



T.C
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSPLATİN'E BAĞLI ÜROGENİTAL ORGAN TOKSİSİTESİNE
KARŞI KUVERSETİNİN OLASI KORUYUCU ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

SELİN ÇADIRCI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECZACILIK FAKÜLTESİ
FARMAKOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. GÖKSEL ŞENER

2015- İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Farmakoloji
Tez Sahibi : Selin ÇADIRCI
Tez Başlığı :Sisplatin'e Bağlı Ürogenital Organ Toksisitesine Karşı Kuversetin'in Olası Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi
Sınav Yeri : Farmakoloji ABD
Sınav Tarihi : 22.10.2015

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Göksel ŞENER

Kurumu

Marmara Üniversitesi

İmza



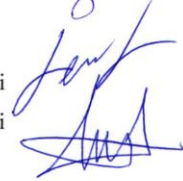
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Levent KABASAKAL

Marmara Üniversitesi

Prof. Dr. Tuğba TUNALI AKBAY

Marmara Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun **05.11.2015** tarih ve **57** sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Selin ÇADIRCI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca her konuda yakın yakın ilgi ve büyük desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Göksel Şener'e ve yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel ve manevi desteğini ve tecrübelerini bizden esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Levent KABASAKAL'a, dokuların analizi sırasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Şule ÇETİNEL'e, Yrd. Doç. Dr. Özge ÇEVİK'e teşekkür ederim.

Selin ÇADIRCI

BEYAN	İ
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii-iv
KISALTMALAR	v-vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	4
4.1. Sisplatin	4
4.1.1. Sisplatin' in Hücreye Alınması	7
4.1.2. Sisplatin' in sitotoksik etki mekanizması	7
4.1.3. Sisplatin' in Atılımı	10
4.1.4. Böbrek Tübül Hücresinde Sisplatin Sonrası Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler	10
4.2. Sisplatin' in Testislere Etkisi	11
4.3. Apoptoz	11
4.4. Oksidatif Hasar	13
4.5. Sitokinler	14
4.6. Flavanoidler	15
4.6.1. Kuversetin	16
5.GEREÇ VE YÖNTEM	18
5.1. Gruplar ve Deney Protokolü	18
5.2. Dokuların İzole Organ Banyosunda Yapılan İn Vitro Çalışmalar İçin Hazırlanışı	19
5.3. Dokularda Yapılan Tayinler	20
5.3.1. Malondialdehit (MDA) Tayini	20
5.3.2. Glutatyon (GSH) Tayini	20
5.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	21
5.3.4. Kaspaz-3 aktivite tayini	21

5.3.5. Kaspaz-3 proteini western blot ile tespiti	21
5.4. Oksidatif DNA hasarı ölçümü	23
5.5. İstatistiksel Analiz	23
6.BULGULAR	
6.1. İzole Organ Banyosu Çalışmaları	24
6.1.1. Korpus kavernozum kasılma ve gevşemeleri	24
6.1.2. Mesane dokusunun karbakole verdiği kasılma yanıtları	24
6.2. Doku Örneklerinde Yapılan Ölçümler	26
6.2.1. Dokularda GSH düzeyi	29
6.2.2 Dokulara MDA düzeyleri	29
6.2.3 Dokularda SOD düzeyleri	31
6.2.4 Dokularda kaspaz-3 düzeyleri	33
6.2.5. Dokuda oksidatif DNA hasarı düzeyleri	35
6.3.Serum Örneklerinde Yapılan Ölçümler	42
6.3.1. Serumda oksidatif DNA hasarı düzeyleri	44
7.TARTIŞMA VE SONUÇ	44
8.KAYNAKLAR	45
9.ÖZGEÇMİŞ	49
EKLER	55
EK 1. Diğer Bilimsel Faaliyetler	56
EK 2. Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Karar Formu	57

KISALTMALAR

8-OHdG: 8-hidroksideoksiguanozin

ANOVA: Analysis of Variance (Varyans analizi)

AP-N: Diaminopeptidaz N

APS: Amonyum persülfat

CAT: Katalaz

cAMP: Siklik adenzin monofosfat

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

Dr.: Doktor

DMTU: Dimetiltiyöüre

DNA: Deoksribonökleik asit

DTNB: Ditiyo nitro benzen

DTT: Ditiyotreitöl

EC₅₀: Etkin konsantrasyon 50

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

FE: Fenilefrin

ERK: Ekstraselöler regulated kinase (Hücre dışında düzenleyici kinazlar)

GGT: Gama glutamin transpeptidaz

Gli: Glisin

GSH: Glutasyon

GSHPx: Glutasyon peroksidaz

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HEPES: Hidroksietil piperazinetansülfonik asit

IL-1Beta: İnterlökin beta

IL-4, IL-13 ve IL-5: İnterlökin 4,5,13

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

İ.v: İntrevenöz

JNK: Jun N-terminal kinaz

KT: Kuversetin

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LP: Lipid peroksidasyonuna

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Mitojenin aktive ettiği protein kinaz)
MDA: Malondialdehit
NF: Nefrotoksisite
NO: Nitrik oksit
O₂^{•-}: Süperoksit anyonu
P: Anlamlılık değeri
Pt: Platinyum
RNA: Ribonükleikasit
ROM: Reaktif oksijen metabolitleri
SAPK: Stres-activated protein kinaz (Stresle aktive olan protein kinaz)
SSS: Santral sinir sistemi
SDS: Sodyum dedosil sülfat
SF: Serum fizyolojik
Sis: Sistein
SOD: Süperoksir dismutaz
SP: Sisplatin
TBA: Tiyobarbitürik asit
TCA: Trikloroasetik asit
TEMED: Tetrametilendiamin
TNF-alfa: Tümör nekroz faktör- alfa
TNFR-1: Tümör nekroz faktör reseptör-1

ŞEKİLLER

Şekil-1: Sisplatin'in moleküler yapısı

Şekil 2: DNA-sisplatin zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar

Şekil-3: Sisplatin nefrotoksitesisi için ileri sürülen biyokimyasal mekanizma

Şekil 4: Sisplatin nefrotoksitesisinde önerilerin apoptotik yolak

Şekil-5: Sisplatine bağlı akut tübüler hücre hasarı yolakları.

Şekil-6: Kuversetin'in kimyasal yapısı.

Şekil-7: Korpus kavernosum dokusunun fenilefrine verdiği kasılma yanıtları

Şekil-8: Korpus kavernosum dokusunun karbakole verdiği gevşeme yanıtları

Şekil-9: Mesane dokusunun karbakole verdiği kasılma yanıtları

Şekil 10: Dokulara ait glutatyon (GSH) sonuçları

Şekil 11: Dokulara ait malondialdehit (MDA) sonuçları

Şekil 12: Dokulara ait süperoksit dismutaz (SOD) sonuçları

Şekil 13, 14, 15, 16: Dokulara ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri sonuçları

Şekil 17: Dokuda oksidatif DNA hasarı sonuçları

Şekil 18: Serumda oksidatif DNA hasarı sonuçları

TABLULAR

Tablo 1: Sisplatin hasarını meydana getiren temel mekanizmalar

Tablo 2: SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı

Tablo 3: Korpus kavernozum dokusunda kümülatif olarak uygulanan fenilefrin ve karbakol ile alınan kasılma ve gevşeme yanıtlarında EC₅₀ değerleri.

Tablo 4: Mesane dokusunda kümülatif olarak uygulanan karbakol ile alınan kasılma yanıtlarında EC₅₀ değerleri.

Tablo 5: Dokulara ait glutatyon (GSH) sonuçları

Tablo 6: Dokulara ait malondialdehit (MDA) sonuçları

Tablo 7: Dokulara ait süperoksit dismutaz (SOD) sonuçları

Tablo 8, 9, 10, 11: Dokulara ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri sonuçları

Tablo 12: Dokuda oksidatif DNA hasarı sonuçları

Tablo 13: Serumda oksidatif DNA hasarı sonuçları

Sisplatin'e bağlı ürogenital organ toksisitesine karşı kuversetin olası koruyucu etkilerinin incelenmesi

Öğrencinin Adı: Selin ÇADIRCI

Danışmanı: Prof. Dr. Göksel ŞENER

Anabilim Dalı: Farmakoloji Anabilim Dalı

1.ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, sisplatin'e bağlı ürogenital organ toksisitesine karşı kuversetin olası koruyucu etkilerinin incelemektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 4 aylık erkek sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 4 gruba (kontrol+ SF, kontrol+kuversetin, sisplatin+SF, sisplatin+kuversetin) ayrılmıştır. Hayvanlara eter anestezisi uygulanarak oral gavaj aracılığı ile 21 gün boyunca SF ve kuversetin uygulanmıştır. Dekapitasyon sonrası kan ve doku (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum) örnekleri alınmıştır. Kanda DNA hasarı, dokularda apoptotik belirteçler, antioksidan ve oksidatif stres parametreleri incelenmiştir. Mesane ve korpus kavernozum dokularında izole organ banyosunda izometrik kasılma çalışmaları yapılmıştır. Bulgular Graphpad Prism v5 programı ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Yapılan izometrik kasılma çalışmaları sonucu korpus kavernozum ve mesane dokularının kasılmalarında iyileşme gözlemlenirken, kaverno dokunun gevşeme yanıtları incelendiğinde kuversetin herhangi iyileştirici etkisi gözlemlenmemiştir. Alınan dokularda, apoptotik belirteçlerden kaspaz-3 ve oksidatif stres parametrelerinden 8-OHdG, malondialdehit, glutatyon, süperoksit dismutaz düzeylerinde olumlu etkileri olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Sisplatin'e bağlı ürogenital organ toksisitesine karşı kuversetin koruyucu etkileri gözlemlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Sisplatin, kuversetin, antioksidan sistem, apoptoz, ürogenital organlar.

Investigation of the possible protective effects of quersetin against cisplatin-induced urogenital organ toxicity.

Student Name: Selin CADIRCI

Supervisor: Prof. Dr. Göksel ŞENER

Department: Pharmacology

2.SUMMARY

Aim: The aim of this study is investigate of the possible protective effects of quersetin against cisplatin-induced urogenital organ toxicity.

Material and Method: In the study, animals were divided into 4 groups (control+SF, control+quercetin, cisplatin+ SF, cisplatin+quercetin). For 21 days, quercetin and SF was administered to the animals via oral gavage under ether anesthesia. After decapitation, blood and tissue (kidney, bladder, testis, corpus cavernosum) samples were collected. In blood DNA damage and in tissue samples apoptotic, antioxidant and oxidative stress parameters were examined. In isolated tissue bath, isometric contraction study was performed with corpus cavernosum and bladder tissues. Data was assessed with Graphpad Prism v5 program.

Results: As a result of performed isometric contraction of the corpus cavernosum and bladder tissues improvements was observed but when we examined cavernosum tissue's relaxation responses, there was not any healing effects of quercetin. Apoptotic parameter caspase-3 and oxidative stress parameters, 8-OHdG, malondialdehyde, glutathione, superoxide dismutase showed significant improvements.

Conclusion: Quercetin improved cisplatin dependent reproductive organ toxicity and provided benefits in apoptosis, oxidative stress parameters.

Key Words: Cisplatin, quercetin, antioxidant system, apoptosis, reproductive organ

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Sisplatin organik platin türevli ilaçlardan tedaviye ilk giren kemoteropatik bir ajandır. Testis, over, mesane, prostat, baş ve boyun kanserleri gibi çeşitli solid kanser tedavilerinde kullanılmaktadır (Sener ve ark., 2000). Nefrotoksisite ve sitotoksitesi kullanımını kısıtlayan majör etmenlerdendir. Böbreklerde yüksek konsantrasyonda sisplatin bulunması ve bunun renal taşıyıcı sistem üzerine yan etkileri nefrotoksitenin oluşmasına neden olur. Glomerüler filtrasyon hızı azalır, kreatinin seviyesi artar, hipomagnezmi ve hipokalemi görülür. İlacın proksimal tüpte lokal olarak birikmesi, hücre içinde toksik metabolitlere dönüşmesi sonuçta böbrekte hasarlara yol açmaktadır (Dos Santos ve ark.,2012). Hücre içine girerek DNA'da guaninin azot atomu ile kovalent bağ yapar. Böylece her bir DNA zincirinde veya çift sarmalı oluşturan zincirler arasında çapraz bağların oluşmasına neden olur. Oluşan bağlar sitotoksik etkidenden sorumludur. DNA çoğalmasını ve RNA sentezlenmesini engeller (Kanter ve ark.,2007).

Sisplatinin nefrotoksik etkisinin temelinde yatan mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, oksidatif stresin önemli rolü olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Sisplatin uygulaması sonrası böbrekte süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidrosil radikalleri ($\bullet OH$) artmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller ise hücre membranında lipid peroksidasyonuna, proteinlerin yapısını bozarak hücre hasara neden olmaktadır. Ayrıca serbest radikaller mitokondrial disfonksiyona da neden olmaktadır (Kawai ve ark., 2006; Gulec ve ark., 2006).

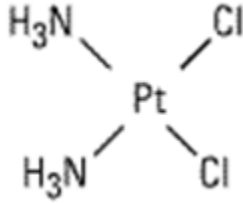
Kuversetin flavonoid ailesinden olan önemli bir antioksidandır ve insan sağlığı üzerine faydalı etkileri olduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktivitesi yanında antiviral, antibakteriyel, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar etkileri vardır (Materska, 2008). Sisplatin toksisitesi daha çok böbrek üzerinde çalışılmış olup diğer dokularda yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır ve kuversetin sisplatin toksisitesinde rolü ürogenital organlarda çalışılmamıştır. Bu nedenle sisplatin toksisitesinde kuversetin etkileri böbrek, mesane, kavernoza ve testis dokularında incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Sisplatin

Platin bileşikleri, diğer antineoplastik ilaçlardan farklı olarak organik platin türevli geniş spektrumlu ilaçlardır. Bu gruptaki ilaçlardan tedaviye ilk giren sisplatindir. Rosenberg sisplatinin antineoplastik özelliğini şans eseri bulmuştur. Sisplatin elektriksel alanda “bakteriyel büyüme oranı” araştırmaları sonucunda keşfedilmiştir. Araştırmacılar platin elektrotları üzerinde elektrik potansiyeli oluşturulduğu zaman alanda üreme olmadığı dolayısıyla sisplatinin hücre bölünmesini inhibe ettiğini fark etmişlerdir.

Moleküler yapı daha sonra tespit edilmiş, iki klorid iyonu ile iki amin grubunun tetravalent platinyum atomu ile cis konfügurasyonu ile bağlandığı belirtilmiştir. Sisplatin ve onun bir analogu olan karboplatin, diğer tedavi yöntemlerine cevap vermeyen tümör tiplerinin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Rosenberg,1985).



Şekil-1: Sisplatin' in moleküler yapısı

Sisplatin, testis, over, mesane, prostat, baş ve boyun kanserleri gibi çeşitli solid kanser tedavilerinde kullanılmaktadır ancak nefrotoksitesisi ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Mide-barsak kanalından absorbe edilmez; sadece i.v uygulanır.

Sisplatin dokulara, plazma proteinlere %90 oranında bağlanır ve kısmen geri dönüşümsüz olarak DNA ile etkileşime girer; bu özelliğinden ötürü sitotoksiktir. Uygulamadan 4 ay sonra dokuda platin saptanabilir. Diğer alkilleyici antineoplastik ilaçlar ile olduğu gibi, sisplatin de DNA hasarına ve hücre büyümesinin yavaşlamasına neden olur, ancak proksimal renal tübüller üzerindeki etkisi ile bu hücrelerde hasara yol açar (Chen ve ark.,2013; Howland ve Mycek, 2009).

Sisplatin nefrotoksisitesinde iki temel faktör vardır: böbreklerde yüksek konsantrasyonda sisplatin bulunması ve bunun renal taşıyıcı sistem üzerine yan etkileri. Renal fonksiyon bozukluğu tek doz sisplatin ile tedavi edilen hastalarda %25-35 civarındadır. İ.v uygulamadan 10 gün sonra glomerüler filtrasyon %20-40'a düşmüştür. Kreatinin seviyesi artmıştır, glomerüler filtrasyon hızı azalmış ve hipomagnezmi ve hipokalemi görülmüştür. İlacın proksimal tüpte lokal olarak birikmesi, hücre içinde toksik metabolitlere dönüşmesi sonuçta böbrekte hasarlara yol açmaktadır (Dos Santos ve ark.,2012).

Sisplatin, tübüler nekroza yol açarak akut böbrek yetmezliğine ve su-elektrolit bozukluklarına neden olur. Uzun süre sisplatin uygulanması sonrasında ise küçük-orta dereceli arter hasarı ve glomerüler ve intersistiyel hasarlar nedeniyle kronik böbrek hastalığı gözlenmiştir (Sanchez-Gonzalez ve ark.,2011).

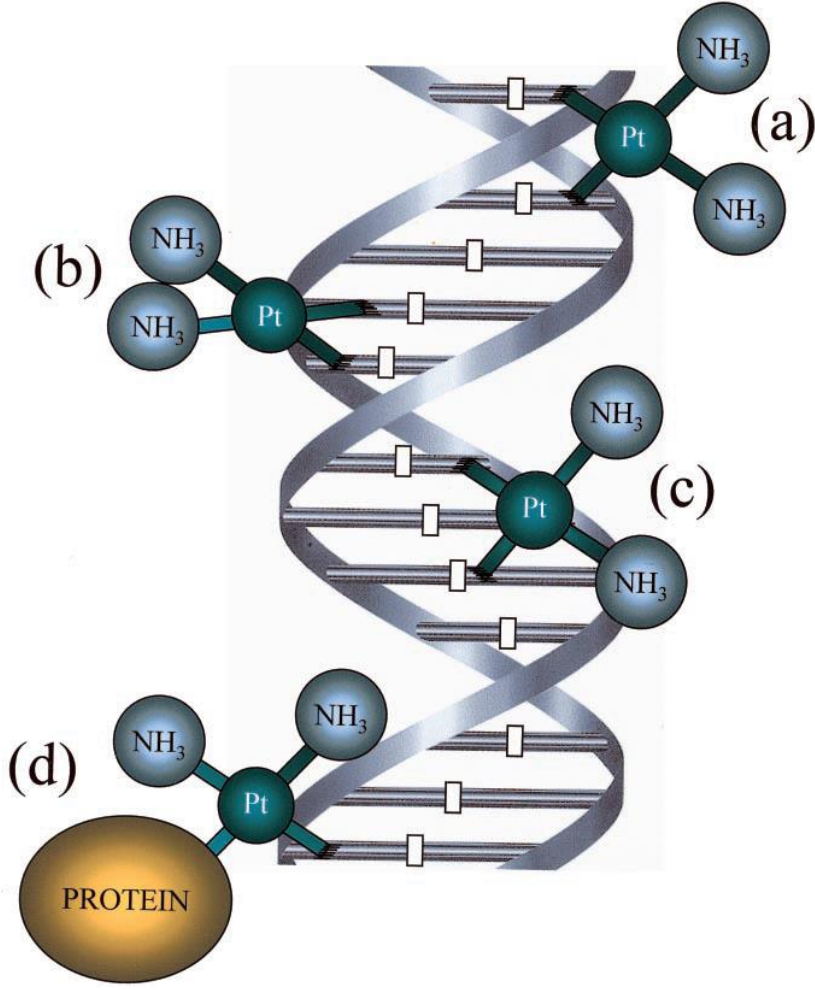
Sisplatin nefrotoksisitesinin direkt ve indirekt olmak üzere 2 farklı şekilde meydana geldiği bildirilmiştir. Renal tübüllerde, böbrek damar yapısında ve glomerüllerdeki direkt etki renal kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını azaltır. Sisplatin indirekt olarak da renal interstisyumda inflamasyona yol açarak akut hasara ve daha sonra kronik interstisyel fibroza yol açar. Fibroz dönüşümsüz böbrek hasarının en önemli göstergesidir.

Düşük molekül ağırlıklı ve nötral yapıdaki sisplatin glomerüllerden hızla süzülür. Tübül hücrelerine girer; buradaki konsantrasyonu plazma konsantrasyonunun beş katı kadardır. İntraselüler maksimum sisplatin konsantrasyonu sitozol, mitokondri, nükleus ve mitokondride bulunur. Düşük sisplatin konsantrasyonunda, sisplatinin iki klor atomu hidroksil grubu ile yer değiştirir, böylece daha toksik platinyum bileşikleri oluşur. Proksimal tübüllerin epitel hücresinde sisplatin toksisitesi tübüler nekroz ile karakterizedir (mikrovilus kaybı, lizozom sayısı ve şeklinde değişiklikler, mitokondrial vakuolleşme) (Cunha ve Peres,2013).

Tablo 1: Sisplatin hasarını meydana getiren temel mekanizmalar (Kuhlmann ve ark., 1997)

Primer etkiler	Sekonder etkiler
Protein sentezinin inhibisyonu - Nükleolar hasar - Ribozomal bozukluk	Taşıyıcı Proteinlerin inaktivasyonu
	Lipid Peroksidasyonu
Glutatyon(GSH) ve protein-SH bozulması - Sitoplazma - Mitokondri	Mitokondrial Hasar - Na ⁺ , K ⁺ -ATPaz inhibisyonu - Ca ⁺⁺ alınımında azalma - ATP bozulması - Membran potansiyali kaybı

Sisplatin DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Oluşan bağlar sitotoksik etkiden sorumludur; çünkü bu çapraz bağlar DNA'nın çoğalmasını ve RNA'nın sentezini engeller. Sisplatin'in bağlandığı DNA, yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozu uyarır. Bu hasar onarılamayacak boyutta olduğunda, hücre tarafından tolere edilemez ve hücrenin ölümüne neden olur (Kanter ve ark.,2007).



Şekil 2: DNA-sisplatin zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar (a) zincirler arası çapraz bağ (b),1,2-zincir içi çapraz bağ. (c), 1,3-zincir içi çapraz bağ.(d), protein-DNA çapraz bağ (Gonzalez ve ark., 2001)

Sisplatinin neden olduğu sitotoksitite hücre döngüsünün her aşamasında ortaya çıkabilir, ancak en fazla G₁ ve S evresinde olan hücreler etkilenir. Sisplatin proteinlere ve tiyol grubu içeren diğer organellere bağlanabilir (Howland ve Mycek, 2009). Sisplatin nefrotoksitesinde oluşan tübüler hücresel hasar uzun yıllar araştırmalara konu olmuştur. Hücresel toksisitide inflamasyon, oksidatif hasar ve apoptoz sorumlu tutulmuştur.

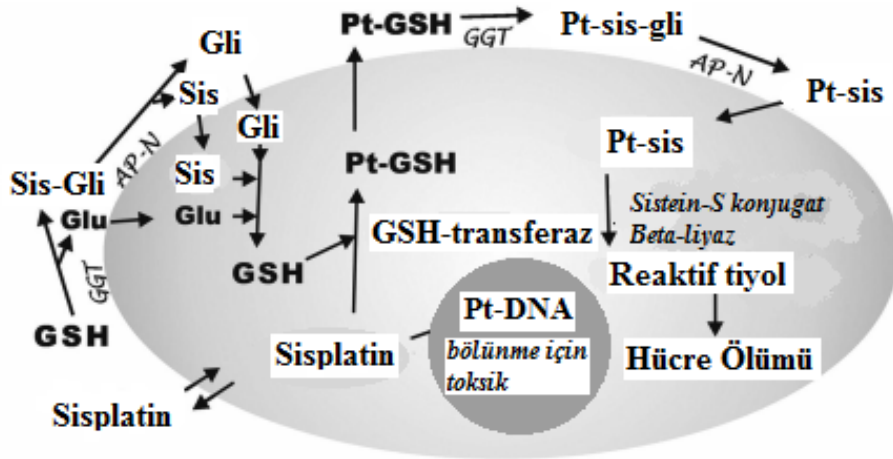
4.1.1. Sisplatin' in Hücreye Alınması

Sisplatin hücre içine bakır taşıyıcı ile girer. Hücre içinde klorür konsantrasyonu düşük olduğu için klorür platin molekülünden ayrılır. Platin ise DNA, RNA ve proteinlere bağlanır. Yapılan çalışmalar platin-DNA ürünlerinin hücre için toksik olduğunu göstermiştir. Bu toksisite özellikle hızlı büyüyen hücrelerde belirgindir (Devajaran ve Hanigan, 2003).

4.1.2. Sisplatin' in sitotoksik etki mekanizması

Sisplatin' in toksik etki mekanizmaları henüz net olarak açıklanamamış olmakla birlikte, bunlardan biri DNA ile birleşme sonucu oluşan artık ürünlerdir. Diğer bir mekanizma ise, sisplatin' in indirgenmiş glutatyon ile konjugasyonu sonucu oluşan reaktif tiyoller aracılığı ile nefrotoksisite oluşturmasıdır.

Sisplatin toksisitesinde Gama glutamin transpeptidaz (GGT) enziminin önemli rolü vardır. GGT ekstraselüler GSH'ı glutamil asit ve sistein-glisin'e ayırır. Diaminopeptidaz sistein-glisini sistein ve glisin olarak ayırır. Böylece, hücre dışı GSH kendini oluşturan aminoasitlere ayrılır ve GGT hücreye sistein kaynağı sunmuş olur. Ayrılan bu aminoasitlerin bir kısmı tekrar hücre içine alınır ve hücreye alınan aminoasitler ile GSH hücre içinde yeniden oluşturulur. Sisplatin, glutatyon-S-transferaz (GST) varlığında GSH ile birleşmekte Pt-GSH konjugatı oluşmaktadır. Oluşan Pt-GSH konjugatları oldukça kararsız yapıdadır. Pt-GSH konjugatları, GGT tarafından hücre dışında Pt-sistein-glisin konjugatlarına metabolize olur. Hücre içine alınan Pt-Sistein konjugatı, beta liyazlar aracılığı ile reaktif tiyollere dönüşür. Oluşan reaktif tiyoller, hücre ölümüne yol açabilirler. GGT'nin inhibisyonunun fare ve sıçanlarda sisplatin nefrotoksisitesini engellediği gösterilmiştir. Nitekim GGT geni olmayan sıçanlarda sisplatin toksisite oluşturamamıştır (Devajaran ve Hanigan, 2003; Ozgunes ve Sabuncuoglu, 2010).



Şekil-3: Sisplatin nefrotoksitesisi için ileri sürülen biyokimyasal mekanizma. GGT: gamma-glutamil transferaz; AP-N: diaminopeptidaz N; Sis: sistein; Gli: glisin, Glu: glutatyon

İndirgenmiş GSH memeli hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Temel antioksidan savunma sistemi olan GSH lipid peroksidasyon kontrol mekanizmasında güçlü bir faktördür. İntraselüler GSH %30 sitozolde, %70 mitokondride bulunur. Mitokondrial GSH iç membran permeabilitesini düzenlenmesinde çok önemlidir.

Platin bileşiği ile sülfidril grubunun etkileşimi sitotoksisiteyi destekleyen ikincil önemli faktördür. Platin molekülün SH grubuna yüksek afinitesinden ötürü, klorid kısmı sülfidril grubu ile yer değiştirir, bu nedenle platin bileşiği inaktive olur. Sisplatinin GSH ve protein SH ile bağlanması detoksifikasyonun ilk aşaması gibi görülsede, bu durum aslında hücre hasarına öncülük eden kaskadın başlamasını sağlar. Protein-S-Sisplatin bileşikler membran fonksiyon bozukluğuna ve sitoplazmada önemli enzim sistemlerinin aktivitelerinin azalmasına neden olur. Ayrıca, glutatyon-sisplatin ürünlerinin kararlı yapıları nedeniyle, serbest reaktif oksijen metabolitlerini temizlemeye yarayan mevcut indirgenmiş glutatyon sayısı azalır. Bu muhtemelen hücrel antioksidan savunma sistemine zarar verir, sonuç olarak lipid peroksidasyonuna (LP) neden olur. Yine de LP meydana gelebilmesi için hücrel GSH normale göre %30' dan aşağıda olmalıdır. Hücrel hasarın büyüklüğü, hücrel reaktif SH grubuna bağlıdır. Hücrel GSH' ın bozulması sisplatin toksisitesini artırır. Bu bilgiler doğrultusunda SH grubu veya SH indirgeyici ajan uygulamasının, sisplatine bağlı hasarı (in vivo- in vitro) önleyebileceği ileri sürülmüştür (Kuhlmann ve ark., 1997).

Toksik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda ve atılımında böbreklerdeki transport sistemleri ve metabolizma reaksiyonları önemli rol oynar. Diğer bir deyişle böbrekte ksenobiyotiklerden oluşan metabolitler nefrotoksisitede önemli rol oynar. Böbrekler kan akımının fazla olması nedeniyle yüksek konsantrasyondaki ksenobiyotik ve metabolitlerine fazla maruz kalır. Ksenobiyotikler her ne kadar karaciğerde metabolize olsalarda oluşan toksik ürünler diğer organlar bu organların transport sistemleri ile alınarak zarar verirler.

Glutasyon-S konjugat nefrotoksisiteye sebep olan yeni bulunmuş yolaklardan biridir. Glutasyon memeli hücrelerinde bulunan, düşük molekül ağırlıklı bir peptittir ve birçok hücreyel olaya katılır. Nükleofilik sülfür atomu ve glutasyonun antioksidan özelliklerinden dolayı, oksidanların ve ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesinde önemli bir faktördür. Ancak, son kanıtlar bu genellemenin her zaman doğru olmadığını göstermiştir ve glutasyon-S konjugatın bazen de toksik olabileceği söylenmiştir. Glutasyon-S konjugatın 3 tipi bulunmaktadır. Orta seviyeli olan, renal toksisite ile bağlantılı bulunmuş ve muhtemelen haloalkanlar, haloalkenler, hidrokinonlar ve aminofenoller renal toksisiteyi açıklayan bir mekanizma teşkil etmektedir (Tarloff ve Lash, 2006).

Platinyum-GSH konjugatları karaciğer ya da böbreklerde oluşur. Karaciğer’de sisplatin birikmesi geçicidir. Uygulanan sisplatinin yaklaşık %1’i 6 saat içinde safradan atılır. Sisplatinin GSH ile konjugasyonunun inhibisyonunun sisplatin nefrotoksisitesini (NF) azaltacağı düşünülmüş ve farelerde yapılan bir çalışmada ketoprofen uygulaması ile GST’in inhibisyonu sisplatin NF’sini azalttığı gösterilmiştir. Sıçanlarda ise GSH sentezinin inhibisyonu sisplatin karşı koruyucu olduğu gösterilmiş. (Devajaran ve Hanigan, 2003). Ancak aşağıda belirtildiği gibi, sisplatinin renal hücreleri öldürdüğüne dair olan moleküler mekanizma sisplatinin konsantrasyonuna ve hücrenin antioksidan seviyesine bağlıdır. Tiyol bileşikleri, klinik olarak sisplatin nefrotoksisitesini azaltmak için kullanılır. Sisplatin uygulamasını takip eden 30 dakika içinde yüksek doz i.v GSH injeksiyonu yapılırsa koruyucu etki gösterir. GSH seviyesinin koruyucu dozlara ulaşabilmesi için gerekli olan doz sisplatin dozunun 30-40 kat daha fazlasıdır. Bu veriler sisplatin-GSH konjugatının sisplatin nefrotoksine çevirir hipotezi ile çelişiyor gibi görünebilir ama

yüksek doz GSH, GGT önce açık yazılacak GGT aktivitesi ile yarışarak nefrotoksisiteyi inhibe eder. GSH, GGT'nin temel fizyolojik substratıdır. GGT hücre yüzeyinde bulunur ve ekstraselüler sıvıda yüksek oranda GSH tarafından inhibe edilir. GGT inhibisyonu ile GSH, sisplatin-GSH metabolizmasını dolayısıyla sisplatin-sistein-glisin konjugatı azalacaktır (Devajaran ve Hanigan, 2003). Birçok sülfür içeren bileşiğin; prokainomid, dietilditiyocarbamet, N-metil-D-glukomineditiyo karbamet, metimazol, sülfatiazol ve amifostin'in sisplatinin antitümör etkisini azaltmadan nefrotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (Jones ve ark.,1992; Borch ve ark., 1980; Yee ve ark., 1994; Korst ve ark., 1998; Osman ve ark., 2000).

Prokainomid antiaritmik bir ilaçtır ve sisplatine bağlanarak sisplatin-prokainamid bileşiğini oluşturur. Prokainamid varlığında daha fazla sisplatin DNA'ya bağlanır, buda antitümör aktivitesini devam ettirdiğini açıklar. Prokainamid sisplatin ile bağlanması sisplatin-GSH kompleksinin oluşmasını önler. Böylece, toksisite azaltılır (Viale ve ark., 2000).

Diğer tiyol grupları da sisplatin ile kompleks oluşturabilir fakat DNA-platin konjugatlarının oluşmasını önlemez. Buna karşı, sodyum tiyosülfat ve biotin'in her ikisinde nefrotoksisiteyi ve antitümör aktivitesini inhibe eder (Jones ve ark.,1992; Uozumi ve ark., 1984).

4.1.3. Sisplatin' in Atılımı

Sisplatin ağırlıklı olarak vücuttan böbrekler aracılığı atılır, safra ve bağırsaklardan atılımı düşük miktardadır. Ancak kanda toksik olmayan seviyeleri dahi böbreklerde ilaç birikimi nedeniyle toksisiteye neden olur. Tübüler epitel hücrelerde sisplatin konsantrasyonu kandakine göre beş kat daha fazladır. Sisplatine bağlı renal toksisite doza bağlıdır ve böylece olası doz artışına sınır getirilerek toksisiteden korunulabilir. Toksik etki ilk olarak proksimal tüpte, tübüler epitel hücrenin S3 segmentinde, daha sonra glomerüler ve distal tüplerde görülür (Cunha ve Peres,2013).

4.1.4. Böbrek Tübül Hücresinde Sisplatin Sonrası Oluşan Biyokimyasal Değişiklikler

İntraselüler “*mitojen-ile aktive olan protein kinaz*” (MAPK) sinyal yolu sisplatin nefrotoksitesinde etkili diğer bir yoldur. Hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağkalım süresini belirleyen 3 temel MAPK yolağı vardır.

- 1- Hücre dışında düzenleyici kinazlar (Ekstraselüler regulated kinase,ERK)
- 2- p38
- 3- Jun N-terminal kinaz / stres ile aktive edilmiş protein kinaz (JNK/SAPK)

Sisplatinin böbreklerde bu üç yolağı da aktifleştirdiğı *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. P38 ve JNK/SAPK yolaklarını inflamasyon, hiperosmolalite, oksidatif stres, hidroksil radikalleri ve sitokinler aktive edebilir. ERK ve p38 “*tümör nekroz faktör*” (TNF-alfa)’yı aktive eder. ERK ayrıca kaspase 3’ü aktive ederek tübüler apoptozu tetikler (Demir M, 2008; Xın Yao ve ark., 2007).

4.2. Sisplatin’ in Testislere Etkisi

İnsanlarda azoospermi ve testiküler atrofi kanser tedavisinde karşılaşılan başlıca yan etkilerdendir. Hayvan modellerinde sisplatin, spermatogenezde uzun süreli bozukluklar yapmıştır. Sisplatin, leyding hücrelerini inhibe ederek, testosteron salgısını bozar. Akut veya kronik kemoteropi maruziyeti germ hücrelerinde apoptoza neden olur (Ahmed ve ark., 2011).

Sisplatinin uygulaması ile testislerde Bax artarken, BCL2 azalmıştır. Spermatogenez diğer kemoteropik ilaçlara nazaran sisplatine daha duyarlıdır. Sisplatin, testiküler antioksidan seviyesini azaltarak lipid peroksidasyonu indükler (Ahmed ve ark., 2011; Turk ve ark., 2011).

Histopatolojik olarak, seminifer tüplerin sayında azalma, boyutunda küçülme, dejenerasyon, spermatogonia’da vakuolleşme, spermatozoid ve daha az sayıda germ hücresi ve seminifer epitelyum bariyerde azalma görülmüştür. Seminifer tüplerde atrofi, germ hücrelerinde azalma ve dejenerasyon, intersitiyel ödem, kapiller tıkanıklık; Jonhsen’s testis skalasında azalma görülmüştür (Turk ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda, sisplatin uygulanan grup kontrol ile karşılaştırıldığında testis dokusunda LP artmış, antioksidan tedavi olan grupta ise LP azalmıştır. Sisplatin ile indüklenen hayvanların testislerinde $O_2^{\bullet-}$ ve MDA artarken, SOD, CAT ve GSH seviyeleri ve testiküler ağırlık, plazma testosteron seviyeleri azalmıştır (İlbey ve ark., 2009; Narayana ve ark., 2012; Marcon ve ark., 2011; Boekelheide, 2005).

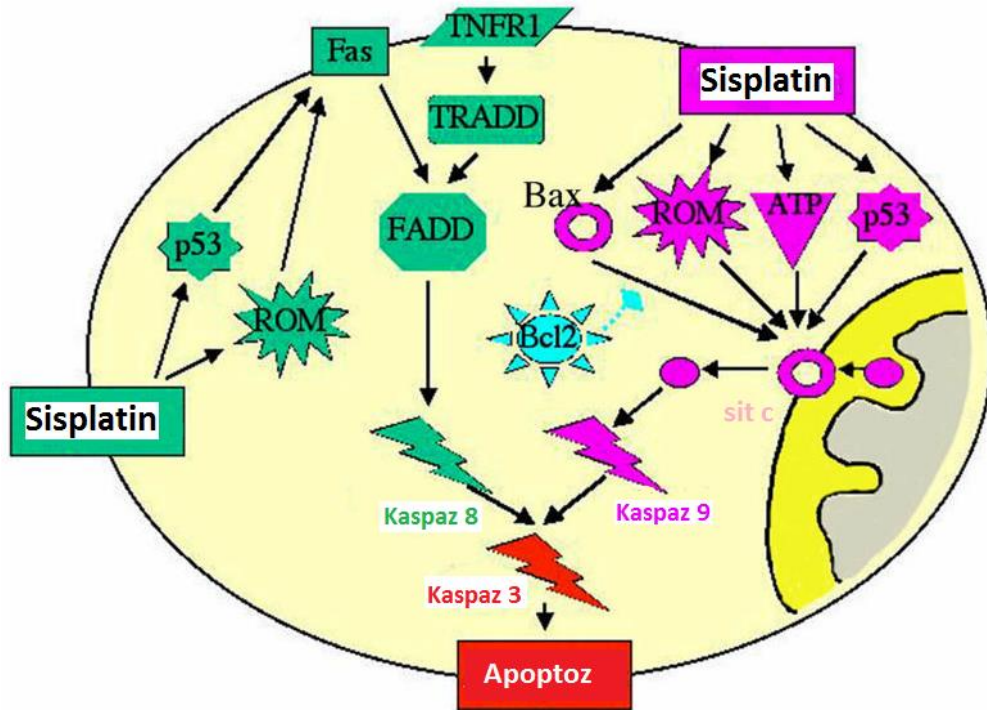
4.3. Apoptoz

Apoptozis; inflamatuvar bir yanıtı tetiklemeden hücre ölümünü kontrol eden bir sinyal kaskadının aktifleştiği, iyi düzenlenmiş ve evrimsel olarak korunmuş, enerji bağımlı bir “hücre intiharı” programıdır. Bu program normal doku gelişimi sırasında ihtiyaç duyulmayan yapıların uzaklaştırılması ve dokunun şeklini alabilmesi için çalışır.

Büyüme faktörlerinin azalması, hipoksi, oksidatif stres, DNA hasarı, mitokondrilerin geri dönüşümsüz hasarı, iskemi/reperfüzyon hasarı gibi apoptotik uyarılar sonucunda hücrede apoptotik sinyal kaskadı başlar (Cubukcuoglu, 2008).

Sisplatinin tümör hücresindeki apoptotik etkisi Fas- yolağın aktivasyonu iledir. İn vitro ortamda kültüre tübül epitelyum hücrelerinde sisplatin (20-80 mikrom) Fas ekspresyonunu artırmış ve apoptoza neden olmuştur (Razzaque ve ark., 1999). Bunu desteklemek üzere yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda wild-tip farelerde sisplatin FAS mRNA upregülasyonuna ve beraberinde caspaz-8 aktivasyonuna yol açarak tübül apoptoza, renal disfonksiyona neden olurken Fas geni mutant farelerde bu nefrotoksik yanıtlar azalmıştır (Tsuruya ve ark., 2003). Benzer başka bir çalışmada wild-farelerde sisplatin sonrası TNF-a artarken TNFR-1 eksiltilmiş farelerde böbrekte sisplatine apoptotik yanıt azalmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda sisplatinin nefrotoksik etkisinde tübül hücrelerindeki “ölüm-reseptör yolağı”nın rolü olduğu anlaşılmıştır. Ancak yinede gerek wild- ve gerekse Fas-mutant ve TNFR1 eksik farelerde tübül hücrelerinde apoptotik hücelere rastlanmıştır (Tsuruya ve ark., 2003; Reeves ve Ramesh, 2002). Bu durumda farklı yolakların aracılığı düşünülmüştür. Yapılan araştırmalar nefrotoksisitede p53 geni ve oksidatif hasarın rolünü açıklamaya hedeflenmiştir.

Myaji ve arkadaşları sisleptin uygulanan hayvanların böbrekte p53 aktivasyonunu gösterirken, sisleptinden önce p53 geni baskılanmış hayvanlarda apoptotik yanıtın önlendiği bildirilmiştir. Bunun dışında bulgular sisleptine bağı DNA hasarının ve sisleptine bağı oksidan hasarın p53 aracılığı ile oluştuğunu açıkça göstermektedir. P53, sırasıyla Bax ve Fas yolağını aktive etmektedir (Muller ve ark., 1998; Chandel ve ark., 1998).



Şekil 4: Sisleptin nefrotoksisitesinde önerilerin apoptotik yolak. ROM: Reaktif oksijen metabolitleri.sit c: sitokrom c. Ölü reseptör yolakları yeşil ve mitokondrial yolaklar mor olarak gösterilmiştir. Bcl2 inhibitör etki gösterirken, diğerleri uyarıcı etki göstermiştir (Devajaran ve Hanigan, 2003).

4.4. Oksidatif Hasar

Serbest radikaller, bir elektronunu kaybetmiş, stabil olmayan moleküllerdir. Kararsız hale gelmiş olan bu moleküller komşu hücelere saldırarak hasara neden olurlar. Yaşlanma, ateroskleroz, kronik dejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları ve kanser oluşumunda rol oynarlar. Serbest radikaller, vücudun enerji üretimi gibi doğal sürecinde oluşabildikleri gibi maruz kalınan kimyasallar sonucunda da oluşabilirler (Bonomini ve ark., 2015; Bar-Or ve ark., 2012)

CAT, SOD ve glutasyon peroksidaz (GSHPx) vücutta üretilen antioksidan enzimlerdir. Süperoksit anyonu, SOD enzimi aracılığı ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüşür, böylece etkisi azaltılmış olur. Meydana gelen hidrojen peroksit ise katalaz enzimi ile su ve oksijene dönüştürülür. Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak üzere görev yapan hücrel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilir bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (Karadeniz ve Koca).

Antioksidan enzimler, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri bu hasarlardan korurlar. Antioksidanların serbest radikalleri etkisiz hale getirebilmesi için, serbest radikallerin ve antioksidanların vücutta denge halinde olması gerekmektedir. Eğer serbest radikal seviyesi, antioksidan seviyesine göre artarsa serbest radikaller hücrelerde oksidatif hasarlara yol açar ve bu duruma oksidatif stres denir (Boots ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda, sisplatine bağlı nefrotoksisitenin patogeneğinde oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. Hücrede reaktif oksijen türleri ksantin-ksantin oksidaz, mitokondri ve NADP oksidaz tarafından üretilir. Oluşan reaktif oksijen türleri hücre bileşenlerine (lipid, protein, DNA) zarar verip, yapılarını bozar. Sisplatin sonrası böbrekte $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 ve $\bullet OH$ artmış, GSH-Px, SOD, CAT seviyelerinin düşmüştür (Kawai ve ark., 2006; Gulec ve ark., 2006).

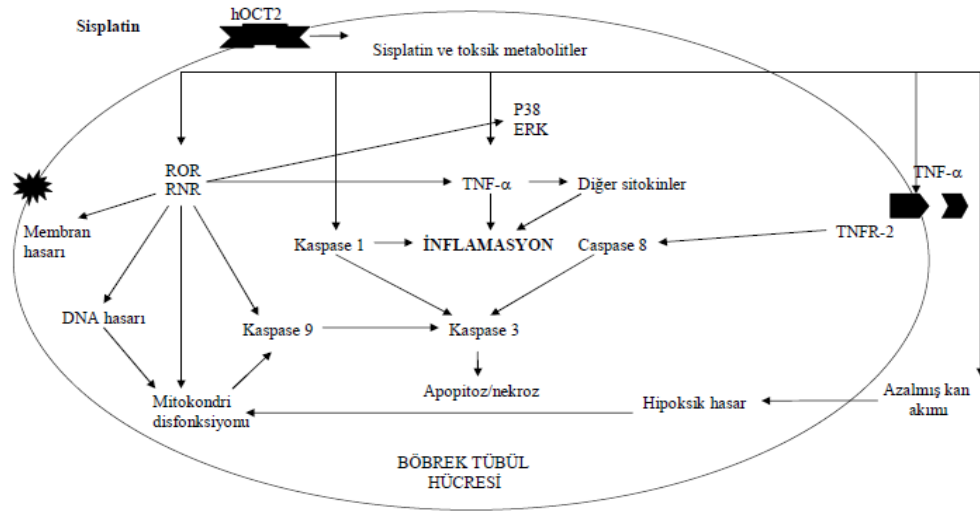
Buna bağlı olarak antioksidan sistemin dengesinin bozulması nefrotoksisiteye sebep olmaktadır. Fakat yapılan çalışmalarda antioksidanların hem in vivo hem de in vitro olarak sisplatine karşı koruyucu etkisi olduğu göstermiştir (Sanchez-Gonzalez ve ark., 2011).

Sisplatin uygulanan hayvanlarda, flavonoidler, vitamin C, vitamin E ve melatoninin meydana gelen nefrotoksisiteye karşı iyileştirici etkileri olduğu gösterilmiştir (Kanter ve ark., 2007; Sener ve ark., 2000; Antunes ve ark., 2000).

4.5. Sitokinler

Yüksek konsantrasyonda sisplatin proksimal tübüllerde nekroza sebep olurken, düşük konsantrasyonda kaspaz 9 aracılığıyla apoptoza sebep olur. Sisplatinin glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve hekzokinaz aktivitesini artırarak serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte intraselüler kalsiyum miktarının artması, NADPH oksidaz'ın artmasına ve buda reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olur. Serbest radikaller aynı zamanda mitokondrial disfonksiyona da neden olur. Antioksidan enzimler sisplatin tarafından inhibe olur.

Kaspaz 1, 8, 9 apoptozu başlatıcı kaspazlardır, kaspaz 3' ü aktive ederek apoptoza sebep olurlar. DNA fragmentlerin ve oksidatif ürünlerin mitokondriyal yolağı uyarması sonucu, kaspaz 9 aktivasyonu gerçekleşmiş olur. Hücre yüzey enzimleri TNF alfa ile birleşerek kaspaz 8 'in aktive olmasına neden olur. Sisplatine bağlı renal hasarda kaspaz 1 direk olarak kaspaz 3'ü aktive eder. Sisplatinin patogenezinde inflamasyonun önemli rolü vardır. TNF-alfa apoptozu indükler, buda reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırır (Xın Yao.,2007).



Şekil-5: Sisplatine bağlı akut tübüler hücre hasarı yolakları.

4.6. Flavanoidler

Flavanoidler düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşiklerdir ve sebze, meyve, fındık, tohum, baharat ve çiçeklerde bulunur. Santral sinir sistemi (SSS) üzerine olan etkisi 2 şekildedir; 1- GABA reseptörünün benzodiazepin kısmına bağlanarak sedasyon, anksiyolitik ve anti konvülsan etki gösterir. 2- Monoamin oksidaz Ave B'yi inhibe ederek antidepresan ve antiparkinson etki gösterebilir. Son çalışmalar, flavanoidlerin ruh halini ve SSS'ni etkileme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir. Flavanoidlerin nöroprotektif etkileri olduğu da gösterilmiştir (Jäger ve Saaby, 2011).

Flavanoidlerin antioksidan aktivitesinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar üzerinde de olumlu etkileri vardır. Flavanoidlerin, endotel nitrik oksiti arttırdığı ve böylece endotel bağımlı gevşeme yanıtlarını artırarak hiperansiyon, kalp krizi ve metabolik sendroma karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Anti inflamatuvar etkisi vardır, inflamatuvar hücre fonksiyonlarını düzenler. Eikozonodileri oluşturan enzimleri inhibe eder, proinflamatuvar moleküllerin üretimini azaltır ve immun sistemi düzenler. Flavanoidlerin kanserojen maddelerin inaktivasyonu, antiproliferasyon, hücre döngüsünün durdurulması, tümör hücresinde apoptozun indüklenmesi ve anjiogenez inhibisyonu gibi antikanser etkileri de gösterilmiştir (Middleton ve ark.,2000).

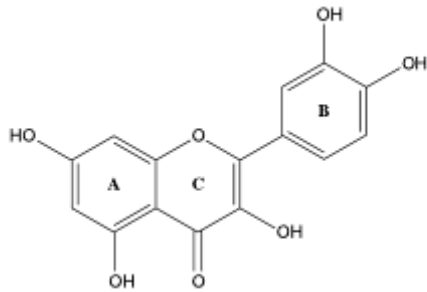
Flavonoidler karaciğer yağlanmasını önler, yağ asidi oksidasyonunu artırır. Birçok flavanoidin Tip 2 diyabet ile ilgili biyolojik hedefler üzerinde etkili oldukları gösterilmiştir (Assini ve ark.,2013).

Flavanoidlerin diyet ile alınımında meme, kolon, akciğer, prostat, pankreas hücrelerinde meydana gelen kanserlerde gerileme görülmüştür.

4.6.1. Kuversetin

Kuversetin, sebze ve meyvelerde bulunan sağlık için faydalı etkileri olan flavanoid grubundan bir antioksidandır. Antioksidan aktivitesi yanında antiviral, antibakteriyel, antikarsinojenik ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Antikarsinojenik özelliği ile mutasyona uğramış hücrelerde apoptozu artırır, DNA sentezini inhibe eder ve kanserli hücrenin büyümesini engeller.

Bir kuversetin molekülü, bileşiğin biyolojik aktivitesini tespit etmeye yarayan beş hidroksil grubu içerir. Kuversetin türevlerinin ana grubu glikozitlerdir (Materska, 2008; Boots ve ark., 2008).



Şekil-6: Kuversetin 'in kimyasal yapısı.

Kuversetin'in aglikon ve glikozit formlarının ikisi de gastrointestinal sistemde farklı ölçüde absorbe edilir. Lipofilik kuversetin molekülü mide tarafından kolayca absorbe edilir ve safraya salınır.

Kuversetin düşük yoğunluklu lipoproteini oksidasyondan korur ve trombosit agregasyonunu önler. Son bulgular kuversetin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Kuversetin anlamlı olarak plazma lipid seviyesini, lipoprotein ve hepatik kolesterolü azaltır ve oksidatif stress sonucu oluşan okside LDL 'yi inhibe eder. Kuversetin ayrıca sıçanlarda nitrik oksit üretimini artışı

aracılı endotel bağımlı vazodilatasyonu uyarır. Kalbi koruyucu bu etkisi arterler, venler ve koronerlerde vazodilatör etkisinden kaynaklanıyor olabilir (Coates ve ark., 2010).

1992 yılında bir çalışmada, kuversetin iskemi-reperfüzyon'unun kardiyomiyositlerde sebep olduğu oksidatif stresi ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz sistemini inhibe ederek azalttığı gösterilmiştir (Boots ve ark.,2008).

İnflamasyon; sitokinler, eikazonoidler ve birçok diğer immun faktörle alakalıdır. Kuversetin TNF-alfa üretimini inhibe eder ve akut-kronik patofizyolojik durumlarda kronik inflamasyonu zayıflatır. Kuversetin, TNF, IL-1Beta ve iNOS gibi immünolojik moleküllerin üretiminde yer alan transkripsiyon faktörü NF-kappaB'yi inhibe ettiğine inanılmaktadır. Astım akciğer havayolunda konstrüksiyon ile karakterize olan inflamatuvar bir hastalıktır. Astım krizi sırasında, kimyasal mediyatörler tarafından salınan allerjenler mast hücreleri ve bazofilleri aktive eder ve inflamasyona neden olan sitokinlerin salınmasına öncülük eder. Bu sitokinler arasında IL-4, IL-13 ve IL-5 allerjik inflamasyonda yer alırlar. Kuversetin bu sitokinlerin insan bazofillerinden sentezlenmesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada kuversetin metaboliti olan 3-O- metilkuversetin cAMP ve cGMP fosfodiesterazı inhibe ederek astımda faydalı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Coates ve ark., 2010).

Birçok epidemiyolojik çalışmada kuversetin diyet ile alınımının oksidatif stresi inhibe ederek prostat, over, göğüs, mide ve barsak kanseri riskini azalttığını göstermiştir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda 250-300 gr. ağırlığında erkek Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Deney süresince 20 °C ±2 ısıda ve 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ortamı ayarlanmış laboratuvar şartlarında yaşayan sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Bu çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı (Karar No: 99. 2013.mar) alınarak yapıldı.

5.1. Gruplar ve Deney Protokolü

Kontrol SF grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlara bir kez intraperitoneal (ip) olarak serum fizyolojik (SF) uygulandı ve bunu takiben 21 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile SF uygulaması yapıldı.

Kontrol KT grubu (n=6): Bu gruptaki hayvanlara bir kez ip olarak SF uygulandı ve bunu takiben 21 gün boyunca eter anestezisi altında oral gavaj ile kuversetin (KT) (20 mg/kg) uygulaması yapıldı (Elbe ve ark., 2015).

Sisplatin + SF grubu (n=8): Bu gruptaki hayvanlara tek doz sisplatin (7 mg/kg; ip) uygulanmasının ardından 21 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile SF uygulaması yapıldı.

Sisplatin + Kuversetin (n=8): Bu gruptaki hayvanlara tek doz sisplatin (7 mg/kg; ip) (Yılmaz ve ark., 2004) uygulanmasının ardından 21 gün boyunca eter anestezisi altında oral olarak gavaj ile KT (20 mg/kg) uygulaması yapıldı.

21 günlük uygulama sonunda hayvanlar dekapite edilerek kan ve doku (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum) örnekleri alındı. Mesane ve korpus kavernozum dokularının kasılma ve gevşeme yanıtları izole organ banyosunda incelenerek fonksiyonel açıdan değerlendirildi. Kan ve dokularda oksidatif hasar ve apoptozis ölçümleri yapıldı. Bu amaçla malondiladehit (MDA), glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), kaspaz-3 ve DNA oksidasyonu tayinleri yapıldı.

5.2. Dokuların İzole Organ Banyosunda Yapılan İn Vitro Çalışmalar İçin Hazırlanışı:

Kullanılan Çözeltiler:

Krebs-Henseleit çözeltisi (mM): NaCl 118.14, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, Glukoz 11.1; Çözelti distile su ile her çalışma günü taze olarak hazırlandı.

Tirod çözeltisi (mM): NaCl 124.9, KCl 2.5, NaHCO₃ 23.8, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.4, CaCl₂ 1.8, Glukoz 5.5; Çözelti distile su ile her çalışma günü taze olarak hazırlandı.

80mM KCl çözeltisi (mM): NaCl 39.35, KCl 80, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 2.2, Glukoz 11.1

124mM KCl çözeltisi (mM): NaCl 39.35, KCl 124, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, Glukoz 11.1

Fenilefrin (Sigma): Fenilefrin 3×10^{-9} - 10^{-3} konsantrasyon aralığında organ banyosuna kümülatif olarak uygulanmak üzere distile suda çözülerek hazırlandı.

Karbakol (Sigma): Karbakol 3×10^{-9} - 10^{-3} konsantrasyon aralığında organ banyosuna kümülatif olarak uygulanmak üzere distile suda çözülerek hazırlandı.

Mesane dokusundan ve üretrası çıkartılarak ayrılan kaverno dokudan hazırlanan şeritler üst ve alt uçlarından organ banyolarına asıldı. Kaverno doku Krebs-Henseleit ve mesane dokusu için Tirod çözeltileri kullanıldı. Çift cidarlı olan organ banyolarının sıcaklıkları termostatlı bir sirkülatör ile 37 °C de sabit tutuldu ve banyolar deney süresince %95 O₂ +% 5 CO₂ gaz karışımı ile gazlandırıldı.

Organ banyolarına asılan dokulara 1 gramlık ön gerginlik uygulanarak 45 dakika dengelemeye bırakıldı ve banyo çözeltileri bu süre boyunca 15'er dakika ara ile yenilendi. Dokuların KCl ile kasılma yanıtlarının alınması için kaverno doku 124mM KCl, mesane dokusu ise 80mM KCl içeren fizyolojik çözelti kullandı.

Daha sonra yıkanılan dokular agonist maddelerin uygulanmasından önce 45 dakika dinlendirildi. Korpus kaverno dokusuna artan konsantrasyonlarda fenilefrin kümülatif uygulanarak doz-yanıt eğrileri alındı. Tekrar yıkanıp dinlendirilen dokular fenilefrin submaksimal dozu ile kasıldı ve artan konsantrasyonlarda kümülatif olarak karbakol uygulaması ile kaverno dokuda gevşeme cevapları kaydedildi. Fenilefrin ile alınan kasılma yanıtları KCl ile alınan kasılma yanıtının yüzdesi şeklinde ve

karbakol ile alınan gevşeme yanıtları ise fenilefrinin submaksimal kasılma yanıtının % gevşemesi olarak değerlendirildi.

Mesane dokusunda artan konsantrasyonlarda kümülatif uygulanan karbakol ile kasılma yanıtları alındı ve bu yanıtlar da benzer şekilde KCl kasılma yanıtının yüzdesi olarak değerlendirildi (Paskaloglu ve ark.,2004).

5.3. Dokularda Yapılan Tayinler

5.3.1 Malondialdehit (MDA) tayini: Dokularda MDA tayini yapılırken Beuge ve Aust'un (1978) yöntemi kullanıldı. Dekapitasyondan hemen sonra çıkarılan böbrek, mesane, testis ve kavernoza dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra kurutuldu. Ika Werk homojenizatöründe buz üstünde 150 mM KCl çözeltisiyle dokuların %10'luk homojenatları hazırlandı.

Gerekli çözeltiler

TBA (Tiyobarbitürik asit) çözeltisi: % 0.375 g TBA ve % 15'lik TCA (Trikloroasetik asit) içeren çözelti, 0.25N HCl ile hazırlandı.

Standart çözeltisi: 1,1,3,3 tetraetoksipropan'ın 10 mM'lık stok çözeltisinden farklı seyreltmeler yapılarak çalışıldı.

Deneyin yapılışı: Kör (0.5ml 150 mM KCL), standart (0.5ml) ve numune (0.5ml doku homojenatı) üzerine 1 ml % 0.375 TBA çözeltisi koyuldu. 15 dakika kaynar su banyosuna bırakıldı ve sonra tüpler oda sıcaklığında soğutuldu. 10 dakika 3000 devir/dakikada santrifüj edildi. Üst faz alınarak oluşan rengin absorbanansı spektrofotometrede 532 nm'de okutuldu.

5.3.2 Glutasyon (GSH) tayini: Dokuda GSH tayini Beutler yöntemine göre yapıldı. Glutasyon tayininde MDA tayini için hazırlanan % 10'luk homojenatlar kullanıldı.

Gerekli çözeltiler:

0,3M Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojen fosfat)

10mM DTNB (Ditiyo nitro benzen, Ellman): 39.63 mg DTNB % 1'lik sodyum sitrat ile 10 ml'ye tamamlandı.

% 20'lik TCA

Standart glutatyon çözeltisi: 50 mg glutatyon distile suda çözüldü, 5 ml'ye tamamlandı. Deneyin yapılışı: 0.4 ml % 10'luk homojenat ile 0.2 ml % 20'lik TCA ile karıştırıldı. 15 dakika 3000 devir/dakikada santrifüj (Hettich Universal) edildi. Üst fazda GSH çalışıldı, çökelti atıldı.

Kör (0.2 ml 150mM KCl), standart (0.2 ml standart çözeltisi) ve numune (0.2 ml üst faz) üzerine 1 ml 0.3 M Na₂HPO₄ ve 0.05 ml Ellman çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı, 5dakika bekletildi ve oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 412 nm.de okundu.

5.3.3 Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini: Doku homojenatlarında SOD aktivitesi Mylorie ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. 50 mM potasyum fosfat tamponu-EDTA, 0.2 mM ribofilavin ve 6mM o-dianisinide kullanılarak hazırlanan tampon ile floresan ışık ve 37 C de bekletilen örnekler 460 nm'de okundu. Sonuçlar U/gr doku olarak ifade edildi.

5.3.4 Kaspaz-3 aktivite tayini: Doku homojenatı (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.1% CHAPS, 1 mM DTT, 100 mM EDTA, pH:7.4) eklenerek ultrasonik homojenizatör ile 15 saniye %70 amplitud kullanılarak buz içerisinde patlatıldı. 14.000xg de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınarak kaspaz-3 ölçümü için kullanıldı.

Kaspaz 3 aktivite düzeyleri kolorimetrik olarak Ben Amor ve arkadaşlarının yöntemine göre substratları ve inhibitörleri kullanılarak ELISA okuyucusunda tayin edildi. Ölçüm prensibi kaspaz-3 substratı olan N-Asetil-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilid'den (Ac-DEVD-pNA) kromofor p-nitroanilin (pNA) oluşmasının spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanır. Serbestlesen pNA'nın absorbansı ELISA okuyucusunda 405 nm'de okunarak bulundu.

Deneyin yapılışı: Doku homojenatı üzerine hücre patlatma tamponu eklenerek soğuk ortamda süspanse edildi ve 10.000xg de santrifüj sonrasında süpernatant kullanıldı. Süpernatant kuyucuklar üzerine yüklendi, üzerine 50 µL reaksiyon tamponu konulduktan sonra 4 mM DEVD-pNA substratı eklendi. Kuyucuklar 37 C° de 2 saat inkübe edildikten sonra 405 nm'de ELISA okuyucusunda okunarak sonuçlar nmol pNA/mg protein/dakika olarak ifade edildi. Kaspaz 3 aktivitesini kaspaz benzeri aktivite gösteren diğer proteazlardan ayırmak için kaspaz 3 inhibitörü olarak Ac-DEVD-CHO kullanıldı.

5.3.5 Kaspaz-3 proteini western blot ile tespiti:

Western-Blot: Hücreler patlatma tamponu kullanılarak buz içerisinde ultrasonik homojenizatörde 15 sn sürede %70 amplitüd ile patlatıldı. 12.000xg de 4 °C de santrifüj edilerek üst fazda Western Blot çalışmaları yapıldı.

Hazırlanan çözeltiler: Yığınlama jeli çözeltisi: 0.5 M Tris, % 0.4 SDS, pH:6.8, Ayırma jeli çözeltisi: 1.5 M Tris,% 0.4 SDS, pH: 8.8, %30 akrilamit-bis çözeltisi, %10 Amonyum persülfat çözeltisi(APS), %10 SDS çözeltisi, TEMED, örnek yükleme tamponu: %4 SDS, %20 gliserol, %10 β -merkaptolanol, % 0.004 bromfenol mavisi ve 0.125 M HCl,(pH 6.8), Elektrofez yürütme çözeltisi: 5 mM Tris, 38.4 mM Glisin, %1 SDS, Transfer çözeltisi: 5mM Tris, 38.4 mM Glisin, %15 Metanol, Ponceau S çözeltisi: 0.5 gr Ponceau S, % 0.1 asetik asit içinde çözülür. Bloklama çözeltisi: %3 yağsız süttozu (TBS içerisinde), TBST: 20mM Tris, 154 mM NaCl, % 0.1 Tween 20, Primer antikor (1:500), Sekonder antikor (1:1000): (HRP konjugatlı), Film banyosu çözeltileri: Ticari developer ve fiksatif çözeltisi.

	Alt Jel	Üst Jel
Madde	%4'lük Yığınlama jeli	%10'luk Ayırma jeli
4X yığınlama çözeltisi	0.625ml	-
4X Ayırma çözeltisi	-	1.25ml
%30 akrilamit-bis	0.335ml	1.65ml
APS	25 μ L	50 μ L
TEMED	5 μ L	10 μ L
SDS	100 μ L	100 μ L
Distile su	1.55ml	2.05ml

Tablo 2: SDS-poliakrilamid jelin yoğunluğuna göre hazırlanışı

Jeller hazırlanıp camlar arasında polimerleşmesi sağlandıktan sonra tanka yerleştirildi. İçerdikleri protein miktarları tespit edilen örnekler, 1:1 oranında hazırlanan örnek yükleme tamponu ile % dakika 95 °C kaynatıldı. Her kuyucuğa 25 µg/ml oranında protein içeren numuneler yüklendi. Bir kuyuya 5 µL standart yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 180V 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonrasında jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için yarı kuru sistemde immunoblotting yapıldı. Proteinlerin nitroselüloz membrana transferinden sonra Ponceau S boyaması yapılarak proteinlerin membrana transfer olup olmadığı kontrol edildi. Ardından membran 2 saat süre ile oda ısısında % 3'lük yağsız süt tozu ile bloklandı. Primer antikor ile +4 °C 'de gece boyunca karıştırıcı üzerinde inkübe edildikten sonra membran, sekonder antikor ile oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Ardından kemilüminesans substrat içeren çözelti ile karanlık odada film banyosu yapıldı.

Elde edilen filmler dansitometrik analiz yapılarak değerlendirildi.

5.4. Oksidatif DNA hasarı ölçümü: Dokularda oksidatif DNA Hasarı, Oxi Select Oxidative DNA Damage Elise Kit (STA-320, Cell Biolabs) kullanılarak kit prosedürüne uygun olarak ölçüldü. Örneklerden DNA izolasyonu PureLink® Genomi DNA Mini Kit (K182001,Life technology) kullanılarak prosedürüne uygun olarak yapıldı. Sonuçlar 8-hidroksideoksiganosin (8-OHdG) ng/mg DNA olarak ifade edildi.

5.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz Graphpad Prism 5.0 (Graphpad Yazılım, San Diego, Ca, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Değerlendirmede tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ileri analiz Tukey's ile yapıldı. P değerinin 0.05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmamızda korpus kavernosum ve mesane dokularında izole organ banyosunda kasılma ve gevşeme çalışmaları, böbrek, mesane, testis ve korpus kavernosum dokularında MDA, GSH, SOD, kaspaz-3 ve 8-OHdG tayinleri yapılmıştır. Elde edilen verilerin gruplar arası karşılaştırılması ANOVA ile incelenerek ikili karşılaştırmalar için Tukey's testi kullanılmıştır.

6.1. İzole Organ Banyosu Çalışmaları

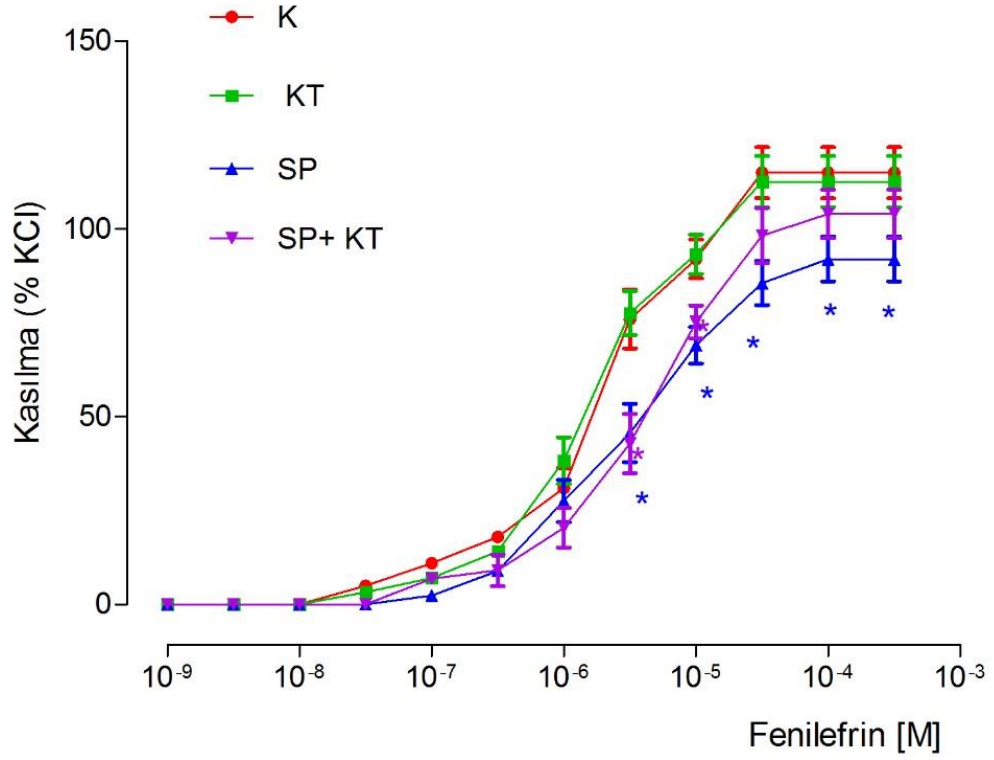
6.1.1. Korpus kavernozum kasılma ve gevşemeleri

Sisplatin grubunda fenilefrine kasılma yanıtı 3×10^{-5} M konsantrasyondan itibaren kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$) olarak düşük bulunmuştur. Kuversetin uygulanan sisplatin grubunda maksimumda anlamlılık olmamakla birlikte 3×10^{-5} - 10^{-5} M konsantrasyonlarında anlamlı ($p < 0,05$) farklılık görülmüştür. EC_{50} değerleri incelendiğinde SP ve SP+KT gruplarının kontrol gruplara göre anlamlı olarak farklı olduğu belirlenmiştir. (Şekil 7, tablo 3)

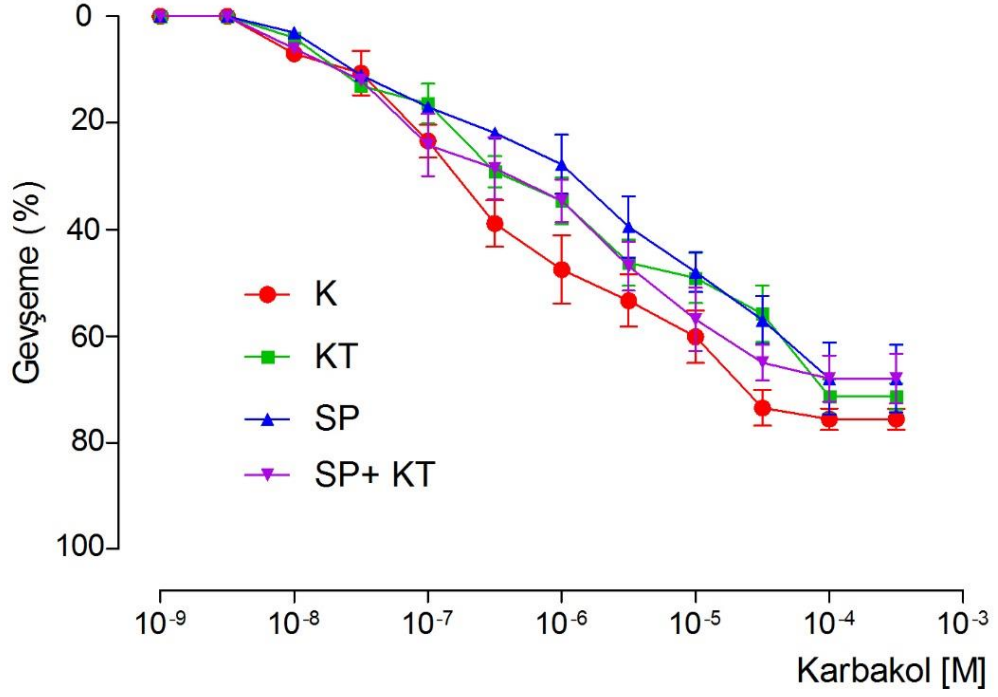
Korpus kavernosum dokusunun karbakol ile incelenen gevşeme yanıtları gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. EC_{50} değerlerine bakıldığında da bir anlamlılık görülmemiştir. (Şekil 8, tablo 3)

Tablo3: Korpus kavernozum dokusunda kümülatif olarak uygulanan fenilefrin ile elde edilen kasılma yanıtlarında ve karbakol ile elde edilen gevşeme yanıtlarında EC_{50} değerleri. * $p < 0.05$

EC_{50}	K	KT	SP	SP+KT
Fenilefrin (%KCl)	$2,7 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$3,04 \times 10^{-6}$ *	$4,56 \times 10^{-6}$ *
Karbakol (%FE)	$3,0 \times 10^{-7}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$1,98 \times 10^{-6}$	$7,61 \times 10^{-7}$



Şekil 7: Korpus kavernosum dokusunun kümülatif fenilefrin uygulaması ile alınan konsantrasyon yanıtı. K: Kontrol. KT: Kuversetin. SP: Sisplatin. SP+KT: Sisplatin+Kuversetin. Kasılmalar KCl (124mM) kasılmasının %'si olarak ifade edilmiştir. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Konsantrasyonların ikili karşılaştırılmalarında t-test kullanılmıştır. * p<0.05: Kontrol gruplarına göre karşılaştırma.



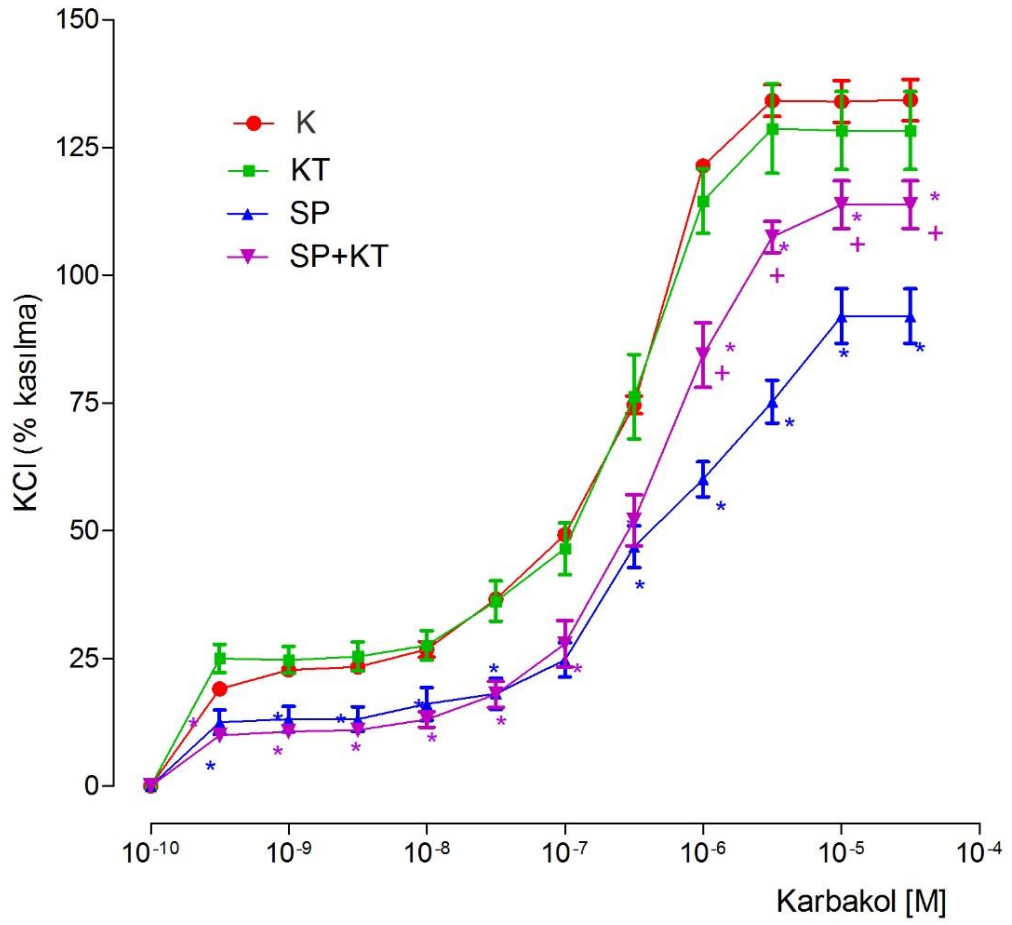
Şekil 8: Korpus kavernosum dokusunun kümülatif uygulanan karbakol ile alınan gevşeme konsantrasyon yanıtı. K: Kontrol. KT: Kuversetin. SP: Sisplatin. SP+KT: Sisplatin+Kuversetin. Gevşemeler submaksimal dozda fenilefrin ile alınan kasılma cevabının %'si olarak ifade edilmiştir. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Konsantrasyonların ikili karşılaştırılmalarında t-test kullanılmıştır.

6.1.2. Mesane dokusunun karbakole verdiği kasılma yanıtları

Sisplatin grubunda karbakol kasılma yanıtı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) olarak düşük bulunmuştur. SP+KT grubunda SP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$) olarak düzelme görülmekle beraber bu değerlerin K grubuna göre hala düşük olduğu belirlenmiştir. EC50 değerleri incelendiğinde SP ve SP+KT gruplarının kontrol gruplara göre anlamlı olarak farklı olduğu belirlenmiştir. (Şekil 9, tablo 4)

Tablo 4: Mesane dokusunda kümülatif olarak uygulanan karbakol ile alınan kasılma yanıtlarında EC₅₀ değerleri.

EC ₅₀	K	KT	SP	SP+KT
Karbakol	$2,71 \times 10^{-7}$	$2,71 \times 10^{-7}$	$5,14 \times 10^{-7} *$	$4,45 \times 10^{-7} *$



Şekil 9: Mesane dokusunun kümülatif uygulanan karbakol ile elde edilen kasılma konsantrasyon yanıtı. K: Kontrol. KT: Kuversetin. SP: Sisplatin. SP+KT: Sisplatin+Kuversetin. Kasılmalar KCl (80mM) kasılmasının %'si olarak ifade edilmiştir. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. Konsantrasyonların ikili karşılaştırılmalarında t-test kullanılmıştır. * p<0.05: Kontrol gruplarına göre karşılaştırma; +p<0.05: Sisplatin grubuna göre.

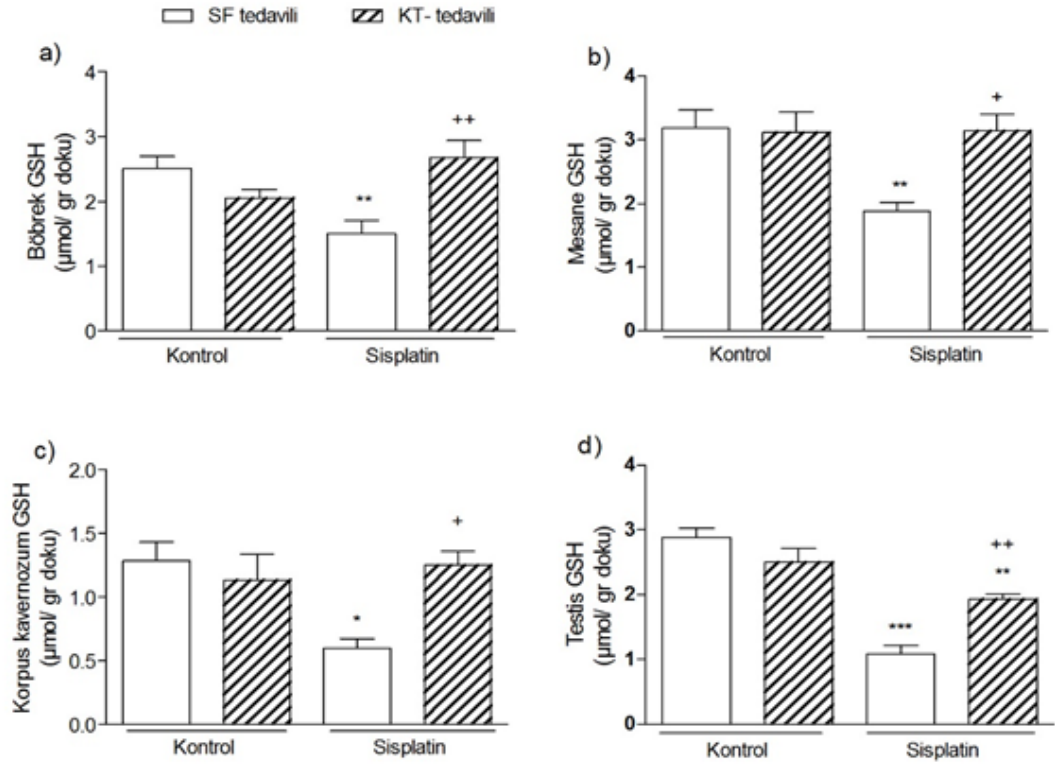
6.2. Doku Örneklerinde Yapılan Ölçümler

6.2.1. Dokularda GSH düzeyleri (Şekil 10, Tablo 5)

Sisplatin uygulaması incelenen tüm dokularda (böbrek, mesane, korpus kavernosum ve testis) GSH düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$ - $p<0.001$) olarak düşürmüştü, buna karşılık kuversetin ile tedavi edilen gruptaki GSH düzeyi sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.05$ - $p<0.01$) olarak iyileşme gözlemlenmiştir.

Tablo 5: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda tüm dokulara (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernosum) ait GSH değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Böbrek	2.5 ± 0.2	2.1 ± 0.1	$1.5 \pm 0.2^{**}$	$2.7 \pm 0.3^{++}$
Mesane	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.3	$1.9 \pm 0.1^{**}$	$3.1 \pm 0.2^+$
Korpus kavernosum	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	$0.6 \pm 0.1^*$	$1.3 \pm 0.1^+$
Testis	2.9 ± 0.1	2.5 ± 0.2	$1.0 \pm 0.1^{***}$	$1.9 \pm 0.1^{*,++}$



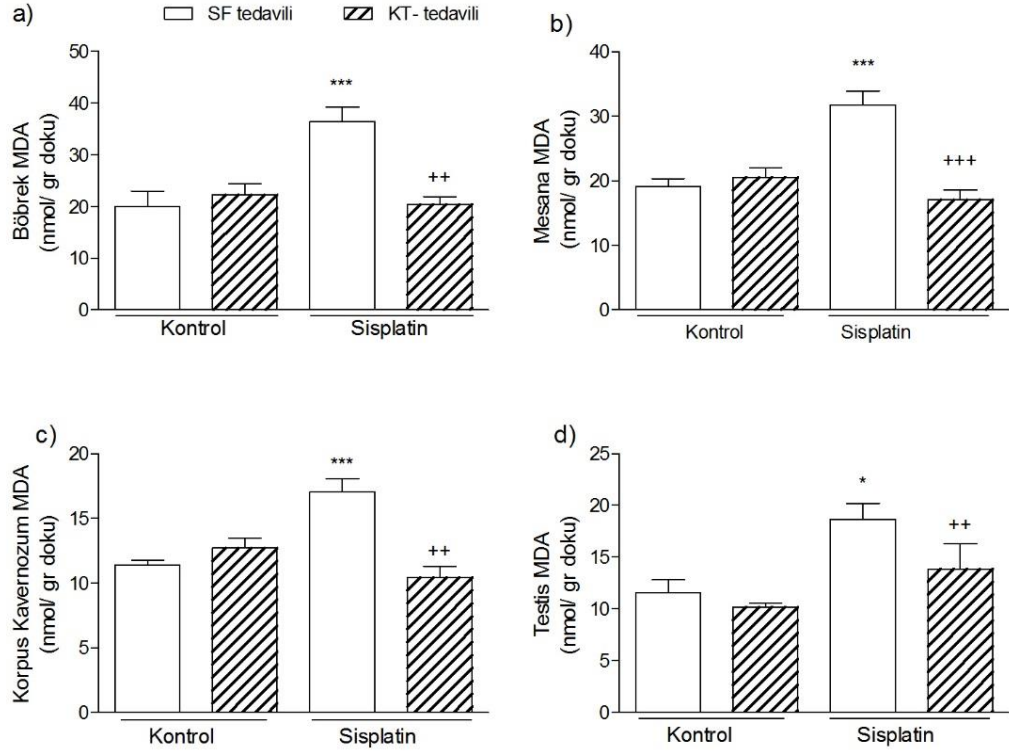
Şekil 10: Böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum dokularına ait GSH sonuçları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: SF ile tedavi edilen cisplatin grubuna göre.

6.2.2 Dokularda MDA düzeyleri (Şekil 11, Tablo 6)

Çalışmamızda incelenen tüm dokularda (böbrek, mesane, korpus kavernosum ve testis) sisplatin uygulaması sonucu lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak ölçülen MDA değerleri sisplatin uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$ - $p<0.001$) bir artış görülmüştür. Kuversetin ile tedavi edilen gruptaki MDA seviyeleri sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.01$ - $p<0.001$) olarak azalmıştır.

Tablo 6: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda tüm dokulara (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernosum) ait MDA değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Böbrek	20.0 ± 3.0	22.2 ± 2.1	36.4 ± 2.8 ^{***}	20.4 ± 1.4 ⁺⁺
Mesane	19.1 ± 1.2	20.5 ± 1.5	31.7 ± 2.2 ^{***}	17.1 ± 1.5 ⁺⁺⁺
Korpus kavernosum	11.3 ± 0.4	12.7 ± 0.8	17.1 ± 1.0 ^{***}	10.4 ± 0.9 ⁺⁺
Testis	11.5 ± 1.3	10.1 ± 0.4	18.6 ± 1.5 [*]	13.8 ± 2.4 ⁺⁺



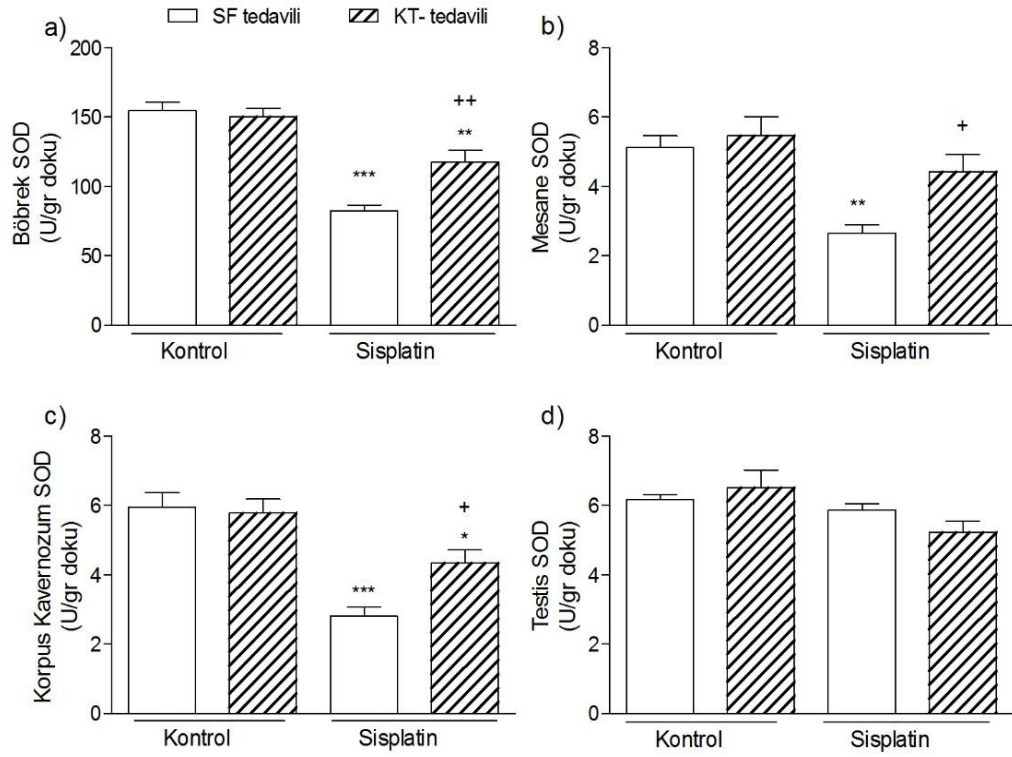
Şekil 11: Böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum dokularına ait MDA sonuçları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

6.2.3 Dokularda SOD düzeyleri (Şekil 12,Tablo 7)

Sisplatin uygulaması incelenen böbrek, mesane ve korpus kavernosum dokularında SOD düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$ - $p<0.001$) olarak azalmış fakat testis dokusunda herhangi bir anlamlılık bulunmamıştır. Kuversetin uygulaması sonucu böbrek, mesane ve korpus kavernosum dokularında SOD düzeyleri sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.05$ - $p<0.01$) olarak yükselmiştir.

Tablo 7: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda tüm dokulara (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernosum) ait SOD değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Böbrek	154.7 ± 6.1	150.3 ± 5.8	82.5 ± 4.0***	117.2 ± 9 ^{*,++}
Mesane	5.1 ± 0.3	5.5 ± 0.5	2.7 ± 0.2**	4.4 ± 0.5 ⁺
Korpus kavernosum	6 ± 0.4	5.8 ± 0.4	2.8 ± 0.2***	4.3 ± 0.4 ^{*,+}
Testis	6.1 ± 0.1	6.5 ± 0.5	5.9 ± 0.2	5.2 ± 0.3



Şekil 12: Böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum dokularına ait SOD sonuçları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001: Kontrol grubuna göre; + p<0.05, ++ p<0.01: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

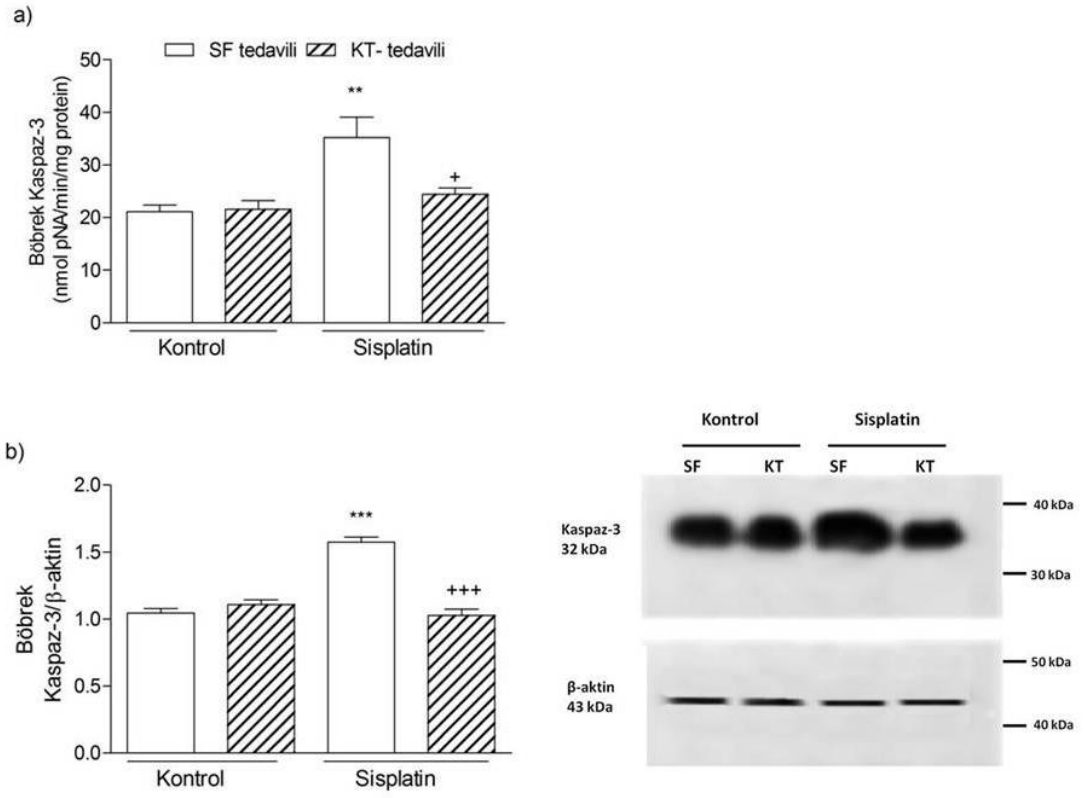
6.2.4 Dokularda kaspaz-3 düzeyleri (Şekil 13,14,15,16; Tablo 8,9,10,11)

Böbrek dokusunda sisplatin uygulanan grupta kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi kontrole göre anlamlı ($p<0.01$) olarak artmıştır. Kuversetin ile tedavi edilen grubun kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azalmıştır.

Sisplatin uygulanan grupta Kaspaz-3 protein düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.001$) olarak artarken, kuversetin ile tedavi edilen grubun kaspaz-3 protein düzeyi anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmıştır. (Şekil 13, Tablo 8)

Tablo 8: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda böbrek dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri.

Böbrek	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Kaspaz-3 enzim aktivitesi	21.1 ± 1.2	21.5 ± 1.7	35.2 ± 3.8 **	24.3 ± 1.2 ⁺
Kaspaz-3 protein düzeyleri	1.04 ± 0.03	1.1 ± 0.03	1.6 ± 0.03 ^{***}	1.02 ± 0.04 ⁺⁺⁺



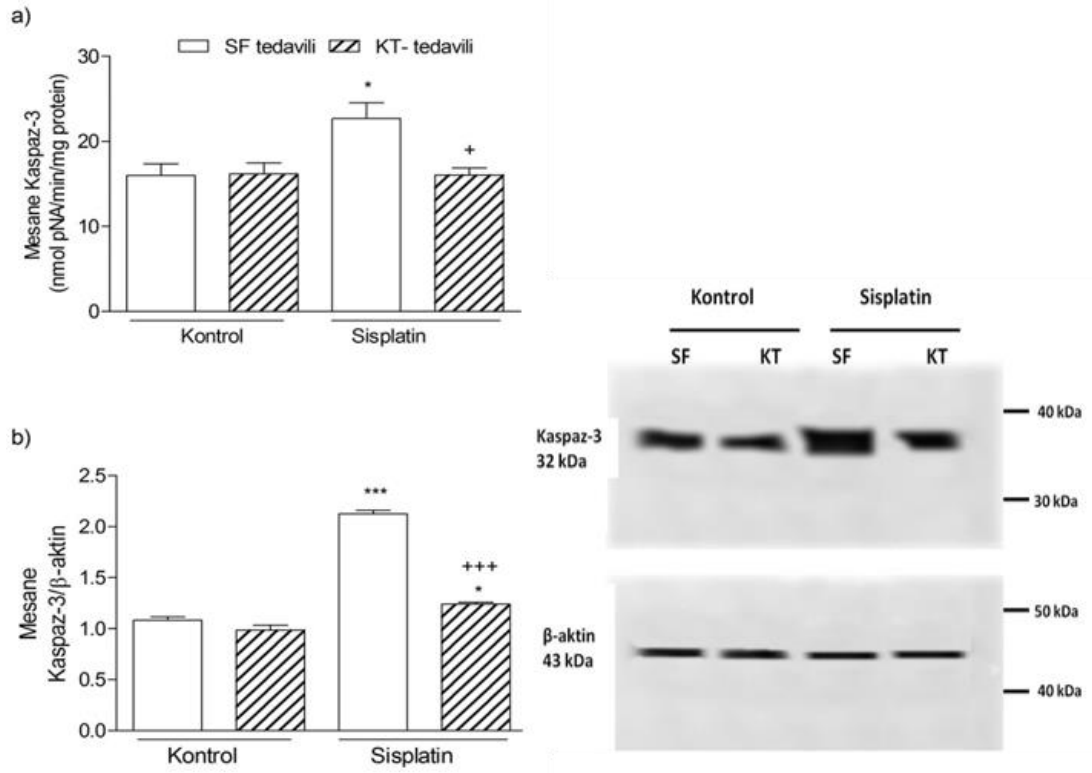
Şekil 13: Böbrek dokusuna ait kaspa-3 enzim aktivitesi, kaspa-3 protein düzeyleri ve western blot yöntemi ile elde edilen protein bantları. SF: Serum fizyolojik, KT: Kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

Mesane dokusunda sisplatin uygulanan grupta kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$) olarak artmıştır. Tedavili grubun kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azalmıştır.

Kaspaz-3 protein düzeyi sisplatin ($p<0.001$) uygulanan grupta ve kuversetin ile tedavi edilen grupta ($p<0.05$) kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, Tedavili grubun kaspaz-3 protein düzeyi sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmıştır. (Şekil 14, Tablo 9)

Tablo 9: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda mesane dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Kaspaz-3 enzim aktivitesi	16 ± 1.4	16.1 ± 1.3	22.7 ± 1.8*	16.1 ± 0.8 ⁺
Kaspaz-3 protein düzeyleri	1.1 ± 0.02	1.0 ± 0.04	2.1 ± 0.03***	1.2 ± 0.01 ^{*,+++}



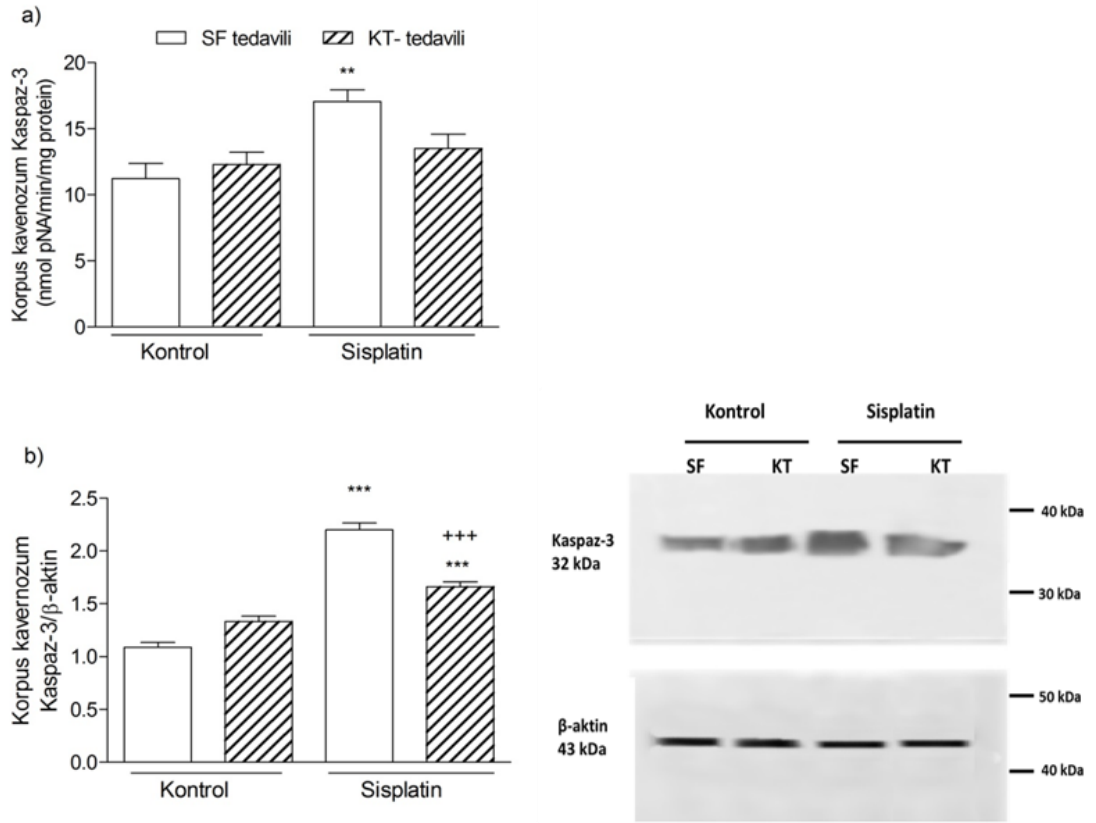
Şekil 14: Mesane dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi, kaspaz-3 protein düzeyleri ve western blot yöntemi ile elde edilen protein bantları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre; + $p < 0.05$, *** $p < 0.001$: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

Korpus kavernozum dokusunda sislpatin uygulanan grupta kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi kontrole göre anlamlı ($p<0.01$) olarak artmıştır. Sislpatin-kuversetin grubunda ise kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir.

Kaspaz-3 protein düzeyleri de sislpatin uygulanan grupta ve kuversetin ile tedavi edilen grupta anlamlı ($p<0.001$) olarak artarken, sislpatin-kuversetin grubunda ise kaspaz-3 düzeyi anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmıştır. (Şekil 15, Tablo 10)

Tablo 10: Sislpatin uygulaması yapılan sıçanlarda korpus kavernozum dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri.

	Kontrol		Sislpatin	
	SF	KT	SF	KT
Kaspaz-3 enzim aktivitesi	11.2 ± 1.2	12.2 ± 1	$17.1 \pm 0.9^{**}$	13.5 ± 1.1
Kaspaz-3 protein düzeyleri	1.1 ± 0.04	1.3 ± 0.05	$2.2 \pm 0.06^{***}$	$1.7 \pm 0.04^{***,+++}$



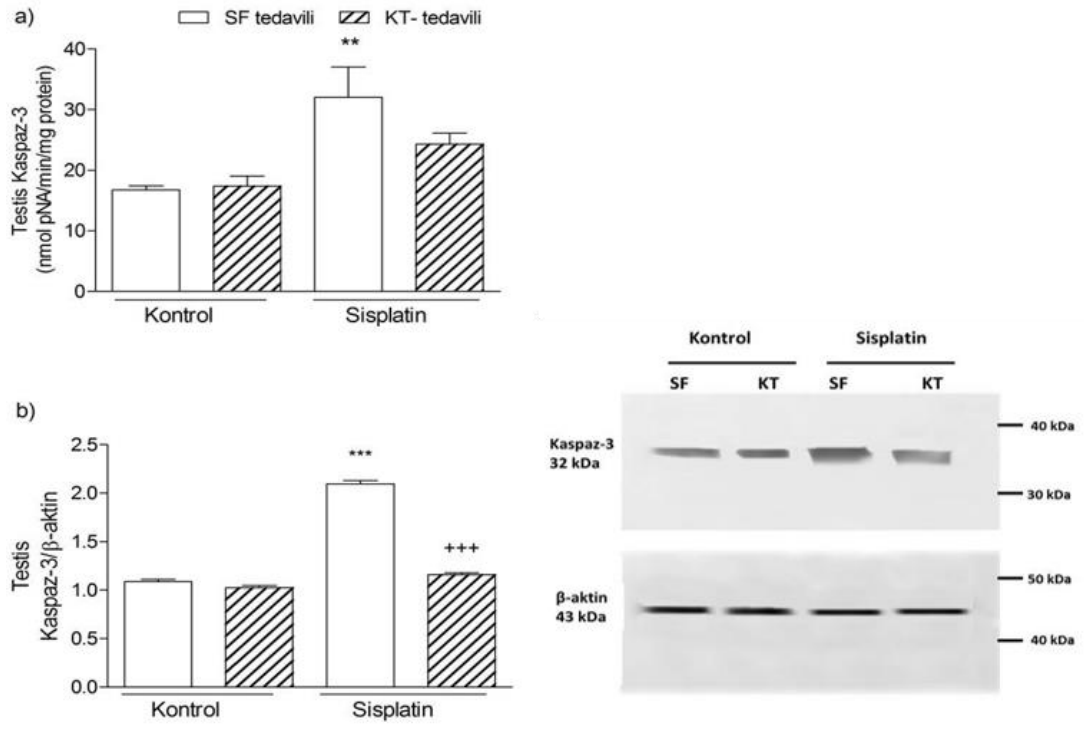
Şekil 15: Korus kavernozum dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi, kaspaz-3 protein düzeyleri ve western blot yöntemi ile elde edilen protein bantları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$: Kontrol grubuna göre; +++ $p < 0.001$: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

Testis dokusunda sisplatin uygulanan grupta kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyi kontrole göre anlamlı ($p<0.01$) olarak artmıştır. Kuversetin ile tedavi edilen grupta ise kaspaz-3 enzim aktivitesi düzeyinde herhangi bir anlamlılık görülmemiştir.

Kaspaz-3 protein düzeyleri de sisplatin uygulanan grupta kontrole göre anlamlı ($p<0.001$) olarak artarken, tedavili grupta ise kaspaz-3 protein düzeyi anlamlı ($p<0.001$) olarak azalmıştır. (Şekil 16, Tablo 11)

Tablo 11: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda testis dokusuna ait kaspaz-3 enzim aktivitesi ve kaspaz-3 protein değerleri.

Testis	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Kaspaz-3 enzim aktivitesi	16.7 ± 0.7	17.4 ± 1.6	$32.1 \pm 5^{**}$	24.3 ± 1.9
Kaspaz-3 protein düzeyleri	1.1 ± 0.02	1.02 ± 0.02	$2.1 \pm 0.03^{***}$	$1.2 \pm 0.01^{+++}$



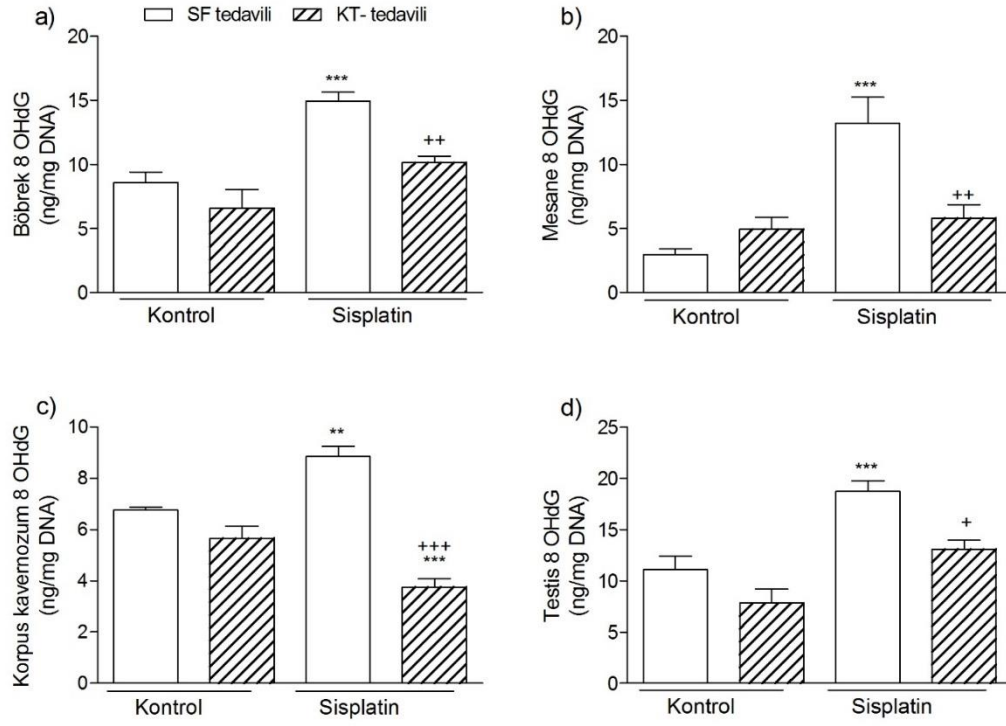
Şekil 16: Testis dokusuna ait ait kaspaz-3 enzim aktivitesi, kaspaz-3 protein düzeyleri ve western blot yöntemi ile elde edilen protein bantları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuersetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. **p<0.01, *** p<0.001: Kontrol grubuna göre; +++ p<0.001: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

6.2.5. Dokuda oksidatif DNA hasarı düzeyleri (Şekil 17, Tablo 12)

Sisplatin uygulaması incelenen böbrek, mesane, korpus kavernosum ve testis dokularında oksidatif DNA hasarı düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.01$ - $p < 0.001$) olarak artmıştır, buna karşılık kuversetin uygulanan böbrek, mesane, korpus kavernosum ve testis dokularında oksidatif DNA hasarı düzeyleri anlamlı ($p < 0.05$ - $p < 0.001$) olarak azalmıştır. Korpus kavernosum dokusunda kuversetin uygulaması DNA hasarını azaltmış olsa da kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük kalmıştır. ($p < 0.001$)

Tablo 12: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda tüm dokulara (böbrek, mesane, testis ve korpus kavernosum) ait oksidatif DNA hasarı değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
Böbrek	8.6 ± 0.8	6.6 ± 1.5	$14.9 \pm 0.7^{***}$	$10.1 \pm 0.5^{++}$
Mesane	3.0 ± 0.5	5.0 ± 0.9	$13.2 \pm 2.0^{***}$	$5.8 \pm 1.0^{++}$
Korpus kavernosum	6.8 ± 0.1	5.7 ± 0.5	$8.8 \pm 0.4^{**}$	$3.8 \pm 0.3^{***,+++}$
Testis	11.1 ± 1.3	7.8 ± 1.3	$18.8 \pm 1.0^{***}$	$13.1 \pm 0.9^+$



Şekil 17: Böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum dokularına ait oksidatif DNA hasarı sonuçları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. ** p<0.01, *** p<0.001: Kontrol grubuna göre; + p<0.05, ++ p<0.01, +++ p<0.001: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

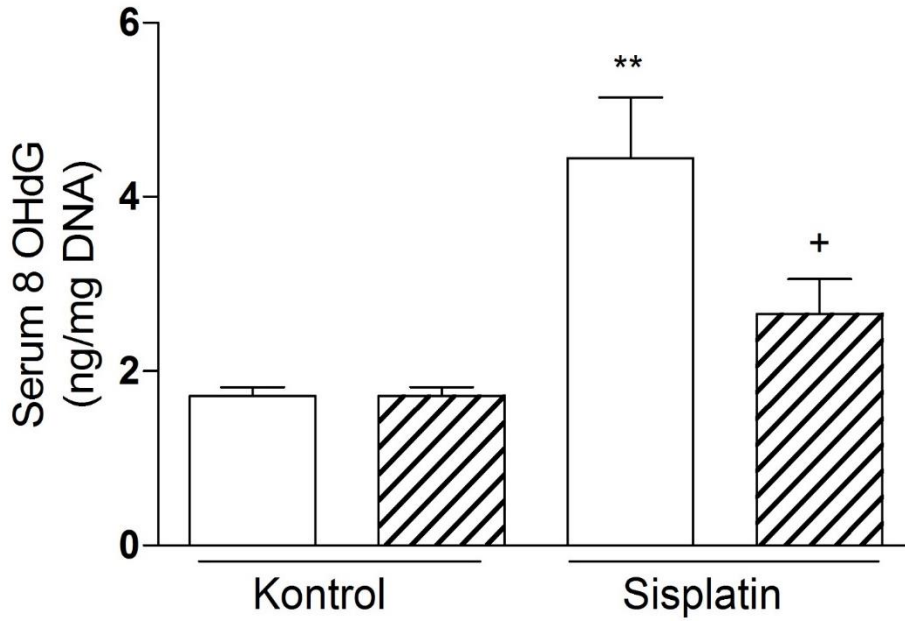
6.3.Serum Örneklerinde Yapılan Ölçümler

6.3.1. Serumda oksidatif DNA hasarı düzeyleri (Şekil 18, Tablo 13)

Serumda oksidatif DNA hasarı düzeyleri sisplatin uygulanan grupta kontrole göre anlamlı ($p<0.01$) olarak artmıştır. Kuversetin ile tedavi edilen grupta ise sisplatin uygulanan gruba göre anlamlı ($p<0.05$) olarak azalma gözlenmiştir.

Tablo 13: Sisplatin uygulaması yapılan sıçanlarda seruma ait oksidatif DNA hasarı değerleri.

	Kontrol		Sisplatin	
	SF	KT	SF	KT
8-OH-dg	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	$4.5 \pm 0.7^{**}$	$2.7 \pm 0.4^+$



Şekil 18: Seruma ait oksidatif DNA hasarı sonuçları. SF: Serum fizyolojik, KT: kuversetin. İstatiksel analiz için tek yönlü varyans analizi ANOVA ve Tukey post hoc testi kullanılmıştır. ** $p<0.01$: Kontrol grubuna göre; + $p<0.05$: SF ile tedavi edilen sisplatin grubuna göre.

7. TARTIŞMA

Sisplatin uzun yıllardan beri baş-boyun, solid testis, prostat mesane gibi birçok kanser türünün tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Doza bağlı olarak meydana gelen nefrotoksisite ve sitotoksisite kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkileridir. Tek doz sisplatin uygulaması sonucu ilaç proksimal tüpte lokal olarak birikirken, uzun süreli sisplatin uygulaması proksimal tübün yanı sıra distal tübülde, glomerüllerde ve intersistiyel bağ dokuda hasara sebep olarak kronik böbrek yetmezliğine sebep olur. Literatürde sisplatin toksisitesinde antioksidanlar ile yapılan çalışmaların olumlu sonuçları vardır. Bu bilgiler ışığında bizde sisplatin uygulaması ile birlikte koruyucu amaçla kuversetin uygulayarak bu antioksidanın koruyucu etkilerini inceledik. Yapılan çalışmalarda sisplatin uygulaması sonucu oluşan nefrotoksisite de oksidatif stresin önemi açık bir şekilde vurgulanmıştır. Meydana gelen reaktif oksijen türleri hücre bileşenlerine (lipid, protein DNA) zarar verir ve antioksidan savunma zayıflar.

Bugüne kadar yapılan birçok insan ve hayvan deneyinde, sisplatin nefrotoksisitesinin mekanizmasını anlamak ve bu yan etkisinin azaltmak için farklı koruyucu ajanlar denenmiştir. Şener ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, sıçanlarda sisplatin nefrotoksisitesini azaltmak amacıyla antioksidan özelliği olan melatoninin etkisi incelenmiştir. Yapılan değerlendirme sonucu renal GSH düzeylerindeki azalma sonucu oluşan lipid peroksidasyonu nefrotoksisitenin oluşmasında birincil etmendir. Melatonin sisplatinin sebep olduğu lipid peroksidasyonunu azaltarak, renal GSH'ı artırmıştır, böylece melatoninin sisplatin nefrotoksisitesine karşı koruyucu olduğu ileri sürülmüştür (Şener ve ark., 2000). Yapılan bir başka çalışmada sisplatin uygulamasını takiben E vitamini verilmiştir. E vitamini sisplatinin meydana getirdiği serbest oksijen radikallerini süpürmesi sonucu lipid peroksidasyonu azaltmıştır. Ayrıca sisplatin uygulamasından sonra sıçan böbrek dokusunda E vitamini konsantrasyonu azalmıştır, antioksidan ilavesi ile bozukluk dengelenmiş, bu nedenle hasarın ortaya çıkması kısmen engellenmiştir (Kanter ve ark., 2007). Bizde bu çalışmada, tek doz sisplatin uygulaması sonucu dokularda meydana gelen biyokimyasal ve histolojik değişikliklere karşı güçlü antioksidan olan kuversetin tedavisi ile kısmen önlenebildiği gösterdik.

Sisplatin uygulamasını yapılan sıçanlarda serum kreatinin- üre seviyelerinde ve MDA seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Çekirdek yağı ile yapılan tedavi sonucu renal MDA seviyesi azalmıştır (Borouhaki ve ark.,2015). Yapılan bir başka çalışmada sisplatin uygulaması sonrasında antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliği olan sitrus flavonoidi nobiletin'in etkinliği incelenmiştir. Sisplatin uygulaması sonucu serum kreatinin ve BUN seviyeleri artmıştır. MDA seviyesindeki artış oksidatif stresin kanıtıdır, bununla birlikte antioksidan GSH, SOD, CAT düzeylerinde azalma meydana gelmiştir. Bax ekspresyonu, kaspaz-3 ve DNA hasarı artmıştır, Bcl-2 ekspresyonu azalmıştır. Nobiletin ile tedavi ile böbrek fonksiyonları korunmuş ve antioksidan seviyeleri eski haline gelmiştir. Bu tedavi ile apoptotik yolların aktivasyonu inhibe olmuş, DNA hasarı azalmıştır (Malik ve ark., 2015). Diğer bir çalışmada sisplatin'in testisler üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Testiküler ve epididimal ağırlık, sperm sayısı, motilitesi, GSH-Px, SOD aktiviteleri ve GSH seviyesi anlamlı olarak azalmıştır, MDA seviyeleri anlamlı olarak artmıştır. Üzüm çekirdeği tedavisi ile sisplatin'in neden olduğu lipid peroksidasyonunu, oksidatif stresi ve genital organ ağırlığı üzerine olan zararlı etkileri zayıflatmıştır. Sonuç olarak üzüm çekirdeği doza bağlı olarak testikular toksisiteye karşı koruyucudur. Sisplatin'in testislerin ağırlığında ve boyutlarında değişiklik yaptığı gösterilmiştir. Bununla birlikte sperm konsantrasyonunda, motilitesinde enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarda ve plazma testosteron seviyelerinde azalmaya neden olmuştur. MDA seviyesi anlamlı olarak artmıştır (Zhao ve ark.,2014). Selenyum ve lycopen'in ayrı ve kombine verilisinde sisplatinine bağlı lipid peroksidasyonu, oksidatif stres azalmıştır ve genital organ ağırlığına ve boyutlarına verdiği hasar anlamlı olarak hafiflemiştir(Salem ve ark.,2012). Yapılan bir çalışmada 5 gün sisplatin uygulamasını takiben 30 gün boyunca sıçanlara kuversetin uygulaması yapılarak sisplatinin böbreklerdeki antioksidan gen ekspresyonu ve antioksidan enzim aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Sıçanlarda CAT, SOD, GPx ve glutatyon redüktaz (GR) değerleri ölçülmüştür. Böbreklerdeki antioksidan gen ekspresyonu ve antioksidan enzim aktivitesine bakıldığı zaman sisplatin uygulanan sıçanlarda CAT, SOD, GPx ve GR değerlerinin kontrol grubuna göre düştüğü, kuversetin ile yapılan tedavi sonucu değerlerin tekrardan yükseldiği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte sisplatin uygulaması

sonrasında sıçanlarda vitamin C ve E değerleri ölçülmüştür. Sonuç olarak vitamin C ve E değerleri sisplatin uygulanan grupta düşük bulunmuştur (Almaghrabi,2015). Bizim çalışmamızda sisplatin uygulanan gruplarda tüm dokularda; böbrek, mesane, testis ve korpus kavernozum; lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerini anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuçlarımız literatüre uygundur.

Kuversetin uzun yıllardan beri tedavi amaçlı kullanılan, sebze ve meyvelerde bulunan flavon grubuna ait bir antioksidandır. Bunun yanı sıra antiviral, antiinflamatuvar ve antikarsinojenik olduğu da gösterilmiştir. Streptozotosin ile oluşturulan deneysel diabetik sıçanlar melatonin, kuversetin ve resveratrol ile tedavi edilerek MDA, SOD, GSH ve CAT değerleri ölçülmüştür. Diabetik sıçanlarda MDA değeri yüksek bulunurken, SOD, GSH ve CAT değerleri kontrole göre düşük bulunmuştur. Yapılan antioksidan tedavi sonrasında MDA değeri düşerken, CAT ve GSH aktiviteleri artış göstermiştir (Elbe ve ark.,2015). Reaktif oksijen türleri iskemi reperfüzyon patofizyolojisinde önemli rol oynar. Kaverno dokuda iskemi reperfüzyon sonrası kuversetin olası koruyucu etkileri incelenmiştir. Korpus kavernozum dokusunda fenilefrin ile kasılma, karbakol ile gevşeme yanıtları organ banyosu aracılığı ile çalışılmıştır. MDA, GSH, SOD ve kaspaz-3 protein seviyeleri ölçülmüştür. İskemi reperfüzyon yapılan grupta kasılma ve gevşeme yanıtları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bozulma gözlemlenmiştir, fakat kuversetin ile yapılan tedavide yanıtlarda iyileşme görülmüştür. MDA ve kaspaz-3 protein seviyelerinde artış, GSH ve SOD seviyelerinde ise azalma görülmüştür. Kuversetin tedavisi sonucu antioksidan ve apoptotik belirteçlerde iyileşme gözlemlenmiştir (Cevik ve ark.,2013).. Yapılan organ banyosu çalışmasında kuversetin ve resveratrol'un fare aorta ve korpus kavernozum dokusunda NO/guanilat siklaz oranının gevşeme üzerine etkisini değerlendirilmiş bunun ayrıca oksidatif strese bağlı erektil disfonksiyon üzerine etkisini keşfetmek amaçlanmıştır. Sonuç olarak sadece resveratrol farelerin korpus kavernozum dokusunda gevşeme yaparken, kuversetin gevşeme üzerine olumlu bir etkisi görülmemiştir (Boydens ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda korpus kavernozum dokusunun hem kasılma hem de gevşeme yanıtları incelenmiştir. Fenilefrine karşı vermiş oldukları kasılma yanıtlarında kontrol grubuna göre anlamlılık bulunmuş olsa da yukarıda belirtilen çalışmaya paralel olarak sisplatin takiben verilen kuversetin sonucu gevşeme yanıtında herhangi bir anlamlılık

bulunmamıştır. Sisplatin uygulanan sıçanların detrusor düz kasında melatonin ve kuversetin kasılmaya olan etkileri incelenmiştir. Sisplatin uygulaması sonrası detrusor düz kasın asetilkolin ve KCl' e verdikleri maksimum yanıtları artmamıştır. Kuversetin ve melatonin ile tedavi sonrası her iki ajanda maksimum yanıtları olmasa da EC₅₀ değerleri sisplatin ile tedavi edilen gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Atalık ve ark.,2010). Bizim çalışmamızda mesanede karbakol ile yapılan kasılma yanıtında gruplar hem kontrol grubuna hem de kendi içinde anlamlılık göstermiştir.

8-OHdG, DNA'nın oksidasyonunun ana ürünlerinden biridir. Hücredeki 8-OHdG konsantrasyonu oksidatif stresin bir ölçüsüdür. Dimetiltiyöre (DMTU) sisplatine bağlı akut renal hasara karşı koruyucu radikal temizleyicidir. Oksidatif stresin baskılanması ve ısı şok proteinlerinin arttırılması sisplatinin neden olduğu renal hasara karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir. 5gün tez doz sisplatin uygulamasını takiben DMTU tedavisi yapılmıştır. DMTU sisplatin'in arttırmış olduğu serum kreatinin, 8-OHdG ve tübüler hasar anlamlı olarak inhibe etmiştir. DMTU ayrıca sisplatine bağlı Bax artışını inhibe etmiştir. Bu bulgular DMTU' nun sisplatine bağlı akut renal hasara karşı koruyucu olduğunu ve Bax aracılı renal tübüler hücrelerde apoptozu önlediği gösterilmiştir (Tsuji ve ark.,2009). Başka bir çalışmada MDA ve 8-OHdG sisplatin uygulandıktan sonra 14. Güne kadar idrarda ölçülmüştür. Sisplatin üriner MDA ve 8-OHdG seviyelerini arttırmıştır. Sonuç olarak, idrarda MDA seviyesi sisplatine bağlı akut renal hasarın tahmininde faydalı bir belirteç olmaktadır (Zhou ve ark.,2006). Bizim sonuçlarımıza göre sisplatin uygulaması sonucu tüm dokularda DNA hasarı anlamlı olarak artmıştır, kuversetin tedavisi sonrasında DNA hasarı anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak yaptığımız deneysel çalışmada sisplatin uygulaması sonucu meydana gelen hasar, kuversetin verilmesi ile anlamlı olarak azalmıştır. Fakat, kuversetin'in klinikte bu amaçla kullanılabilmesi için daha geniş kapsamlı deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

8.KAYNAKLAR

Ahmed EA, Omar HM, Elghaffar SKh, Ragb SM, Nasser AY. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against Cisplatin induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol.* 2011 May;49(5):1115-21.

Almaghrabi OA. Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. *Saudi J Biol Sci.* 2015 Mar;22(2):227-31.

Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD. Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res.* 2000 Apr;41(4):405-11.

Assini JM, Mulvihill EE, Huff MW. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2013 Feb;24(1):34-40.

Atalik KE, Keles B, Uyar Y, Dundar MA, Oz M, Esen HH. Response to vasoconstrictor agents by detrusor smooth muscles from cisplatin-treated rats and antioxidant treatment. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010 Jun;32(5):305-10.

Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Brody EN. Oxidative stress in severe acute illness. *Redox Biol.* 2015 Apr;4C:340-345.

Ben Amor N, Pariente JA, Salido GM, Bartegi A, Rosado JA. Caspases 3 and 9 are translocated to the cytoskeleton and activated by thrombin in human platelets. Evidence for the involvement of PKC and the actin filament polymerization. *Cell Signal.* 2006 Aug;18(8):1252-61. Epub 2005 Nov 21.

Beutler E. Glutathione in red blood cell metabolism. *A manual of biochemical methods.* New York: Grune and Stratton; 1975. p 112-114.

Boekelheide K. Mechanisms of Toxic Damage to Spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;(34):6-8.

Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015 Mar 10;6(2):109-20.

Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008 May 13;585(2-3):325-37.

Borch RF, Katz JC, Lieder PH, Pleasants ME. Effect of diethyldithiocarbamate rescue on tumor response to cis-platinum in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Sep;77(9):5441-4.

Borouhaki MT, Rajabian A, Farzadnia M, Hoseini A, Poorlashkari M, Taghavi A, Dolati K, Bazmandegan G. Protective effect of pomegranate seed oil against cisplatin-induced nephrotoxicity in rat. *Ren Fail.* 2015 Aug 19;1-6.

Boydens C, Pauwels B, Decaluwé K, Brouckaert P, Van de Voorde J. Relaxant and antioxidant capacity of the red wine polyphenols, resveratrol and quercetin, on isolated mice corpora cavernosa. *J Sex Med.* 2015 Feb;12(2):303-12.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-10.

Çevik Ö, Çadircı S, Şener TE, Tinay I, Akbal C, Tavukçu HH, Çetinel S, Kıran D, Şener G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. *Free Radic Res.* 2013 Sep;47(9):683-91.

Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumacker PT. Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene.* 2000 Aug 10;19(34):3840-8.

Chen X, Wu Y, Dong H, Zhang CY, Zhang Y. Platinum-based agents for individualized cancer treatment. *Curr Mol Med*. 2013 Dec;13(10):1603-12.

Coates PM, Betz JM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Mass J, White JD. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. Second Edition. Informa Healthcare, 2010, 656-664.

Cubukcuoglu Deniz G. Kalıcı atriyal fibrilasyon ve normal sinüs ritimli olgularda atriyal hücrelerde apoptozis ve apoptozisi regüle edici proteinlerin karşılaştırılması. Ankara üniversitesi Biyoteknoloji enstitüsü, 2008 Ankara. (Danışman: Doç.Dr. Ahmet Rüçhan Akar)

Dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol* 2012; 86:1233-50.

Demir M. Sıçanlarda oluşturulan sisplatin nefrotoksitesinde kefirin etkinliğinin değerlendirilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2008, Isparta. (DANIŞMAN: Prof. Dr. M. Tuğrul SEZER).

Elbe H, Dogan Z, Taslidere E, Cetin A, Turkoz Y. Beneficial effects of quercetin on renal injury and oxidative stress caused by ciprofloxacin in rats: A histological and biochemical study. *Hum Exp Toxicol*. 2015 Apr 30.

Elbe H, Esrefoglu M, Vardi N, Taslidere E, Ozerol E, Tanbek K. Melatonin, quercetin and resveratrol attenuates oxidative hepatocellular injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Exp Toxicol*. 2015 Sep;34(9):859-68.

Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol*. 2001 Apr;59(4):657-63.

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

Gulec M, Iraz M, Yilmaz HR, Ozyurt H, Temel I. The effects of ginkgo biloba extract on tissue adenosine deaminase, xanthine oxidase, myeloperoxidase, malondialdehyde and nitric oxide in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Ind Health.* 2006 Apr;22(3):125-30.

Howland RD, Mycek MJ. Lippincott Illustrated Rewiees.Çeviren: Prof.Dr. Filiz Onat, Doç.Dr. Zafer Gören, Doç.Dr. Atıla Karaalp Farmakoloji. 3. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd.Şti.,2009,s:479-481.

İlbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatininduced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinaseand nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod.* 2009 Jul;24(7):1717-25.

Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules.* 2011 Feb 10;16(2):1471-85.

Jones MM, Basinger MA, Holscher MA. Control of the nephrotoxicity of cisplatin by clinically used sulfur-containing compounds. *Fundam Appl Toxicol.* 1992 Feb;18(2):181-8.

Kanter M, Tarladacalısır Topçu Y, Uygun M. Cisplatin nefrotoksisitesinde E vitamininin koruyucu etkileri: ışık ve elektron mikroskobik çalışma. *Tıp Araştırma Dergisi* 2007;5(3):83-90.

Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracelluler calcium and oxygen radicals to cisplatin related renal cell injury. *J Pharmacol Sci.* 2006 Jan;100(1):65-72.

Koca N, Karadeniz F. Serbest radikal oluşum mekanizmaları ve vücuttaki antioksisan savunma sistemleri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*.

Korst AE, Boven E, van der Sterre ML, Fichtinger-Schepman AM, van der Vijgh WJ. Pharmacokinetics of cisplatin with and without amifostine in tumour-bearing nude mice. *Eur J Cancer*. 1998 Feb;34(3):412-6.

Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Dec;12(12):2478-80.

Malik S, Bhatia J, Suchal K, Gamad N, Dinda AK, Gupta YK, Arya DS. Nobiletin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury due to its anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Jul-Aug;67(7-8):427-33.

Marcon L, Zhang X, Hales BF, Robaire B, Nagano MC. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rats spermatogonial stem/progenitor cells. *J Androl*. 2011 Jul-Aug;32(4):432-43.

Materska M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity. *Pol. J. Food Nutr. Sci*. 2008, Vol. 58, No. 4, pp. 407-413.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000 Dec;52(4):673-751.

Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A. Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2001 May;12(5):900-8.

Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2033-45.

Myroie AA, Collins H, Umbles C, Kyle J. Erythrocyte superoxide dismutase activity and other parameters of copper status in rats ingesting lead acetate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986 Mar 15;82(3):512-20.

Narayana K, Al-Bader M, Mousa A, Khan KM. Molecular effects of chemotherapeutic drugs and their modulation by antioxidants in the testis. *Eur J Pharmacol.* 2012 Jan 15;674(2-3):207-16

Osman AM, El-Sayed EM, El-Demerdash E, Al-Hyder A, El-Didi M, Attia AS, Hamada FM. Prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by methimazole. *Pharmacol Res.* 2000 Jan;41(1):115-21.

Paskaloglu K, Sener G, Ayanğolu-Dülger G. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol.* 2004 Sep 24;499(3):345-54.

Peres LA, da Cunha AD. Acute nephrotoxicity of cisplatin molecular mechanisms Jr. *J Bras Nefrol.* 2013 Oct-Dec;35(4):332-40.

Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):835-42.

Razzaque MS, Koji T, Kumatori A, Taguchi T. Cisplatin-induced apoptosis in human proximal tubular epithelial cells is associated with the activation of the Fas/Fas ligand system. *Histochem Cell Biol.* 1999 May;111(5):359-65.

Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer*. 1985 May 15;55(10):2303-16.

Sabuncuoglu S, Ozgunes H. Cisplatin toxicity: importance of oxidative stress and effect of antioxidants. *J Ist Faculty Med* 2010; 73: 3

Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F, Morales AI, Lopez-Novoa JM. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Nov;26(11):3484-95.

Sánchez-González PD, López-Hernández FJ, López-Novoa JM, Morales AI. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 2011;41: 803-21.

Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJ. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology*. 2012 May;79(5):1184.e1-6.

Sener G, Satiroglu H, Kabasakal L, Arbak S, Oner S, Ercan F, Keyer-Uysal M. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. *Fundam Clin Pharmacol*. 2000 Nov-Dec;14(6):553-60.

Tarloff JB, Lash LH. *Toxicology of the kidney*. Third edition. CRC Press 2006, 816.

Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Kishihara K, Hirakata H, Iida M. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int*. 2003 Jan;63(1):72-82.

Tsuji T, Kato A, Yasuda H, Miyaji T, Luo J, Sakao Y, Ito H, Fujigaki Y, Hishida A. The dimethylthiourea-induced attenuation of cisplatin nephrotoxicity is associated with the augmented induction of heat shock proteins. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Jan 15;234(2):202-8

Türk G, Ceribaşı AO, Sahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine.* 2011 Mar 15;18(5):356-61.

Uozumi J, Ishizawa M, Iwamoto Y, Baba T. Sodium thiosulfate inhibits cis-diamminedichloroplatinum (II) activity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1984;13(2):82-5.

Xin Yao, Md; Kessarın Panıchpısal, Md; Neil Kurtzman, Md; Kenneth Nugent, Md. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *Am J Med Sci* 2007;334(2):115–124.

Viale M, Vannozzi MO, Pastrone I, Mariggiò MA, Zicca A, Cadoni A, Cafaggi S, Tolino G, Lunardi G, Civalleri D, Lindup WE, Esposito M. Reduction of cisplatin nephrotoxicity by procainamide: does the formation of a cisplatin-procainamide complex play a role? *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jun;293(3):829-36.

Yee S, Fazekas-May M, Walker EM, Montague D, Stern S, Heard KW. Inhibition of cisplatin toxicity without decreasing antitumor efficacy. Use of a dithiocarbamate. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994 Nov;120(11):1248-52.

Yılmaz HR, Sogut S, Ozyurt H, Iraz M, Yıldırım Z, Akyol O. Sıçanlarda Sisplatinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Metabolik Enzim Aktivitelerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisi. *Van Tıp Dergisi:* 11 (1):1-6, 2004.

Zhao YM, Gao LP, Zhang HL, Guo JX, Guo PP. Grape seed proanthocyanidin extract prevents DDP-induced testicular toxicity in rats. *Food Funct.* 2014 Mar;5(3):605-11.

Zhou H, Kato A, Miyaji T, Yasuda H, Fujigaki Y, Yamamoto T, Yonemura K, Takebayashi S, Mineta H, Hishida A. Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Mar;21(3):616-23.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Selin	Soyadı	ÇADIRCI
Doğum Yeri	Kadıköy	Doğum Tarihi	19.11.1989
Uyruğu	T.C	Tel	0506 271 58 44
E-mail	selincadirci@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Uludağ Üniversitesi-Biyoloji	2011
Lise	Kadıköy Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Kabin Memuru	Türk Hava Yolları	2015 halen
Laboratuvar Teknikeri	Acıbadem Hastanesi	2014-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İYİ	İYİ	İYİ

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
53,75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	71,335	71,2	65,19

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint	İYİ

EK : Diğer Bilimsel faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

EK-1

Yayınlar

Cevik O, **Cadırcı S**, Sener TE, Tinay I, Akbal C, Tavukçu HH, Cetinel S, Kıran D, Sener G. Quercetin treatment against ischemia/reperfusion injury in rat corpus cavernosum tissue: a role on apoptosis and oxidative stress. Free Radic Res. 2013;47(9):683-91

Tavukçu HH, Sener TE, Tinay I, Akbal C, Erşahin M, Cevik O, **Cadırcı S**, Reiter RJ, Sener G. Melatonin and tadalafil treatment improves erectile dysfunction after spinal cord injury in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2014 Feb 19.

Ozyurt H, Ozden AS, Cevik O, Ozgen Z, **Cadırcı S**, Elmas MA, Ercan F, Sener G, Gören MZ. Investigation into the role of the cholinergic system in radiation-induced damage in the rat liver and ileum. J Radiat Res. 2014 Jun 8.

Ozyurt H, Cevik O, Ozgen Z, Ozden AS, **Cadırcı S**, Elmas MA, Ercan F, Gören MZ, Sener G. Quercetin protects radiation-induced DNA damage and apoptosis in kidney and bladder tissues of rats. Free Radic Res. 2014 Aug 14:1-9.

Posterler

Tinay I, Celik O, **Cadırcı S**, Cevik O, Oroglu B, Sener G, Tarcan T. ‘Tavşanda Subaraknoid Kanamanın Ve Sonrasında Uygulanan Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Mesane Dokusu Üzerindeki Etkileri.’ 3. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 3-6 Ekim 2013, ANTALYA.

Sener TE, Tinay I, Tarcan T, Cevik O, **Cadırcı S**, Cetinel S, Sener G. ‘Sıçanlarda İskemi/Reperfüzyon Modelinde Oluşan Mesane Dokusu Kontraktil Bozukluğu Ve Apoptoz Üzerine Kuersetinin Etkileri.’ 3. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 3-6 Ekim 2013, ANTALYA.

Sener TE, Tinay I, Tarcan T,Cevik O, Erşahin M, **Cadırcı S**, Cetinel S, Sener G.
'Spinal Kord Hasarı Sonrasında Kuersetinin Sıçan Mesane Dokusu Üzerinde
Koruyucu Etkileri.' 3. Ulusal İşlevsel Üroloji ve Kadın Ürolojisi Kongresi, 3-6 Ekim
2013, ANTALYA.

EK-2: Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu Karar Formu



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	99.2013.mar	Çalışma: Yüksek lisans tezi
	PROJE ADI	Sispilatin'e bağlı urogenital organ toksisitesine karşı kuversetinin olası koruyucu etkilerinin incelenmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Göksel ŞENER	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER- MÜ Eczacılık Fakültesi farmakoloji ABD	
	DESTEKLEYİCİ	BAPKO	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih <u>19.05.2013</u> Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereççe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
------------------------	--

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.

Unvan / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeligi	Onaylanan Proje ile ilişkisi		Toplantıya katılım		İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var	Yok	Evet	Hayır	YÜRÜTÜCÜ
Prof.Dr. İnci ALİCAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	Var	Yok	Evet	Hayır	<i>Ju</i>
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	<i>Ayşen</i>
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	<i>Serap</i>
Doç.Dr. Hasan Raci YANANLI	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var	Yok	Evet	Hayır	<i>Dilek</i>
Öğr. Gör.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Bilur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	