek için 50 μ l Cell Lysis Buffer 50-200 μ g protein seyreltilir.
6. Her bir örnek için 2X Reaksiyon Tamponu (10 mM DTT içeren) 50 μ l eklenir.
7. 4 mM DEVD-pNA substrat (200 μ M final kons.)'dan 5 μ l eklenir ve 1,5 saat 37 ° C'de inkübe edildi. 405 nm'de plak okuyucuda okutuldu.

3.6.10.2 Kaspaz-8 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Pellet konsantrasyonu $1-5 \times 10^6$ hücre süspanse edildi.
2. Cell Lysis Buffer ile 50 μ l içinde süspanse edildi.
3. Hücreler 10 dakika süreyle buz üzerinde inkübe edildi.
4. 1 dakika boyunca santrifüj (10,000 x g) edildi (Protein konsantrasyonu ölçüldü).
5. Her örnek için 50 μ l Cell Lysis Buffer 50-200 μ g protein seyreltilir.
6. Her bir örnek için 2X Reaksiyon Tamponu (10 mM DTT içeren) 50 μ l eklenir.
7. 4 mM IETD-pNA substrat (200 μ M final kons.)'dan 5 μ l eklenir ve 1,5 saat 37 ° C'de inkübe edilir. 405 nm'de plak okuyucuda okutuldu.

3.6.10.3 Kaspaz-9 Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi

1. Pellet konsantrasyonu $1-5 \times 10^6$ hücre süspanse edildi.
2. Cell Lysis Buffer ile 50 μ l içinde süspanse edildi.
3. Hücreler 10 dakika süreyle buz üzerinde inkübe edildi.
4. 1 dakika boyunca santrifüj (10,000 x g) edildi (Protein konsantrasyonu ölçüldü).
5. Her örnek için 50 μ l Cell Lysis Buffer 50-200 μ g protein seyreltilir.
6. Her bir örnek için 2X Reaksiyon Tamponu (10 mM DTT içeren) 50 μ l eklenir.
7. 4 mM LEHD-pNA substrat (200 μ M final kons.)'dan 5 μ l eklenir ve 1,5 saat 37 ° C'de inkübe edildi. 405 nm'de plak okuyucuda okutuldu.

3.6.11 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Mitokondriyel membran potansiyel değişimi mitokondriyel apoptotik yolağın değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerden biridir. İntakt hücrelerin mitokondriyel membran potansiyeli lipofilik katyonik prob 5,5 V,6,6 V-tetrachloro-1,1 V 3,3 V-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1; Molecular Probes) kullanılarak flow sitometrik olarak ölçülmüştür. Hücreler inkübasyon süreleri sonrasında tripsinle toplanarak propilen tüplere aktarılmıştır.

1. Örnekler 400 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılır.
2. Pelletin üzerine 0,5 ml JC-1 Working Solution'dan eklenir, vortekslenerek ve pipetaj yapılarak 10-15 dk 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilir.
3. Örneklerin üzerine 2 ml 1x Assay Buffer'dan eklenir, vortekslenir, pipetaj yapılarak 400g'de 5 dk santrifüj edilir.
4. Süpernatant atılarak, pelletin üzerine 0,5 ml 1x Assay Buffer eklenerek vortekslenir ve pipetaj yapılarak Akım Sitometri (BD Accury C6) cihazında mitokondriyel JC-1 değişimi için flüoresan emisyon kayması yeşilden (~533 nm) kırmızı (~585 nm) de okutulmuştur.

3.6.12 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Hücre İçi Reaktif Oksijen Ürün Oluşumun Ölçülmesi

Hücre içi ROS oluşumu 5-(and 6)-carboxyl-2',7'-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) probu kullanılarak ölçülmüştür. Bu esterifiye form hücre membranına permeabilize olabilen ve hücre içi esterazlar tarafından deasetilasyona uğramaktadır. Oksidasyona bağlı olarak DCFDA oldukça floresan olan 2,7-dichloro fluorescein (DCF)'e dönüşme prensibine dayanmaktadır.

1. Hücre sayımı ve pasajlanma aşamasında belirtilen basamaklar izlenerek her iki hücre hattı da tripsine edilerek flasktan kaldırılarak belirlenen tüplere aktarılır.
2. Hücre süspansiyonun olduğu tüpler 1200 rpm'de santrifüj edilir.
3. Süpernatant atılır ve pellete 2 ml PBS (33°C) eklenerek hücreler yıkanır. Hücrelerin son konsantrasyonu 10 uM DCFDA olacak şekilde serumsuz ortamda hazırlanmıştır ve karanlıkta 15 dakika 33°C'de inkübe edilerek hücreler Akım Sitometri (BD Accury C6) cihazında eksitasyon ve emisyon 488/530 nm dalga boylarında okutulmuştur.

3.6.13 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Örneklerin Protein Düzeyinin Belirlenmesi

Proteinlerin peptid bağlarının Cu^{+1} ile reaksiyona girmesi, çözeltide bulunan Cu^{+2} , Cu^{+1} 'e indirgenir. Cu^{+1} bicinchoninic asit (BCA) tarafından şelatlanmaktadır. Serbest BCA Cu ile şelat oluşturduğundan açık yeşil olan rengin pembeye ışıma vermesi prensibine dayanmaktadır. Lipid peroksidasyon ölçümünde örneklerin protein miktarları saptanmıştır. Elde edilen protein miktarları deney protokolünde belirlenen protein miktarı düzeyine göre seyreltildikten sonra çalışmaya başlanmıştır.

Protein ölçüm kiti BCA (Thermo-Fisher) içindeki Working Reagent (WR) 50:1 ve standartlar (0, 25µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 2000 µg/ml) oranlarında hazırlanmıştır. Her iki hücre hattı lizatları tripsine edilerek flakstan kaldırılmıştır ve uygun miktarlarda dilüe edilmiştir. Standartlardan (BSA) 25 µL ve hazırlanan örneklerden 25 µl ilgili kuyucuklara eklenmiş, örneklerle ve standartlara WR'den 200µL eklenerek plak 565nm'de ELISA okuyucuda okutulmuştur. Elde edilen standart konsatrasyon grafiğinden örneklerin protein miktarları ug/mL olacak şekilde belirlenmiştir.

3.6.14 RT-PCR Analizi

Hücreler daha önceden belirlenen süre ve ajan uygulamaları sonrasında hücre lizaları kazınarak toplanmış ve bu hücre örneklerinden önce RNA izolasyonu, cDNA çevrimi sonrasında Real-Time PCR yöntemiyle gen ekspresyon düzeyleri Aktin ve GAPDH yapısal genlere oranlanarak düzeyleri normalize edilmiştir. Daha sonra kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri değişim gösteren genler anlamlı kabul edilerek değerlendirilmiştir.

3.6.14.1 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinden RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu; hücreler lizize edilir, fenol ile RNA'nın ekstrakte edilir.

1. Hücreler içinde bulundukları saklama solusyonundan ayrılmıştır.
2. Üzerlerine 100 µl Lysis buffer eklenir ve 5 dk bekletildikten sonra Green Beads tüplerin içine aktarılmıştır.

3. Tüplere 700 ml tripure eklenir ve tüpler MAGNA Lyser Homojenizatörde 45 saniye 4500 rpm' de döndürülmüştür.
4. Homojenizatörden çıkarılan tüpler cihazla birlikte gelen cooling block' a alınarak 2 dk bekletilmiştir (Homojenizatörde hızın ve sürenin etkisiyle ısınan tüpleri soğutmak için bu işleme başvurulmaktadır)
5. 5 dakika oda ısısında bekletilmiştir.
6. Tüplere 200 µl kloroform eklenerek 5 dk bekletilmiştir.
7. 12.000 rpm' de 4 °C'de 20 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda 3 faz oluşmaktadır:
 - 1.FAZ (Sulu faz): RNA içerir. (Renksizdir)
 2. FAZ: DNA içerir (beyaz renklidir)
 - 3.FAZ (Organik faz): Protein içerir (kırmızı renktedir)
8. RNA izolasyonu için renksiz olan 1.faz yeni tüpe aktarılmıştır.
9. Yeni tüpe 500 µl izopropanol eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkubasyona bırakılmıştır.
10. 12.000 rpm' de 4 °C'de 10 dk santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır.
11. Oluşan çökelek üzerine 1 ml %75 EtOH eklenmiştir.
12. 7.500 x g'de 4 °C'de 5 dak santrifüjlenerek süpernatant atılmıştır.
13. 57 °C'de EtOH uçurulmuştur. Kalan çökeleğe 50-100 µl RNase free su eklenerek pipetaj yapılmıştır.
14. İzolasyonun ardından RNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür. RNA'nın A₂₆₀/ A₂₈₀ absorbans oranının 1,9-2,0 arasında olduğu belirlenmiştir.

3.6.14.2 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin cDNA Sentezi

cDNA, RNA'dan revers transkriptaz enzimiyle DNA sentezidir. Öncelikle RNA izole edilir ardından cDNA'ya çevrim yapılır. Revers transkriptaz, gen zincirindeki poli A kuyruğuna bağlanır, mRNA ve primerini kalıp olarak kullanarak tek zincirli cDNA uzanır.

1. cDNA Sentezi için her bir RNA örneği 45-50 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR).
2. 0,2µl lik pcr tüpleri örnek sayısı kadar çıkartılır ve soğutma kabına yerleştirilerek aşağıda belirtilen bileşenler eklenmiştir (Tablo 6).

Tablo 5. RT-PCR’da Gerekli Olan Bileşiklerin Hazırlanması

<i>Bileşenler (tek reaksiyon için)</i>	<i>Hacim</i>	<i>Son Hacim Konsantrasyonu</i>
Total RNA veya mRNA	10 µl	Total RNA;10 -5000ng mRNA;1- 100ng *
Anchored oligo(dt)	1 µl	2,5 µM
Random Hexamer Primer	2 µl	60 µM
Toplam Hacim =13 µl		

*Üretici firma tarafından önerilen değerleridir.

3. Tüpler thermalcyclera yerleştirilerek 65 °C’de 10 dk RNA’lar denatüre edilmiştir.
4. Sonrasında tüpler hızlı şekilde buz üzerine alınarak 2 dk beklemeye bırakılmıştır.
5. Mastermix hazırlanır (Bu miktarlar örnek sayısına göre hazırlanmıştır)

Tablo 6. RT-PCR’da Gerekli Olan Mix Karışımının Hazırlanması

<i>Bileşenler (tek reaksiyon için)</i>	<i>Hacim</i>	<i>Son Hacim Konsantrasyonu</i>
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer(5x)	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor(40 U / µl)	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide mix (10 mM each)	2 µl	1 mM
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U / µl)	0,5 µl	10 U
Toplam Hacim =7 µl		

6. Her tüpe 7 µl mix’den eklenerek 3-4 kez pipetaj yapılmıştır (Tablo 7).
7. Tüpler Thermalcyclera yerleştirilir ve daha önce kaydedilmiş olan program çalıştırılmıştır. Program: 10 dk 25 °C
60 dk 50 °C
4 °C’de bekleme
8. cDNA’lar RealTime PCR için hazırdır (analiz zamanına kadar -20 °C’de saklanmıştır).

3.6.14.3. REAL TIME PCR Aşaması

Primer Ara Stok Hazırlanması;

F ve R yazan primerler kullanılmıştır. F ve R primerden 10 µM (100 µM’lık ana stoktan 10 µl alınıp üzerine 90 µl su eklenerek) ara stok oluşturulmuştur.

Tablo 7. RT-PCR’da Gerekli Olan Primer ve Örnek Karışımının Hazırlanması

LightCycler ® FastStart DNA Master SYBR Green I		
Tek Reaksiyon (hacim)	Tek reaksiyon (konsantrasyon)	Bileşenler
6,6µl	-	Su, PCR-grade (Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
0,8 µl	2 mM	25 mM Mg ₂ ⁺ solüsyonu (Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
0,3 µl	0,3 µM	<i>Forward Primer (F) (ara stok 10 µM)</i>
0,3 µl	0,3 µM	<i>Reverse Primer (R) (ara stok 10 µM)</i>
1 µl	X	Enzim Karışımı (Roche FastStart DNA Master Sybr Green I: Tüp 1a ve 1b birleşim)
9µl Mix + 1µl cDNA = 10µl total reaksiyon Hacmi		

Kullanılan Primer; Referans Genler için UPL Human assay (Roche) primerleri kullanılmıştır; **ACTB:** P.n = 05046165001 **GAPDH:** P.n =05190541001 *p.n=Product no

Primer dizaynı clustal W aling programı ve oligo7 software kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen primerler blast programı ile spesifikliğı kontrol edilmiştir. Primer dizileri aşağıda verilmiştir.

Tablo 8. HTB-186 İçin Analiz Edilecek Genler ve Primerler

hNrf2 (NFE2L2) <i>F;</i> CAGCAGGACATGGATTTGATT <i>R;</i> TGGAGTTGTTCTTGTCTTTCCTT	hNQO1 <i>F;</i> CGAGCCCAGCCAATCAG <i>R;</i> GCCTCCTTCATGGCATAGTT
hHO-1(HMOX1) <i>F;</i> AGAGAATGCTGAGTTCATGAGGA <i>R;</i> AAGACTGGGCTCTCCTTGTTG	hGST <i>F;</i> TGCAGAAGATTTGGACAAGTTAAG <i>R;</i> GCTGGCAATGTAGTTGAGAATG
hCatalase <i>F;</i> TCGAGCAGAAGGAAAGTAATGG <i>R;</i> CAGCCTGCTGTATTATCTCCAA	hGPx1 <i>F;</i> CAGTCGGTGTATGCCTTCTC <i>R;</i> CGCCACATTCTCGATAAGTAGTA
hSOD2 <i>F;</i> GAACGTCACCGAGGAGAAGTAC <i>R;</i> TTGATATGACCACCACCATT	hGR(NR3C1) glucocorticoid receptör (GCR) <i>F;</i> GGAATAGGTGCCAAGGATCTG <i>R;</i> TGGATGGAGGAGAGCTTACA
hSOD3 <i>F;</i> TCTCTTGGAGGAGCTGGAAA <i>R;</i> TCCGCCGAGTCAGAGTTG	hGclm(gcls) <i>F;</i> GGGAACCTGCTGAACTGG <i>R;</i> ATCTGGGTTGATTTGGGAAC

Tablo 9. HEI-OC1 İçin Analiz Edilecek Genler ve Primerler

Actin Mouse F; AGCCATGTACGTAGCCATC R; CTCTCAGCTGTGGTGGTGA	SOD3 F; CTGAGGACTTCCCAGTGAC R; GGTGAGGGTGTGAGAGTGT
Nrf2 F; CTCGCTGGAAAAAGAAGTG R; CCGTCCAGGAGTTCAGAGG	NQO1 F; TTCTCTGGCCGATTCAGAGT R; GGCTGCTTGGAGCAAAATG
HO-1 F; CACGCATATACCCGCTACCT R; CCAGAGTGTTCATTCGAGA	GST F; CGCCACCAAATATGACCTCT R; CCTGTTGCCCCACAAGGTAGT
Catalase F; GAGACCTGGGCAATGTGAT R; GTTTACTGCGCAATCCCAAT	GPx F; GTCCACCGTGTATGCCTTCT R; TCTGCAGATCGTTCATCTCG
SOD2 F; GCGGTGCTGTAAACCTCAT R; CCAGAGCCTCGTGGTACTTC	GAPDH F; AACTTTGGCATTGTGGAAG R; ACACATTGGGGGTAGGAAA
GR F; CAACACAGTGGCCATTAC R; TTGTTTCTCATGGACCACCA	GCLS F; TGGAGCAGCTGTATCAGTG R; AGAGCAGTTCTTTTCGGGTA

Tablo 10. Real Time-PCR Reaksiyon Aşaması

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon			Melting Curve			Cooling
Analiz modu	Yok	Kuantifikasyon modu			Erime Eğrisi Modu			Yok
Döngü	1	45			1			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	95	60	99	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:15	00:00:15	00:00:01	00:00:01	00:00:00	00:00:30
Acquisition Mode	Yok	Yok	Yok	single	yok	Yok	Continuous	yok

3.6.15 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Aktivasyonunun Ölçülmesi

Tüm hücrelerdeki toplam HO-1'i ölçmek için fluorojenik substratlar kullanılarak tasarlanmış bir ELISA testidir. Hücreler plaktaki kuyucukalara sabitlenerek kuyularda permeabilize edilir. Hücreler aynı anda iki primer antikor ile inkübe edilir: hedef protein için spesifik bir antikor ve bir temizlik proteini olan GAPDH için spesifik olan bir normalleştirme antikorudur. Birincil antikorlar farklı türlerden türemiştir. Farklı türleri

tanıyan iki ikincil antikör, yabanciturpu-peroksidaz (HRP) veya alkalın fosfataz (AP) ile etiketlenir ve tespit için HRP veya AP için iki spektrumlu florojenik substrat kullanılır. Hedef proteinin floresansı iyi değışim varyasyonlarının düzenlenmesi için her bir kuyucuğun toplam GAPDH'sinin normalleştirilmesidir. Bu iki dalga boylu test, HO-1'in hassas tekrarlanabilirliği ile kesin olarak analiz edilmesini sağlar.

HEI-OC1 ve HTB-186 hücre hatları herbir koşul için 4'er tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hücreler protokolde belirtildiği gibi flasklardan kaldırılarak tripan mavisi ile homositometrede hücre sayımı yapılarak belirtilen hücre sayısı elde edilmiştir.

1. 10.000-20.000 hücre olacak şekilde hücreler plaklarda çoğaltılmıştır.
2. 1X PBS % 4 formaldehitten 100 µl hücrelere eklenmiş, plak kapağı kapatılarak oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir.
3. Formaldehit çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 1X Wash Buffer'dan 200 µl kuyucuklara eklenerek plak 5 dk boyunca hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır (yıkama işlemi 3kez tekrar edilmiştir).
4. Wash Buffer uzaklaştırıldıktan sonra Quenching Buffer dan 100 µl eklenerek kapağı kapatılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.
5. Quenching Buffer uzaklaştırıldıktan sonra 1X Wash Buffer'dan 200 µl kuyucuklara eklenerek plak 5 dk boyunca hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır (yıkama işlemi 3kez tekrar edilmiştir).
6. Wash Buffer uzaklaştırıldıktan sonra Blocking Buffer 100 µl eklenerek kapağı kapatılmış ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir.

Primer ve Sekonder Antikorların Bağlanması

7. Blocking Buffer uzaklaştırıldıktan sonra 1X Wash Buffer'dan 200 µl kuyucuklara eklenerek plak 5 dk boyunca hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır (yıkama işlemi 3kez tekrar edilmiştir).
8. Wash Buffer uzaklaştırıldıktan sonra Primary Antibody Mixture'den 100 µl eklenmiştir. Plak, kapatıcı ile kapatılarak 4° C'de 16 saat inkübe edilmiştir.

9. Primary Antibody Mixture uzaklaştırıldıktan sonra 1X Wash Buffer'dan 200 µl kuyucuklara eklenerek plak 5 dk boyunca hafifçe çalkalanarak yıkanmıştır (yıkama işlemi 3kez tekrar edilmiştir).
10. Her bir kuyucuğa Secondary Antibody Mixture'dan 100 µl eklenerek plak kapatıcı ile kapatılarak oda sıcaklığında 2 saat inkübe edilmiştir.

Florojenik Tespit

11. Secondary Antibody Mixture uzaklaştırıldıktan sonra 1X Wash Buffer'dan 200 µl hücrelere eklenerek 2 kez yıkama yapılmıştır. Bu yıkama işleminden sonra 2 kez de 1X PBS ile 200 µl eklenerek yıkama işlemi yapılmıştır. Her yıkama basamağında plak hafifçe çalkalanarak 5 dk boyunca bekleme yapılmıştır.
12. 1X PBS kuyucuklardan uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa Substrate F1'den 75 µl eklenerek oda sıcaklığında 20-60 dk inkübe edilmiştir (Bu aşamada plak direkt ışıktan korunmuştur).
13. Her kuyucuğa Substrate F2'den 75 µl eklenerek oda sıcaklığında 20-40 dk boyunca inkübe edilmiştir. (Bu aşamada plak direkt ışıktan korunmuştur).
14. Plate önce excitation 540 nm ve emission 600 nm'de, daha sonra excitation 360 nm ve emission 450 nm'de okutulur (Hücrelerin 600 nm'de okuması total HO-1 miktarını, 450 nm 'de okuması total GAPDH miktarını temsil etmektedir).

3.6.16 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyonunun Ölçülmesi

Nrf2, insan, fare ve sıçan modeli sistemlerinde Nrf2 aktivasyonunu incelemek için kullanılan bir kitledir. Nrf2'nin DNA bağlama aktivitesini ölçen 96 kuyucuklu plaka bazlı bir analiz yöntemidir. Doku veya hücre örneklerinden elde edilen nüklear ekstraktla çalışır. Nüklear ekstraktta yer alan aktif Nrf2 formu bu oligonükleotide (ARE içeren) spesifik olarak bağlanır. Nrf2'yi tespit etmek için kullanılan primer antikor, DNA bağlanması üzerine Nrf2 proteini üzerindeki bir epitopu tanıır. Bir HRP-konjuge sekonder antikorun eklenmesi, spektrofotometri ile kolayca ölçülen hassas bir kolorimetrik okuma sağlar.

HEI-OC1 ve HTB-186 hücre hatları herbir koşul için 4'er tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hücreler protokolda belirtildiği gibi flasklardan kaldırılarak tripan mavisi ile homositometrede hücre sayımı yapılarak belirtilen hücre sayısı elde edilmiştir.

1. Hücreler 10 ml soğuk PBS'de yıkanır.
2. 4 ° C'de 5 dakika boyunca 300 x g'de santrifüj edilir.
3. Pelletin üzerine 1 ml soğuk HB bufferdan eklenir.
4. Hücreler 15 dakika boyunca buz üzerinde şişmesi için inkübe edilir.
5. 50 µl 10% Nonidet P-40 (0.5 % final) eklenerek 10sn vortekslenir.
6. 4 ° C sıcaklıkta 30 saniye boyunca santrifüj edilir. Diğer kullanımlar için süpernatant (sitoplazmik fraksiyon) kullanılacaksa bu aşamada alınır alınır ve -80 ° C'de saklanır.
7. Nükleer pelet 50 ul Complete Lysis Buffer süspanse edilir ve bir shaker üzerinde 30 dk süre ile buz üzerinde hafifçe sallanır.
8. 4 ° C'de 14,000 x g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant kullanılmak için ayrılır, alikotlanır.
9. 3.17'de belirtildiği gibi protein konsantrasyonu 0,15 mg olacak şekilde konsantre edilir.

1. Basamak :

1. Her kuyucuğa 40 µl Complete Binding Buffer eklenmiştir.
2. **Sample Kuyucuğu:** Her kuyucuk için Complete Lysis Buffer'da seyreltilmiş olan 5-20 µg nükleer ekstraktan 10 µl eklenmiştir.
Positif Kontrol Kuyucuğu: Her kuyucuk için 10 µl Complete Lysis Buffer'da seyreltilmiş nükleer ekstraktan 1,25 µg/ µl (0,5 µl cos-7 nükleer ekstrakt + 9,5 µl Complete Lysis Buffer) eklenmiştir.
Blanks Kuyucuğu: Sadece 10 µl Complete Lysis Buffer'dan eklenmiştir.
3. Plak üzeri kapatılıp 1 saat hafif bir şekilde 100 rpm'de karıştırıcı ile inkübe eklenmiştir.
4. Her bir kuyucuğa 3 kez 200 µl Wash Buffer eklenmiştir. Plak hızla ters çevrilerek boşaltılmıştır.

2. Basamak : Primer Antikor Bağlanması

5. Her bir kuyucuğa dilüe edilmiş Nrf2 Antibody'den (1:100 dilüe edilmiş 1X Antibody) 100 µl eklenmiştir.
6. Plak üzeri kapatılıp çalkalama işlemi yapmadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

7. Her bir kuyucuğ 4 kez 200 µl Wash Buffer eklenmiştir. Plak hızla ters çevrilerek boşaltılmıştır.

3. Basamak : Sekonder Antikor Bağlanması

8. Her bir kuyucuğ dilüe edilmiş HRP- Conjugated Antibody'den (1:100 dilüe edilmiş 1X Antibody) 100 µl eklenmiştir.
9. Plak üzeri kapatılıp çalkalama işlemi yapmadan oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Her bir kuyucuğ 4 kez 200 µl Wash Buffer eklenmiştir. Plak hızla ters çevrilerek boşaltılmıştır.

4. Basamak : Kolorimetrik Reaksiyon

11. Her bir kuyucuğ 100 µl Developig Solution'dan eklenmiştir.
12. 2-15 dk arası oda sıcaklığında bekletilmiştir.
13. 100 µl Stop Solution'dan eklenmiştir.
14. 5 dk içinde 450 nm/655nm referansta ELISA okuyucuda okutulmuştur.

3.6.17 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde MDA Analizi

MDA tayini lipid peroksidasyonu ürünleri üzerinden belirlenmektedir. Örneklerin MDA düzeyleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı (CTO-10AS VP, Shimadzu) kullanılarak DEU Tıp fakültesi araştırma laboratuvarlarında ölçülmüştür. MDA ölçümü için 150 x 4,6 mm 5 µM tanecik çapındaki C18 kolon kullanılmıştır. HEI-OC1 ve HTB-186 hücre hatları herbir koşul için 4'er tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hücreler lizat olarak daha önce hücre toplama basamaklarında belirtildiği gibi flasklardan toplanarak MDA ölçümleri aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 40 µl örnek ve standartlar kapaklı cam tüplere konulmuştur.
2. 10 µl saf su ilave edilmiştir.
3. 20 µl 2.8 mmol/L BHT (etanolde) ilave edilmiştir.
4. 40 µl % 81 SDS eklenmiştir.
5. 600 µl 8 g/L TBA + Asetik asit karışımı ilave edilmiştir (TBA 200 mL/L asetik asit ile 1:1 oranında dilue edilerek 2 M NaOH pH NaOH ile 3,5'e ayarlanmıştır).
6. 95 °C'de su banyosunda 1 saat inkübe edilmiştir

7. Su banyosunda çıkartıldıktan sonra bir süre buz üzerinde soğumaya bırakılmıştır.
8. 200 µl saf su, 1000 µl butanol:piridin (15:1) ilave edilerek 1 dk boyunca vortekslenmiştir. Tüpler vortekslenildikten sonra 2-3 dk beklemeye bırakılmıştır (Bu aşamada renkli üst fazın ayrıldığı gözlenmektedir).
9. Renkli olan üst faz (organik) ependorf tüplerine alınarak 10,000 rpm'de 8 dk santrifüj edilmiştir.
10. HPLC cihazında 10 mikrolitre enjeksiyon yapılmıştır (532nm).

3.6.18 HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinde Total Glutasyon (GSSG/GSH) Analizi

Bir numunedeki toplam glutasyon içeriğini ölçmek için tasarlanmış nicel bir testtir (GSH/GSSG). Glutasyon Redüktaz, oksidize glutasyonu (GSSG), NADPH varlığında indirgenmiş glutasyon (GSH) düzeyine indirgemektedir. Ardından, kromojen 405 nm'de emen renkli bir bileşik üretmek için GSH'nin tiyol grubuyla reaksiyona girmektedir. Bilinmeyen numunelerdeki toplam glutasyon içeriği önceden belirlenmiş glutasyon standart eğrisi ile karşılaştırılarak belirlenmektedir. Kromofor üretimi hızı numunedeki glutasyon konsantrasyonu ile orantılıdır. Metafosforik asit, numunelerdeki müdahale eden proteinleri veya enzimleri uzaklaştırmak için sağlanır.

Hücre Lizatının Hazırlanması

Adheren hücreler tripsine edilerek 4 °C 5dk 500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Hücre pelletine 1X PBS eklenerek 4 °C 5dk 500 rpm'de tekrar santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletine 3. kez 1X PBS eklenerek 4 °C 5dk 500 rpm'de santrifüj edilmiştir (Hücre sayımı yapılarak 1-5 10⁶ hücre konsantrasyonu elde edilmiştir). Soğuk ortamda pelletin üzerine 200-500 µl % 5 MPA (metafosforikasit)'dan eklenerek homojenizatör ile resüspanse edilerek 1,5 ml tüplere aktarılmış ve 5dk 12.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant deneyin sonraki aşamasında kullanılmak üzere toplanmıştır.

1. İlgili kuyucuklara 1X glutation redüktaz çözeltisinden 25 µl eklenmiştir.
2. Kuyucuklara 1X NADPH çözeltisinden 25 µl eklenmiştir.
3. 100 µl ilgili kuyucuklara hazırlanan glutasyon standart ve ilgili kuyucuklara örnekler eklenerek iyice pipetaj yapılmıştır.
4. 1X Chromogen 50 µl eklenerek pipetaj yapılmıştır.

5. 10 dk boyunca 2 dk aralıklarla 405 nm’de okutulmuştur.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 11. Araştırma Planı ve Takvimi

Eylem	Tarih
Literatür Taraması	Aralık 2013
Etik Kurul Onayı	Ekim 2014
Verilerin Toplanması	Kasım 2014 - Aralık 2014
Deneylerin Yapılması	Aralık 2014 - Haziran 2016
Verilerin Analizi	Haziran 2016 - Ağustos 2016
Tez Yazımı	Eylül 2016 - Ocak 2017 (2016 sonrası literatürüne göre güncellenmiştir)
Tez Savunması	26.04.2019

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler için SPSS 22 programı kullanıldı. Grupların normal dağılımları değerlendirildikten sonra karşılaştırılmaları parametrik test olan T-Test kullanılarak istatistiksel analiz gerçekleştirildi. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

- Sağlıklı hücreler ve kanser hücreleri eş zamanlı olarak çalışılmıştır. Dört tekrarlı olarak çalışılan testlerin değerlerinin birbiriyle olan yakınlığı dikkat çekerek bulguların geçerlilik ve güvenilirliğini istatistiksel anlamda güçlendirmiştir.
- HEI-OC1 hücrelerinin inkübasyon süresi 72 saatliktir. Bu sürede radyasyonun ve sisplatinin oluşturduğu geç etkileri gözlemlemek adına sağlıklı hücrelerin proliferatif hızı göz önüne alındığında bu süreçte hücreler olağan bir apoptoza uğradığı için öncelikle canlılık daha sonra apoptoz değerlendirmelerinde doz ve süre optimizasyonu sınırlamasıyla karşılaştırılmıştır.

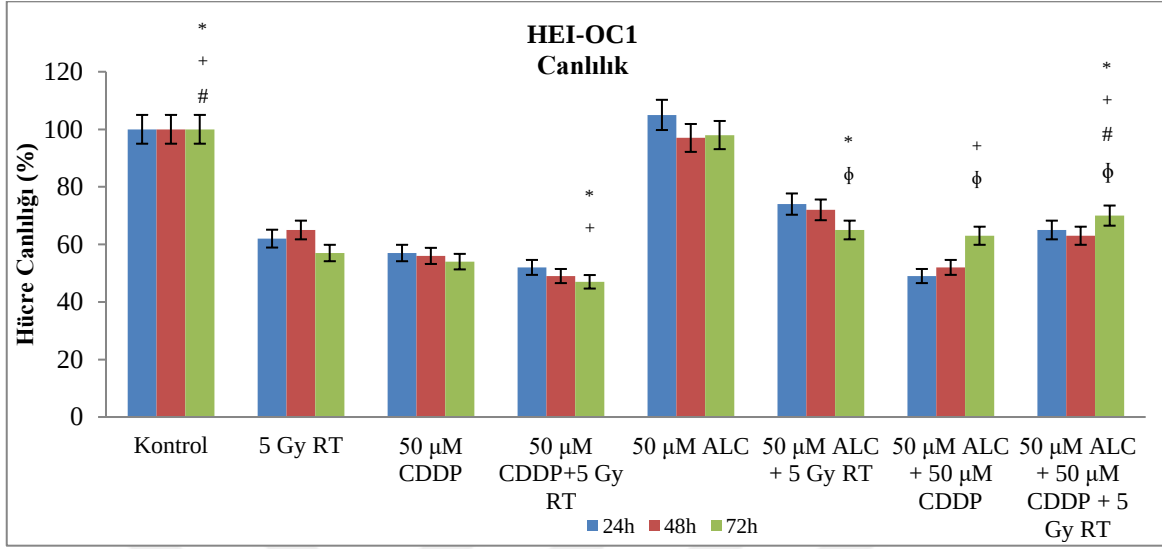
- Başlangıçta HEI-OC1 ve HTB-186 hücrelerinin birlikte değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Fakat HEI-OC1 hücrelerinde süre ve buna bağlı olarak doz optimizasyonu ile karşılaşılmıştır. HTB-186 hücreleri ile birlikte değerlendirme aşamasına gelindiğinde ise tekrar süre ve doz optimizasyonu ile karşılaşıldığından her iki hücre hattı için farklı doz ve süreler belirlenmiştir. Bu nedenle tez içerisinde ayrı ayrı değerlendirmeye alınarak yorumlanmışlardır.
- Genelde sağlıklı hücre olarak fibroblast kullanılır. Bizim alışmamızda spesifik olarak ototoksisite değerlendirilmek istendiği için HEI-OC1 hücrelerinin kültüre edilmesi zor olmasına rağmen HEI-OC1 hücreleri sağlıklı kontrol hcreti olarak kullanılmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu proje, Dokuz Eyll Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 02.10.2014 tarih ve 1722-GOA protokol numaralı 2014/31-06 karar numarası ile onaylanmıştır (EK 1).

4. BULGULAR

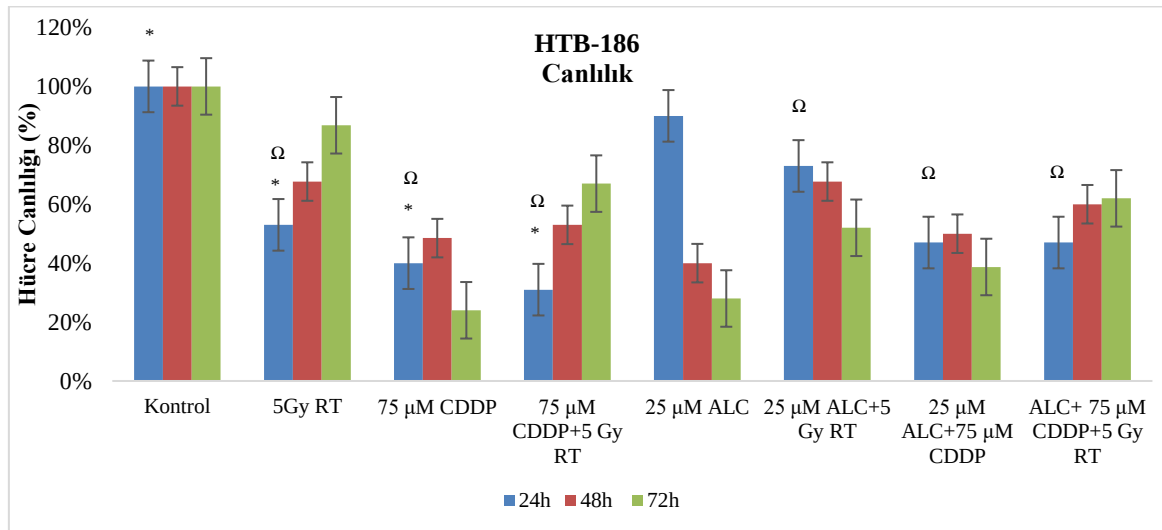
4.1 HEI-OC1 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Bulguları



Şekil 15. HEI-OC1 Hücrelerine Ajanların Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

5 Gy RT, 50 µM CDDP ve 50 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplarda zamana bağlı olarak HEI-OC1 hücre canlılığı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak azaldı (* $p < 0,05$). 50 µM ALC, HEI-OC1 hücrelerini 72 saat inkübasyonunda 50 µM ALC+50 µM CDDP, 50 µM ALC+5Gy RT ve 50 µM ALC+50 µM CDDP+5 Gy RT kaynaklı toksisiteye karşı koruyarak IC50 dozu 24 saat olarak belirlenmiştir (* $p < 0,05$).

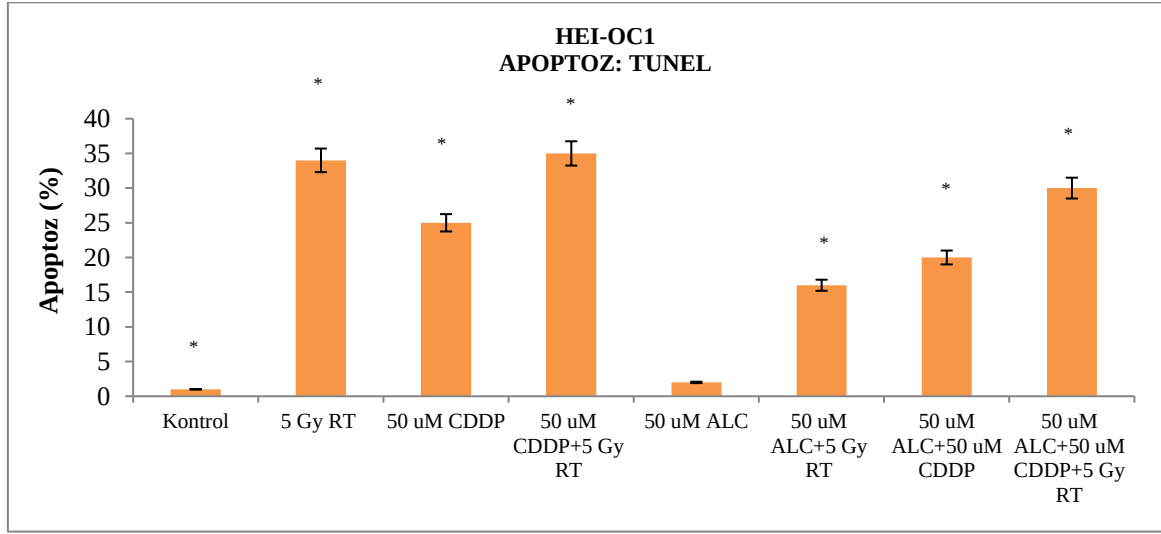
4.2 HTB-186 Hücrelerinde WST-1 Testi ile Canlılık Bulguları



Şekil 16. HTB-186 Hücrelerine Ajanların Uygulanmasıyla Zamana Bağlı Canlılık Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT, 75 μ M CDDP ve 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar zamana bağılı olarak HTB-186 hücre canlılığını istatistiksel anlamlı olarak azalttı (* p <0,05). 5 Gy RT, 75 μ M CDDP ve 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplara 25 μ M ALC eklendiğinde HTB-186 hücrelerinin 24 saat inkübasyonu sonucunda ALC+RT, ALC+CDDP ve ALC+CDDP+RT gruplarında IC50 dozu 24 saat olarak belirlenmiştir (Ω p <0,05).

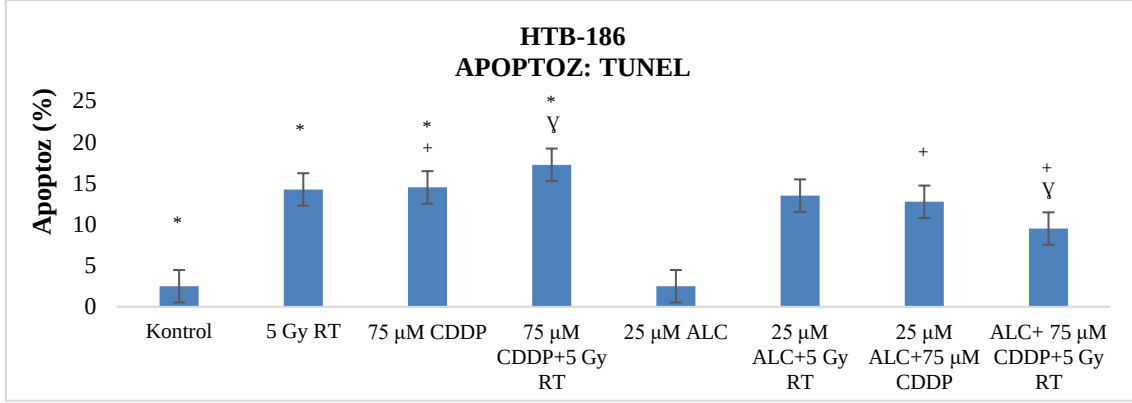
4.3 HEI-OC1 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü Bulguları



Şekil 17. HEI-OC1 Hücreleri TUNEL Apoptoz Grafiği.

5 Gy RT, 50 μ M CDDP ve 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HEI-OC1 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak arttı (p *<0,05). 5 Gy RT uygulanan grup, 50 μ M ALC + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldı (p *<0,05). 50 μ M CDDP uygulanan grup, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldı (p *<0,05). 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldı (p *<0,05).

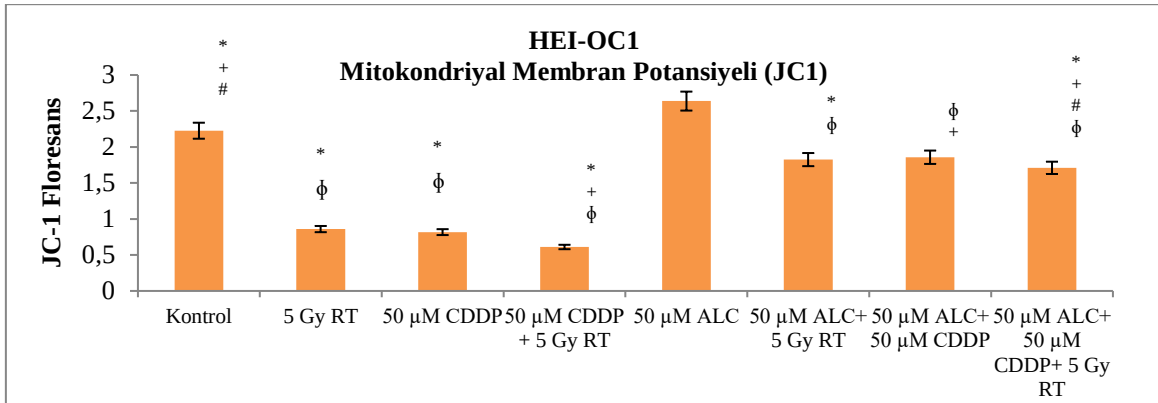
4.4 HTB-186 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü Bulguları



Şekil 18. HTB-186 Hücreleri TUNEL Apoptoz Grafiği.

5 Gy RT, 75 µM CDDP ve 75 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HTB-186 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak arttı (* $p < 0,05$) ($p = 0,0001$). 75 µM CDDP uygulanan grup, 25 µM ALC + 75 µM CDDP ve 25 µM ALC + 75 µM CDDP + 5 Gy RT grupları ile karşılaştırdığında apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldı (+ $p < 0,05$) ($p = 0,0001$). 75 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup, 25 µM ALC + 75 µM CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında apoptotik hücre ölümü istatistiksel anlamlı olarak azaldı (Y $p < 0,05$) ($p = 0,0001$).

4.5 HEI-OC1 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Bulguları

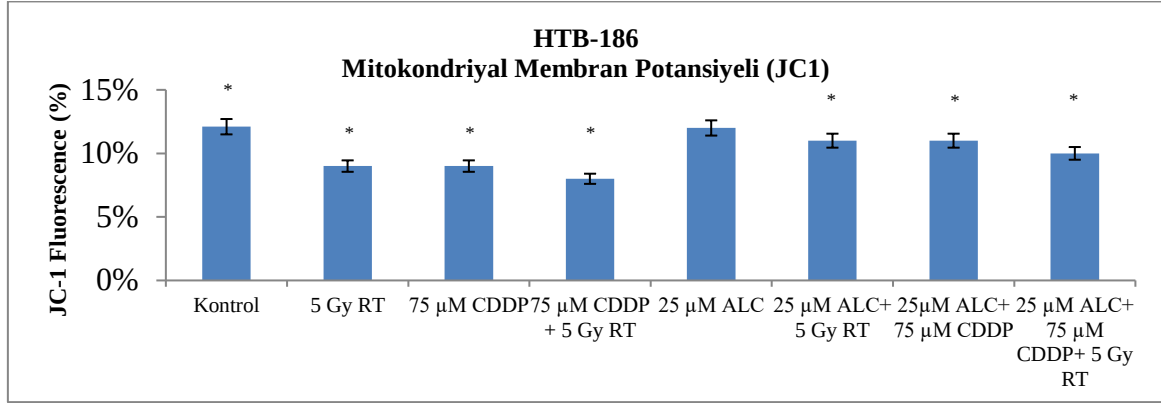


Şekil 19. HEI-OC1 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT, 50 µM CDDP ve 50 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında mitokondriyel membran potansiyeli istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$). Bu gruplara 50 µM ALC eklendiğinde (50 µM ALC + 5 Gy RT, 50

$\mu\text{M ALC} + 50 \mu\text{M CDDP}$ ve $50 \mu\text{M ALC} + 50 \mu\text{M CDDP} + 5 \text{ Gy RT}$) mitokondri membran potansiyeli istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*,+,#, ϕ p<0.05).

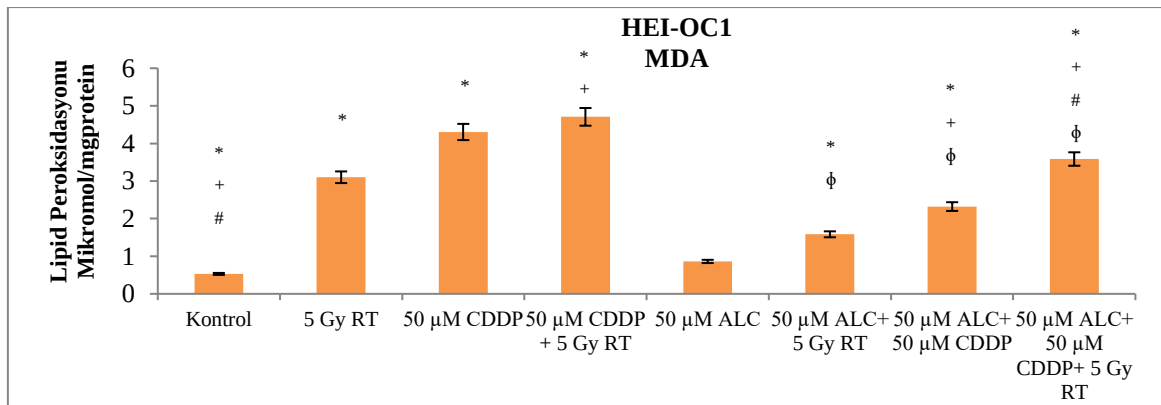
4.6 HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Bulguları



Şekil 20. HTB-186 Hücrelerinde Mitokondriyel Membran Potansiyeli Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT, 75 $\mu\text{M CDDP}$ ve 75 $\mu\text{M CDDP} + 5 \text{ Gy RT}$ uygulanan gruplar karşılaştırıldığında mitokondriyel membran potansiyeli istatistiksel anlamlı olarak azalırken, 25 $\mu\text{M ALC} + 5 \text{ Gy RT}$, 25 $\mu\text{M ALC} + 75 \mu\text{M CDDP}$ ve 25 $\mu\text{M ALC} + 75 \mu\text{M CDDP} + 5 \text{ Gy RT}$ uygulanan gruplarda mitokondriyel membran potansiyeli istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (*p<0.05).

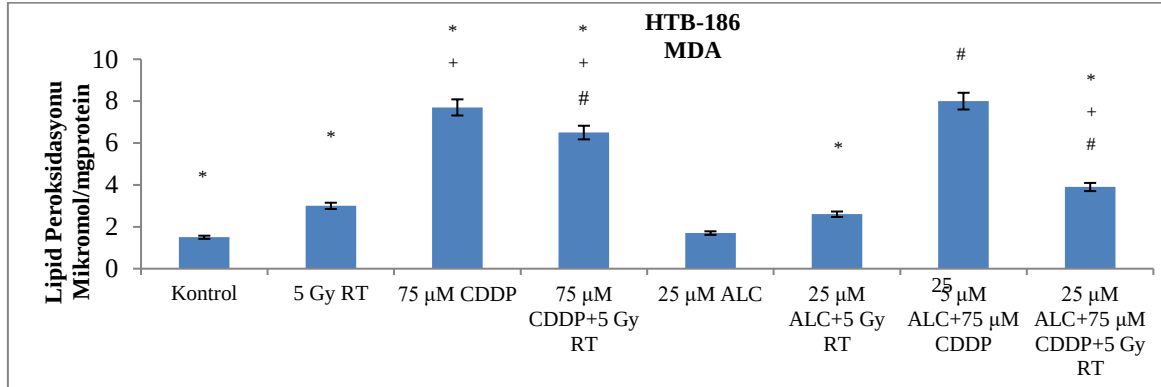
4.7 HEI-OC1 Hücrelerinde MDA Analizi Bulguları



Şekil 21. HEI-OC1 Hücrelerinde MDA (lipid peroksidasyon indüksiyon) Analiz Grafiği.

Kontrol grubu 5 Gy RT, 50 μ M CDDP ve 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artarken, bu gruplara 25 μ M ALC eklendiğinde MDA seviyeleri istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*,+,#, ϕ p<0.05).

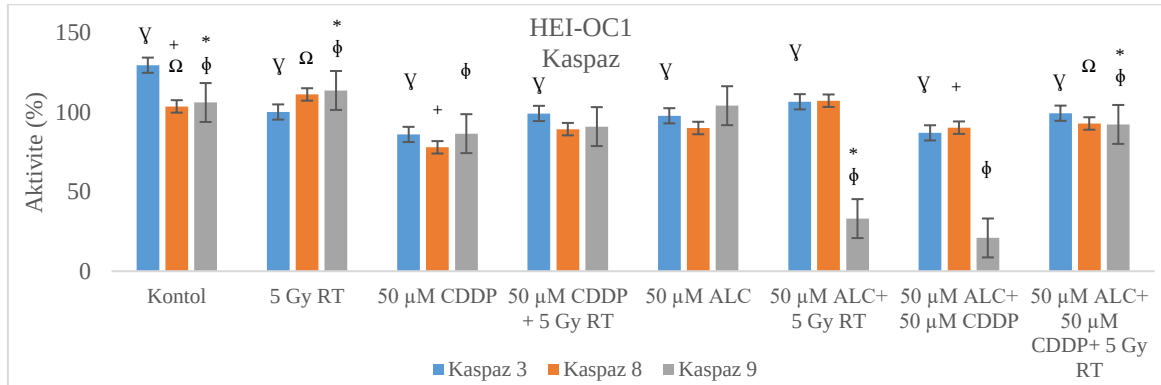
4.8 HTB-186 Hücrelerinde MDA Analizi Bulguları



Şekil 22. HTB-186 Hücrelerinde MDA (lipid peroksidasyon indüksiyon) Analiz Grafiği.

Kontrol grubu 5 Gy RT, 75 μ M CDDP ve 75 μ M CDDP + 5 Gy RT grupları ile karşılaştırıldığında MDA seviyeleri istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 μ M ALC + 5 Gy RT uygulanan gruplarda MDA seviyeleri istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (*p<0.05). 75 μ M CDDP grubu, 75 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi azalırken, 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi azalmıştır ($^+$ p<0.05). 75 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ve 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP grupları 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi azalmıştır ($^{\#}$ p<0.05).

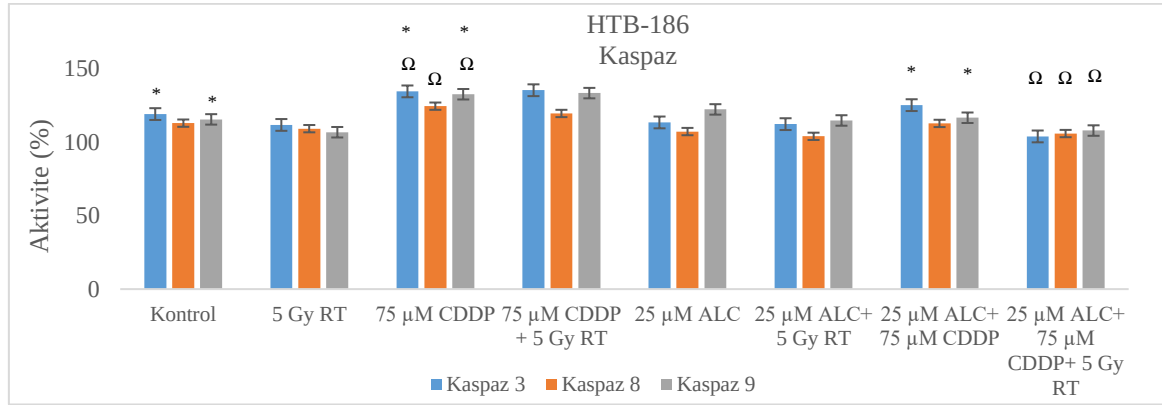
4.9 HEI-OC1 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivitesi Bulguları



Şekil 23. HEI-OC1 Hücreleri Kaspaz 3-8-9 Aktivite Grafiği.

Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında kaspaz 3 aktivitesi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($\chi^2 p < 0,05$). Kontrol grubu ile 50 μM CDDP uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 8 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak azalırken, 50 μM ALC+50 μM CDDP uygulanan grupta istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($^+ p < 0,05$). Kontrol grubu ile 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 8 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 μM ALC+50 μM CDDP+ 5 Gy RT uygulanan grupta istatistiksel anlamlı olarak azalarak kontrol grubu seviyesine gerilemiştir ($^{\Omega} p < 0,05$). Kontrol grubu ile 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 9 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 μM ALC+5 Gy RT uygulanan grup istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($^* p < 0,05$). 50 μM ALC+5 Gy RT uygulanan grup ile 50 μM ALC+50 μM CDDP+5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 9 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($^* p < 0,05$). Kontrol grubu ile 50 μM CDDP uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 9 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak azalırken, 50 μM ALC+50 μM CDDP uygulanan grup istatistiksel anlamlı olarak daha da azalmıştır ($^{\Phi} p < 0,05$). 50 μM ALC+50 μM CDDP uygulanan grup ile 50 μM ALC+50 μM CDDP+5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 9 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($^{\Phi} p < 0,05$).

4.10 HTB-186 Hücrelerinde Kaspaz 3-8-9 Aktivitesi Bulguları

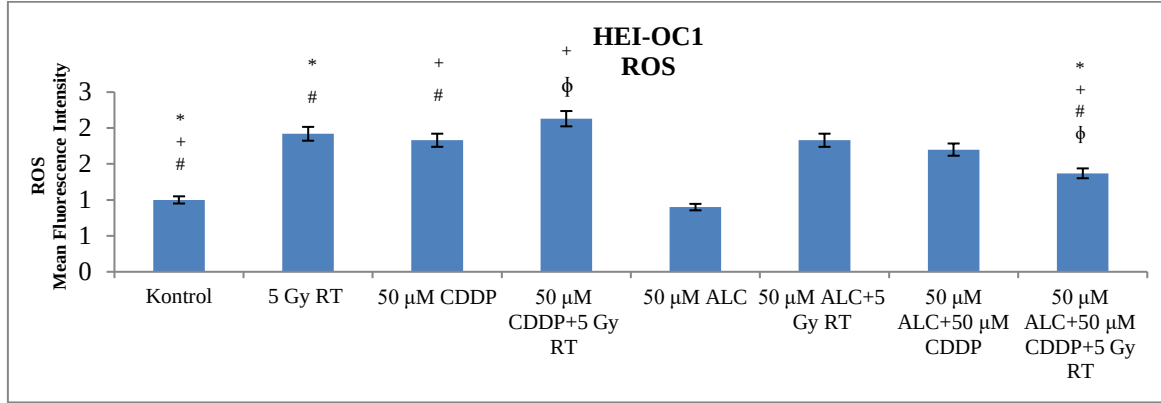


Şekil 24. HTB-186 Hücreleri Kaspaz 3-8-9 Aktivite Grafiği.

RT uygulanan gruplar kendi aralarında kıyaslandığında $p > 0,05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kontrol grubu ile 75 μM CDDP ve 75 μM CDDP+5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 μM ALC+75 μM CDDP ve 25 μM ALC+75 μM CDDP+5 Gy RT uygulanan gruplar istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($^* p < 0,05$). 75 μM CDDP grubu ile 25

μ MALC+75 μ M CDDP+5 Gy RT uygulanan grup karşılaştığında kaspaz 3, 8 ve 9 aktiviteleri istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır($p<0,05$).

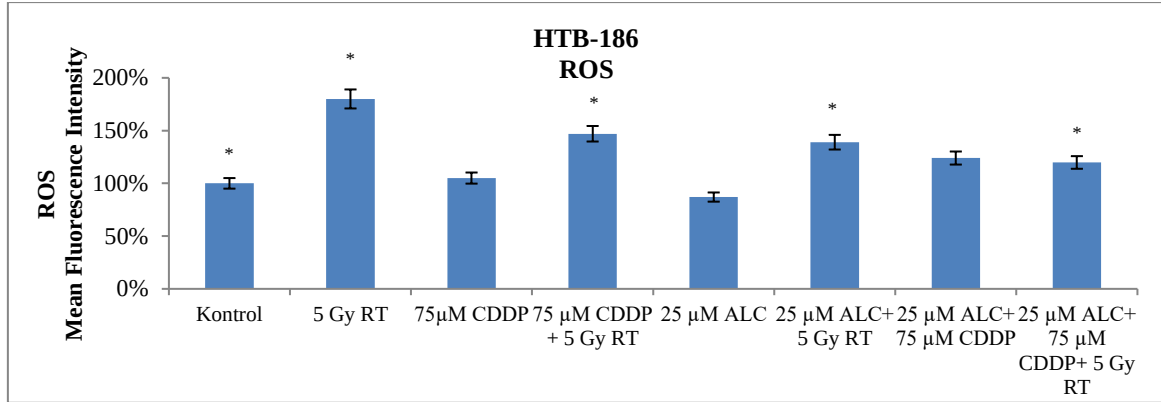
4.11 HEI-OC1 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Bulguları



Şekil 25. HEI-OC1 Hücreleri Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grupta ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile 5 Gy RT ve 50 μ M CDDP uygulanan gruplar karşılaştığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grupta ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Kontrol grubu ile 50 μ M CDDP ve 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu ile karşılaştırdığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup ile karşılaştırıldığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$).

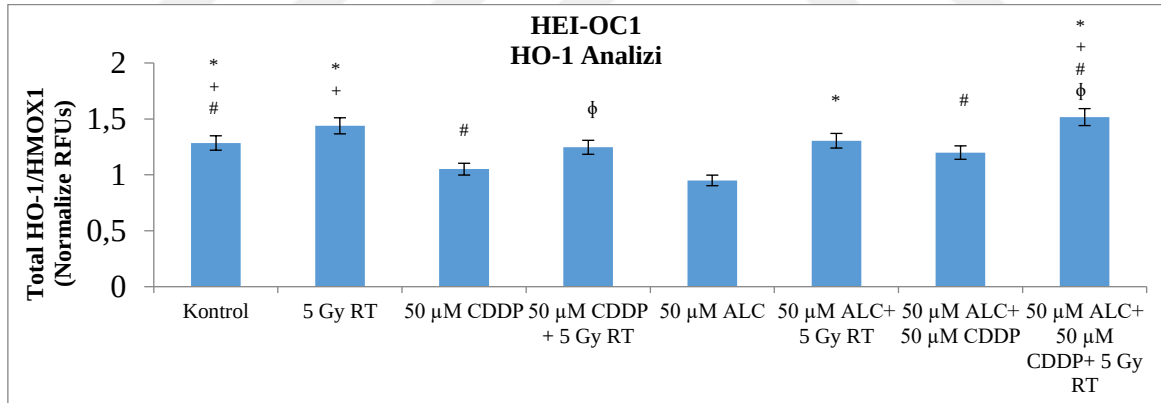
4.12 HTB-186 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Bulguları



Şekil 26. HTB-186 Hücreleri Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT ve 75 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 µM ALC + 75 µM CDDP ve 25 µM ALC + 75 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplarda ROS üretimi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0,05$).

4.13 HEI- OC1 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Bulguları

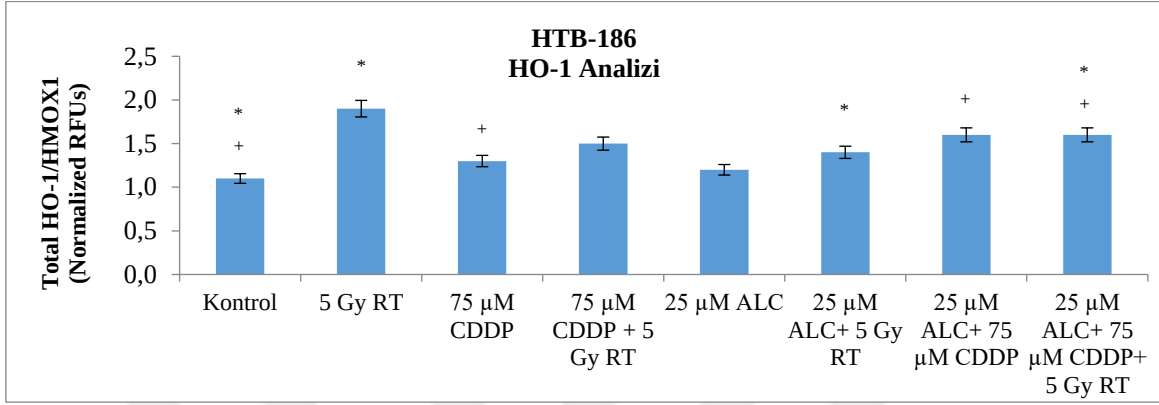


Şekil 27. HEI- OC1 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Grafiği.

Kontrol grubu, 5 Gy RT uygulanan grup ile karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 50 µM ALC + 5 Gy RT uygulanan grupta HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak kontrol seviyesine gerilemiştir (* $p < 0,05$). 5 Gy RT uygulanan grup ile 50 µM ALC + 50 µM CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (+ $p < 0,05$). 50 µM CDDP uygulanan grup ile ALC + 50 µM CDDP ve 50 µM ALC + 50 µM CDDP + 5 Gy RT grupları karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (# $p < 0,05$). 50 µM

CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup ile 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT grubu karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($^{\Phi}p<0.05$).

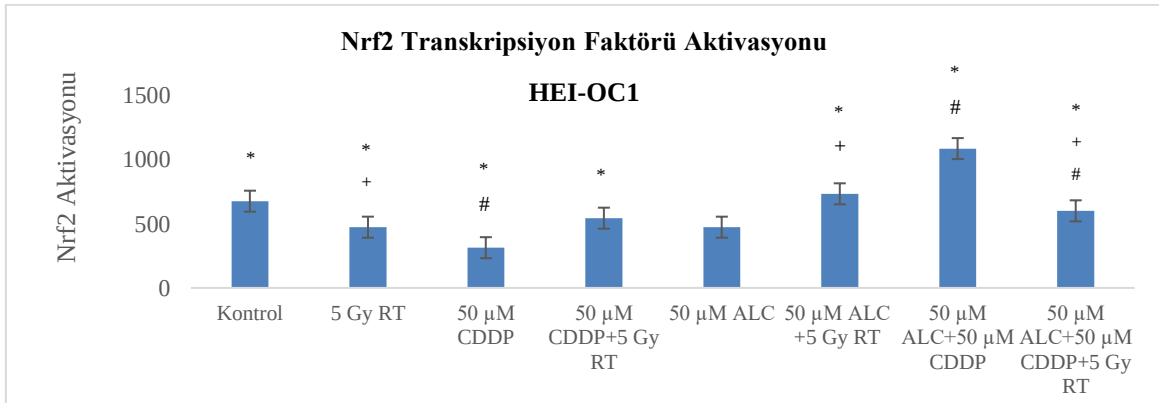
4.14 HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Bulguları



Şekil 28. HTB-186 Hücrelerinde Total HO-1 Analizi Grafiği.

Kontrol grubu, 5 Gy RT uygulanan grup ile karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 μ M ALC + 5 Gy RT ve 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplarda HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır ($^*p<0.05$). 75 μ M CDDP uygulanan grup ile 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP ve 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında HO-1 seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artmıştır ($^+p<0.05$).

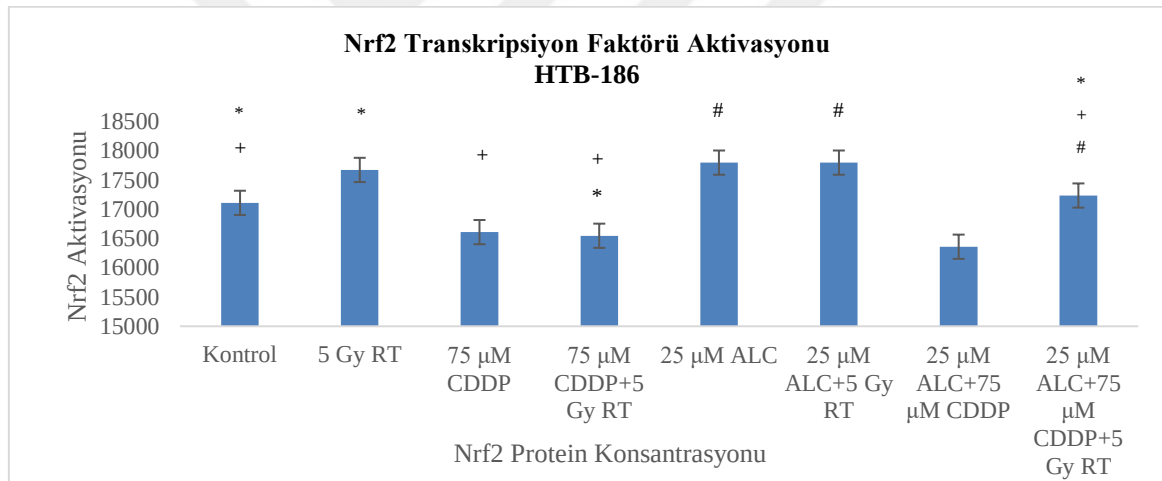
4.15 HEI-OC1 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Bulguları



Şekil 29. HEI-OC1 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT, 50 μ M CDDP, 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak azalırken, 50 μ M ALC + 5 Gy RT, 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP ve 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (* p <0.05). 5 Gy RT uygulanan grup, 50 μ M ALC + 5 Gy RT ve 50 μ M ALC + 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (+ p <0.05). 50 μ M CDDP uygulanan grup, 50 μ M ALC+50 μ M CDDP uygulanan grup ile karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonu seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (# p <0.05). 50 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup, ALC +50 μ M CDDP + 5 Gy RT grup ile karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonunda fark görülmemiştir.

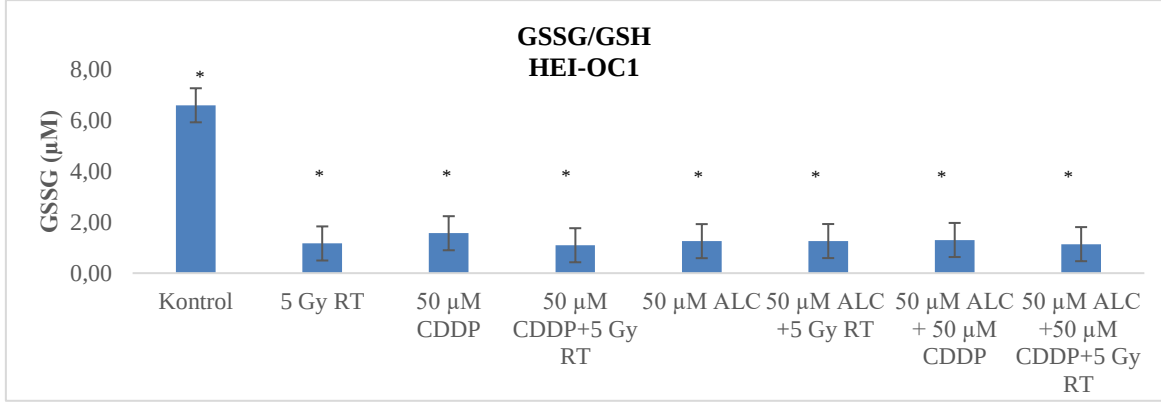
4.16 HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Bulguları



Şekil 30. HTB-186 Hücrelerinde Nrf2 Aktivasyon Grafiği.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grupta Nrf2 aktivasyon seviyesi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* p <0.05). Kontrol grubu ile 75 μ M CDDP ve 75 μ M CDDP + 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyon seviyesi istatistiksel anlamlı olarak azalırken, 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak artmıştır (+ p <0.05). 25 μ M ALC ve 25 μ M ALC + 5 Gy RT uygulanan gruplarda Nrf2 aktivasyon seviyesi değişmezken, 25 μ M ALC + 75 μ M CDDP + 5 Gy RT Nrf2 aktivasyonu istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (# p <0.05).

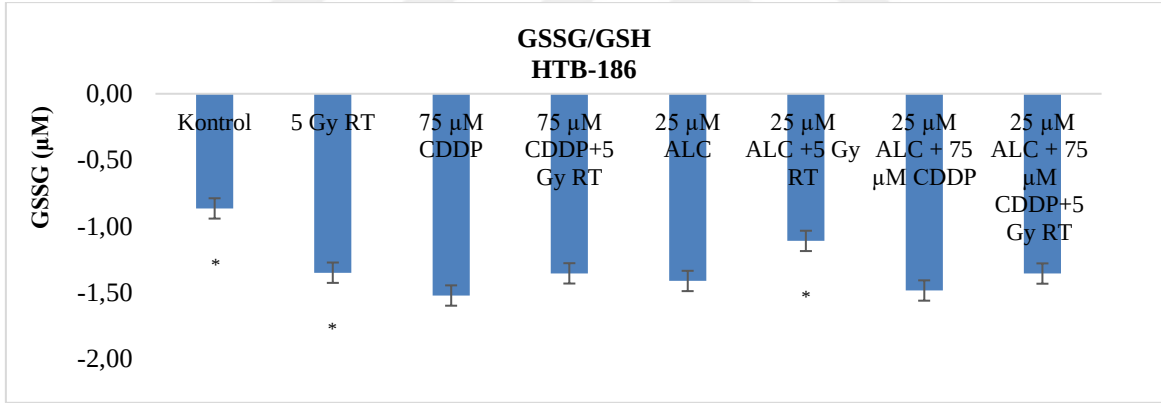
4.17 HEI-OC1 Hücrelerinde GSSG/GSH Analiz Bulguları



Şekil 31. HEI-OC1 Hücrelerinde GSSG/GSH Analizi Grafiği.

Kontrol grubu, diğer gruplarla karşılaştırıldığında gruplarda GSSG/GSH seviyesi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0.05$).

4.18 HTB-186 Hücrelerinde GSSG/GSH Analiz Bulguları

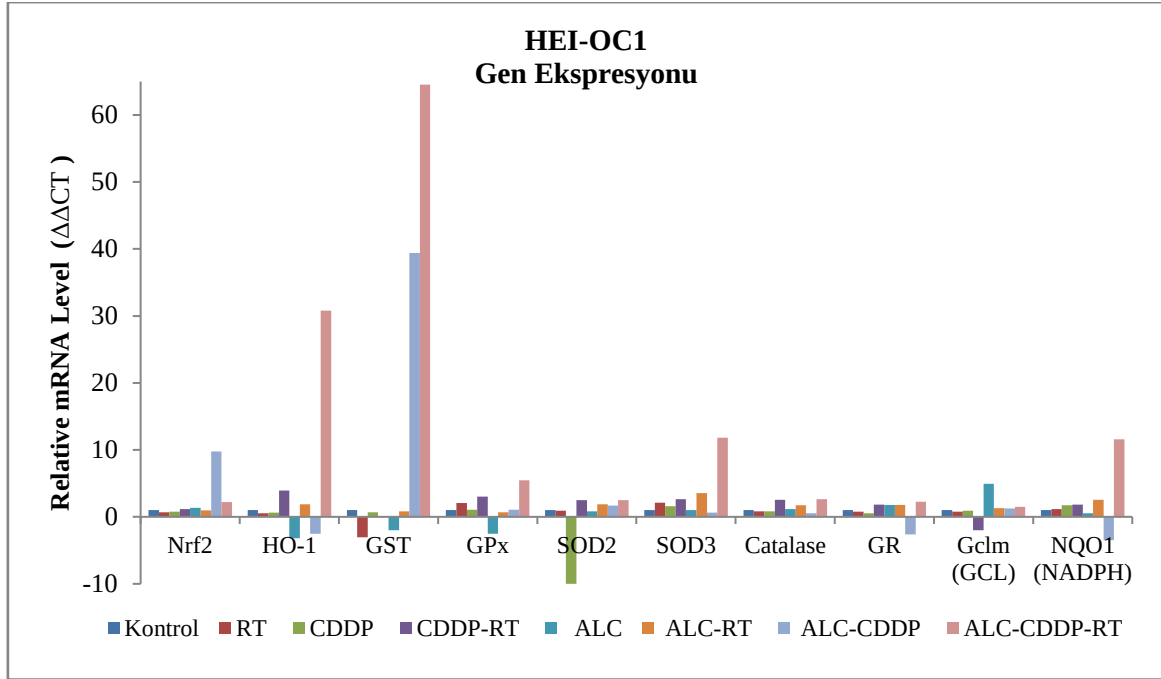


Şekil 32. HTB-186 Hücrelerinde GSSG/GSH Analizi Grafiği.

HTB-186 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda glutatyon düzeylerinde azalma göstermiştir.

Kontrol grubu ile 5 Gy RT uygulanan grup karşılaştırıldığında GSSG seviyesi istatistiksel anlamlı olarak artarken, 25 μM ALC + 5 Gy RT uygulanan grupta GSSG seviyesi istatistiksel anlamlı olarak azalmıştır (* $p < 0.05$).

4.19 HEI-OC1 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Bulguları

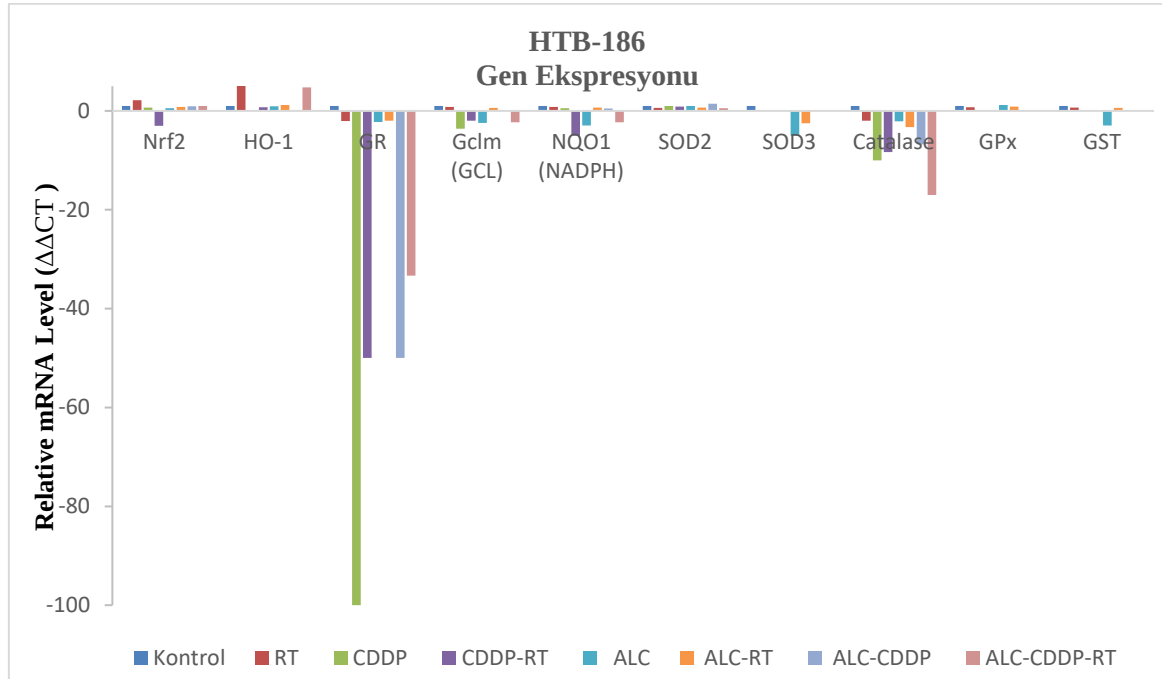


Şekil 33. HEI-OC1 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Grafiği.

Nrf2 gen ekspresyonu ALC-CDDP ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artış göstermiştir. Diğer gruplarda Nrf2 gen ekspresyonu açısından belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. HO-1 gen ekspresyonu CDDP-RT ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, ALC ve ALC-CDDP gruplarında ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. GST gen ekspresyonu, ALC-CDDP ve ALC-CDDP-RT grupları kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri artarken, RT ve ALC gen ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. GPx gen ekspresyonu, RT, CDDP-RT, ALC-CDDP-RT grupları kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri artarken, ALC gen ekspresyonu 2 kat ve üzeri azalmıştır. SOD2 gen ekspresyonu, CDDP-RT ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, CDDP grubunda ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. SOD3 gen ekspresyonu RT, CDDP-RT, ALC-RT ve ALC-CDDP-RT grupları kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri ekspresyon artmış göstermişlerdir. Katalaz gen ekspresyonu, CDDP-RT ve ALC-CDDP-RT grupları kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artmış ekspresyon göstermişlerdir. GR gen ekspresyonu ALC-CDDP-RT grubunda kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, ALC-CDDP grubunda ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. Gclm gen ekspresyonu ALC grubunda kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, CDDP-RT grubunda ekspresyon 2 kat azalmıştır. NQO1, ALC-RT

ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, ALC-CDDP grubunda ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır.

4.20. HTB-186 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Bulguları



Şekil 34. HTB-186 Hücrelerinde RT-PCR Analiz Grafiği.

Nrf2 gen ekspresyonu RT grubunda kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artarken, CDDP-RT grubunda gen ekspresyonu 2 kat ve üzeri azalmıştır. Diğer gruplarda Nrf2 gen ekspresyonu açısından belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. HO-1 gen ekspresyonu RT ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre 2 kat ve üzeri artmış, diğer gruplarda belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Katalaz ve GR genlerinin ekspresyonları RT, CDDP, CDDP-RT, ALC, ALC-RT, ALC-CDDP ve ALC-CDDP-RT grupları kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. Gclm gen ekspresyonu, CDDP, CDDP-RT, ALC, ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. GPx ve SOD2 genlerinde belirgin bir ekspresyon belirlenmemiştir. SOD3 gen ekspresyonu ALC ve ALC-RT gruplarında kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. NQO1 gen ekspresyonu, CDDP-RT, ALC ve ALC-CDDP-RT gruplarında kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır. GST gen ekspresyonu, ALC grubu kontrol grubuna göre ekspresyon 2 kat ve üzeri azalmıştır.

4.21. Verilerin Analizi

Tablo 12. HEI-OC1 ve HTB-186 Hücrelerinin p Değerleri

	HEI-OC1			HTB-186	
	ALC+CDDP	ALC+RT	ALC+CDDP+RT	CDDP+RT	ALC+CDDP+RT
Apoptoz	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
MDA	p=0,003	p=0,003	p=0,001	p=0,001	p=0,001
ROS	p=0,001	p=0,001	p=0,039	p=0,001	p=0,001
Nrf2 Aktivasyonu	p=0,001	p=0,001	p=0,034	p=0,001	p=0,001
HO-1 Aktivasyonu	p=0,003	p>0,05	p=0,051	p=0,002	p=0,001
Kaspaz 3	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
Kaspaz 8	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
Kaspaz 9	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001

Çalışmamız için anlamlı olan bulguların p değerleri Tablo 12’de verilmiştir. Kontrol grubu ile Tablo 12’de belirtilen gruplar karşılaştırılmıştır. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 12’de verilen bulgular tartışma bölümünde değerlendirilen bulgulardır.

5. TARTIŞMA

Medulloblastom, beyin hücrelerinin dejenerasyonu ile ortaya çıkan, çocukluk çağı kanserleri arasında en sık görülen merkezi sinir sistemi tümörüdür. Sisplatin, çocukluk çağı ve erişkin dönemdeki medulloblastom gibi birçok farklı kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılan alkilleyici, platin bazlı kemoterapötik ajandır. Sisplatin, radyasyon ve kemoradyasyonun klinikteki ototoksik, bilateral geri dönüşümsüz ve ileri derecede sensorinöral işitme kaybı gibi etkileri kanser hastalarının yaşam kalitesinde de ciddi düşüş yaşatmaktadır.

İç kulakta sisplatin, kohlea tüy hücrelerinin apoptozuna ve spiral ganglion nöronlarının geri döndürülemez sensorinöral işitme kaybına neden olmaktadır (171). Radyoterapinin sitotoksik etkisi hücrelerde hidroksil radikalleri ve artan ROS nedeniyle protein ve DNA'ya zarar verebilir. Radyasyondan sonra oluşan sensörinal işitme kaybı, vasküler yetmezlik, kılcal damar sayısında azalma, endotel hücrelerde bozulma, artium ve stria vaskülerinde dejenerasyon, spinal ganglion hücre artofisi ve kohlear sinirlerde hasarlanma gibi farklı etkilere neden olur (172).

Ototoksik ilaçların kombine uygulamasının ototoksisiteyi artırdığı bilinmektedir (173). CDDP, RT ve CDDP+RT'nin toksik etkileri sonucunda aşırı ROS birikimi kohleanın yapısında hasar oluşumuna ve apoptoza neden olur. Bu durum antioksidan savunma sisteminin doğru bir şekilde çalışmasını engeller ve/veya bu savunma sisteminde görevli diğer antioksidan mekanizmalarının da bozulmasına neden olur. Radyasyona bağlı serbest oksijen radikalleri ile birlikte platin metabolitlerinin oluşumu tüy hücrelerinde artan DNA hasarı ile daha fazla hasara neden olabilir. Ayrıca, CDDP+RT kombinasyonunun ototoksitesinin neden olduğu ana mekanizma, apoptozun olası bir artışına neden olduğu düşünülmektedir (174). HEI-OC1 hücrelerine CDDP uygulandığında kontrole kıyasla Nrf2 ekspresyonu azalırken, ALC'nin eklenmesiyle Nrf2 ekspresyonu oldukça artmıştır. Ayrıca RT, CDDP+RT uygulanan gruplarda da Nrf2 aktivasyonu azalırken bu gruplara ALC eklendiğinde (ALC+RT, ALC+CDDP+RT) Nrf2 aktivasyonu artmıştır. Nrf2, normal hücrelerde ALC indüksiyonuyla antioksidan ve detoksifiye edici genlerin ekspresyonunu tetikleyebileceği ayrıca kemoterapi, radyoterapi ve kemoradyoterapi uygulanan hastalarda ileride ototoksisiteye neden olabileceği düşünüldüğünden uygulanan tedaviler ile kombine

ALC verildiğinde, etkilerinin *in vivo* olarak sağlıklı hayvanlarda özenle değerlendirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda HEI-OC1 kulak hücrelerinde CDDP ve RT'de oluşan Nrf2 aktivasyon etkisi ile oksidatif strese bağlı oluşan hücre ölümü ALC'nin etkisiyle baskılanmıştır. Mansour, Haseeb ve ark. yaptığı çalışmalarda farklı dokularda RT'nin oluşturduğu doku hasarına karşı ALC'nin koruyucu etkisinin olduğu çalışmamızla benzer bir şekilde ortaya konmuştur. (198,199). Wu ve ark. yaptıkları çalışmada PC12 sağlıklı böbrek üstü bezi hücre hattına uygulanan ajanların oksidatif stres kaynaklı nöronal hücre ölümüne karşı koruduğu bildirilmiştir (175).

Çalışmamızda ALC, kohlea hücrelerinde Nrf2 aktivasyonu ile CDDP kaynaklı ROS üretimini baskılamıştır. HEI-OC1 hücrelerine tek başına CDDP uygulandığında ROS artarken, ALC ile kombine (ALC+CDDP) uygulandığında ROS'da bir miktar azalma olduğu belirlenmiştir. HEI-OC1 hücrelerine CDDP+RT terapötik rejimine ALC eklendiğinde (ALC+CDDP+RT) ROS baskılanmıştır. Kim ve ark, Deshpande ve ark, Williams ve ark. yaptıkları çalışmalarda HEI-OC1 kulak hücrelerine uygulanan ajanların oluşturduğu ototoksisite farklı antioksidan özellikteki maddeler uygulayarak ROS'un baskılandığını bildirmişlerdir (176,177,178). Bizim çalışmamız da literatürle uyumlu olarak ROS, ALC'nin etkisiyle baskılandığından ototoksisiteyi de baskıladığı düşünülmektedir.

Medulloblastomun CDDP ve/veya RT tedavisinde ALC uygulamasıyla ototoksik etkiyi azaltması ya da korumasını *in vivo* ve *in vitro* inceleyen bir çalışma henüz literatüre eklenmemiştir. Bu çalışmanın güçlü yönlerinden biri; RT ve CDDP'nin medulloblastom ve işitsel hücrelerde oluşturduğu hasara karşı ALC'nin etkisinin araştırıldığı öncü bir çalışma olmasıdır.

Monika ve ark, Low ve ark, Bhandare ve ark, Schultzve ark, Malgonde ve ark. kemoradyoterapi uygulanan kanser hastalarında oluşan sensörinal işitme kaybı sadece radyoterapi uygulanan hastalara göre daha fazla olduğu ve kemoradyoterapi ile oluşan kulak hasarı daha karmaşık hal alsa da uygun şekilde tedaviler uygulandığında hasarın

düzelebileceğini bildirmişlerdir. Bizim çalışmamız da literatürdeki çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (172,179,180,181,182).

Oksidatif stres hasarında ROS artışı; protein, DNA, lipid peroksidasyonu, plazma membranındaki hücresel aktivitelerde yapısal değişiklere neden olmaktadır (184,185,186,187).

Hücre hasarı meydana geldiğinde MDA seviyesi artmaktadır. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz yayınlımızda uygulanan tedavi ile MDA'nın arttığı ve tedaviyle kombine uygulanan ALC'nin MDA'yı baskıladığını gösterdik (183). Çalışmamız literatürle uyumlu olarak HEI-OC1 hücrelerine RT, CDDP ve CDDP+RT gibi stres oluşturacak koşullar uygulandığında MDA seviyesi kontrol grubuna göre artmıştır. RT, CDDP ve CDDP+RT gruplarına ALC'nin eklenmesiyle (RT+ALC, CDDP+ALC ve CDDP+RT+ALC) her bir gruptaki MDA seviyesi baskılanmıştır. ALC ayrıca RT+CDDP kombinasyonunun neden olduğu lipid peroksidasyon seviyelerini inhibe etmiş, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir seviyeye getirmemiştir ($p>0.05$). Çalışmamızda ALC, işitsel hücrelerde CDDP+RT'ye aracılık eden ROS üretimine ve mitokondriyal membran potansiyeli değişikliklerini belirgin bir şekilde baskıladığı belirlenmiştir.

Kanser hücrelerinde ise normal hücrelere göre MDA seviyesi daha fazladır (64). Bangaru ve ark. yaptığı çalışmada curcuminin medulloblastom hücrelerinde membran yapısındaki bozulmayı baskıladığı bildirilmiştir (193). Çalışmamız literatürle uyumlu olarak HTB-186 hücrelerine RT, CDDP ve CDDP+RT uygulandığında stres oluşturan bu koşullar MDA seviyesini kontrol grubuna göre arttırmıştır. CDDP+RT uygulanan gruba ALC'nin eklenmesiyle (ALC+CDDP+RT) MDA seviyesindeki artışı baskılayarak antioksidan savunma mekanizmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

Kanser hücrelerinin normal hücrelere göre daha fazla ROS ürettiği gerçeğinden yola çıkarak, ROS'un baskılanmasına dayanan kanser tedavileri için farklı çalışmalar yapılmıştır (188,189,190). Gupta ve ark. yaptığı çalışmada kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelerde de karşılaştığımız mitokondriyal membran bozukluğu, metabolizmada bozukluklar ve genetik mutasyonlar oluştuğunda ROS üretiminin arttığını bildirilmiştir

(195). Çalışmamız literatürle uyumlu olarak sağlıklı hücelere ve kanser hücelerine tedavi uygulandığında mitokondri membran potansiyeli azalırken, bu gruplara ALC eklendiğinde mitokondri membran potansiyeli artmıştır. Newmeyer ve ark, Fang ve ark. yaptıkları çalışmalarda kanser hücelerinde ROS seviyesinin mitokondriyal kaynağa bağlı olduğunu bildirmişlerdir (191,192). Hayes ve ark. yaptığı çalışmada kanser hücelerinde ROS'un metabolik stres ile tetiklendiği ve artan ROS seviyesinin hücre yapısının bozulmasına, DNA hasarına, hücre yaşlanmasına ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir (93). HTB-186 hücelerinde RT ve CDDP+RT'de gerçekleşen hücre ölümü Nrf2 aktivasyonu ile ilişkilendirilerek oksidatif stresin ALC'nin etkisiyle azaldığı düşünülmektedir. HTB-186 hücelerinde kontrole kıyasla CDDP, CDDP+RT, CDDP+ALC uygulanan gruplarda CDDP'nin etkisiyle Nrf2 baskılandığı, bu nedenle oksidatif stresin de indüklenmiş olabileceği düşünülmektedir. CDDP+RT ile CDDP+ALC uygulanan gruplarda Nrf2 ve HO-1 aktivasyon sonuçları benzer seviyededir. HTB-186 hücelerinin RT ve CDDP+RT uygulanan grupların oksidatif strese maruz kalmasıyla mitokondriyal membran potansiyeli bozulmuştur, ALC'nin eklenmesiyle (ALC+CDDP+RT) membran potansiyelindeki bozulma baskılanmıştır. Bu nedenle HTB-186 hücelerinde antioksidan savunma sistemi aracılı hücre ölümünün engellenerek ROS aracılı oluşan toksisitenin baskılandığı düşünülmektedir.

Haorah ve ark. *in vitro* koşullarda yapmış olduğu insan beyin endotel hüceleri çalışmasında, hücelerin etanolle muamele sonucunda ROS oluşumu ve antioksidan enzimlerinde artış gözlemlemişlerdir. Mitokondri koruyucu ajan olan ALC uygulaması ile SOD ve mitokondriyal membran potansiyeli stabilizasyonu sağlanmış, NO ve ROS seviyesindeki artışın baskılandığı belirlenmiştir (194).

Düzenli ve ark, Altun ve ark. yaptığı çalışmada uygulanan tedavi ile apoptozun arttığı ve tedaviyle kombine uygulanan ALC'nin apoptozu baskıladığı bildirilmiştir (183,197). Çalışmamız literatürle uyumlu olarak HEI-OC1 kulak hüceleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RT, CDDP ve CDDP+RT uygulanan hücelerde apoptoz artarken, bu gruplara ALC eklendiğinde (ALC+RT, ALC+CDDP ve ALC+CDDP+RT) apoptoz baskılanarak tüm hücelerini toksisiteden koruduğu düşünülmektedir.

Kim ve ark. yapmış olduğu *in vitro* çalışmada CDDP'nin neden olduğu ROS kaynaklı sitotoksitenin kaspaz-3 aracılı apoptozu D- α - tokoferol süksinat kullanılarak baskılandığını bildirilmiştir (209). Güneş ve ark. *in vivo* yapmış olduğu çalışmada; Wistar albino ratlara uygulanan CDDP'nin spiral ganglion hücre ve beyin dokusunda oluşan kaspaz 3, 8 ve 9 aracılı apoptozun ALC+CDDP'nin kombine uygulanması ile ototoksik tüy hücre ölümünü önleyebileceği ve beyin dokusunda koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir (210). Low ve ark. yapmış olduğu *in vitro* çalışmada kohlea hücre kültürüne uygulanan 5 Gy ve üstündeki RT dozlarında apoptoz mekanizmasının sitokrom c ve kaspaz yollarıyla indüklendiği bildirilmiştir (197,211).

Çalışmamızda HEI-OC1 kulak hücrelerinde RT uygulanan grupta intrinsek apoptotik enzim kaspaz 9 kontrole göre artarken, ALC+RT uygulandığında kaspaz-9 aktivitesi baskılanmıştır. CDDP uygulanan grupta kaspaz 8 ve 9 kontrole göre azalırken, ALC+CDDP grubunda kaspaz 8 indüklenmiş ve kaspaz-9 aktivitesi oldukça baskılanmıştır. Kulak hücrelerine RT uygulandığında kontrole kıyasla kaspaz 8 ve 9 aktivitesi indüklenirken, ALC+CDDP+RT uygulandığında kaspaz-8 kontrol seviyesine gerilemiş ve kaspaz-9 baskılanmıştır. Bizim çalışmamız da literatürdeki bulgularla uyumluluk göstermektedir.

Hacker ve ark. *in vitro* ve *in vivo* koşullarda yapmış olduğu medulloblastom çalışmasındaki bulgular, valproik asit ve IFN- γ kombine tedavisinin kaspaz-8 aktivasyonunu baskılayarak apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (205). Chen ve ark. medulloblastom hücrelerinden *in vitro* yaptıkları çalışmada CDDP'nin kaspaz 3 ve 7'nin aktivasyonu ile apoptozu neden olduğu ve soya kaynaklı kemoprotektif özellikteki östrojen benzeri ajanların uygulanmasıyla da CDDP'nin sitotoksik etkilerine karşı duyarlılığını azalttığı bildirilmiştir (206). Johnson ve ark. *in vivo* koşullarda medulloblastomlu fare modellerindeki doku özütlerinde sitokrom c aracılı kaspaz-9 aktivasyonu olduğunu bildirmişlerdir (207). Kumar ve ark. medulloblastom hücrelerinden *in vitro* yaptıkları çalışmada perifosinin, yaygın olarak uygulanan kemoterapi ilaçlarından etoposid ve CDDP veya RT ile kombine etkisine bakıldığında; kaspaz 3, 7 ve 9 aktivasyonu mevcutken, kaspaz-8 aktivasyonunun görülmediği bildirilmiştir. (208).

HTB-186 hücrelerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RT, CDDP ve CDDP+RT uygulanan hücrelerde apoptoz artarken, bu gruplara ALC eklendiğinde (ALC+RT,ALC+CDDP ve ALC+CDDP+RT) apoptotik hücre ölümü azalmıştır. Medulloblastom hücrelerinde mitokondriyal bağımlı apoptozda CDDP ve CDDP+RT uygulandığında kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri artarken, bu gruplara ALC'nin eklenmesiyle kaspaz 3 ve 9 aktiviteleri baskılanarak apoptozu inhibe ettiği düşünülmektedir. Çalışmamızda medulloblastom tedavisinde uygulanan CDDP ve RT'nin oluşturduğu apoptoz ve kaspaz yolaklı etki mekanizması literatürle uyumluluk göstermektedir.

Kulak hücrelerinde Nrf2 gen ekspresyonunun antioksidan savunma sistemini tetiklediği düşünülmektedir (175,176,177). Buna bağlı olarak CDDP+RT'ye ALC eklenmesi (ALC+CDDP+RT) antioksidan savunma sistemindeki Nrf2, GR, HO-1, NQO1, SOD2, SOD3, GPx, GST, Glcm ve katalaz genlerinde ekspresyon seviyesi artmıştır. Kontrol grubuna göre CDDP karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyon seviyesi azalırken, ALC'nin eklenmesiyle (ALC+CDDP) gen ekspresyon sonucuyla da uyumluluk göstererek artmıştır. Ayrıca Nrf2 ile ilişkili olarak GR, NQO1, GST genlerinin ekspresyon seviyeleri artmıştır. HEI-OC1 hücrelerinde kontrol grubuna göre ALC+CDDP karşılaştırıldığında gen ekspresyon sonucuyla da uyumluluk göstererek HO-1 aktivitesi azalmıştır. Ayrıca HO-1 ile ilişkili olarak GR, NQO1, GST genlerinin ekspresyon ifadeleri azalmıştır. Kulak hücrelerinde kontrol grubuna göre CDDP+RT karşılaştırıldığında gen ekspresyon sonucuyla da uyumluluk göstererek HO-1 aktivitesi artmıştır. HO-1 ile ilişkili olarak SOD2, SOD3, GPx ve katalaz genlerinin ekspresyon seviyeleri de artmıştır. Wu JZ ve ark. yaptıkları çalışmada PC12 sağlıklı böbrek üstü bezi hücre hattına uygulanan ajanların Nrf2 aracılı faz II detoksifikasyon genlerinden olan NQO1, GCLC, HO-1 genlerinin ekspresyonlarının arttığı bildirilmiştir (175). GSH, Glcm'yi katalize eder. Hayes ve ark. glutatyon metabolizmasında yer alan enzimleri, Nrf2 aracılı detoksifikasyonda yer alan enzimleri ve Nrf2'nin düzenlenmesinde rol alan enzimlerin oksidatif stres sırasında birlikte indüklendiğini bildirmiştir (93). Radyasyon, kemoterapi ve kemoradyoterapinin sağlıklı hücrelerde oluşturduğu hasar sonucunda oluşan antioksidan savunma, çalışmamızda elde edilmiş bulgular ışığında literatürle uyumludur.

HTB-186 hücrelerinde kontrol grubu ile CDDP ve CDDP+RT uygulanan grup karşılaştırıldığında Nrf2 aktivasyonu azalırken, ALC'nin eklenmesiyle (ALC+CDDP+RT) Nrf2 aktivasyon seviyesi artmıştır. Medulloblastom hücrelerinde kontrol grubu ile RT uygulanan grup karşılaştırıldığında gen ekspresyon sonuçlarıyla uyumluluk göstererek Nrf2 ve HO-1 aktiviteleri artmıştır. Medulloblastom hücrelerinde kontrol grubu ile CDDP+RT uygulanan grup karşılaştırıldığında Nrf2 aktivitesi ve gen ekspresyon ifadesi azalmıştır. Ayrıca Nrf2 ile ilişkili olarak GR, NQO1, Glcm ve katalaz genlerinin ekspresyonlarının ifadesi azalmıştır. Medulloblastom hücrelerinde kontrol grubu ile ALC+CDDP+RT uygulanan grup karşılaştırıldığında HO-1 gen ekspresyonu artarken, GR, Glcm, NQO1, katalaz genlerinin ekspresyon ifadeleri azalmıştır. Orgel ve ark. yapmış olduğu çalışmada medulloblastom hastalarına platin bazlı kemoterapi uygulandığında işitme kaybına sebebiyet verdiği bildirilmiştir (201). Rednam ve ark. yapmış olduğu çalışmada GST, GPx, GR, katalaz ve süperoksit dismutazların gelecekteki terapötik stratejileri etkileyebileceği bildirilmiştir (200). Haorah ve ark. yapmış olduğu çalışmada insan beyin endotel hücrelerine *in vitro* koşullarda etanol uygulanmasıyla mitokondri membran potansiyeli hasarı ve buna bağlı olarak ROS indüklenir ve daha sonra ALC uygulamasıyla da SOD ve katalazın inhibisyonu ROS'un baskılanmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu durum ALC'nin kan beyin bariyerinde etanole bağlı oksidatif stres sırasında oksidanların ve antioksidanların önleyici mekanizmalarını göstermektedir (202).

Glutasyon (GSH), hücrelerde serbest radikal temizleyici ve detoksifikasyonda görevli bir antioksidandır. Zhu ve ark. HEI-OC1 hücrelerinde yapmış olduğu çalışmada oksijen-glukoz yoksunluğu (OGD) MDA'yı artırırken, GSH'yi azaltmıştır. MIF (makrofaj göçü inhibe edici faktör), OGD'ye bağlı HEI-OC1 hücrelerinde MDA seviyesini azaltmış ve GSH'yi arttırmıştır. OGD+MIF kombine uygulandığında MIF'in koklea hücreler üzerinde antioksidan etkisi olduğu bildirilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da HEI-OC1 hücresinde GSSG aktivasyonu, kontrol grubuna kıyasla baskılanmıştır.

Bansal ve ark. GSH'nin, hücre çoğalmasında, hücre bölünmesinde ve farklılaşmasında yararlı ve oksidatif stres sırasında tespit edilen en yaygın metabolit olduğunu, çekirdek içindeki yüksek GSH/GSSG oranının uygun nükleik asit biyosentezi ve DNA onarımı sağladığını bildirmişlerdir (203). Chirou ve ark. yaptığı *in vivo* çalışmada

NOD-SCID farelere uygulanan CDDP medulloblastom tedavinin olumsuz etkilerini en aza indirmek için glutamin kısıtlama diyeti ile metabolik zayıflıklarının aydınlatılması için yeni bir terapötik strateji planlamışlardır. Bunun sonucunda hücre proliferasyonunda ve kaspaz-3 aracılı apoptozda anlamlı bir azalma ile birlikte, farelerin hayatta kalma oranlarında önemli bir artışa neden olduğunu belirlenmiştir (112). Brown ve ark. 71 medulloblastom hastasından alınan kan örneklerinden CDDP maruziyetinin neden olduğu glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S-transferaz, tioredoksinler ve diğer mitokondriyal antioksidan faktörlerin inhibisyonunun aşağı regülasyonları süperoksit anyonunun parçalanması için gerekli enzim dengesini bozduğunu bildirilmişlerdir (204).

HTB-186 hücrelerinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda GSSG düzeylerinde aşağı yönde azalma göstermiştir. Çalışmamızda kanser hücrelerinde GSSG aktivasyonu aşağı yönde regüle olmasını şu şekilde açıklayabiliriz; GSSG'yi GSH'a indirgeyen GR geninin de aynı şekilde aşağı yönde regüle olması gereklidir. Bizim çalışmamızda aynı şekilde bu sonucu göstermektedir. Kanser hücresinde GPx geninin eksprese olmamasına neden olarak da ortamda bulunan GR'nin olduğunu düşünmekteyiz. Kanser hücresindeki gen bulguları ile GSSG aktivasyon bulguları uyumluluk göstermektedir.

Antioksidanların optimal koşullar altında (genellikle büyümeyi teşvik eden daha düşük dozlarda) birçok yararlı etkisi göz önüne alındığında, kemoterapötik ilaç kaynaklı oluşan hasarların antioksidanlar tarafından önlenmesi son yıllarda aktif olarak çalışılmaya başlanmıştır (113,158). Çalışmamızda hem antioksidanların hem de serbest radikal temizleyicilerinin, kohleada lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivite düzeylerinde azalmaya neden olan sisplatin ve radyasyon kaynaklı yan etkilerin baskılanabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle çalışmamız farklı literatür araştırmalarıyla uyumluluk sağlamaktadır (183,196,197).

Çalışmamızda iç kulak hücrelerinde özellikle ALC+CDDP+RT uygulanan grupta Nrf2, antioksidan ve faz II detoksifiye edici genlerin ekspresyon seviyelerinin indüklendiği görülmüştür. Medulloblastom hücrelerine ALC+CDDP+RT kombine uygulandığında Nrf2 oksidatif stres ilişkili genleri indüklerken, antioksidan ve faz II detoksifiye edici genlerin ekspresyon seviyelerini azalttığı saptanmıştır.

6. SONUC VE ÖNERİLER

- ✓ Çalışmamızda kulak ve medulloblastom hücrelerinde CDDP+RT kaynaklı oluşan sitotoksitenin ALC'nin etkisiyle inhibe olduğu düşünülmektedir. ALC uygulanan kulak hücrelerinde kemoradyoterapinin neden olduğu ototoksiste baskılanırken, medulloblastom hücrelerinde antitümoral etkiyi destekleyici aday bir ajan olarak değerlendirilebilir.
- ✓ Çalışmamız dahilinde iç kulak hücrelerinde ALC'nin kemoterapi ve radyoterapinin oluşturduğu ototoksiste karşı koruyucu etkisi olduğu ve bu korumayı da Nrf2 ve antioksidan gen ekspresyonları aracılığıyla gerçekleştirdiğini önerilmektedir.
- ✓ İç kulak hücrelerinde ALC'nin Nrf2 aracılı antioksidan etkisinin *in vivo* deney hayvanı ototoksiste modelinde test edilerek *in vivo* durumun ortaya konması ve diğer normal dokulardaki etkilerinin değerlendirilmesi gerekmektedir.
- ✓ Çalışmamızın bulguları kendi içinde ve literatürle birlikte değerlendirildiğinde Nrf2 aktivasyonu ve Nrf2 ile ilişkili genlerdeki ekspresyon değişimleri genel olarak uyumludur. Nrf2 ve HO-1 aktivasyon düzeylerinin Western Blot yöntemiyle protein düzeyinde ele alınması mevcut gen ekspresyon sonuçlarının desteklenmesi açısından ilerleyen çalışmalarda dikkate alınmalıdır.
- ✓ Normal hücrelerde, Nrf2 aktivasyonu redoks homeostazını tutar ve kanser gelişimini önler. Kanser hücrelerinde redoks dengesizliği sonucunda oluşabilecek moleküler mutasyonlar ve patolojik sonuçlar da düşünülerek hedeflenen tedaviler için ilaçların geliştirilmesi aşaması titizlikle araştırılmalı ve hayata geçirilmelidir.
- ✓ Sonuç olarak *in vitro* uygulanan ALC terapisinin, HTB-186 hücrelerinde kemoradyoterapi etkisini güçlendirdiği, HEI-OC1 hücrelerinde kemoteradyoterapi nedeniyle hücre hasarını azalttığı görülmüştür.

7. **KAYNAKLAR**

1. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 11-13.
2. Or D, Güney YY, Dizdan A, Dizman A, İnan GA ve ark. Medulloblastoma ve Güncel Tedavi Yaklaşımları. Acta Oncologica Turcica. 2013; 32-38.
3. Chen WC, Jackson A, Budnick AS, Pfister DG, Kraus DH, Hunt MA, Stambuk H, Levegrun S, Wolden SL. Sensorineural hearing loss in combined modality treatment of nasopharyngeal carcinoma. Cancer. 2006;106: 820-829.
4. Wackym PA, Storper IS, Newman AN. Cochlear and vestibular ototoxicity. In: Canalis RP, Lampert PR, editors. The Ear Comprehensive otology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2000: p571-85.
5. Dennis A. Manual of Clinical Oncology. In: Dennis A, Casciato. 5th ed. Philadelphia:Lippincott Williams&Wilkins; 2004: p:61-62.
6. Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trial using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. Oncol Rep. 2004; 11(3): 559-95.
7. Azzam EL, Jay-Gerin JP, Pain D. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 2012 Dec 31; 327(1-2): 48-60.
8. Kizhakekuttu T, Widlansky M. Natural antioxidants and hypertension: promise and challenges. Cardiovascular Therapeutics.2010; 20–32.
9. Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. Physiol Rev. 1983; 63: 1420-1480.
10. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 3-4.
11. Kijima N, Kanemura. Molecular Classification of Medulloblastoma. Y. Neurol Med Chir (Tokyo). 2016; 56(11): 687-697.
12. Johnston D, Keene D, Strother D, Taneva M. Survival Following Tumor Recurrence in Children With Medulloblastoma. Journal of Pediatric Hematology/Oncology. 40(3): e159–e163, APR 2018.
13. Genetic drivers of metastatic dissemination in sonic hedgehog medulloblastoma. Jenkins NC, Kalra RR, Dubuc A, Sivakumar W, Pedone CA, Wu X, Taylor MD, Fults DW. Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 25; 2:85.

14. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 12.
15. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 13.
16. Quantitative MRI in post-operative paediatric cerebellar mutism syndrome. Toescu SM, Hales PW, Aquilina K, Clark CA. Eur J Radiol. 2018 Nov; 108:43-51.
17. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 13-14.
18. Retrospective estimation of heart and lung doses in pediatric patients treated with spinal irradiation. Gasic D, Rosenschöld PMA, Vogelius IR, Maraldo MV, Aznar MC, Nysom K, Björk-Eriksson T, Bentzen SM, Brodin NP. Radiother Oncol. 2018 Aug; 128(2): 209-213.
19. Genetic drivers of metastatic dissemination in sonic hedgehog medulloblastoma. Jenkins NC, Kalra RR, Dubuc A, Sivakumar W, Pedone CA, Wu X, Taylor MD, Fults DW. Acta Neuropathol Commun. 2014 Jul 25;2:85.
20. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 17-19.
21. Viral tumor antigen expression is no longer required in radiation resistant subpopulation of JCV induced mouse medulloblastoma cells. Donadoni M, Sariyer R, Wollebo H, Bellizzi A, Sariyer IK. Genes Cancer. 2018 Mar; 9(3-4): 130-141.
22. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 25.
23. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 23-26.
24. Molecular genetic analysis of the hepatocyte growth factor/MET signaling pathway in pediatric medulloblastoma. Onvani S, Terakawa Y, Smith C, Northcott P, Taylor M, Rutka J. Genes Chromosomes Cancer. 2012 Jul; 51(7):675-88.
25. American brain tumor association. Medulloblastoma. 2015; 28-29.
26. Yılmaz S. Rat Modelinde Topikal Rifamisin Uygulamasının Ototoksik ve Orta Kulak Mukozası Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Adana. 2016.
27. Gulya A. Development of anatomy of the temporal bone and Skull Base. Shambaugh GE Jr, Glasscock ME III, editors. Surgery of the ear. ed 5. Philadelphia: WB Saunders, 2003; 3-35.

28. Aslan A, Belgin E. Kulak anatomisi ve isitme fizyolojisi. Koç C, editör. Kulak Burun Bogaz Hastalıkları ve Bas-Boyun Cerrahisinde. Ankara, Günes Tıp Kitapevi; 2004; 45–71
29. Akyıldız AN. Kulak Hastalıkları ve Mikrocerrahisi. Cilt 1. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, 1998; 29-47-48-89-90.
30. Donaldson JA, Duckert LG. Anatomy of the ears. In: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL (Eds.). Otolaryngology Vol.1, 3th ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 199; 23-58.
31. Karasalihoğlu AR. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş-Boyun Cerrahisi. 3. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 2003; 3-14.
32. Austin DF. Kulak anatomisi. In Ballenger JJ, Snow JB, editors. Hafız G. çev. ed. Otolaringoloji Bas ve Boyun Cerrahisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2000; 838-57.
33. Wright A. Anatomy and ultrastructure of the human ear. In: Keer AG, Gleeson M (Eds.). Scott-Brown's Otolaryngology. Vol.1, 6th ed. London: Butterworth-Heinemann Publish, 1997; 1,1-50.
34. Bünyamin T. Amikasinin Ototoksik Etkisinin ve E Vitamininin Ototoksitedeki Olası Protektif Etkisinin, Sıçan Kokleasında Otoakustik Emisyon İle Araştırılması, Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2008.
35. Eroğlu S. İletim Tipi İşitme Kayıplarının Kohlea Üzerindeki Etkisi, Uzmanlık Tezi, İstanbul. 2018.
36. Janfaza P. Baş ve Boyunun Cerrahi Anatomisi. Çeviri editörleri: Cansız H, Yüksel S. Nobel tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002.
37. Bakır S., Otoloji Kulak Anatomisi ve Fizyolojisi KBB Notları.
38. Chirtes F, Albu S. Prevention and Restoration of Hearing Loss Associated with Use of Cisplatin. Hindawi Publishing Corporation Biomed Research International. 2014; Article ID 925485-pg 9.
39. Spitz D, Azzam E, Li J, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. Cancer and Metastasis Reviews. 2004; 23: 311-322.

40. Coy SL, Cheema AK, Tyburski JB, Laiakis EC, Collins SP, Fornace A Jr. Radiation metabolomics and its potential in biodosimetry. *Int J Radiat Biol.* 2011; 87(8):802-23.
41. Riggs LC, Matz GJ, Rybak RP. Ototoxicity. In: Bailey BJ, Calhoun KH, eds. *Head and Neck Surgery-Otolaryngology* 2nd ed. Philadelphia:Lippincott-Raven; 1998: 2165-70.
42. Seligmann H, Podoshin L, Ben-David J, Fradis M, Goldsher M. Drug-induced tinnitus and other hearing disorders. *Drug Safety* 1996;14(3):198-212.
43. Wright A, Forge A, Kotecha B. Ototoxicity. In: Kerr AG, Gleeson M, editors. *Scott-Brown's Otolaryngology*, Vol:3 6th ed. London: Butterworth-Heinemann, Reed Educational and Professional Publishing; 1997. p1-36.
44. Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. 10. Basım. Ankara: Hacettepe Taş; 2002. syf 404–405.
45. Michael C, Perry S. Principles Of Cancer Therapy. In: Goldman. *Cecil Medicine—An Imprint of Elsevier*. 23rd ed. Philadelphia:Saunders; 2007: Chapter 192.
46. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
47. O'dwyer PJ, Stevenson JP, Jhonson SW. Clinical pharmaco kinetics and administration of established platinum drugs. *Grugs.* 2000;29(4):19-27.
48. Ruggiero A, Trombatore G, Triarico S, Arena R ve ark. Platinum compounds in children with cancer: toxicity and clinical management. *Anticancer Drugs.* 2013;24(10):1007-19.
49. Teranishi MA, Nakashima T. Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin induced ototoxicity in guinea pigs. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2003;67(2):133-9.
50. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;137(5):747-52.

51. Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4(6):889-901.
52. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA. An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: Molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology.* 2016;371:58-66.
53. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-20.
54. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14298-302.
55. Townsend DM, Tew KD, He L, King JB, Hanigan MH. Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother.* 2009;63(2):79-85.
56. Devita V, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer Principles & Practice of Oncology.* In: J.B. Lippincott Company. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins;1993: p:390-397
57. Krickwood J, Latze M, Yasko J: *Current Cancer Therapeutics*, 2nd ed. Current Medicine; 1996: p:16-17.
58. Dipiro J, Tolbert R, Yee G, Matzke G, Wells B, Posey L. *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach.* McGraw-Hill Medical Publishing Division, Newyork. 6th ed. 2005: Capter 124, p:2308-2309.
59. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 2014;740:364-78.
60. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573-84.
61. Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G. Mikotoksinler: toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 2008;28(1): 63-92.

62. Florea AM, Busselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):1351-71.
63. Brozovic A, Ambriovic-Ristov A, Osmak M. The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40(4):347-59.
64. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8): 118–126.
65. Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep*. 2003;10(6):1663-82.
66. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther*. 2003;1:47-61.
67. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-79.
68. Ramesh G, Kimball SR, Jefferson LS, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically stimulate TNF- α production by renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007;292(2): F812-9.
69. Laurell G, Jungnelius U. High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations. *Laryngoscope*. 1990;100(7): 724-34.
70. Rybak LP, Mukherjea D, Jajoo S, Ramkumar V. Cisplatin ototoxicity and protection: clinical and experimental studies. *Tohoku J Exp Med*. 2009;219(3):177-86.
71. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin induced ototoxicity and prevention. *Hear Res*. 2007 Apr;226(1-2):157-67.
72. Fetoni AR, Quaranta N, Marchese R, Cadoni G, Paludetti G, Sergi B. The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. *Int J Audiol*. 2004 Sep;43(8):465-70.

73. van den Berg JH, Beijnen JH, Balm AJ, Schellens JH. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. *Cancer Treat Rev.* 2006 Aug;32(5):390-7.
74. Eric L. Slaterry, Mark E. Cisplatin ototoxicity blocks sensory regeneration in the avian inner ear. *J Neurosci.* 2010; 30(9): 3473–3481.
75. Majumder P, Duchon P, Jonathan E. Gale. Cellular glutathione content in the organ of corti and its role during ototoxicity. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:143.
76. Ann C. Y. Wong and Allen F. Ryan. Mechanisms of sensorineural cell damage, death and survival in the cochlea. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7: 58.
77. Fetoni AR, Sergi B, Ferraresi A, Paludetti G, Troiani D. Protective effects of allopurinol and tiopronin against cisplatin-induced ototoxicity. *Acta Otolaryngol.* 2004 May;124(4):421-6.
78. Feghali JG, Liu W, Van De Water TR. L-n-acetyl-cysteine protection against cisplatin-induced auditory neuronal and hair cell toxicity. *Laryngoscope.* 2001 Jul;111(7):1147-55.
79. Li Y, Womer RB, Silber JH. Predicting cisplatin ototoxicity in children: the influence of age and the cumulative dose. *Eur J Cancer* 2004;40(16):2445-51.
80. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry.* 2004;37(4):277-85.
81. Kanter M, Tarladaçalışır YT, Uygun M. Cisplatin Nefrotoksitesinde E Vitamini'nin Koruyucu Etkileri: Işık ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007;5(3):83-90.
82. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006; 10;160(1):1-40.
83. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006; 141(2):312-22.

84. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. *Life Sciences*. 2006; 803-811.
85. Simone C, Simone N, Simone V, Simone C. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med*. 2007;13(1):22-8.
86. Prasad K, Cole, W, Kumar B, Che Prasad K. Pros and cons of antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treatment Reviews*. 2002; 28(2):79-91.
87. Cochran CG. Cellular injury by oxidants. *Am. J. Med.*, 1991; 92:235-305.
88. Matés JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2002; 153:83-104.
89. Fang Y, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18(10):872-9.
90. Percival M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 1998; 10:1-4.
91. Podda M, Grundmann- Kollmann M. Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2001; 26: 578-582.
92. Portugal M, Barak V, Ginsburg I, Kohen R. Interplay among oxidants, antioxidants and cytokines in skin disorders: Present status and future considerations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2007; 61: 412-22.
93. Hayes J, Kostova A. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014; (39)199-218.
94. Kumar S. Free Radicals and antioxidants: human and food system. *Advances in applied science research*. 2011; 2(1): 129-135.
95. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49(3):481-93.
96. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy Y, De B. Free Radicals, Antioxidants, Diseases And Phytomedicines: Current Status And Future Prospect. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research*. 2010; 3(1): 91-100.

97. Frombaum M, Le Clanche S, Bonnefont-Rousselot D, Borderie D. Antioxidant effects of resveratrol and other stilbene derivatives on oxidative stress and *NO bioavailability: Potential benefits to cardiovascular diseases. *Biochimie*. 2012; 94(2):269-76.
98. Lancaster JR Jr, Hibbs JB Jr. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(3): 1223-7.
99. Esterbauer H, Schaur R, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynoneal, malonaldehyde. *Free Rad. Biol. Med*. 1991; 11:81-128.
100. Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantifications. *Toxicol Pathol*. 2002; 30: 620-650.
101. Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Ushida K, Nikaido O, Osawa, T. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol*. 1997; 89:10405-9.
102. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B. Urinary 8-hydroxy- 2-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1989; 86:9697–9701.
103. Brown G, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life*. 2001; 52: 189–195.
104. Marnett L. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen*. 1999; 424:83-95.
105. Höhn A, Weber D. Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. *Redox Biol*. 2017; 11: 482–501.
106. Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. New York, USA: Oxford University Press; 1999. p10-121.
107. Zhu WY, Jin X, Ma YC, Liu ZB. MIF Protects Against Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Ototoxicity In HEI-OC1 Cochlear Cells By Enhancement Of

- Akt-Nrf2-HO-1 Pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 5; 503(2): 665-670.
108. Zelko I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZnSOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33: 337-49.
 109. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*. 2005; 26: 340-52.
 110. Ortega AL, Mena S, Estrela JM. Review Glutathione in Cancer Cell Death. *Cancers* 2011, 3, 1285-1310.
 111. Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B. ve ark. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2013; 2013: 972913.
 112. Niklison-Chirou MV, Ernngren I, Engskog M, Haglöf J ve ark. TAp73 Is A Marker Of Glutamine Addiction In Medulloblastoma. *Genes Dev*. 2017 Sep 1; 31(17): 1738–1753.
 113. Çetin D, Hacimuftuoglu A, Tatar A, Turkez H. The in vitro protective effect of salicylic acid against paclitaxel and cisplatin-induced neurotoxicity. *Cytotechnology*. 2016 Aug; 68(4):1361-7.
 114. Yue Y, Zhou H, Liu G, Li Y. The advantages of a novel CoQ10 delivery system in skin photo-protection. *Int J Pharm*. 2010; 392, 57-63.
 115. Schiller H, Reilly P, Bulkley G. Tissue perfusion in critical illnesses. Antioxidant therapy. *Crit Care Med*. 1993;21: 92-102.
 116. Gökpınar S, Koray T, Akçiçek E, Göksan T ve ark. Algal Antioksidanlar. E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences. 2006;23(1/1) 85-89.
 117. AS. Agyeman, Chaerkady R, Shaw PG, Davidson NE ve ark. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast

- epithelial cells reveals common expression profiles. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 132:175-187.
118. MacLeod AK, McMahon M, Plummer SM, Higgins LG ve ark. Characterization of the cancer chemopreventive NRF2-dependent gene battery in human keratinocytes: demonstration that the KEAP1-NRF2 pathway, and not the BACH1-NRF2 pathway, controls cytoprotection against electrophiles as well as redox-cycling compounds. *Carcinogenesis*. 2009; 30: 1571-1580.
119. Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects Medicine*. 2009; 30: 42-59.
120. Chiou S, Wang S, Wu D, Lin Y ve ark. Control of Oxidative Stress and Generation of Induced Pluripotent Stem Cell-like Cells by Jun Dimerization Protein 2. *Cancers*. 2013; 5: 959-984.
121. Kaspar JW, Niture SK and Jaiswal AK: Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47: 1304-1309.
122. Circu ML and Aw TY: Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48: 749-762.
123. Soriano FX, Leveille F, Papadia S, Higgins LG ve ark. Induction of sulfiredoxin expression and reduction of peroxiredoxin hyperoxidation by the neuroprotective Nrf2 activator 3H-1,2-dithiole-3-thione. *J Neurochem*. 2008; 107: 533-543.
124. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid. *Toxicology*. 2006; 217: 213-220.
125. Bieber L. Carnitine. *Annu Rev Biochem*. 1988; 57: 261-83.
126. Matera M, Bellinghieri G, Constantino G, Santoro D, Calvani M, Savica V. History of L-carnitine: Implications for renal disease. *Journal of Renal Nutrition*. 2003; 13(1):2-14.
127. Arslan A. diyabetik sıçanlarda karnitinin yara iyileşmesi ve flep yaşayabilirliğine etkisi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi; Deneysel çalışma: Uzmanlık tezi. 2010.
128. No authors listed. Acetyl-L-Carnitine. *Altern Med Rev* 1999; 4: 438-41.

129. Zanelli S, Solenski N, Rosenthal R, Fiskum G. Mechanisms of Ischemic Neuroprotection by Acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1053:153-61.
130. Çetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B, Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci.* 2006; 51:488-94.
131. Calabrese V, Giuffrida Stella A, Calvani M ve ark. Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J Nutr Biochem.* 2006;17: 73-88.
132. Purpura D, Girado M, Smith T. Structure activity determinants of pharmacological effects of amino acids and related compounds on central synapses. *J Neurochem* 1959;3:238.
133. Hayashi K. Action of carnitine on excitable tissues of vertebrates. In: Peeters H ed. *Protides of the Biological Fluids.* Amsterdam: Elsevier;1960:371-381.
134. Perez JR, Werrbach-Perez K, Ramacci MT. Role of nerve growth factors in neurological disease. In: Agnoli A, Cahn J, Lassen N eds. *Senile dementias.* 2nd International Symposium. Paris: Libby;1988:15-25.
135. No authors listed. L-carnitine Monograph. *Altern Med Rev.* 2005; 10:42-50.
136. Matthew W. Curran T, Olson J, Morhart M ve ark. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) to enhance nerve regeneration in carpal tunnel syndrome: study protocol for a randomized, placebo-controlled trial. *Trials.* 2016; 14: 17:200.
137. Smuder A, Kavazis A, Min K, Powers S. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2011; 110: 935-42.
138. Rosca M, Lemieux H, Hoppel C. Mitochondria in the elderly: is acetylcarnitine a rejuvenator? *Adv Drug Deliv Rev.* 2009 Nov 30;61(14):1332-1342.
139. Mayes P. Lipids of physiologic significance. In: Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V eds. *Harper's Biochemistry.* 25th ed. Stamford: Appleton and Lange; 2000. p160-171.

140. Akın H. Farelerde Asetil-L-Karnitin Uygulamasının Deneysel Ağrı Modelleri Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Edirne. 2005.
141. Keshavarz-Bahaghighat H, Sepand MR, Ghahremani MH, Aghsami M, Sanadgol N, Omid A, Bodaghi V, Sabzevari O. Acetyl-L-Carnitine Attenuates Arsenic-Induced Oxidative Stress and Hippocampal Mitochondrial Dysfunction. *Biol Trace Elem Res*. 2018 Aug;184(2):422-435.
142. Rebouche C. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;1033:30-41.
143. Pacifici EH, McLeod LL, Sevanian A. Lipid hydroperoxide-induced peroxidation and turnover of endothelial cell phospholipids. *Free Radic Biol Med*. 1994; 17: 297-309.
144. Madesh M, Balasubramanian KA. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys*. 1997; 15: 187-192.
145. Chao HH, Liu JC, Hong HJ, Lin JW, Chen CH, Cheng TH. L-Carnitine reduces doxorubicin-induced apoptosis through a prostacyclin-mediated pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *Int J Cardiol*. 2011; 146: 145-52.
146. Sultan A, Sokolove PM. Free fatty acid effects on mitochondrial permeability: an overview. *Arch Biochem Biophys* 2001;386: 52-61.
147. Arockia Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1713-1726.
148. Vanella A, Russo A, Acquaviva R. L -propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16: 99- 104.
149. Di Cesare L, Ghelardini C, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy. *Eur J Neurosci* 2007; 26: 820-827.
150. Zhu X, Sato EF, Wang Y, et al. Acetyl-L-carnitine suppresses apoptosis of thioredoxin 2-deficient DT40 cells. *Arch Biochem Biophys* 2008; 15;478:154-160.

151. Zanelli SA, Solenski NJ, Rosenthal RE, Fiskum G. Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Aug;1053:153-61.
152. Scafidi S, Fiskum G, Lindauer SL, Bamford P ve ark. Metabolism of acetyl-L-carnitine for energy and neurotransmitter synthesis in the immature rat brain. *J Neurochem.* 2010 Aug;114(3):820-31.
153. Graziano F, Bissoni R, Catalano V, et al. Potential role of levocarnitine supplementation for the treatment of chemotherapy-induced fatigue in non-anaemic cancer patients. *Br J Cancer* 2002; 86: 1854-1847.
154. Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, et al. L-carnitine supplementation for the treatment of fatigue and depressed mood in cancer patients with carnitine deficiency: a preliminary analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033:168-176.
155. Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, et al. Safety, tolerability and symptom outcomes associated with L-carnitine supplementation in patients with cancer, fatigue, and carnitine deficiency: a phase I/II study. *J Pain Symptom Manage* 2006; 32: 551-559.
156. Malik B, Stillman M. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Curr Pain Headache Rep* 2008; 12: 165-174.
157. Peluso G, Barbarisi A, Savica V, et al. Carnitine: an osmolyte that plays a metabolic role. *J Cell Biochem* 2000; 80: 1-10.
158. Hara Y, Sakagami H, Shi H, Abe T. Partial Protection of Paclitaxel-induced Neurotoxicity by Antioxidants. *In Vivo.* 2018 Jul-Aug;32(4):745-752.
159. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:231-41.
160. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004; 384:201-32.

161. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW ve ark. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. 2001 ;1(4) ;515-25.
162. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 2001; 26:390-7.
163. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007; 87:99-163.
164. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptozis. *Annu Rev Biochem*. 2004; 73:87-106.
165. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*. 2008; 18:157-64.
166. Peter M, Budd R, Desbarats J, Hedrick S ve ark. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. 2007; 129:447-50.
167. Green D, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004 ;305: 626-9.
168. Youle R, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:47-59.
169. Carter Z, Mak D, Wendy D Schober, Dietrich M ve ark. Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptozis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5. *Blood*. 2008; 1; 111(7):3742-50.
170. Bokov A, Chaudhuri A, Richardson A. The role of oxidative damage and stres in aging. *Mech. Ageing Dev*. 2004; 125; 811-826.
171. Dong Y, Liu D, Hu Y, Ma X. NaHS Protects Cochlear Hair Cells from Gentamicin-Induced Ototoxicity by Inhibiting the Mitochondrial Apoptosis Pathway. *PLoS ONE*. 2015; 10(8): e0136051.
172. Monika S. Malgonde and Manoj Kumar. Radiotherapy-enhanced ototoxicity in elderly. *South Asian J Cancer*. 2014; 3(4): 221–222.

173. Rybak LP. Ototoxicity of loop diuretics. *Otolaryngol Clin N Am* 1993; 26: 829–44.
174. Kim SJ, Park C, Han AL ve ark. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. *Hear Res.* 2009; 251: 70-82.
175. Wu J, Cheng C. Synthetic Chalcones with Potent Antioxidant Ability on H₂O₂-Induced Apoptosis in PC12 Cells. *International Journal of Molecular Sciences.* *Int. J. Mol. Sci.* 2014; 15, 18525-18539.
176. Kim S, Im G, An YS, Lee SH, Jung HH, Park SY. The effects of the antioxidant α -tocopherol succinate on cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016; 86:9-14.
177. Deshpande SS, Irani K. Oxidant signalling in carcinogenesis: a commentary. *Hum Exp Toxicol.* 2002; 21(2): 63-4.
178. Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2000; 32(3): 283-92.
179. Low WK, Toh ST, Wee J, Fook-Chong SM, Wang DY. Sensorineural hearing loss after radiotherapy and chemoradiotherapy: A single, blinded, randomized study. *J Clin Oncol.* 2006; 24:1904–9.
180. Bhandare N, Antonelli PJ, Morris CG, Malayapa RS, Mendenhall WM. Ototoxicity after radiotherapy for head and neck tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 67:469–79.
181. Schultz C, Goffi-Gomez MV, Pecora Liberman PH, Pellizzon AC, Carvalho AL. Hearing loss and complaint in patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010; 136:1065–9.
182. Malgonde M, PS Nagpure. Audiometric Patterns in Ototoxicity After Radiotherapy and Chemotherapy in Patients of Head and Neck Cancers. *Indian J Palliat Care.* 2015; 21(2): 164–167.

183. Altun Z, Pamukoğlu A, Olgun Y. ve ark. Acetyl-L-Carnitine protects HEI-OC1 auditory cells from radiation and cisplatin induced toxicity. *Int J Clin Exp Med*. 2016; 9(7): 13605-13614.
184. Nishikawa M, Nagatomi H, Chang BJ, Sato E, Inoue M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 387 (1): 78–84.
185. Rabik C, Dolan M. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007; 33(1):9-23.
186. Santos NAG, Catao CS, Martins NM et al. Cisplatin induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Arch Toxicol*. 2007; 81(7): 495-504.
187. Sayed-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA et al. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine depleted rat model. *Chemotherapy* 2004; 50(4): 162-170.
188. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):579-91.
189. Lee S, Kim H, An Y, Chang J, Choi J, Im G. Protective effect of resveratrol against cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OC1 auditory cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2014; 79(1):58-62.
190. Youn C, Eu-Rijo, Sim J, Cho S. Peanut sprout extract attenuates cisplatin-induced ototoxicity by induction of the Akt/Nrf2-mediated redox pathway. 2017; 92:58-62.
191. Newmeyer D, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003; 21;112(4):481-90.
192. Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2009;61:290–302.

193. Bangaru ML, Chen S, Woodliff J, Kansra S. Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis and blocks migration of human medulloblastoma cells. *Anticancer Res.* 2010; 30(2): 499-504.
194. Haorah J, Knipe B, Persidsky Y. Stabilization Of Superoxide Dismutase By Acetyl-L-carnitine In Human Brain Endothelium During Alcohol Exposure: Novel Protective Approach. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(8): 1601–1609.
195. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(11): 4405-9.
196. Low W, Tan M, Chua A, Sun L, Wang D. Yahya cohen memorial lecture: the cellular and molecular basis of radiation-induced sensori-neural hearing loss. *Ann Acad Med Singapore.* 2009; 38: 91–4.
197. Düzenli U, Altun Z, Olgun Y, Pamukoğlu A ve ark. Role of N-acetyl cysteine and acetyl-L-carnitine combination treatment on DNA-damage-related genes induced by radiation in HEI-OC1 cells. *Int J Radiat Biol.* 2018; 29: 1-11.
198. Mansour HH. Protective Role Of Carnitine Ester Against Radiation-Induced Oxidative Stress In Rats. *Pharmacological Research. Pharmacol Res.* 2006; 54(3):165-71.
199. Khan HA, Alhomida AS. A Review Of The Logistic Role Of L-Carnitine In The Management Of Radiation Toxicity And Radiotherapy Side Effects. *J. Appl. Toxicol.* 2011; 31: 707–713.
200. Rednam S, Scheurer ME, Adesina A, Lau CC ve ark. Glutathione S-Transferase P1 Single Nucleotide Polymorphism Predicts Permanent Ototoxicity in Children with Medulloblastoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2013; 60(4): 593–598.
201. Orgel E, Jain S, Ji L, Pollick L ve ark. Hearing Loss Among Survivors Of Childhood Brain Tumors Treated With An Irradiation-Sparing Approach. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Jun; 58(6): 953-8.
202. Haorah J, Floreani NA, Knipe B, Persidsky Y. Stabilization Of Superoxide Dismutase By Acetyl-L-Carnitine In Human Brain Endothelium During Alcohol

- Exposure: Novel Protective Approach. *Free Radic Biol Med*. 2011 Oct 15;51(8):1601-9.
203. Bansal A, Simon MC. Glutathione Metabolism In Cancer Progression And Treatment Resistance. *J Cell Biol*. 2018 Jul 2; 217(7): 2291-2298.
 204. Brown AL, Lupo PJ, Okcu MF, Lau CC ve ark. SOD2 Genetic Variant Associated With Treatment-Related Ototoxicity In Cisplatin-Treated Pediatric Medulloblastoma. *Cancer Med*. 2015 Nov; 4(11): 1679–1686.
 205. Hacker S., Dittrich A., Mohr A. ve ark. Histone Deacetylase Inhibitors Cooperate With IFN- γ To Restore Caspase-8 Expression And Overcome TRAIL Resistance In Cancers With Silencing Of Caspase-8. *Oncogene*. 2009; 28: 3097–3110.
 206. Chen SM, Lin TK, Tseng YY, Tu CH and ark. Targeting Inhibitors Of Apoptosis Proteins Suppresses Medulloblastoma Cell Proliferation Via G2/M Phase Arrest And Attenuated Neddylation Of P21. *Cancer Med*. 2018; 7(8): 3988–4003.
 207. Johnson CE, Huang YY, Parrish AB, Smith MI ve ark. Differential Apaf-1 Levels Allow Cytochrome C To Induce Apoptosis In Brain Tumors But Not In Normal Neural Tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Dec 26; 104(52): 20820-5.
 208. Kumar A, Fillmore HL, Kadian R, Broaddus WC ve ark. The Alkylphospholipid Perifosine Induces Apoptosis and p21-Mediated Cell Cycle Arrest in Medulloblastoma. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(11): 1813-21.
 209. Kim SK, Im GJ, An YS, Lee SH ve ark. The Effects Of The Antioxidant α -Tocopherol Succinate On Cisplatin-Induced Ototoxicity In HEI-OC1 Auditory Cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016 Jul; 86:9-14.
 210. Gunes D, Kirkim G, Kolatan E, Guneri EA ve ark. Evaluation Of The Effect Of Acetyl L-Carnitine On Experimental Cisplatin Ototoxicity And Neurotoxicity. *Chemotherapy*. 2011; 57(3): 186-94.
 211. Low WK, Tan MG, Sun L, Chua AW ve ark. Dose-dependant Radiation-Induced Apoptosis In A Cochlear Cell-Line. *Apoptosis*. 2006 Dec; 11(12): 2127-36.

8. EKLER

Ek-1 Etik Kurul Raporu

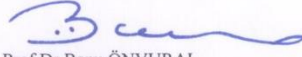
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk. 09.10.2014
Sayı: 679

Sayın Doç.Dr.Zekiye ALTUN,

Kurulumuz tarafından 09.10.2014 tarih ve 1722-GOA protokol numaralı 2014/31-06 karar numarası ile görüşülen "Sisplatin ve Radyoterapi Ototoksitesine Karşı Asetil-L-Karnitin House Ear Institute-Organ CORTI 1 (HEI-OC1) Hücre Dizisi ve HTB-186 Medullablastom Hücreleri Üzerine Etkileri" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
ACIK ADRES	GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
TELEFON	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat Inciraltı-İZMİR
FAKS	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
E-POSTA	0 232 412 22 43 etikkurul@deu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1722-GOA	
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Sisplatin ve Radyoterapi Onkolojilerine Karşı Asetil-L-Karnitinin House Ear Institute-Organ COBT1 1 (HE1-OC1) Hücre Dizisi ve HTB-186 Medullablastom Hücreleri Üzerine Etkileri	
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Zekiye ALTUN Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji A.D	
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-	
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/31-06	Tarih: 02.10.2014
	Doç.Dr.Zekiye ALTUN'un sorumlusu olduğu "Sisplatin ve Radyoterapi Ototoksitesine Karşı Asetil-L-Karnitinin House Ear Institute-Organ CORTI 1 (HEI-OCI) Hücre Dizisi ve HTB-186 Medullablastom Hücreleri Üzerine Etkileri" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Ek-2 Özgeçmiş



AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	57637215444
Doğum Tarihi	28/03/1988
İletişim Adresi	Yeşilkent Mahallesi Nazım Hikmet Bulvarı 2011 Sokak Innovia 3 I Blok Kat 19
Telefon	(232) 425 15 45 (537) 504 42 50
E-posta	aycapmk@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

12 Şubat 2013 - Şu Anda (6 yıl 2 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TEMEL ONKOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.58 / 4.0

04 Eylül 2008 - 02 Kasım 2012 (4 yıl 2 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, HALIÇ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
MOLEKÜLER BİYOLÖJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ, MOLEKÜLER BİYOLÖJİ VE GENETİK
PR. (ÜCRETLİ)
Diploma Numarası: 172
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.12 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

U. DÜZENLİ, Z. S. ALTUN, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. F. BAYRAK, L. OLGUN & H. O. ÇETİNAYAK, Role Of N-acetyl Cysteine And Acetyl-L-carnitine Combination Treatment On Dna-damage-related Genes Induced By Radiation In Hei-oc1 Cells., Journal International Journal of Radiation Biology , 2018, 0955-3002, 95, 3, 298-306.

B. GÖRGÜLÜ, A. AKKOÇLU, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. B. DEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, İ. ÖZTOP & O. KILINÇ, The Importance Of Investigating Tumor Biology And Biomarkers In Pleural Effusions, Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis, 2018, 2155-9929, 9, 5, 403.

Z. ALTUN, A. PAMUKOĞLU, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, H. O. CETINAYAK, G. KIRKIM, E. A. GUNERİ, P. ERCETİN & N. OLGUN, Acetyl-L-Carnitine protects HEI-OC1 auditory cells from radiation and cisplatin induced toxicity, INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, 2016, 1940-5901, 9, 7, 13605-13614.

Z. ALTUN, A. PAMUKOĞLU, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, H. O. CETINAYAK, G. KIRKIM, E. A. GUNERİ, P. ERCETİN & N. OLGUN, Acetyl-L-Carnitine protects HEI-OC1 auditory cells from radiation and cisplatin induced toxicity, INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL AND EXPERIMENTAL MEDICINE, 2016, 1940-5901, 9, 7, 13605-13614.

Z. ALTUN, E. CECEN, A. PAMUKOĞLU, S. AKTAŞ & N. OLGUN, Does silymarin combined with cisplatin affect neuroblastoma cell death via pro-inflammatory cytokine production?, IZMİR DR BEHCET UZ COÇUK HASTANESİ DERGİSİ, 2016, 2146-2372, 6, 1, 37-45.

U. DUZENLİ, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU & Z. ALTUN, Effect of Ecklonia Cava Polyphenol Extract in House Ear Institute-Organ of Corti 1 Cells Against Cisplatin Ototoxicity: A Preliminary Study, TURKISH ARCHIVES OF OTORHINOLARYNGOLOGY-TURK OTORINOLARENGOLOJİ ARSIVI, 2016, 2149-3987, 54, 4, 141-145.

E. CECEN, P. ERCETİN, G. KIRKIM, A. PAMUKOĞLU, S. AKTAŞ, Z. ALTUN, E. DOĞAN & N. OLGUN, Apoptotic Effects of Sanguinarine on the Organ of Corti 1 Cells: Comparison with Cisplatin, JOURNAL OF INTERNATIONAL ADVANCED OTOLOGY, 2015, 1308-7649, 11, 1, 19-22.

Bildiriler

Z. S. ALTUN, M. AYLA KOYUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR & H. N. OLGUN, The Effects Of Rosiglatozone On Minimal Residual Disease Model Of Neuroblastoma, Poster Sunumu, 49th Annual Congress Of The International Society Of Pediatric Oncology, 12 Ekim 2017, 15 Ekim 2017.

M. AYLA KOYUN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR & H. N. OLGUN, Rosiglatozonun Nöroblastom Minimal Rezidüel Hastalık Modeli Ve Diferansiasyon Üzerindeki Etkileri, Sözlü Sunum, 22. Ulusal Kansere Kongresi, 19 Nisan 2017, 23 Nisan 2017.

A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, Y. OLGUN, H. O. ÇETİNAYAK, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, The Effects Of Acetyl-L Carnitine On Cisplatin And Radiation Induced Apoptosis Treatment On Medullablastoma Cells., Sözlü Sunum, 6. Multidisipliner Kansere Araştırma Kongresi, 27 Ekim 2016, 30 Ekim 2016.

S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. B. DEMİR, S. SAYGAN, B. ÇİÇEKSOY, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, E. Ö. SERİNAN, Y. OLGUN & H. N. OLGUN, The Effects Of Electromagnetic Field Exposure At 900 Mhz Frequency Emitted From Mobile Phones On Cochlear Cells, Poster Sunumu, 6. Multidisipliner Kansere Araştırma Kongresi, 27 Ekim 2016, 30 Ekim 2016.

S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. B. DEMİR, S. SAYGAN, B. ÇİÇEKSOY, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, E. Ö. SERİNAN, Y. OLGUN & H. N. OLGUN, The Effects Of Electromagnetic Field Exposure At 900 Mhz Frequency Emitted From Mobile Phones On Cochlear Cells, Poster Sunumu, Chloé 2016, 05 Haziran 2016, 08 Haziran 2016.

M. AKSOY, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, Ç. PEKÇETİN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & S. AKTAŞ, The Effect Of Alpha Lipoic Acid As A Powerful Antioxidant In Busulfan Treatment For Chronic Myeloid Leukemia, Poster Sunumu, 1st International Cell

Death Research Congress, 04 Mayıs 2016, 07 Mayıs 2016.

U. DÜZENLİ, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Y. OLGUN, A. F. BAYRAK, Ç. ÇELİK & A. ALIYEVA, Radyasyona Bağlı İşitme Kayıplarının Önlenmesinde N Asetin Sistein Ve Asetil L-karnitin Kombinasyonunun Etkinliği, Sözlü Sunum, Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz Ve Baş Boyun Cerrahisi, 28 Ekim 2015, 01 Kasım 2015.

İ. AĞABABAOĞLU, A. B. DEMİR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN & A. AKKOÇLU, Chaperonin (hsp60) And Annexin 2 Are Candidate Biomarkers For Early Diagnosis Of Nsclc, Poster Sunumu, 16th World Conference On Lung Cancer, 06 Eylül 2015, 09 Eylül 2015.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, B. GÖRGÜLÜ, Z. S. ALTUN & A. AKKOÇLU, Chemotherapy And Targeted Therapy Sensitivity Testing In Malignant Pleural Effusions, Poster Sunumu, 16th World Conference On Lung Cancer, 06 Eylül 2015, 09 Eylül 2015.

Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, H. O. ÇETİNAYAK, G. KIRKIM, E. A. GÜNERİ, L. OLGUN & H. N. OLGUN, The Protective Role Of Acetyl-L-carnitine Against Cisplatin And Radiotherapy Induced Ototoxicity: Nrf2 And Target Genes, Poster Sunumu, 30th Politzer Society Meeting 1st World Congress Of Otolaryngology, 30 Haziran 2015, 03 Temmuz 2015.

Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Y. OLGUN, H. O. ÇETİNAYAK, G. KIRKIM, E. A. GÜNERİ, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, The Protective Role Of N-acetyl-L-cysteine Against Cisplatin And Induced Ototoxicity: Nrf2 And Target Genes, Poster Sunumu, 3rd Eacr-sponsored Anticancer Agent Development Congress, 18 Mayıs 2015, 19 Mayıs 2015.

M. AYDIN, B. ŞENTÜRK, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, F. ÇAĞLAR, A. B. DEMİR & S. AKTAŞ, Prostat Kanseri Hücreleri Ve Kök Hücrelerinde Taksanların Etkisi, Sözlü Sunum, Namık Kemal Üniversitesi 1. Tıp Öğrenci Kongresi Kansere Multidisipliner Yaklaşım, 15 Mayıs 2015, 16 Mayıs 2015.

U. DÜZENLİ, Z. S. ALTUN, Y. OLGUN, A. F. BAYRAK, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ, L. OLGUN & H. N. OLGUN, Effect Of Ecklonia Cava Polyphenol Extract In House Ear Institute-organ Corti 1 (hei-oc1) Cells Against Cisplatin Ototoxicity, Poster Sunumu, 10th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences (apsci 2015), 30 Nisan 2015, 03 Mayıs 2015.

Z. S. ALTUN, Y. OLGUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. F. BAYRAK, U. DÜZENLİ, H. O. ÇETİNAYAK, S. AKTAŞ, H. N. OLGUN & L. OLGUN, The Effect Of Acetyl-L-carnitine On Dna Damage Related Genes Induced By Radiation And Cisplatin Treatment In Cochlear Cells, Poster Sunumu, 10th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences (apsci 2015), 30 Nisan 2015, 03 Mayıs 2015.

Z. S. ALTUN, Y. OLGUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. F. BAYRAK, U. DÜZENLİ, H. O. ÇETİNAYAK, S. AKTAŞ, H. N. OLGUN & L. OLGUN, The Role Of Acetyl-L-carnitine On Dna Damage Related Genes Induced By Radiation And Cisplatin Treatment In Cochlear Cells, Poster Sunumu, 10th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences, 30 Nisan 2015, 03 Mayıs 2015.

U. DÜZENLİ, Y. OLGUN, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. O. ÇETİNAYAK, S. AKTAŞ, A. F. BAYRAK, H. N. OLGUN & L. OLGUN, The Role Of N-acetyl Cysteine On Dna Damage Related Genes Induced By Radiation And Cisplatin Treatment In Hei-oc1 Cells, Poster Sunumu, 10th Asia Pacific Symposium On Cochlear Implants And Related Sciences (apsci 2015), 30 Nisan 2015, 03 Mayıs 2015.

Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. O. ÇETİNAYAK, Y. OLGUN, S. AKTAŞ, G. KIRKIM, E. A. GÜNERİ, L. OLGUN & H. N. OLGUN, Asetil-L-karnitinin Sisplatin Ve Radyoterapi İlişkili Ototoksisiteye Karşı Korumucu Rolü: Nrf2 Ve Hedef Genleri,

Poster Sunumu, 21. Ulusal Kanser Kongresi, 22 Nisan 2015, 26 Nisan 2015.

S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR & H. N. OLGUN, Nöroblastoda Mifamurtide Etkisinin İn Vitro Ve Ex Vivo Araştırılması, Poster Sunumu, 21. Ulusal Kanser Kongresi, 22 Nisan 2015, 26 Nisan 2015.

M. CEYHAN, Z. S. ALTUN, A. B. DEMİR, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR & H. N. OLGUN, Nöroblastomda Embriyonik Kök Hücre Farklılaşması Ve Apoptoz İlişkili Genler Ve Metilasyon Değişimleri, Poster Sunumu, 21. Ulusal Kanser Kongresi, 22 Nisan 2015, 26 Nisan 2015.

S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. E. KOLATAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, D. DURSUN, E. Ö. SERİNAN, A. B. DEMİR, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Acetyl L Carnitine Interferes With Antitumor Effect Of Cisplatin, Poster Sunumu, 46th, 22 Ekim 2014, 25 Ekim 2014.

S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. E. KOLATAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, D. DURSUN, E. Ö. SERİNAN, A. B. DEMİR, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Acetyl-L-carnitine Interferes With Antitumor Effect Of Cisplatin, Poster Sunumu, 46th Congress Of The International Society Of Paediatric Oncology, 22 Ekim 2014, 25 Ekim 2014.

R. E. ÇEÇEN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. E. KOLATAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, In Vivo Effect Of Sanguinarine On Neuroblastoma, Poster Sunumu, 46th Congress Of The International Society Of Paediatric Oncology, 22 Ekim 2014, 25 Ekim 2014.

A. PAMUKOĞLU KAYNAR, E. Ö. SERİNAN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Do Korean Red Ginseng And Acetyl-L-carnitin Have Protective Effects Against Oxidative Stress In Cochlear Cells?, Poster Sunumu, 5th International Congress On Cell Membranes And Oxidative Stress, 09 Eylül 2014, 12 Eylül 2014.

U. DÜZENLİ, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Y. OLGUN, A. F. BAYRAK, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Ecklonia Cava Polifenol Ekstresi'nin Koflea Modelinde Sisplatin Toksisitesine Karşı Koruyucu Etkisinin Değerlendirilmesi, Sözlü Sunum, 9. İtç Kulak Hastalıkları Ve Kokleer İmplantasyon Sempozyumu, 03 Eylül 2014, 05 Eylül 2014.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, M. AYLA KOYUN, E. Ö. SERİNAN, R. E. ÇEÇEN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Üçlü Negatif Meme Kanseriinde Tacrolimusun İn Vitro Ve İn Vivo Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, İx. Aydın Onkoloji Günleri- Klinik Onkolojide Güncel Tedaviler Sempozyumu, 23 Mayıs 2014, 26 Mayıs 2014.

R. E. ÇEÇEN, S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Z. S. ALTUN & H. N. OLGUN, Nöroblastomda İmmun Düzenleyici Hücrelerin Rolü, Poster Sunumu, İmmuno-onkoloji Hedefe Yönelik Kanseri Tedavileri Kongresi, 14 Mayıs 2014, 18 Mayıs 2014.

A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, H. O. ÇETİNAYAK, Y. OLGUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Medullablastom Hücrelerinde Koruyucu Ajanların Sisplatin Ve Radyoterapi İle İndüklenmiş Hücre Ölümüne Etkisi, Poster Sunumu, Xvii. Ulusal Pediatrik Kanseri Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014, 256 - 257.

S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, H. E. KOLATAN, O. YILMAZ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & H. N. OLGUN, Nöroblastom Fare Modelinde Asetil-İ Kanitinin Sisplatin Toksisite Ve Tümör Biyolojisi Üzerine Etkilerinin Araştırılması, Poster Sunumu, Xvii. Ulusal Pediatrik Kanseri Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014, 256 - 256.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, M. AYLA KOYUN, E. Ö. SERİNAN, R. E. ÇEÇEN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Nöroblastomda In Vitro Tacrolimus Etkisi, Sözlü Sunum, XVII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014, 182 - 182.

R. E. ÇEÇEN, S. AKTAŞ, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, H. E. KOLATAN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, O. YILMAZ & H. N. OLGUN, Sanguinarin Ajanının Nöroblastom Üzerine In Vivo Etkisi, Poster Sunumu, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014, 289 - 289.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, M. AYLA KOYUN, E. Ö. SERİNAN, R. E. ÇEÇEN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Silmarinin Sisplatin Kombinasyonu İle Nöroblastom Hücrelerine Etkileri, Poster Sunumu, XVII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 13 Mayıs 2014, 17 Mayıs 2014.

İ. AĞABABAOĞLU, A. B. DEMİR, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, Z. S. ALTUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ, H. ERSÖZ & A. AKKOÇLU, Chaperonin (hsp60) And Annexin 2 Are Candidate Biomarkers For Early Diagnosis Of Non Small Cell Lung Carcinom, Poster Sunumu, Earc-sponsored 2. Anticancer Ajenst Congress-5.multidisciplinary Cancer Research Congress, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, B. GÖRGÜLÜ, Z. S. ALTUN & A. AKKOÇLU, Chemoterapy And Targeted Therapy Sensitiv Testing In Malignant Pleural Effusions, Poster Sunumu, Earc-sponsored 2. Anticancer Ajenst Congress- 5.multidisciplinary Cancer Research Congress, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

S. AKTAŞ, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, B. GÖRGÜLÜ, Z. S. ALTUN & A. AKKOÇLU, Chemotherapy And Targeted Therapy Sensitiv Testing In Malignant Pleural Effusions, Poster Sunumu, Earc-sponsored 2. Anticancer Ajenst Congress- 5.multidisciplinary Cancer Research Congress, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

R. E. ÇEÇEN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, G. KIRKIM, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ, Z. S. ALTUN, E. DOĞAN & H. N. OLGUN, Sanguinarine Has In Vitro Less Ototoxic Effect Than Cislatin, Poster Sunumu, Earc-sponsored 2. Anticancer Ajenst Congress- 5.multidisciplinary Cancer Research Congress, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, M. AYLA KOYUN, E. Ö. SERİNAN, R. E. ÇEÇEN, Z. S. ALTUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Silmarinin Sisplatin Kombinasyonu İle Nöroblastom Hücrelerine Etkileri, Poster Sunumu, Earc-sponsored 2. Anticancer Ajenst Congress- 5.multidisciplinary Cancer Research Congress, 23 Nisan 2014, 27 Nisan 2014.

A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, D. DURSUN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR & S. AKTAŞ, The Effect Of Rapamycin On Apoptosis And Apoptotic Gene Expression In Breast Cancer Cells, Poster Sunumu, Cell Death In Cancer, 30 Ocak 2014, 02 Şubat 2014.

A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, H. O. ÇETİNAYAK, Y. OLGUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, The Effects Of Protective Agents Against Cisplatin And Radiotherapy Induced Cell Death, Poster Sunumu, 3rd Mediterranean Multidisciplinary Oncology Forum, 24 Kasım 2013, 24 Kasım 2013, 69 - 69.

A. PAMUKOĞLU KAYNAR, Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, H. O. ÇETİNAYAK, Y. OLGUN, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Medullablastom Hücrelerinde Korumucu Ajanların Sisplatin Ve Radyoterapi İle İndüklenmiş Hücre Ölümüne Etkisi, Poster Sunumu, I. Uluslararası Katılımlı Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 30 Ekim 2013, 03 Kasım 2013, 142 - null.

Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, R. E. ÇEÇEN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, The Effect of Silymarin On pro-inflammatory Cytokines In Neuroblastoma Cells, Sözlü Sunum, Xxv.national Biochemistry Congress, 03 Eylül 2013, 03 Eylül 2013, 38.

Z. S. ALTUN, A. P. ERÇETİN ÖZDEMİR, A. B. DEMİR, R. E. ÇEÇEN, A. PAMUKOĞLU KAYNAR, S. AKTAŞ & H. N. OLGUN, Silmarin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Potansiyel Anti-tumoral Etkisi, Sözlü Sunum, 20. Ulusal Kanser Kongresi, 19 Nisan 2013, 23 Nisan 2013.

Ödüller

Diğer, Ulusal, Özgün Araştırma Birincilik Ödülü, Ecklonia Cava Polifenol Ekstresinin Sisplatin Ototoksitesisine Karşı House Ear Institute- Organ Of Corti 1 (hei-oc1) Hücrelerindeki Etkileri, Ödül Alınan Kurum: Türk Otolarengoloji Arşivi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 22 Mart 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Sözlü Sunum İkincisi, Prostat Kanser Hücreleri Ve Kök Hücrelerinde Taksanların Etkisi, Ödül Alınan Kurum: Namık Kemal Üniversitesi (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 21 Mayıs 2015.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Sözel Bildiri Ödülü, Nöroblastoda Mifamurtide Etkisinin In Vitro Ve Ex Vivo Araştırılması, Ödül Alınan Kurum: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 25 Nisan 2015.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, En İyi Özgün Araştırma Ödülü, Nöroblastomda In Vitro Tacrolimus Etkisi, Ödül Alınan Kurum: Türk Pediatri Onkoloji Grubu (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 21 Mayıs 2014.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Poster Bildiri Birincilik Ödülü, Sanguinarin Ajanının Nöroblastom Üzerine İn Vivo Etkisi, Ödül Alınan Kurum: Türk Pediatri Onkoloji Grubu (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 16 Mayıs 2014.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2228-A Son Sınıf Lisans Öğrencileri için Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Burs Programı, Online Başvuru Onaylanmadı, 2014 - 1.
AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılım Desteği Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 3, 24.04.2014 - 27.04.2014.
AYÇA PAMUKOĞLU KAYNAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı, Başvurusu Reddedildi, 2014 - 1, 01.03.2014 - 28.02.2015.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

Original Article

Acetyl-L-Carnitine protects HEI-OC1 auditory cells from radiation and cisplatin induced toxicity

Zekiye Altun¹, Ayça Pamukoğlu¹, Yüksel Olgun², Safiye Aktaş¹, Hasan Oğuz Çetinayak³, Günay Kırkım², Enis Alpin Güneri², Pınar Erçetin¹, Nur Olgun⁴

¹Department of Basic Oncology, Dokuz Eylül University Institute of Oncology, Izmir, Turkey; ²Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Dokuz Eylül University School of Medicine, Izmir, Turkey; ³Department of Radiation Oncology, Dokuz Eylül University School of Medicine, Izmir, Turkey; ⁴Department of Pediatric Oncology, Dokuz Eylül University Institute of Oncology, Izmir, Turkey

Received February 22, 2016; Accepted May 15, 2016; Epub July 15, 2016; Published July 30, 2016

Abstract: Concomitant applications of CDDP and RT have synergistic effects in oncology. CDDP and RT can cause ototoxicity through oxidative stress. Nrf2 is a transcription factor that has antioxidant properties. The aim of this study is to evaluate the protective effect of ALC via Nrf2 and target genes against CDDP and RT induced ototoxicity in The House Ear Research Institute-Organ of Corti I cells (HEI-OC1). HEI-OC1 cells were exposed to a single dose of 5 Gray RT. After incubation for 72 h with or without ALC, CDDP, and their combinations, ototoxicity of HEI-OC1 cells were examined through analyzing apoptosis, oxidative stress and Nrf2 and related gene expressions by TUNEL, flow cytometry, HPLC and quantitative real-time PCR. ALC protected from RT, CDDP and CDDP-RT induced cell death by inhibiting apoptosis and oxidative stress. ALC-CDDP-RT treatment increased the expressions of Quinone oxidoreductase1 (NQO1), SODIII, Heme Oxygenase (HO-1) and Glutathione-S Transferase (GST). In conclusion, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and oxidative stress might play important roles in cisplatin (CDDP), radiotherapy (RT) and CDDP-RT induced ototoxicity. Therefore, targeting Nrf2 by Acetyl-L-Carnitine (ALC) might be potential therapeutic strategies.

Keywords: HEI-OC1, ototoxicity, radiotherapy, cisplatin, Nrf2, Acetyl-L-Carnitine

Introduction

Cisplatin (CDDP) is a platinum-based chemotherapeutic agent widely used in therapy of solid tumors that has some adverse effects such as ototoxicity, neurotoxicity and nephrotoxicity. CDDP and RT have synergistic effects for cancer therapy but they may also enhance their side effects when they are applied together such as ototoxicity. CDDP and RT related ototoxicity and sensorineural hearing loss can decrease especially the quality of life of pediatric cancer patients.

CDDP and RT exert their effects through DNA direct or indirectly which can result in single or double strand breaks and oxidative stress [1-3]. Reactive oxygen species (ROS) is a signaling molecule in cells but excess amounts of ROS can damage and leads to apoptosis in the cochlear structures. Nuclear factor-erythroid

2-related factor 2 (Nrf2) is a nuclear transcription factor that has some antioxidant and anti-inflammatory features in many cell types including auditory cells [3-5]. Activated Nrf2 induces the transcription of many cytoprotective genes that encode antioxidant genes and detoxifying enzymes.

Acetyl-L-Carnitine (ALC) is an antioxidant agent that offers some protection against CDDP related toxicities such as neurotoxicity and ototoxicity both *in vitro* and *in vivo* [5, 6]. Our previous work showed that ALC can modulate CDDP induced oxidative stress in different ways such as reducing glutathione levels and lipid peroxidation, while apoptotic effects of CDDP are not interfered with ALC treatment in neuroblastoma [6]. ALC also has a protective effect against cisplatin induced ototoxicity in auditory cells, with induction of anti-apoptotic gene expression and attenuating levels of pro-inflammatory cyto-

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

kines [1]. However, there has been no study about the Nrf2 related molecular mechanism of ALC against CDDP, RT and CDDP-RT induced ototoxicity. L-carnitine has a protective role against radiation induced injury in another tissues such as the testis and ileal mucosa [2, 8]. ALC prevented radiation-induced sickness by reducing oxidative lipid peroxidation levels [9]. Only one *in vivo* study has demonstrated the amelioration of total cranial radiation-induced cochlear degeneration in guinea pigs by L-carnitine [10].

The aim of this study was designed to examine the role of ALC against CDDP, RT and CDDP-RT induced ototoxicity and clarify the molecular mechanisms of Nrf2 and target genes in The House Ear Research Institute-Organ of Corti I (HEI-OC1) cells. Moreover, the possible mechanisms of the underlying this otoprotective effect were investigated via ROS, as well as changes in mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation and apoptosis.

Material and methods

The House Ear Research Institute-Organ of Corti I cell line (HEI-OC1) was kindly obtained from F. Kalinec. This auditory cell line is a useful model for ototoxicity studies [11]. Cells were maintained in high-glucose DMEM containing 10% FBS at 33°C [1]. Cisplatin (Hexal, Sandoz/Novartis/Bangladesh) and Acetyl-L-carnitine (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) were freshly prepared before each experiment. Cells were incubated with CDDP, RT and ALC and combinations (ALC-RT, ALC-CDDP, ALC-RT-CDDP) by 24, 48 and 72 hours (h). Control cells only were treated with the medium. In ALC group, cells were treated with only 50 μ M ALC at 24, 48 and 72 h incubations in all experiments. After 24 h plating, cells were pretreated with 50 μ M ALC or 50 μ M CDDP or 50 μ M ALC-50 μ M CDDP for 30 min before and then RT 5 Gray (5 Gy) was applied on ALC, ALC-RT, ALC-CDDP, ALC-CDDP-RT groups. ALC and CDDP were left in the culture mediums during the experiments. Cells (1×10^4 /wells in 96-well microtiter well plates) were exposed to a 5 Gy single fraction dose of irradiation using 6MV-X power in a Linear accelerator (Primus, Siemens, USA) at Dokuz Eylul University Radiation Oncology Department. Cells were kept at room temperature when they were treated with RT about 20 min and then they were incubated at

33°C. After RT treatment, cells were further cultured at 24, 48 and 72 h. At the end of the incubation periods, the viability of cells was evaluated by using a WST-1 assay kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) which is a colorimetric method. WST-1 analysis was performed as previously described [1]. All values were compared to the corresponding controls. Mean of triplicate experiments for each dose was used to calculate 50% cell viability inhibitor doses of CDDP, RT and CDDP-RT combinations. ALC dosage was chosen at 50 μ M from a previous study and treatment of 50 μ M ALC similarly protected the cells from CDDP and RT induced cell death at 72 h [1]. Then all experiments and measurements were performed at 72 h after RT treatment.

Cells were exposed to RT, CDDP, ALC and combinations for 72 h, and then apoptotic cell death was monitored using the TdT-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) assay to detect fragmented DNA in apoptotic nuclei (GenScript TUNEL Apoptosis Detection Kit, for adherent cells, FITC-labelled POD, USA, Piscataway, NJ) as previously described [1]. A total of 5000 cells/condition were evaluated by fluorescence microscope and scored as per cent of apoptosis per total cells.

The effects of RT, CDDP, RT-CDDP and ALC on intracellular reactive oxygen species levels and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in HEI-OC1 cells were evaluated by using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Invitrogen Molecular Probes, USA, Eugene, OR) and 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',2,2'-tetrakis(4-ethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) (JC-1; Invitrogen Molecular Probes, USA, Eugene, OR) [4]. Briefly, HEI-OC1 cells were cultured for 24 h and then treated with 5 Gy RT, 50 μ M CDDP and 5 Gy RT-50 μ M CDDP for 72 h with or without pretreatment with 50 μ M M ALC. After the 72 h incubation, cells were harvested using trypsin-EDTA into tubes and washed with PBS. The cells were treated with 10 μ M DCFH-DA and 2 μ M JC-1 Working Solution and further incubated for 15 min at 33°C. Flow cytometric analyses (10000 events per sample) of DCFH-DA-treated and JC-1 treated cells were performed using a BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) at excitation and emission wavelengths (488 and 530 nm for DCF-DA and 533 and 585 nm for JC-1, respectively) and evaluated using the BD Accuri C6 Software (BD Biosciences,

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

Table 1. The list of primers used in the real-time PCR experiments

Genes	Primers	
	Forward	Reverse
Nrf2	TCCATCCCGAATTACAGTGTC	AGTTGCCCACTTCTTTTCCAG
HO-1	AGATGACACCTGAGGTCAAGCA	GACTCTGGTCTTTGTGTTCTCT
GST	CGCCACCAATATGACCTCT	CTGTTGCCCAAGGTAGT
GPx	GTCCACCGTGTATGCCTTCT	TCTGCAGATCGTTCATCTCG
NQO1	TTCTCTGGCCGATTGAGAGT	AGGCTGCTTGAGAGCAAAATA
GR	GACAACCTGACTTCCTTGGG	GAGCACACCGGAGAGTTTG
SODII	AGCGGTCGTGTAACCTCAAT	CCAGAGCCTCGTGGTACTTC
SODIII	AGAGCCTGACAGGTGACAGAG	GCCTATCTTCTCAACAGGTCA
Catalase	GAGACCTGGGCAATGTGACT	GTTTACTGCGCAATCCAAT
GCL	AGTTGGAGCAGCTGTATCAGTG	ATGTCAGGGATGCTTTCTTGA
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	GTCATCATACTGGCAGGTTTCT

USA). The red/green fluorescence ratio was introduced to identify living and apoptotic cells. JC-1 exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (≈ 529 nm) to red (≈ 590 nm). Hence, mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\psi_m$) is indicated by a decrease in the red/green fluorescence intensity ratio of JC-1. Data are presented as percentages of the fluorescence intensity ratio of control.

Cells were harvested and washed twice with ice-cold phosphate buffered saline after treatments. Subsequently homogenization step, protein concentration was determined using a protein assay kit (Pierce, Thermo Scientific, USA, Rockford). Lipid peroxidation was quantified by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by high performance liquid chromatography (HPLC) (CTO-10AS VP, Shimadzu) [6]. Thiobarbituric acid levels were normalized to protein content and expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein.

Total RNA was extracted from cells with the use of Tripure Isolation Reagent (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNAs obtained from total RNAs and they were used for quantitative real-time PCR. cDNA was amplified with Sybr Green I (Roche FastStart DNA Master, Roche, Mannheim, Germany). Nrf2, Heme Oxygenase I (HO-1), Glutathione S Transferase (GST), Glutathione Peroxides (GPx), NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 (NQO1), Glutathione Reductases (GR),

Superoxide dismutase (SOD) II, Superoxide dismutase (SOD) III, Catalase and Glutamate Cysteine Ligase (GCL) gene expressions analyses were performed with LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany) (Table 1). GAPDH expression was used for normalization of the mRNA levels. The evaluation of relative mRNA levels among the treatment groups was carried out using the $\Delta\Delta\text{CT}$ method. Data are presented as relative fold changes compared with the control group. The significance gene expressions cut off level is considered as > 2 fold changes.

Statistical analyses were performed using SPSS 15.0 software program (Chicago, IL, USA). All results are expressed as means $\pm$ SEM. Continuous variables were compared using the Mann-Whitney rank sum test. All treatment experiments were repeated at least three times to generate statistically relevant data. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In this study 5 Gy RT, 50 μM CDDP and 5 Gy RT-50 μM CDDP treatments significantly inhibited HEI-OC1 cell viability in a time dependent manner as shown in Figure 1 ($P < 0.05$). CDDP-RT combination was decreased the cell viability significantly about 50% at 72 h ($P < 0.05$). HEI-OC1 cells were pretreated with 50 μM ALC 30 min and protected from RT, CDDP and CDDP-RT combination induced auditory cell cytotoxicity significantly at 72 h ($P < 0.05$) (Figure 1).

RT, CDDP and CDDP-RT treatments significantly induced apoptosis of HEI-OC1 cells through DNA fragmentation in the cells when compared with the control (Figure 2) ($P < 0.05$). 50 μM ALC prevented against RT, CDDP and CDDP-RT induced apoptotic cell death when compared to their controls at 72 h (Figure 2) ($P < 0.05$). These results indicated that, this protection came about by inhibiting DNA fragmentation in the cells. Moreover, according to cell viability and apoptosis measurements ALC protected RT, CDDP and CDDP-RT induced hair cell toxicity at the same ratios in the cells.

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

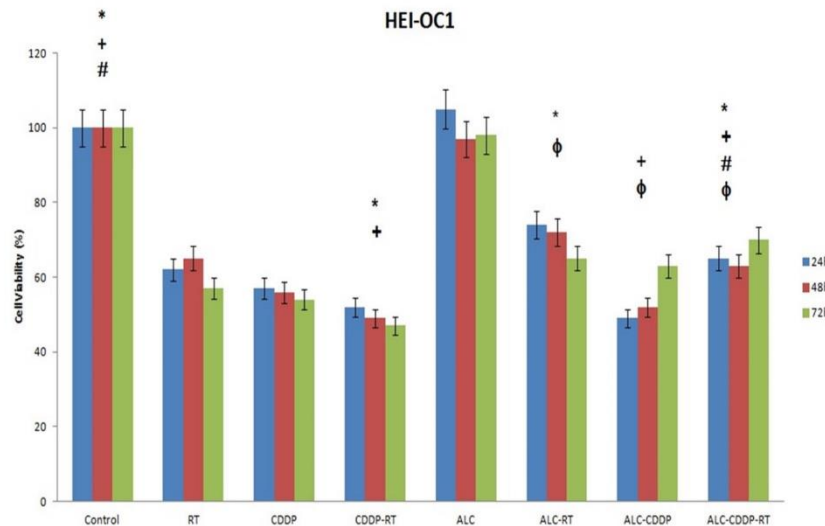


Figure 1. ALC protected HEI-OC1 cells against CDDP, RT and CDDP-RT induced toxicity. Cells were pretreated with 50 μ m ALC for 30 min followed by the addition of CDDP (50 μ m), RT (5 Gray) and CDDP-RT for 24, 48 and 72 h. Values represent the mean $\pm$ SEM of 6 observations (Mann-Whitney-U, $P < 0.05$). (* $P < 0.05$ versus RT, * $P < 0.05$ versus CDDP, * $P < 0.05$ versus CDDP-RT, * $P < 0.05$ versus ALC).

Firstly, the cells significantly induced ROS generation and lipid peroxidation with RT, CDDP or RT-CDDP treatments in auditory cells (Figures 3 and 4) ($P < 0.05$). Furthermore, HEI-OC1 cells decreased their mitochondrial potential and induced apoptosis as a result of these treatments, when compared with the control group (Figure 5). These cells showed a decrease in red fluorescence and an increase in green fluorescence. It suggests that RT, CDDP and RT-CDDP reduced $\Delta\Psi_m$. ALC markedly suppressed the RT-CDDP mediated DCF-DA oxidation and changes in mitochondrial membrane potential (Figures 3 and 4) ($P < 0.05$). ALC also inhibited RT-CDDP combination induced lipid peroxidation levels but not to a statistically significant level (Figure 4) ($P > 0.05$).

ROS generation and mitochondrial membrane potential was affected by RT and CDDP treatment alone in the cells ($P < 0.05$). Moreover, lipid peroxidation levels were significantly increased due to RT and CDDP ($P < 0.05$). ALC protected cochlear cells by inhibiting ROS generation; lipid peroxidation and variation in mitochondrial membrane potential from both RT and CDDP induced oxidative stress in the groups at the same ratios (Figures 3-5) ($P < 0.05$).

The transcription factor of Nrf2 is a major regulator genes encoding phase II detoxifying and antioxidant genes such as HO-1, GST, GPx, NQO1, GR, SOD II, SOD III, Catalase and GCL. In this study, these gene expressions of mRNA levels were determined by the RT-PCR method. Nrf2 and all of antioxidant these genes mainly induced with RT-CDDP combinations treatments at 72 h incubation as compared with control (Figure 6) ($P < 0.05$). RT alone induced GPx and SODIII expressions were increased slightly when compared with the control group ($P < 0.05$). ALC-RT combinations induced SODIII and NQO1 gene expressions when compared to control group ($P < 0.05$).

CDDP treatment did not show any Nrf2 and target gene expressions after 72 h incubations time point except that SODII expressions decreased in comparison with control ($P < 0.05$). ALC-CDDP combinations prominently increased the level of expressions of GST and Nrf2 genes while the level of NQO1, GR and HO-1 gene expressions decreased ($P < 0.05$). CDDP-RT combination was induced HO-1, GPx, SODIII, Catalase and SODII gene expressions slightly ($P < 0.05$). ALC protected the HEI-OC1 cells especially from CDDP-RT combination induced

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

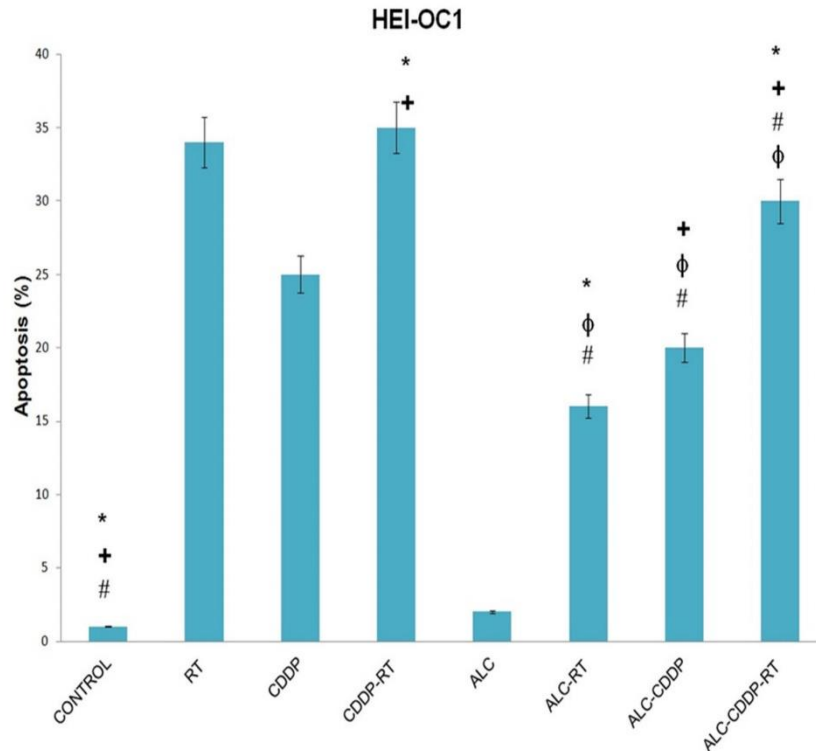


Figure 2. Effect of ALC on CDDP, RT and CDDP-RT induced apoptotic cell death in auditory cells. After pretreatment with 50 μ m Acetyl-L-carnitine (ALC), auditory cells were protected from 50 μ m cisplatin (CDDP), 5 Gray radiation (RT) and CDDP-RT induced apoptotic cell death at 72 h. Values represent the mean $\pm$ SEM of 6 observations (Mann-Whitney-U, $p < 0.05$). (* $P < 0.05$ versus RT, * $P < 0.05$ versus CDDP, * $P < 0.05$ versus CDDP-RT, * $P < 0.05$ versus ALC).

toxicity through inducing Nrf2 and related anti-oxidant gene expressions (**Figure 6**) ($P < 0.05$). ALC-CDDP-RT combinations induced almost all gene expressions of Nrf2, GR, SODII, Catalase, GPx, and mainly NQO1, SODIII, HO-1 and GST genes except GCL when compared to the control group ($P < 0.05$).

Discussion

Ototoxicity is the main dose limiting side effect for children or adult patients when a combination of RT and CDDP is used in the clinic. However, chemoradiation is the major risk for hearing loss especially in childhood. Formation of platinum metabolites with the radiation induced free oxygen radicals together may cause further damage through increasing DNA damage to hair cells [3]. Furthermore, the main mechanism behind the ototoxicity of the CDDP-

RT combination is a possible augmentation of apoptosis. This study revealed that CDDP, RT and CDDP-RT combinations inhibited cochlear cell viability and induced apoptotic cell death. ROS generation, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential changes were determined, linked to CDDP, RT and CDDP-RT combinations in cochlear cells. However, researchers have studied many potential chemoprotective agents that reduce the adverse reactions induced by cisplatin or radiotherapy including ebselen [3], resveratrol [12], erdostein [4] and buccillamine [13].

ALC is a natural anti-oxidant compound that has essential roles in intermediary metabolism linked to the facilitating essential fatty acid entry and exit from mitochondria. Previous studies demonstrated that L-carnitine or ALC gave protection from RT related toxicities in

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

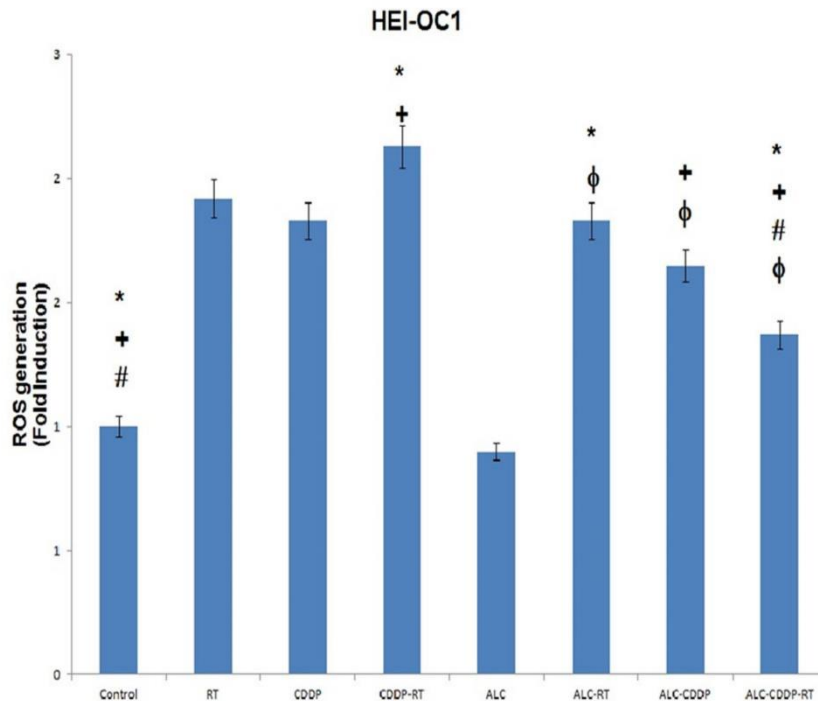


Figure 3. Pharmacological inhibition of CDDP, RT and CDDP-RT induced ROS generation in HEI-OC1 cells with ALC. Cells were treated with 50 μ M ALC for 30 min and further incubated with 50 μ M CDDP, 5 Gy RT and CDDP-RT for 72 h. After 72 h, the level of intracellular ROS was monitored using a fluorescent probe, DCFH-DA. The data represented the mean $\pm$ S.E.M. of six independent experiments (Mann-Whitney-U, $P < 0.05$). (* $P < 0.05$ versus RT, * $P < 0.05$ versus CDDP, * $P < 0.05$ versus CDDP-RT, * $P < 0.05$ versus ALC).

vivo and *in vitro* in different ways [2, 9, 14-16]. Another *in vivo* study showed that hepatic and lung toxicity due to total body irradiation was prevented by ALC through the activation of an antioxidant defense mechanism [14]. Furthermore, L-carnitine protected the brain, retinal, renal, ovary and ileal tissues from damage caused by irradiation in short and long time periods by up-regulation of antioxidant enzyme activities and inhibiting apoptotic cell death mechanism [2, 15, 16]. Up to date, only Altas and et al. has shown that L-carnitine has protective effect against RT induced damage in cochlea, *in vivo* [10]. They showed that intraperitoneal L-Carnitine treatment reduced the degeneration of stria vascularis and hair cells in total cranial irradiated guinea pigs. ALC has also immunostimulatory effects on CDDP or RT induced damages shown by *in vivo* and *in vitro* studies [1, 8]. However, how ALC protects auditory cells from CDDP, RT or CDDP-RT-induced damage in cochlear cells remains unclear.

In this study, ALC markedly suppressed RT-CDDP mediated ROS generation and mitochondrial membrane potential changes in auditory cells. RT-CDDP induced lipid peroxidation levels were inhibited by ALC. Moreover, RT-CDDP induced apoptotic cell death decreased with ALC pretreatment of HEI-OC1 cells. The protective mechanism of ALC from RT-CDDP induced toxicity might be related to mitochondrial stability of apoptotic cell death. Additionally, under stress conditions such as CDDP and RT chemoradiation of cells, Nrf2 translocate from the cytoplasm into the nucleus to stimulate transcription of heme oxygenase-1 and other cytoprotective enzymes through binding to antioxidant responsive elements. Therefore, Nrf2 and related antioxidant gene expressions were also determined in this study through RT, CDDP or CDDP-RT combination induced auditory cell damage model. One study showed that after 24 h CDDP treatment of auditory cells erdosteine increased the downstream

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

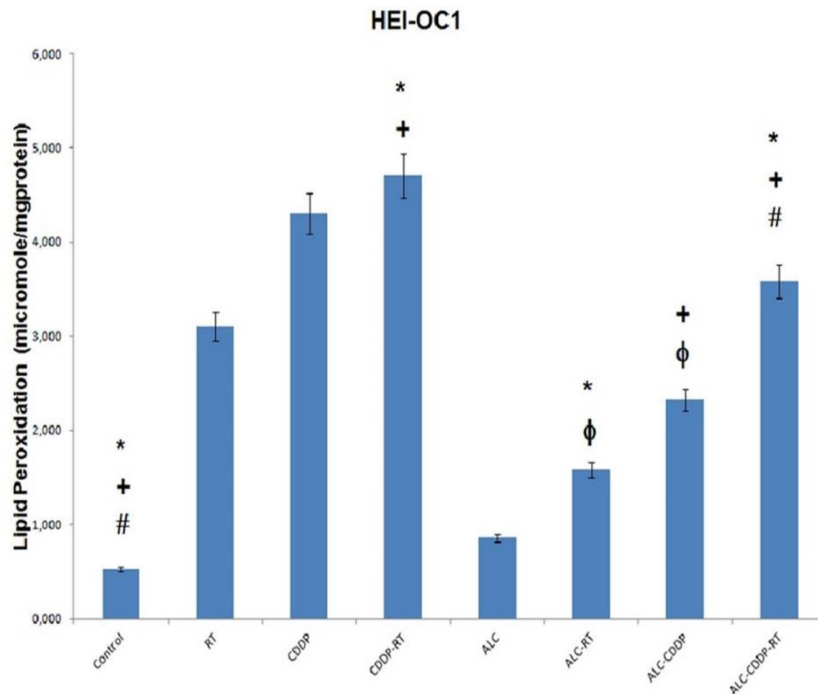


Figure 4. Effect of ALC on CDDP, RT and CDDP-RT induced lipid peroxidation. Lipid peroxidation induction (HPLC analysis) at 72 h in HEI-OC1 cells with CDDP (50 μ M), RT (5 Gy) and CDDP-RT were determined. Values represent the mean $\pm$ SEM of 3 observations.

of Nrf2 antioxidant genes of HO-1 and SOD II and glutathione biosynthesis related genes of glutathione synthetase [13]. In agreement with this study and related to CDDP ototoxicity we showed that ALC-CDDP treatment significantly induced Nrf2 and GST gene mRNA expressions, while CDDP alone did not affect these genes in our ototoxicity model. There are some differences between these studies regarding the doses and incubation times of CDDP treatments. Another agent flunarazine only increased the expression of an endogenous molecule, HO-1 that protects against oxidative stress, in HEI-OC1 cells linked to Nrf2 [5]. However, mRNA expression profiles of other Nrf2-regulated genes, such as NQO1, catalytic and modifier subunits of GCL, GSTm-1, and GSTA4, were not affected by flunarazine in the presence of cisplatin. Kim et al. [13] showed that bucillamine also prevented cisplatin induced auditory cell death by Nrf2 and related to redox regulation of GSH system of genes such as catalytic subunit of GCL. Similar to our

study, Kim et al. [3] showed that ebselen considerably increased the mRNA expression levels of HO-1 and NQO1 in cisplatin-treated HEI-OC1 cells.

Up to date there was no study about the possible protective molecular mechanism of carnitine against radiation induced auditory cell damage in the literature. In the present study, we firstly showed that ALC inhibited oxidative stress and apoptotic cell death induced by RT or RT-CDDP. Moreover, this protection was elucidated by Nrf2 related mechanism in auditory cells. ALC-RT induced SODIII and NQO1, while RT alone induced GPx and SODIII gene mRNA expressions. ALC significantly showed the maximum protective effect on the Nrf2 and mediated antioxidant gene expressions when the cells were exposed to chemoradiation (RT-CDDP) together. The approximately all of the Nrf2 and target gene expressions were induced by ALC pretreatment after RT-CDDP treatment in auditory cells. The most increased genes were GST,

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

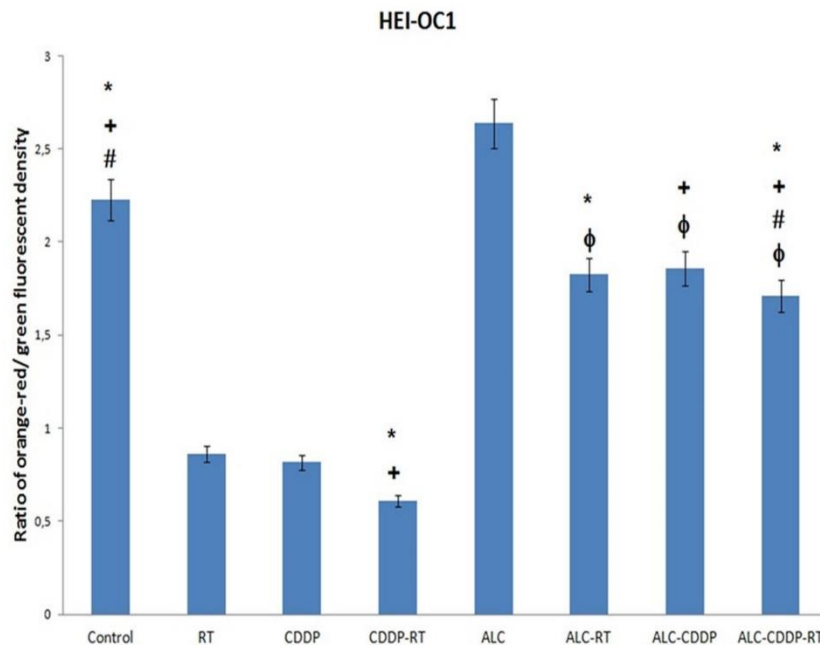


Figure 5. Effect of ALC on CDDP, RT and CDDP-RT induced mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) changes assayed by JC-1 assay. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M of 6 observations. RT (5 Gy), CDDP (50 μ m) and CDDP-RT reduced mitochondrial membrane potential at 72 h in HEI-OC1 cells. ALC was increased decline of mitochondrial membrane potential in cells with CDDP, RT and RT-CDDP combination (Mann-Whitney-U, $P < 0.05$). (* $P < 0.05$ versus RT, $^{\#}P < 0.05$ versus CDDP, $^{\phi}P < 0.05$ versus CDDP-RT, $^{\circ}P < 0.05$ versus ALC).

HO-1, SODIII and NQO1 with ALC against to RT-CDDP. Furthermore, Nrf2, GR, SODII, Catalase and GPx gene expressions were induced with a combination of ALC-RT-CDDP. Our previous study revealed that ALC has anti-inflammatory features and activating anti-apoptotic Akt1 expressions might be related to Nrf2 pathway in this protection [1]. This is the first study to show that ALC protected auditory cells against RT-CDDP mediated ototoxicity. This was achieved through Nrf2 and detoxifying target gene expressions.

In conclusion, CDDP, RT and CDDP-RT resulted in oxidative stress and apoptosis and altered Nrf2 related gene expressions in auditory cells. Inhibition of oxidative stress and upregulation of Nrf2 related gene expressions in the presence of ALC significantly reduced oxidative stress. Our data suggests that ALC has protective effects on CDDP, RT and CDDP-RT induced ototoxicity by regulating Nrf2 related phase II detoxifying and antioxidant genes. Therefore,

ALC might be a promising protective agent against RT or CDDP-RT induced ototoxicity like as CDDP. Further *in vivo* translational molecular mechanistic studies must be done concerning Acetyl-L-carnitine and the toxic side effects of radiation and cisplatin.

Acknowledgements

We would like specially to thank Professor F. Kalinec for providing HEI-OC1 cells. This study was supported by a grant from Dokuz Eylul University Research Foundation (Project 2012. KB.SAG.107). This research has been carried out at the Institute of Oncology Basic Oncology Laboratory and Medical School (Learning Resources Centre) Research Laboratory of Dokuz Eylul University. Some part of the results of this study was presented at 21st National Cancer Congress (22-26.04.2015), EACR-Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress (18th-19th of May 2015) and 30th Politzer Society Meeting 1st World Congress of

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

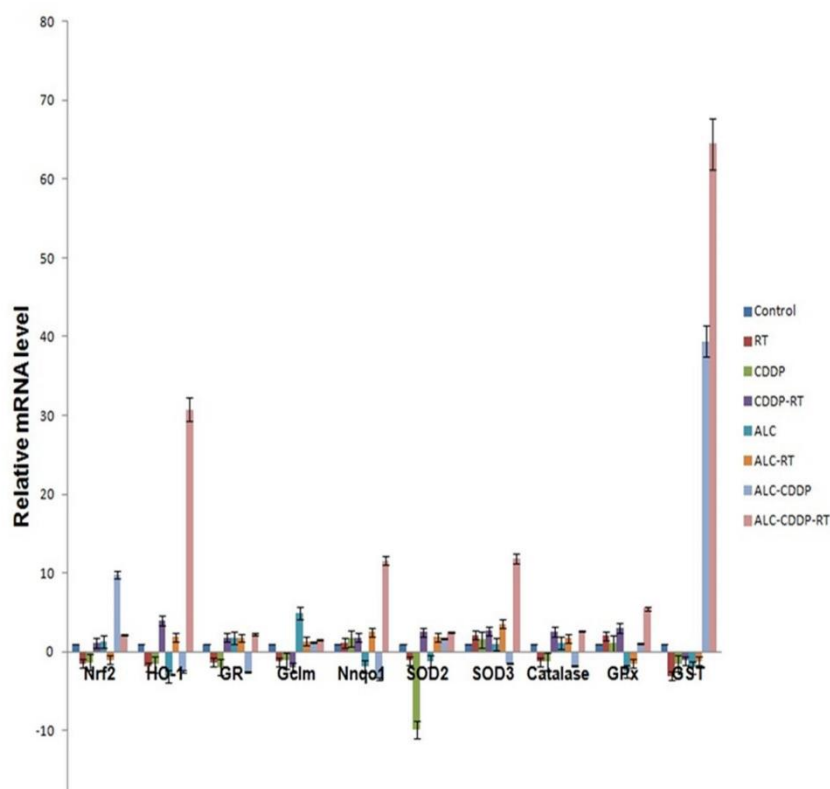


Figure 6. Effect of ALC on CDDP, RT and CDDP-RT induced Nrf2 and target gene expressions. Acetyl-L-Carnitine (ALC) induces the relative expression levels of Nrf2 and phase II antioxidants and detoxifying genes at 72 h in HEI-OC1 cells treated with CDDP and mainly CDDP-RT. Cells were pretreated with 50 μ M ALC for 1 h followed by the addition of 50 μ M CDDP, 5 Gy RT and CDDP-RT at 72 h. Expression levels of Nrf2, mHO-1, Nnqo1, SOD3 and GST were significantly increased by the treatment with ALC as compared with CDDP and CDDP-RT at 72 h ($P < 0.05$).

Otology (June 30- July 3, 2015) as poster presentations.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Dr. Zekiye Altun, Department of Basic Oncology, Dokuz Eylul University, Oncology Institute, Inciralti, 35340, Izmir, Turkey. Tel: + 90 232 4128204; Fax: +90 232 278 58 95; E-mail: zekiyesaltun@gmail.com; zekiye.altun@deu.edu.tr

References

- [1] Altun Z, Olgun Y, Ercetin P, Aktas S, Kirkim G, Serbetcioglu B, Olgun N, Guneri EA. Protective effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and
- [2] Akpolat M, Gulle K, Topcu-Tarlacalisir Y, Safi Oz Z, Bakkal BH, Arasli M, Ozel Turkcu U. Protection by L-carnitine against radiation-induced ileal mucosal injury in the rat: pattern of oxidative stress, apoptosis and cytokines. *Int J Radiat Biol* 2013; 89: 732-740.
- [3] Kim SJ, Park C, Han AL, Youn MJ, Lee JH, Kim Y, Kim ES, Kim HJ, Kim JK, Lee HK, Chung SY, So H, Park R. Ebselen attenuates cisplatin-induced ROS generation through Nrf2 activation in auditory cells. *Hear Res* 2009; 251: 70-82.
- [4] Kim SJ, Park C, Lee JN, Lim H, Hong GY, Moon SK, Lim DJ, Choe SK, Park R. Erdosteine protects HEI-OC1 auditory cells from cisplatin toxicity through suppression of inflammatory cytokines and induction of Nrf2 target proteins. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 288: 192-202.
- [5] So H, Kim H, Kim Y, Kim E, Pae HO, Chung HT, Kim HJ, Kwon KB, Lee KM, Lee HY, Moon SK,

pro-inflammatory cytokines. *Cell Prolif* 2014; 47: 72-80.

ALC protects HEI-OC1 from RT and CDDP toxicities

- Park R. Evidence that cisplatin-induced auditory damage is attenuated by downregulation of pro-inflammatory cytokines via Nrf2/HO-1. *J Assoc Res Otolaryngol* 2008; 9: 290-306.
- [6] Altun ZS, Gunes D, Aktas S, Erbayraktar Z, Olgun N. Protective effects of acetyl-L-carnitine on cisplatin cytotoxicity and oxidative stress in neuroblastoma. *Neurochem Res* 2010; 35: 437-443.
- [7] Gunes D, Kirkim G, Kolatan E, Guneri EA, Ozogul C, Altun Z, Serbetcioglu B, Yilmaz O, Aktas S, Mutafoğlu K, Tufekci O, Erbayraktar Z, Olgun N. Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity. *Chemotherapy* 2011; 57: 186-194.
- [8] Ahmed MM, Ibrahim ZS, Alkafafy M, El-Shazly SA. L-carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochem* 2014; 116: 1046-1055.
- [9] Babicová A, Havlíková Z, Hroch M, Rezáčová M, Pejchal J, Vávrová J, Chládek J. In vivo study of radioprotective effect of NO-synthase inhibitors and acetyl-L-carnitine. *Physiol Res* 2013; 62: 701-710.
- [10] Altas E, Ertekin MV, Gundogdu C, Demirci E. L-carnitine reduces cochlear damage induced by gamma irradiation in Guinea pigs. *Ann Clin Lab Sci Summer* 2006; 36: 312-318.
- [11] Kalinec GM, Webster P, Lim DJ, Kalinec F. A cochlear cell line as an in vitro system for drug ototoxicity screening. *Audiol Neurotol* 2003; 8: 177-189.
- [12] Olgun Y, Altun Z, Aktas S, Eroetin P, Kirkim G, Kiray M, Bagriyanik A, Ozogul C, Serbetcioglu B, Guneri EA. Molecular mechanism of protective effect of resveratrol against cisplatin induced ototoxicity. *Int Adv Otol* 2013; 9: 145-152.
- [13] Kim SJ, Ho Hur J, Park C, Kim HJ, Oh GS, Lee JN, Yoo SJ, Choe SK, So HS, Lim DJ, Moon SK, Park R. Bucillamine prevents cisplatin-induced ototoxicity through induction of glutathione and antioxidant genes. *Exp Mol Med* 2015; 20: e142.
- [14] Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res* 2006; 54: 165-171.
- [15] Sezen O, Ertekin MV, Demircan B, Karşlıoğlu I, Erdoğan F, Koçer I, Calik I, Gepdiremen A. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced brain and retinal damages. *Neurosurg Rev* 2008; 31: 205-213.
- [16] Caloglu M, Caloglu VY, Yalta T, Yalcin O, Uzal C. The histopathological comparison of L-carnitine with amifostine for protective efficacy on radiation-induced acute small intestinal toxicity. *J Cancer Res Ther* 2012; 8: 260-265.