



**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**



**RATLARDA CİSPLATİN KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE
ÜZERİNE KARADUT (*Morus nigra* L.) EKSTRAKTININ KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAHİME ALTINTAS

**ARALIK 2020
GÜMÜŞHANE**

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA CİSPLATİN KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE
KARADUT (*Morus nigra* L.) EKSTRAKTININ KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RAHİME ALTINTAS

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
“Biyoteknoloji Anabilim Dalı”
Yüksek Lisans Programında Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 15.12.2020
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 24.12.2020

ARALIK 2020

TEZ BEYANNAMESİ

Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlamış olduğum “**Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Nefrotoksisite Üzerine Karadut (*Morus nigra* L.) Ekstraktının Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**” isimli tez çalışmada; bütün bilgi ve belgeleri genel akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı bütün bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğumu, başka kaynaklardan yararlandığım bilgileri metin ve kaynaklarda eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksi durumda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim./....../20..

Rahime ALTINTAS

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RATLARDA CİSPLATİN KAYNAKLI NEFROTOKSİSİTE ÜZERİNE KARADUT (*Morus nigra* L.) EKSTRAKTININ KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

RAHİME ALTINTAS

Gümüşhane Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ

2020, 75 sayfa

Cisplatin kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik/sitotoksik bir ajandır ve başta nefrotoksisite olmak üzere hepatotoksisite, mukozit, kan parametrelerinde anormal değişiklikler, periferik nöropati gibi çeşitli yan etkilere yol açabilmektedir. Yan etkilerin oksidan-antioksidan dengenin belirgin biçimde oksidan yönde bozulmasından kaynaklandığı belirtilmektedir. Çalışmamızda zengin polifenolik içeriğe, yüksek antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteye sahip Karadut (*Morus nigra*) meyvesinden elde edilen ekstraktın, ratlarda cisplatin kaynaklı böbrek toksisitesi üzerine koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Karadut numunelerinden etanol, metanol ve sulu ekstraktlar hazırlandı. Bunların Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasitesi (FRAP), 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH), toplam antioksidan kapasite (TAS), toplam fenolik içerik

ve 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit (ABTS) antioksidan aktiviteleri tespit edildi ve çalışmanın bundan sonraki kısımlarında en yüksek antioksidan aktiviteyi veren ekstrakt olan metanolik ekstrakt kullanıldı. Hayvan deneylerinde her biri 3-4 aylık (n=7) Wistar Albino dişi ratlardan meydana gelen 5 farklı gruba (kontrol grubu, karadut grubu [KD], cisplatin grubu, Cis+200 mg/kg KD grubu ve Cis+400 mg/kg KD grubu) ayrıldı. Kontrol grubuna 12 gün boyunca serum fizyolojik, karadut grubuna oral yolla 12 gün karadut metanolik ekstraktı (400 mg/kg/gün); Cisplatin grubuna 5. günü i.p yolla tek doz Cisplatin (7,5 mg/kg), tedavi gruplarında ise 5.gün 7,5 mg/kg'lık cisplatin ve 12 gün karadut metanol ekstraktı (200 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün) oral yolla verildi. 12. Gün tüm gruplardan anestezi altında intrakardial yolla kan alındıktan sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. Kanda; Kan üre azotu (BUN), Kreatinin (CREA), toplam antioksidan kapasitesi - toplam oksidan kapasitesi (TAS-TOS) ölçüldü ve oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeyleri hesaplandı. Böbrek dokusunda ise Süperoksid Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Malondialdehit (MDA), tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α), Kaspaz-3, TAS, TOS düzeyleri ölçüldü ve OSİ indeksi hesaplandı. Ayrıca böbrek dokusunun histopatolojik değerlendirilmesi yapıldı. Karadut ekstraktları içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olarak metanolik ekstrakt bulundu ve ratlara bu ekstrakt verildi. Ratlarda cisplatin ile oluşturulan akut böbrek hasarı sonrası serum örneklerinde tedavi gruplarının cisplatin grubuna göre BUN, kreatin ve TOS düzeylerinde anlamlı düzeyde azalırken ($p<0.05$), TAS seviyesinde anlamlı düzeyde artışı gözlemlendi. Böbrek doku örneklerinde MDA, Kaspaz-3 ve TNF- α düzeylerinde anlamlı azalma ($p<0.05$), TAS, SOD ve CAT düzeylerinde ise cisplatin grubuna göre anlamlı bir artış belirlendi ($p<0.05$). Histopatolojik değerlendirmede cisplatin grubunda kontrol grubuna göre anatomik ve fizyolojik olarak anlamlı bozulmalar görüldü. Tedavi gruplarında ise cisplatin grubuna göre proksimal ve distal epitel hücrelerinin kayıplarında ve debris birikimlerinde azalma olduğu saptandı ($p<0,05$). Biyokimyasal ve histolojik sonuçlar açısından yüksek doz karadutun düşük doza göre nefrotoksisiteye karşı daha etkili olduğu tespit edildi. Sonuç olarak karadutun cisplatin indüklü böbrek hasarına ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Cisplatin, Karadut, Metonollik ekstrakt, Nefrotoksisite

ABSTRACT
MS THESIS

INVESTIGATION of the PROTECTIE EFFECT of BLACK MULBERRY
(*Morus nigra* L.) EXTRACT on CISPLATIN-INDUCED
NEPHROTOXICITY in RATS

RAHİME ALTINTAS

Gümüşhane University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biotechnology

Advisor: Assit. Prof. Dr. Kağan KILINÇ

2020, 75 pages

Cisplatin is an antineoplastic / cytotoxic agent used in cancer treatment and may cause various side effects such as nephrotoxicity, hepatotoxicity, mucositis, abnormal changes in blood parameters and peripheral neuropathy. It is reported that these side effects appear due to the deterioration of the oxidant-antioxidant balance in the oxidant direction. The studing aiming to bring this axidant/antioxidant disequbilium in to ladance might impose cisplatin based cancer chemotherapy therefore, it the aim of this study is to investigate the protective effects of the extract obtained from Black Mulberry (*Morus nigra*) extracts, which has rich polyphenolic content, high antioxidant and anti-inflammatory activity, on cisplatin-induced rat model of nephrotixicity. Ethanol, methanol and aqueous extracts were prepared from black mulberry samples and their Iron (III) Ion Reducing Antioxidant Capacity (FRAP), 2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), total antioxidant capacity (TAS), total phenolic content and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) antioxidant activity analysis were performed. The most appropriate activity has shown on the methanolic extract group which was used in the next part of the study. In animal experiments, 5 different groups (control group, black mulberry group [KD], cisplatin group, Cis + 200 mg / kg KD group and Cis + 400 mg / kg) consisting of Wistar Albino female rats, each 3-4 months old (n = 7) KD group) were used. Saline was administered to the control group for 12 days, black mulberry methanolic extract for 12 days (400 mg / kg / day) to the black mulberry group; Cisplatin (7.5 mg / kg) on the 5th day in the Cisplatin group, 7.5 mg / kg cisplatin on the 5th day and black mulberry methanol extract for 12 days (200 mg / kg / day and 400 mg) in the treatment groups. / kg / day) given orally. On the 12th day, all rats were sacrificed after blood was taken from all groups by intracardial route under anesthesia. In the blood; Blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CREA), total antioxidant capacity - total oxidant capacity (TAS-TOS) were measured and oxidative stress index (OSI) levels were calculated. Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), Caspase-3 (Caspase-3), TAS, TOS levels were measured in the kidney tissue and the OSI index was calculated. In addition, histopathological evaluation of the kidney tissue was made. Methanolic extract was found to have the highest antioxidant activity among the black mulberry extracts and this extract was given to rats. After acute kidney injury induced by cisplatin in rats, BUN, creatine and TOS levels of the treatment groups were significantly decreased ($p < 0.05$), while the TAS level was significantly increased compared to the cisplatin group. Significant decrease in MDA, caspase-3 and TNF- α levels in kidney tissue samples ($p < 0.05$), and a significant increase in TAS, SOD and CAT levels compared to cisplatin group ($p < 0.05$). Histopathological evaluation showed anatomic and physiologic significant impairments in the cisplatin group compared to the control group. Also Proximal and distal epithelial cell loss and debris accumulation were found to be decreased in the high and low dose black mulberry groups compared to the cisplatin group ($p < 0.05$). In terms of biochemical and histological results, it was determined that high dose black mulberry was more effective against nephrotoxicity than low dose. As a result, it has been observed that black mulberry has a protective effect against cisplatin-induced kidney damage and oxidative stress.

Keywords: Antioxidant, Black mulberry, Cisplatin, Methanolic extract, Nephrotoxicity

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmaya maddi destek sağlayan Gümüşhane Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca değerli katkıları, yol gösterici fikirleri ve motivasyon için Tez Danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ'a teşekkür ederim.

Çalışma esnasındaki uygulamalara ve analizlere katkılarından dolayı KTÜ Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Birgül Vanizör KURAL'a, Ekstraksiyon aşamasında yardımlarından dolayı Gümüşhane Üniversitesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Cemalletin BALTACI'ya, deneysel aşamadaki yönlendirmelerinden dolayı KTÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Selim DEMİR'e, ratların sakrafiye edilmesinde katkıları için KTÜ Tıp Fakültesi Öğr. Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Arif Burak ÇEKİÇ'e histopatolojik analizlerindeki katkılarından dolayı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Levent TÜMKAYA ve Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye, KTÜ'de sürdürülen araştırmalar sırasında ekipman desteği sağlayan ve tecrübelerinden yararlandığım Arş. Gör. Elif ŞAHİN ve Araş. Gör. Neslihan SAĞIR'a, yüksek lisans eğitimim süresince desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Deniz CANBOLAT'a ve Merve BULUT'a, yaptığım herşeyde olduğu gibi; yüksek lisans eğitimim süresince maddi manevi desteğini ve sabrını esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Rahime ALTINTAS

Gümüşhane

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	VIII
İÇİNDEKİLER.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XII
TABLO DİZİNİ.....	XIV
SEMBOLLER ve KISALTMA DİZİNİ.....	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. Kanser.....	3
1.3. Kemoterapi.....	4
1.4. Cisplatin.....	5
1.4.1. Kimyasal Özellikleri.....	6
1.4.2. Cisplatinin Hücre İçine Alınışı.....	7
1.4.3. Cisplatin Farmakokinetiği.....	8
1.4.4. Cisplatinin Yan Etkileri.....	9
1.4.4.1. Cisplatin Nefrotoksisitesi.....	9
1.5. Serbest Radikaller.....	12
1.6. Antioksidanlar.....	14
1.6.1. Polifenoller.....	16
1.7. Karadut.....	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	21
2.1. Giriş.....	21
2.1.1. Kullanılan Cihaz Alet ve Malzemeler.....	21
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	22
2.2. Metod.....	22
2.2.1. Karadut Meyvesinin Toplanması ve Kurutulması.....	22
2.2.2. Ekstraksiyon.....	23
2.2.3. Karadut Meyvesinin Ekstraktlarının Antioksidan Belirlenmesi.....	23
2.2.3.1. Toplam Polifenol İçerik Tayini.....	23

2.2.3.2.	DPPH Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini	25
2.2.3.3.	Toplam Demir İndirgeme Antioksidan Kapasitesi	26
2.2.3.4.	ABTS Radikal Katyon Süpürücü Etki Tayini	28
2.2.4.	Deney Hayvanları ve Kullanılan İlaçlar	29
2.2.4.1.	Çalışma Grupları.....	30
2.2.4.2.	Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması.....	30
2.2.5.	Biyokimyasal Analizler	31
2.2.5.1.	Serum Biyokimya Analizleri	31
2.2.5.2.	Doku Homojenizatlarının Hazırlanması.....	31
2.2.5.3.	Protein Miktar Tayini	31
2.2.5.4.	SOD Aktivite Tayini.....	32
2.2.5.5.	Katalaz Aktivite Tayini	34
2.2.5.6.	MDA Analizi.....	34
2.2.5.7.	Kaspaz-3 Analizi.....	36
2.2.5.8.	TNF- α Analizi.....	37
2.2.5.9.	Toplam Antioksidan (TAS) ve Toplam Oksidan (TOS) Kapasitesi.....	39
2.2.5.10.	Oksidatif Stres İndekslerinin (OSI) Hesaplanması.....	39
2.2.6.	Histopatolojik Analizler	39
2.2.6.1.	Semikantitatif Analiz	40
2.2.7.	İstatistiksel Analizler	40
3.	BULGULAR	41
3.1.	Antioksidan Analiz Sonuçları.....	41
3.2.	Biyokimyasal Analiz Sonuçları	41
3.2.1.	Kreatinin Düzeyleri	41
3.2.2.	BUN Düzeyleri.....	42
3.2.3.	TAS-TOS ve OSI Değerleri	43
3.2.4.	Dokuda MDA Düzeyleri	47
3.2.5.	Dokuda SOD Düzeyleri.....	48
3.2.6.	Dokuda CAT Düzeyleri.....	48

3.2.7.	Dokuda TNF- α Düzeyleri.....	49
3.2.8.	Dokuda Kaspaz-3 Düzeyleri.....	50
3.3.	Histopatolojik Bulgular	51
4.	TARTIŞMA.....	55
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	64
6.	KAYNAKLAR.....	65
7.	EKLER	76
	ÖZGEÇMİŞ.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1	Diğer bazı platin türevleri: A-Oksaliplatin, B-Karboplatin, C-Endoplatin D-Ormaplatin	5
Şekil 1.2.	Cisplatinin moleküler yapısı.....	6
Şekil 1.3.	Cisplatinin DNA hasar mekanizması. (a) Cisplatinin hidrolize olması, (b) Hidrolize olmuş cisplatin metabolitinin DNA iplikçiklerine bağlanması.....	8
Şekil 1.4.	Cisplatinin hücresel ve moleküler etki mekanizması	11
Şekil 1.5.	Oksidatif hasar.....	14
Şekil 1.6.	ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları.....	16
Şekil 1.7.	Farklı Polifenol sınıflarının kimyasal yapısı	17
Şekil 1.8.	Karadut meyvesi.....	18
Şekil 2.1.	Gallik asit standart grafiği.....	25
Şekil 2.2.	DPPH troloks standart grafiği	26
Şekil 2.3.	FRAP standart grafiği.....	28
Şekil 2.4.	ABTS standart grafiği	29
Şekil 2.5.	Doku protein ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	32
Şekil 2.6.	SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği	33
Şekil 2.7.	Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	36
Şekil 2.8.	Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	37
Şekil 2.9.	TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği.....	39
Şekil 3.1.	Serum örneklerinin kreatin değerleri.....	42
Şekil 3.2.	Serum örneklerinin BUN değerleri	43
Şekil 3.3.	Serum örneklerinin TAS değerleri	43
Şekil 3.4.	Serum örneklerinin TOS değerleri	44
Şekil 3.5.	Serum örneklerinin OSI değerleri	44
Şekil 3.6.	Doku örneklerinin TAS değerleri.....	45
Şekil 3.7.	Doku örneklerinin TOS değerleri.....	46
Şekil 3.8.	Doku örneklerinin OSI değerleri.....	46
Şekil 3.9.	Doku örneklerinin MDA değerleri	47
Şekil 3.10.	Doku örneklerinin SOD değerleri	48

Şekil 3.11. Doku örneklerinin CAT değerleri	49
Şekil 3.12. Doku örneklerinin TNF- α değerleri	50
Şekil 3.13. Doku örneklerinin Kaspaz-3 değerleri	51
Şekil 3.14. Kontrol grubu (H&E A(x20), B(x40))	51
Şekil 3.15. Karadut grubu (H&E C(x20), D(x40)).....	52
Şekil 3.16. Cisplatin grubu (H&E E(x20), F(x40))	52
Şekil 3.17. Cis+200 mg/kg (H&E G(x20), H(x40))	53
Şekil 3.18. Cis+400 mg/kg (H&E I(x20), J(x40)).....	53

TABLO DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1.1. Kemoterapide yaygın olarak kullanılan ilaçların sınıflandırılması	4
Tablo 1.2. Otoksidasyon reaksiyonlarının katalizörleri olarak geçiş metaller	13
Tablo 1.3. Bitkilerde bulunan meyve polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması	16
Tablo 2.1. Kullanılan cihaz ve aletler.....	21
Tablo 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	22
Tablo 2.3. Karadut ekstraktlarında TFM tayini için yapılan pipetlemeler	24
Tablo 2.4. Karadut ekstraktlarında DPPH tayini için yapılan pipetlemeler	26
Tablo 2.5. Karadut ekstraktlarında FRAP tayini için yapılan pipetlemeler	27
Tablo 2.6. Karadut ekstraktlarında ABTS tayini için yapılan pipetlemeler	29
Tablo 2.7. SOD aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler	33
Tablo 2.8. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı	34
Tablo 2.9. MDA analizi için yapılan pipetlemeler	35
Tablo 2.10. Caspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler.....	37
Tablo 2.11. TNF- α aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler	38
Tablo 3.1. Ekstraktların antioksidan sonuçları.....	41
Tablo 3.2. Tübüler Nekroz Skor (TNS) metodu.....	53
Tablo 3.3. TNS sonuçları (ortalama (25%-75% interquartile alan)	54

SEMBOLLER ve KISALTMA DİZİNİ

BCA	: Bisinkoninik Asit
BUN	: Kan üre azotu
CAT	: Katalaz
CuCl ₂	: Bakır (II) Klorür
CTR1	: Copper Transporter 1
DPPH	: 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GFH	: Glomerüler filtrasyon hızı
GIS	: Gastrointestinal sistem
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₃ PO ₄	: Fosforik Asit
<i>ip</i>	: İntraperitoneal
KH ₂ PO ₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
Na ₂ CO ₃	: Sodyum Karbonat
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
O ₂ ⁻	: Süperoksit Radikali
PBS	: Fosfat tamponlu salin
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TBA	: Tiyoarbitürik asit
TEP	: Tetraetoksipropan
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü alfa
TNS	: Tümör nekroz skoru
TOS	: Total Oksidan Seviye
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş ve Amaç

Kanser, DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi, çoğalması ile meydana gelen ve kalp hastalıklarından sonra en yaygın ölüm nedeni olan bir hastalıktır (Pavlopoulou vd., 2015). Bilimin ilerlemesi ile birlikte bu hastalığa yönelik standart tedavilerin yanı sıra yeni tedavi yöntemleri de geliştirilmektedir. Tedaviye yönelik standart olarak kabul edilen kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlere ek olarak aşılarda, hormonal tedavi yöntemleri ile hedeflenmiş gen terapileri giderek artan biçimde kullanılmaya başlanmıştır (Baykara, 2016). Kanser tedavisinde kemoterapi en çok tercih edilen yöntemdir. Kemoterapi yöntemi tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını baskılamayı veya mümkün oldukça onları yok etmeye amaçlar.

Kemoterapi uygulamalarında antineoplastik ajanlar yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Antineoplastik ilaçlar çoğalan kanser hücrelerini yok ettikleri gibi, hızlı biçimde çoğalma özelliği gösteren normal somatik hücrelere de zarar verebilmektedir. Dolayısıyla bu ajanların bazı zararlı yan etkileri de söz konusudur (Kintzel, 2001). Kemoterapide kullanılan antineoplastik ilaçların içerisinde yüksek etkiye sahip ve çeşitli kanser türlerinde yaygın olarak kullanılan ajanlardan biri de cisplatindir.

Cisplatin testis, baş ve boyun, ovaryum, servikal, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi birçok kanser türlerinde kullanılmaktadır (Pabla ve Dong, 2008). Cisplatinin diğer antioplastik ilaçlarda olduğu gibi normal somatik hücreler üzerinde de bazı yan etkileri vardır. Bu yan etkiler arasında nefrotoksisite, hepatoksisite, ototoksisite, mukozit, öze fajit, ülseratif lezyonlar, bulantı, kusma, tat duyusunda kayıp, kısmi ümmün yetmezlik ve kardiyomiyopati sayılabilir. Nefrotoksisite cisplatin ilacının kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisidir. Yapılan çalışmalarda cisplatinin nefrotoksistide serbest oksijen radikallerinin artışına bağlı olarak oksidatif stresi tetiklediği belirtilmiştir (Zhi-na vd., 2017).

Reaktif Oksijen Türleri (ROS) dış orbitalinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron taşıyan, yüksek enerjili, kararsız atom veya moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller eşlenmemiş elektron bulundurduklarından dolayı diğer maddelerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler (Özcan vd., 2015).

Antineoplastik ilaçların ve cisplatinin yan etkilerinin azaltmak amacıyla zengin antioksidan içerikli bitkilerin kullanıldığı pek çok in vivo ve in vitro çalışma yapılmıştır (Ozyurt vd., 2004; Baliga vd., 1999).

Karadut (*Morus nigra*), dutgiller (*moracea*) familyasına mensup olan ve geleneksel tedavide meyve ve yaprakları sıklıkla kullanılan bir bitkidir. Karadutun meyve ve yapraklarının, askorbik asit, fenolik bileşikler, antosiyaninler ve diğer flavonoid bileşikler gibi fitokimyasal maddeler bakımından zengin olduğu ve antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik, anti-HIV, antienflamatuar, hipolipidemik, hepatoprotektif, antiobezite, nöroprotektif, antihiperlipidemi, antiaterojenik ve antikanser etkisi gibi geniş bir biyolojik aktivite sergilediği pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Wu vd., 2013; Özgen vd., 2009; Turan vd., 2017). Karadutun içeriğinde çeşitli miktarda kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik ve galik asit gibi fenolik asitler ile kateşin, epikateşin, quersetin, kaemferol, cyanidin gibi flavonoidler bulunmaktadır (Chan vd., 2013).

Kemoterapötik ilaçların tıbbi bitkiler yoluyla etkilerinin azaltılmasına yönelik hayvan deneylerini içeren çalışmalarda genellikle süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin kapasiteleri değerlendirilmektedir. Bununla beraber kanser tedavisinde uygulanan yöntemlerin bağışık yanıtı düşürücü, yüksek inflamantuar etki, gastronestinal yollarda lezyon oluşturması gibi etkileri de bulunmaktadır /Yao vd., 2007). Karadutun yukarıda belirtilen özellikleri dikkate alındığında kemoterapinin söz konusu yan etkilerine karşı önleyici veya azaltıcı yönde etkileri olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada Karadut (*Morus nigra*) meyvesinin zengin polifenolik içeriği, yüksek antioksidan ve anti-inflamatuar aktivitesi doğrultusunda cisplatinin böbrek nefrotoksitesisi üzerine etkilerinin azaltılması yönünde ne derece etkili olduğunun tespit edilmesi, bu şekilde antikanser tedavide yeni bir etken ürünün ortaya konması, antineoplastik ilaçların yan etkilerini önlemeye yönelik olası mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmıştır.

1.2. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile meydana gelen, patogenezinde genetik ve çevresel koşulların rol oynadığı bir hastalıktır (Dalay, 2006) ve kardiyovasküler hastalıklardan (KVH) sonra en sık önemli ölüm sebeplerinden biridir. Son dönemlerde gelişmiş tanı yöntemleri (erken tanı dahil) sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artmış olması, toplumun hastalık hakkında bilinçlenmesi, toplumsal tarama çalışmalarının yapılması gibi sebeplerden dolayı bu hastalığın tespitinde kaynaklanan artış görülmektedir. Bunun dışında artan çevre kirleticileri, kanserojen gıdalar ve gıda zincirinde koruyucu olarak kullanılan ajanlar, beslenme şekli ve vücut ağırlığı, sigara, artmış kanserojen enfeksiyon hastalıkları ve stres gibi sebepler de bu artışı desteklemektedir (American Cancer Society, 2020). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre kanser vakalarının 2020'li yıllardan itibaren katlanarak artması beklenmektedir (Cancer Fact sheet February 2018). Kanser tedavilerine yönelik sağlık harcamaları ülkelerin bütçelerinde önemli yer tutmaktadır.

Kanser yayılım özelliğine göre iyi huylu-yayılmasız (bening) ve kötü huylu-yayılıcı (malign) olarak sınıflandırılmaktadır. Yüzden fazla kanser çeşidi tanımlamakla birlikte insanlar arasında genetik farklılık hem kanserin ortaya çıkışında hem de tedavilere verilen cevapta en önemli faktörlerden biridir. Klasik kanser tedavi yöntemleri arasında en yaygın olanlar cerrahi uygulamalar, kemoterapi ve radyoterapi olarak sıralanabilir (Akdemir, 2004). Biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler sayesinde gen terapileri, hormon tedavileri, hedeflenmiş immün sistem, yeni aşılar şeklinde yeni kanser tedavi metotları geliştirilmiştir (Baykara, 2016). Kanser tedavi yöntemleri bir takım yan etkilere sebep olmaktadır bu etkilerin bir kısmı tedavinin sürecinde ortaya çıkıp daha sonra kaybolmaktadır. Örneğin mukozit, kombine tedavilerde ve yüksek doz ışın tedavilerde görülmektedir (Yıldırım vd., 2003). Bu tedavi süreçlerinde en yaygın biçimde görülen yan etkilerin başında tedavinin gidişatını etkileyen nefrotoksite gelmektedir (Bhosle vd., 2009).

Cerrahi tedavi yöntemleri daha çok bening tümörlerin ve erken teşhis edilmiş malign tümörlerin çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak ilerlemiş metastatik (yayılıcı) olgularda tercih edilmez. Radyoterapi, kanserli hücrelerin iyonizasyon ışınları kullanarak yok edilmesine dayanan bir tedavi yöntemidir. Vücudun sadece belli bir bölgesini hedef alarak yapılabildiği gibi, tüm vücudu hedef alan tedaviler de uygulanmaktadır

(Kinhikar vd., 2014). Kemoterapide ise bir takım kimyasal ajanlar kullanılır ve kanser dokunun baskılanması sağlanır.

1.3. Kemoterapi

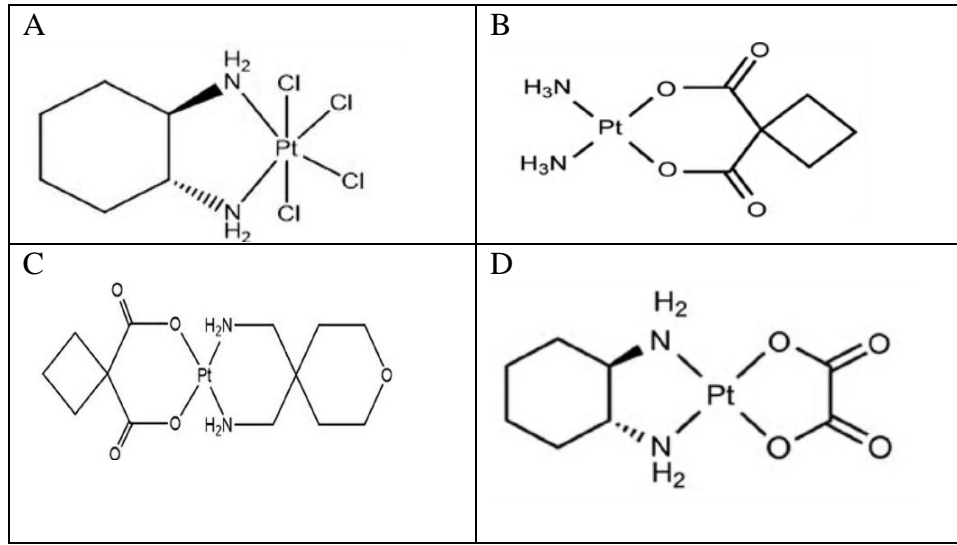
Kemoterapi hücrelerin kimyasallarla tedavi edilmesi anlamındadır ve kanser tedavi yöntemleri arasında sık biçimde kullanılır. Bu yöntemde amaç, kanserin türüne ve evresine göre kanseri tedavi etmek, yayılımını engellemek, tümörün büyümesini yavaşlatmak ve vücudun farklı bölgelerine yayılan kanser hücrelerini yok etmektir (Tannock, 1996). Günümüzde genellikle klasik kemoterapi ilaçları ile yeni nesil kemoterapi ilaçları birlikte kullanılmakta ve böylece tümöre karşı daha etkili cevap oluşturmaktadır. Bu nedenle kür şeklinde uygulanan kemoterapiler birden fazla ilaç içerebilir. Bununla birlikte bu güçlü etkinin yanında daha şiddetli yan etkileri de ortaya çıkarmaktadır. Kemoterapi ilaçları çoğunlukla intravenöz yol ile verilmekte olup ayrıca subkutan, intramüsküler, intraarteriyel, intratekal, topikal, intraperitoneal, intraplevral, intravezikal, intraventriküler olarak da uygulanabilmektedir (Miaskowski, 1999; Gündoğdu, 2014). Kemoterapide kullanılan bazı ilaçlar tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Kemoterapide yaygın olarak kullanılan ilaçların sınıflandırılması (Bhosle, 2009).

Alkilleyici ajanlar	Anti metabolitleri	Mitotik İnhibitörler	Topoizomerz inhibitörleri	Anti-tümör antibiyotikler
Platinler(cisplatin, karboplatin), Azothardalı türevleri (klorambucil, melfalan),oksazof osforinler (siklofosfamid, ifosfamid)	Pirimidin analogları (gemcitabin, 5-florourasil, kapekitabin), antifolatlar (metotreksat, raltitrexed)	Vinca alkaloids (vincristine, vinorelbine) taksanlar (paclitaxel, docetaxel)	Topoizomeraz-I inhibitörleri (irinotekan, topotekan), topoizomeraz-II inhibitörleri (etoposet)	Antrasiklinler (doksorubisine, pirubisin), bleomisin, Mitoksantron

Bu ilaçlar kendi içerisinde sitotoksik ajanlar (Cisplatin, Karboplatin, Oksaliplatin, İfosfamide, Metotreksat, Pemetrekset, Gemcitabin), hedefe yönelik ajanlar [vasküler endotel büyüme faktörü inhibitörü (VEGF) İmatinib, Rituksimab, İnterferon] ve bifosfanatlar (Klodronat, Risedronat, Zoledronid vb) olarak sınıflandırılabilir (Erdoğan,

2012). Cisplatinin yanısıra nedaplatin, oksaliplatin, lobaplatin, karboplatin ve heptaplatin gibi birçok platin türevi klinik çalışmalarda test edilmiş bunlardan karboplatin ve oksaliplatin klinik kullanım için onay almıştır (Florea vd., 2011). Sitotoksit ajanların böbrekler üzerinde geniş bir etkisi vardır ve doz ayarlamasında glomerüler filtrasyon hızı (GFH) önemli rol oynar. Bazı durumlarda bu ilaçlar renal fonksiyonlarda dönüşümsüz bozulmalara neden olabilir (Wald vd., 2009).



Şekil 1.1. Diğer bazı platin türevleri: A-Oksaliplatin; B-Karboplatin; C-Endoplatin; D-Ormaplatin (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Hedefe yönelik ajanlarla tedavide kanser hücrelerindeki proteinlere bağlanarak etki gösteren ilaçlar kullanılır. Bununla ilgili bu yöntem tam olarak geliştirilmemiştir ve diğer tedavilerle kombine olarak kullanılır (Chu ve Sartorelli, 2014).

Bisfosfonatlar ise daha çok menopoz sonrası osteoporoz tedavisinde kullanılmakta olup osteolik metastatik kemik vakalarında tercih edilmektedir (Bhosle, 2009).

Bu üç grup tedavi yönteminin tümünde nefrotoksite ve buna bağlı böbrek yetmezliği (akut ve kronik), GFH’da azalma ve hiperürisemi görülebilmektedir.

1.4. Cisplatin

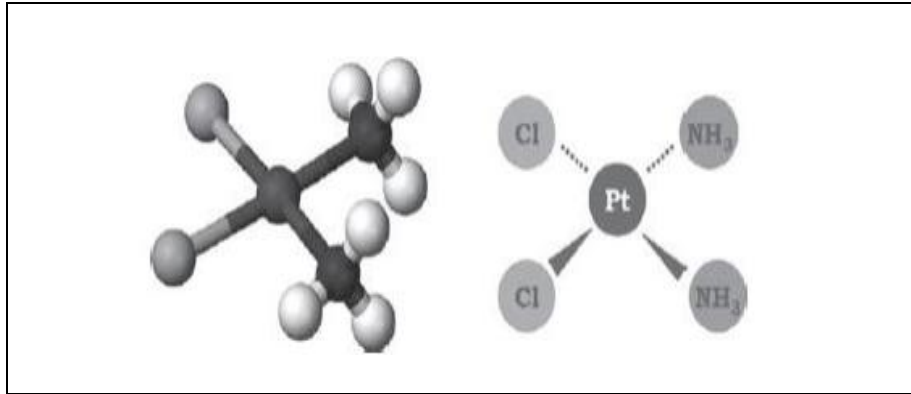
Cisplatin ilk kez 1845’de Peyron tarafından keşfedilmiş ve Peyron kloridi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra cisplatin molekülü cisplatinin nötral bir cis izomeri olduğu gösterilmiştir. 1960 yılında Biyofizikçi Barnett Rosenberg *E coli* üzerinde yaptığı çalışmada

cisplatinin bakterinin büyümesini engellemediğini fakat bölünmesini önlediğini tespit etmiştir. (Kelland., L, 2007). Cisplatin ilacı ilk olarak 1971’de klinik çalışmalarda kullanılmış, 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) tarafından over ve testiküler kanserlerin tedavisinde kullanılması kabul edilmiştir (Kelland., L, 2007).

Cisplatin [cis-diaminodichloroplatin (II)], kanser tedavisinde büyük etkisi olan nispeten basit bir inorganik bileşiktir. Bu bileşik testis kanserleri, baş-boyun kanserleri, küçük hücreli akciğer kanseri, over kanserleri, merkezi sinir sistemi (MSS) maligniteleri, mide kanseri, mesane kanseri gibi birçok farklı kanser hastaların tedavisinde etkin ve başarılı bir şekilde kullanılan bir kemoterapötik ilacıdır. Ancak klinik uygulamada kullanımını kısıtlayan nefrotoksisite, hepaoksisite, mukozit, bulantı, kusma gibi yan etkileri gözlenmektedir (Rybak L.P, 2007).

1.4.1. Kimyasal Özellikleri

Cisplatin inorganik divalent, suda çözünebilir platinum içeren bir bileşiktir. Cisplatin, cis konfigürasyonunda merkezi bir platin atomunu çevreleyen, iki klor atomu ve iki amonyak molekülünden oluşur. Bağ açıları sabittir ve DNA’ya bağlanmada yapısal uyum sağlarlar. Farklı platin bileşikler de aynı şekilde merkezi yerleşimli platin atomuna sahipken, diğer gruplar açısından farklılık göstermektedir (Lebwohl vd., 1998).



Şekil 1.2. Cisplatinin moleküler yapısı (Sanchez-Gonzales vd., 2011).

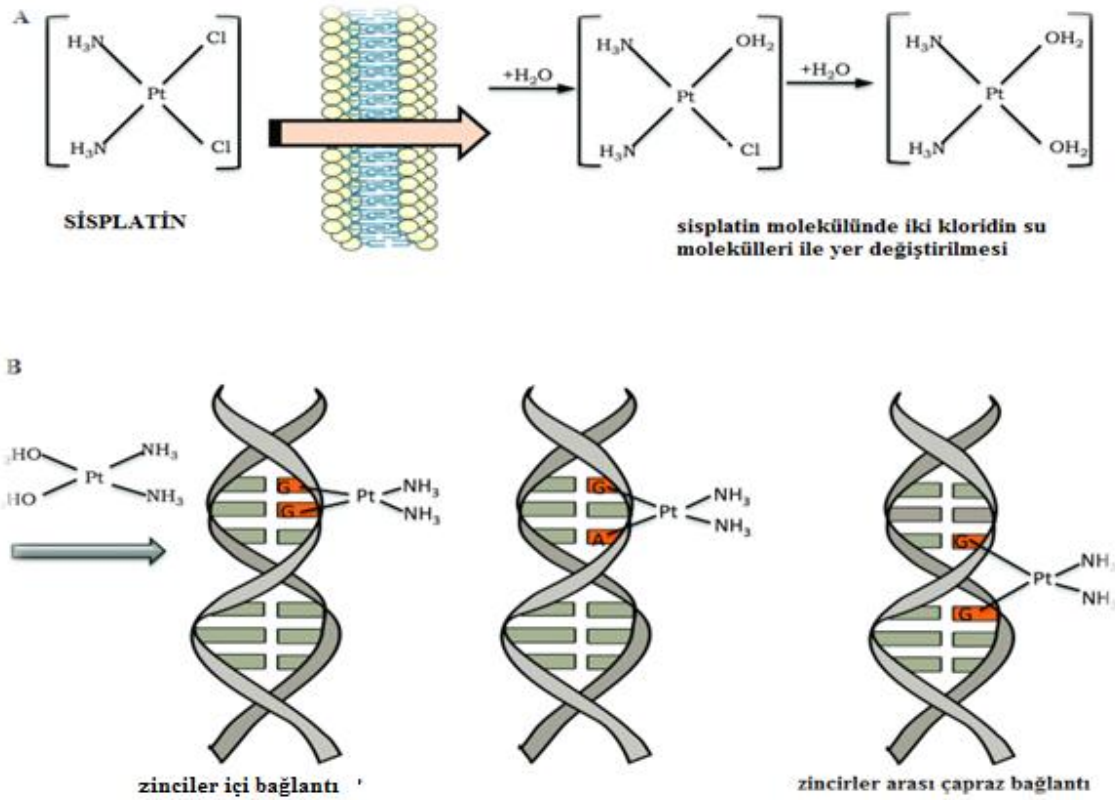
Rosenberg tarafında yapılan çalışmada ise inhibisyonun sorumlu olan formun “cis” formu olduğu, “trans” formunun ise sitotoksik etkisi olmadığı belirtilmiştir. Vücutta cisplatin bileşiği hücre içine alınıncaya trans ve cis olarak iki farklı formda bulunur, cis formunda bu bileşik sitotoksik özellik gösterirken, trans izomerinin antineoplastik etkisi

olmadığı gözlenmiştir (Tarladaçalışır vd., 2005). Önemli olan kısmı ise bu bileşik çoğunlukla hücre içerisinde sitozol, çekirdek, mikrozom ve mitokondriuma yerleşirken eğer hücre içerisinde yeterli miktarda klor yoksa, kendi bünyesinde bulunan 2 adet klor atomunu vererek normalden daha fazla sitotoksik etki gösteren bir ajana dönüşmektedir (Kuhlmann vd., 1997). Cisplatinin cis formu sitotoksik etki gösterdiğinden dolayı bu alandaki çalışmalar genelde “cisplatin” üzerinde yapılmaktadır.

1.4.2. Cisplatinin Hücre İçine Alınışı

Cisplatin ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda pasif difüzyon ile hücre içine girdiği tahmin edilmiştir. Ancak daha sonra bakır transport proteini tarafından (CTR1) cisplatinin hücre içine aktif olarak alındığı belirtilmiştir (Wang vd., 2005).

Cisplatin hücreye girdikten sonra, sitozol içerisinde düşük klor konsantrasyonu olması nedeniyle cisplatin yapısındaki Pt- Cl (Platin-Klor) bağları hidrolize uğrar ve oluşan bu yeni pozitif yüklü molekül, negatif yüklü olan DNA’ya bağlanması kolaylaşır. Cisplatin, DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arasında komşu guaninler arasında çapraz bağlar oluşturur; bu olay “DNA’nın platinasyonu” olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.3) (Lau vd., 2010; Zhang vd., 2010). DNA platinasyonunun derecesi, hücre çekirdeğinde biriken platin miktarıyla doğru orantılıdır. Bu bağlanma, DNA’nın transkripsiyon ve replikasyonunu aksamasına neden olur. DNA hasarı apoptozisi başlatmasıyla ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezini de inhibe etmektedir. Ayrıca cisplatin, hücre mitokondirisine zarar verdiği gibi, Adenozin trifosfat (ATP) aktivitesini ve hücreyi G₂ fazında durdurarak hücresel taşıma sistemini deaktive eder (Parker vd., 1991; Pabla vd., 2008).



Şekil 1.3. Cisplatinin DNA hasar mekanizması. (a) Cisplatinin hidrolize olması, (b) Hidrolize olmuş cisplatin metabolitinin DNA iplikçiklerine bağlanması (Siddik Z.H, 2003).

1.4.3. Cisplatin Farmakokinetiği

Cisplatin gastrointestinal kanaldan emilmediği için oral yolla uygulanamaz. Bu nedenle yalnızca intravenöz veya intraperitoneal yolla uygulanmaktadır. Taşınımı plazma proteinlerine %90 oranında veya kısmen geri dönüşümsüz olarak kovalent bağ yapmasıyla gerçekleşir (Chabner vd., 2001). Cisplatin ilacının intravenöz uygulamasından sonra bir saat içerisinde plazmada en yüksek seviyeye ulaşır. Kan beyin bariyeri sebebiyle merkezi sinir sistemine geçişi çok zayıftır. Bundan dolayı serbest cisplatinini iki saat içinde plazmada tespit etmek mümkün değil.

Cisplatin dokulara hızlı bir şekilde yayılım gösterir; böbrek, karaciğer ve prostat dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, diğer organlarda (mesane, kaslar, testis, pankreas ve dalakta) daha az bulunur ve bağırsak, adrenal, kalp, akciğer, beyinde ise diğer dokulara oranla daha düşük konsantrasyonlarda bulunur (Boulikas vd., 2003). Cisplatin uygulanmasından itibaren 4 ay kadar bir sürede böbrek dokusunda platin bulunabilir.

Cisplatinin yarı ömrü 10-60 dakika kadardır.Yapılan çalışmalarda insan ve hayvanlarda ilacın % 80'inin idrarla ilk 24 saatte ve diğer % 8'in ise sonraki 24 saatte vücuttan atıldığı görülmüştür. Cisplatinin safra kanalı yoluyla atılım oranı ise % 10'un altındadır (Kaya, 2000).

1.4.4. Cisplatinin Yan Etkileri

Günümüzde kemoterapide yaygın olarak kullanılan cisplatin, güçlü bir anti-proliferatif ilaç olmasının yanında, normal dokularda ototoksisite, nörotoksisite, nefrotoksisite, gastrotoksisite, myelosupresyon, mukozit ve alerjik reaksiyonlar gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır (Hartmann vd., 2003; Galluzzi vd., 2014). Yapılan klinik çalışmalarda cisplatin tedavisi gören hastaların %30 ile 50'sinde işitme kaybı, %14-57'sinde nörotoksisite, %70'inde ise nefrotoksisite geliştiği belirtilmiştir (Travis vd., 2014; Rathinam vd., 2015). Bu yan etkiler bazı durumlarda hastaların tedaviyi yarıda bırakmasına neden olmaktadır. Bu yan etkilerden en ciddi ve doz kısıtlayıcı olan ise nefrotoksisitedir. Cisplatinden kaynaklanan nefrotoksisite akut böbrek hasarı, Fankoni-benzeri sendrom, hipomagnezemi, distal renal tübüler asidoz, hipokalsemi, böbrek tuz kaybı, böbrek konsantrasyon yetersizliği, hiperürisemi, geçici proteinüri, eritropoietin yetersizliği vb çeşitli belirtilerle kendini göstermektedir (Miller, 2010). Fakat bu belirtiler arasında ciddi bir şekilde hayatı tehdit eden, akut böbrek hasarı oluşumudur (Sastri vd., 2005; Sánchez-González vd., 2011). Geçen yıllarda cisplatinden daha güçlü ve daha az yan etki gösteren anti-neoplastik etkisi bilinen yeni platin içerikli bileşiklerin sentezi için birçok araştırma yapılmıştır. Ancak çalışmalar sonucunda yeni anti-neoplastik ajanlar sentezlenmesine rağmen, kanser tedavisindeki etkinliklerinin cisplatinden daha başarılı olmamasından dolayı, günümüzde cisplatin hala birçok yan etkisi olmasına rağmen kanser tedavisinde temel bir ilaç olmaya devam etmektedir (Chu ve Sartorelli, 2014).

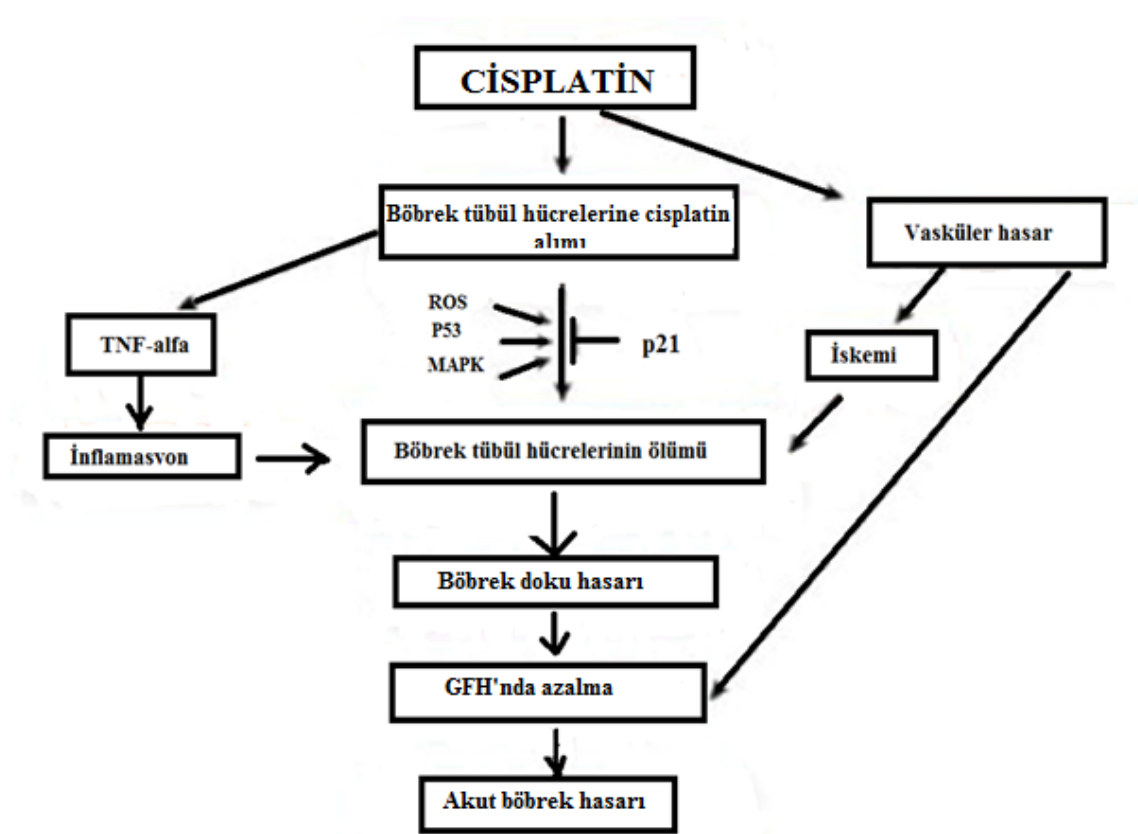
1.4.4.1. Cisplatin Nefrotoksisitesi

Cisplatin ilacının kemoterapi de kullanıldığından beri en ciddi ve doz kısıtlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir. Cisplatin ilacının asıl atılım yeri böbrekler olduğu için diğer organlara oranla daha fazla birikmeye neden olmaktadır. Hastanelerde bu ilacın böbrekler üzerindeki yan etkilerini azaltmak ya da önlemek amacıyla tedavi gören hastalara yoğun

hidrasyon uygulanmasına rağmen, cisplatin tek doz sonrası (50–100 mg/m²) hastaların %35’de nefrotoksisite ortaya çıkmaktadır (Sastray, 2005). Serum konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında böbrek proksimal tübüllerinde cisplatin miktarı 5 kat fazladır. (Kuhlmann vd., 1997). Cisplatininin böbrek dokusunda bu kadar artması nefrotoksisite oluşumuna sebep olmaktadır (Yao vd., 2007). Böbrekte en yoğun mitokondri içeriğine sahip olan proksimal tübül S3 bölümü ile distal tübül ve proksimal tübülün S1 bölümleri sırası cisplatinin en fazla biriktiği yerlerdir (Kroning vd., 2000; Qian vd., 2005). Sitoplazma, mitokondri ve nükleusta cisplatinin hücre içi konsantrasyonları diğer bölgelere göre daha yüksek olarak bulunmuştur (Gullans, 2000). Yetişkin bireylerde bölünme özelliği olmayan proksimal tübül hücrelerin, cisplatin nefrotoksisitesi patogenezindeki temel mekanizmada ilacın çekirdek DNA’sında olmadığı ve mitokondri DNA’sında oluşturduğu hasardan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Wainford vd., 2008). Çünkü cisplatin molekülü hidrolize olmasından sonra oluşturduğu artı yüklü metabolitler, eksi yüklü mitokondriler içinde birikebilmektedir. Diğer taraftan mitokondri DNA’sı histon proteinleriyle iyice sarmalanmadığından dolayı herhangi bir hasar-tamir mekanizması bulunmamaktadır (Yang vd., 2006; Olivero vd., 1997; Cullen vd., 2007). Ancak proksimal tübül hücrelerinin yoğun miktarda mitokondri içermesi ve bunun yanında böbrekteki mitokondri proksimal tübül hücrelerinde yüksek miktarda olması da, bu segmentin cisplatin kaynaklı apoptoza olan özel ilgisini belirtilmektedir (Kriz ve Kaissling, 2013). Buna göre proksimal tübül hücreleri cisplatine mitokondri yoğunluğu ile orantılı biçimde ilgi duymaktadır (Qian vd., 2005).

Cisplatin nefrotoksisitesi, kompleks ve çok etkili bir süreç olarak ifade edilmektedir. Böbrek tübül hücrelerinin cisplatin ilacına maruz kalmasıyla tübüler hücre hasarı ve ölümünü ortaya çıkaran birçok sinyal yolağı aktifleştirmektedir. Bununla birlikte böbrek hasarının daha da ilerlemesine neden olan şiddetli bir inflamasyon ile uyarılır. Cisplatin aynı zamanda böbrek damarlarının hasarını da uyarır ve Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFH)’nin azalmasıyla birlikte böbreğe gelen kan akımındaki miktarında azalma görülmesi böbreklerde iskemik hasar oluşmasına da neden olur. Bu mekanizmaların cisplatin nefrotoksisitesinde böbrek fonksiyonlarının kaybını tetiklerken akut böbrek hasarı meydana gelir (Wald vd., 2009; Oh vd., 2016; Hanigan vd., 2003; Pabla ve Dong, 2008).

Aşağıdaki şekil 1.4’de cisplatinin hücre içine girmesiyle tübül hücrelerinde meydana gelen süreci gösterilmektedir. Tübül hücreleri cisplatin ilacına maruz kalmasıyla hücrelerde bir takım sinyal yolları aktive olmaktadır. Bunların başında intrinsik mitokondri yolağı, ekstrinsik ölüm reseptör yolağı, endoplazmik retükulum (ER) stres yolağı ve inflamasyon yolağı meydana gelmektedir (Pabla ve Dong 2008).



Şekil 1.4. Cisplatinin hücresel ve moleküler etki mekanizması (Pabla ve Dong, 2008).

Cisplatin nefrotoksitesinin mitokondri ile bağlantılı ROS, MAPK, p53 ve p21 yolları ile güçlü bir ilişki içerisindedir. Bunun dışında cisplatin tübül hücrelerinde tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) üretimini uyarılarak inflamasyon yanıtını da tetiklemektedir (Santos vd., 2007; Wang vd., 2005 Matsushima vd., 1998; Pabla ve Dong, 2008; Dos Santos vd., 2012).

1.5. Serbest Radikaller

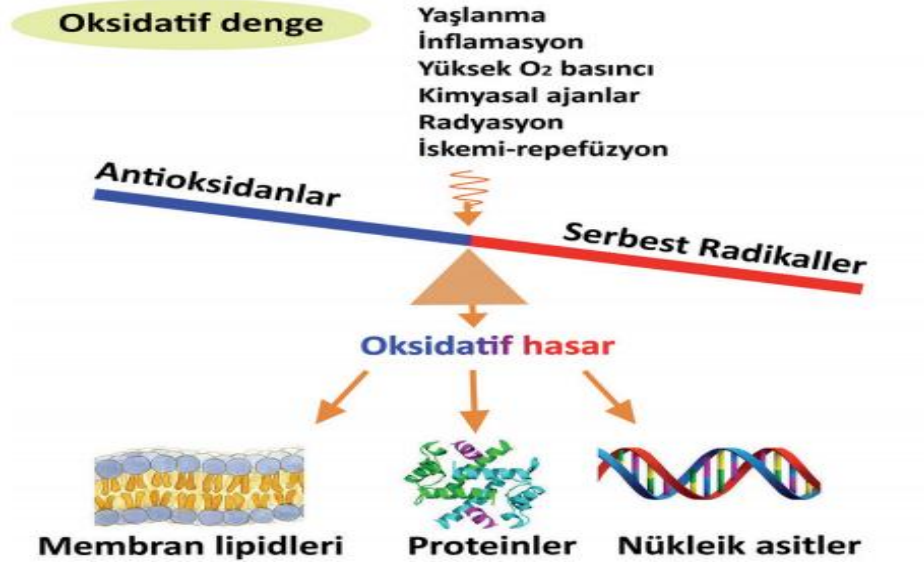
ROS oksijeni normal hücrel metabolizma sonucu canlı organizmalar tarafından enerji üretimi için kullanıldığında hem reaktif türleri hem de reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır ve serbest radikaller mitokondri tarafından sürekli olarak normal oksijen kullanımı sırasında üretilmektedir. ROS serbest radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Serbest radikaller bir yada daha fazla eşleşmemiş elektron içeren ve bundan dolayı moleküle reaktivite veren kısa ömürlü ve kararsız molekül olarak tanımlanmaktadır. Eşlenmemiş elektron olduğundan dolayı serbest radikaller diğer bileşiklere kolaylıkla reaksiyona girebilirler. Çiftler halinde elektron bulunduran atomlar veya moleküller kararlı bir yapıda olduklarından dolayı, diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimleri serbest radikallere göre daha zayıftır. Bundan dolayı non radikaller kararlı yapıda olan, eşlenmemiş elektronu olmayan ve diğer bileşikler ile radikallerden daha zayıf olan moleküllerle reaksiyona girenlerdir (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Valko vd., 2007). Mitokondriler tarafından enerji üretimi sonucu oluşan bu serbest radikaller lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişiklik oluşturabilirler (Shinde vd., 2012). Mitokondrinin yanı sıra serbest radikaller birçok endojen ve eksojen kaynaklardan oluşmaktadır. Serbest radikaller zararları olduğu gibi yararları da vardır. Yüksek enerjiye maruz kalma veya elektron transfer reaksiyonları ile moleküler oksijenin (O_2) aşamalı olarak azaltılması, yüksek reaktif ROS'un üretilmesine neden olur. Radikal olmayan formlar iki serbest radikal eşleşmemiş elektronlarını paylaştığında oluşur. Fizyolojik öneme sahip üç ana ROS, süperoksit anyon (O_2^-), hidroksil (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) 'dir. Aşağıdaki tablo 1.2'de aotoksidasyon reaksiyonları verilmiştir.

Tablo 1.2. Otoksidasyon reaksiyonlarının katalizörleri olarak geçiş metalleri (Miller vd., 1990).

Oksidant	Formül	Reaksiyon Denklemi
Süperoksit Anyon	$O_2^{\cdot -}$	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot -} + H^+$ $2O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Hidrojen Peroksit	H_2O_2	$Hipoksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow ksantin + H_2O_2$
Hidroksil Radikali	$\cdot OH$	$Ksantin + H_2O + O_2 \leftrightarrow urik asit + H_2O_2$
Hidroklorik Asit	$HOCl$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$ $H_2O_2 + Cl_2 \rightarrow HOCl + H_2O$
Peroksil Radikalleri	ROO^{\cdot}	$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$
Hidroperoksil Radikali	HOO^{\cdot}	$O_2^{\cdot -} + H_2O \leftrightarrow HOO^{\cdot} + OH^-$

ROS, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, vasküler adventisyal fibroblastlar ve perivasküler adipositler dahil olmak üzere her türlü vasküler hücre tarafından üretilmektedir (Fukai ve Ushio-Fukai, 2011).

ROS, protein ve lipidlerin peroksidasyonunda rol oynar ve fonksiyonel modifikasyonlarına yol açar. Vücutta, hücre zarı lipidleri, özellikle fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitleri oksitlenmesi kolaydır ve yeni biyoaktif maddeler üretebilir (Guéraud vd., 2010). Oksidasyon yoluyla üretilen ürünler ROS'tan daha zararlı olabilir (Venturini, vd., 2015). Oksidatif dengenin bozulması vücutta geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilir. Oksidatif stresin neden olduğu hastalıklar kanser, diyabet, nörolojik bozukluklar, kardiyovasküler bozukluklar, amiloidoz, yaşa bağlı olarak gerçekleşen bağışıklık yetersizliği, yaşlılarda bunama ve hipertansiyon gibi hastalıklar ile ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumludur (Çağatay ve Kayalı, 2006). Oksidatif dengeyi bozulmasına neden olan etmenler Şekil 1.5'de gösterilmektedir.



Şekil 1.5. Oksidatif hasar (Özcan vd, 2015).

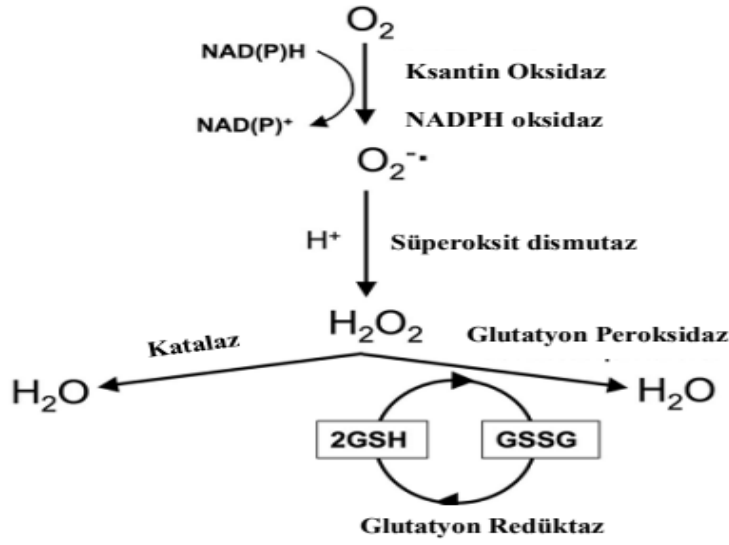
Sonuç olarak, oksidatif stres sadece ROS'un üretilmesine ve birikmesine neden olmakla beraber, aynı zamanda lipid ve protein peroksidasyonu yoluyla metabolik ürünlerin üretilmesi yoluyla oksidatif stresi arttırmaktadır.

1.6. Antioksidanlar

Antioksidanlar, metabolizmanın toksik yan ürünleri olan serbest radikalleri etkisiz hale getiren ve oksidatif stresi önleyen bir sistemin elemanlarıdır. Antioksidanlar serbest radikallerle hızlı bir şekilde etkileşime girerek serbest radikalleri stabilize eder, hücreleri toksik etkilere karşı korur ve bazı hastalıkların önlenmesine katkıda bulunur (Karabulut ve Gülay, 2016).

Normal koşullar altında, bu antioksidanların hem aktiviteleri hem de hücre içi seviyeleri ile meydana gelen metabolik olaylar sonucu oluşan pro-oksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) arasında bir denge vardır. Bu denge organizmaların hayatta ve sağlıklı kalabilmesi için önemlidir. Bununla birlikte, vücut yaşlandıkça, antioksidan seviyeleri giderek azaldığı için antioksidanlar ve pro-oksidanlar arasındaki denge bozulur. Bu da oksidatif stresin oluşmasına neden olur (Sekhon vd., 2010). Antioksidanlar, pro-oksidanları etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Antioksidanların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleri antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörlerdir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Antioksidanlar, doğada eksojen (dışarıdan alınan) veya endojen (vücut tarafından üretilen) olarak iki farklı şekilde bulunur. Endojen antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan grup antioksidanlar arasında lipoik asit, glutatyon (GSH), L-arginin, alfa-tokoferol, ürik asit, bilirubin transferrin, sistein melatonin laktoferrin, glukoz, çinko, taurin, hipotatatin bulunur. Enzimatik antioksidanlar ise Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GRx) olarak sayılabilir (Young ve Woodside, 2001). Ekzojen antioksidanlar vitaminler, gıda ve ilaç antioksidanları olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır (Willcox vd., 2004). SOD, CAT, GPx ve GRx doğrudan ROS ve reaktif azot türlerinin (RNS) nötralizasyonunda rol oynayan başlıca antioksidan enzimlerdir (Halliwell, 1994). SOD, katalitik süperoksit anyon radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünü katalizlemesi ile serbest radikallere karşı ilk savunma hattıdır. H_2O_2 bir radikal olmamasına rağmen $O_2^{\cdot-}$ oluşumuna aracılık edebilir. SOD'un vücutta sitozolde, mitekondri ve ekstraselüler ortamda bulunuşuna ve içerdikleri aktif metal atomlarına göre 3 izoformu vardır. (Karabulut ve Gülay, 2016). SOD aktivitesi yaşlanmaya bağlı olarak düşer. SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 diğer antioksidan enzimler olan katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından ayrı reaksiyonlar biçiminde katalizlenir (Şekil 1.6). Mitekondride metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan H_2O_2 SOD ve GPx tarafından derhal katalize edilirken bir kısmı sitoplazmaya geçer. Burada peroksizomlarda sentezlenen CAT tarafından yakalanır, su ve oksijen molekülüne ayrıştırılır. CAT'ın H_2O_2 'e olan ilgisi GPx'ten fazladır (Arslankoç vd., 2019).



Şekil 1.6. ROS üretiminin ve metabolizmasının başlıca yolları (Aitken, 2008).

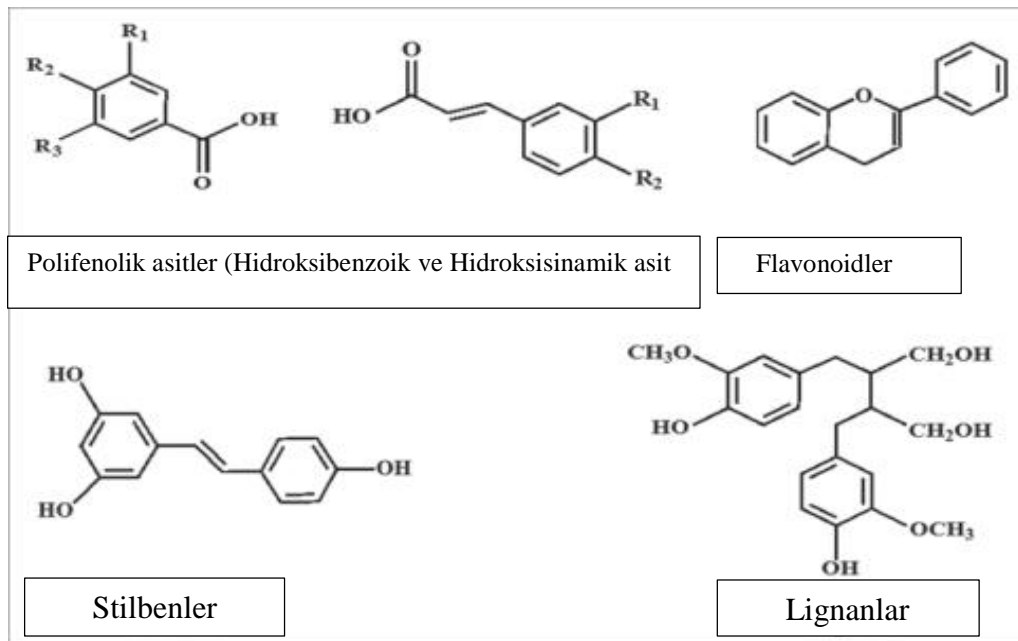
1.6.1. Polifenoller

Bitkiler tarafından üretilen ve sekonder metabolitler olarak da bilinen polifenoller, bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubunun bağlanmış olduğu bir benzen halkası içerirler. Fitokimyasal içerik olarak geniş bir çeşitliliğe sahiptirler ve çeşitli bitki türlerinde 8000 den fazla tanımlanmış fenolik bileşik mevcuttur. Bu bileşikler sahip oldukları halka sayısına ve bunların kompozisyonuna göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 1.3). Bileşiklerin ortak özellikleri halkasal yapı içemeleridir (Şekil 1.7) ve bu yapı metabolik yollarda oluşan oksidan sistemler üzerine bazı özellikler kazandırmaktadır (Pandey ve Rizvi, 2009).

Tablo 1.3. Bitkilerde bulunan meyve polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Kahraman 2002).

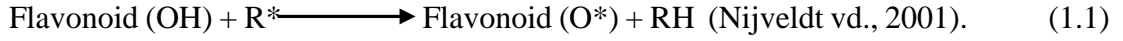
Fenolik Bileşikler	
Fenolik Asitler	Flavonoidler
1.Hidroksisinamik asit (Ör: p-Kumarik Asit, Ferulik Asit)	Antosiyanidinler (Ör: Siyanidin, Delfinidin)
2. Hidroksibenzoik asit (Ör: p-Hidroksibenzoik Asit, Gallik Asit, Vanilik Asit)	Flavonoller (Kuamferol, Kuarsetin, Myrisetin)
	Flovonlar (Ör: Apigenin Luteolin)
	Flavanonlar (ör:Hesperedin,)
	Kateşinler= Flavanoller (ör: Kateşin Epikateşin)
	İzoflavonoidler

Yüksek polifenolik içerik (fenolik asit ve flavonoid) bakımından bazı üzüksü meyveler özel bir yere sahiptir. Oksidan ajanların pek çok hastalığın temelini oluşturduğunun keşfinden sonra antioksidan doğal ürünler üzerine olan çalışmalar hız kazanmıştır. Bitkilerin metabolizmaları sonucunda birçok fenolik madde oluşturmaktadır. Bu sebeple, bitki kökenli tüm gıdalarda daima farklı miktarda ve nitelikte çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Bu maddelere bitkilerin meyve, yaprak, tohum, sürgün kök ve gövdelerinde rastlanmaktadır.



Şekil 1.7. Farklı Polifenol sınıflarının kimyasal yapısı (Pandey, 2009).

Polifenollerin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri bütünüyle ortaya konmamış olmakla beraber, serbest radikal oluşumunu engellemek ve/veya bunların tetiklediği sinyal yollarını inhibe etmek şeklinde gerçekleştiği belirtilmektedir. Örneğin koroner arter hastalığının önemli etmenlerinden biri olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun engellenmesi ile inflamatuvar yanıtın oluşturacağı lezyonların önüne geçilmektedir. Yine oksidan sistemlerin etkili olduğu ve oksidatif stresin tetiklediği mitojenik aktivasyonlu protein kinazlar (MAPK) sinyal yollarını hücre sağkalımı yönünde etkileyebilmektedirler (Hou vd., 2004). Meyve fenolik bileşiklerinin ROS ve RNS türlerinin süpürülmesinde oldukça etkili oldukları bilinmektedir. Polifenolikler hidroksi grupları üzerinden serbest radikallerle etkileşime girmeye yatkınlık gösterir:



Fenolik bileşiklerin birçoğunun yüksek antioksidan özelliği ile sağlık alanında etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Özellikle koyu kırmızı ve mor renkli, antosiyanine zengin, yüksek miktarda antioksidan kapasitesine sahip meyvelerin bazı kanser tipleri, nörolojik hastalılar, diyabet, kalp-damar rahatsızlıkları, kronik inflamasyon gibi çeşitli hastalıklara iyi geldiği, yaşlanmayı geciktirdiği saptanmıştır (Ercişli vd., 2005; Aviram vd., 2000).

1.7. Karadut

Dut olarak bilinen *Morus* cinsi, yirminin üzerinde tür içerir ve Moraceae familyasına aittir. Dut bitkisi, ortalama 10-13 m yüksekliğe sahip, yuvarlak, kısa gövdeli ağaçlar olup, yaprakları keskin sivri uçlu, koyu renkli, tırtıklı kenarlı yapraklı olup yaprak sapı 1.5-2.5 cm uzunluğa sahiptir (Yaltirik, 1982).



Şekil 1.8. Karadut meyvesi (URL-1, 2020).

Dutun anavatanının Türkistan olduğu söylenmektedir. Bununla beraber farklı dut cinsleri Çin, İran, Irak, Türkiye, Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde, Kuzey ve Güney Amerika'da geniş bir yayılım göstermektedir (Yiğit vd., 2007).

Yaygın olarak yetiştirilen en önemli *Morus* türleri *Morus alba* (beyaz dut), *Morus rubra* (kırmızı dut) ve *Morus nigra*'dır (karadut). *Morus alba*, çok tatlı ve düşük asitliğe sahip beyaz ve mor meyvelerden oluşmaktadır. *Morus rubra*, kuru madde bakımından zengin ve düşük asitliğe sahiptir. Karadut ise dutlar içinde en koyu renge ve kendine has hafif ekşi, sulu bir tada sahiptir. *Morus nigra*, 400 yıldan uzun bir süredir Türkiye'de yetiştirilmektedir

ve tüm dut ağaçlarının % 2'sini oluşturmaktadır (Ercişli ve Orhan, 2007). Dut meyvesi kolayca bozulabilir ve genellikle taze tüketilmesi önerilir. Dut ortaya çıktığından beri meyvesinden ziyade ipek böcekçiliği yetiştiriciliğinde daha çok kullanılmıştır. Dutların yaprakları ve kök kabukları çay olarak kullanılmakta, meyvelerinden pekmez ve reçel yapılmaktadır.

Karadut geleneksel tedavide uzun zamandan beri kullanılan bir meyvedir. Özellikle yara iyileştirici özelliği iyi bilinmekte olup, kemoterapi alan hastalarda sıklıkla görülen ağız yaralarının tedavisinde bu özellikten yararlanılmaktadır. Karadutun yara iyileştirici özelliği antiinflamatuvar etkisi ile açıklanmaktadır. Ayrıca dutun meyvesi dışında, kökleri ve kabukları, halk tıbbında diyabet, hipertansiyon, anemi ve artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ozgen vd., 2009; Kostic vd., 2013).

Yapılan çalışmalarda, kırmızı ve karadutun beyaz duta göre antosiyanin bakımında daha zengin içeriğe sahip olduğu görülmüştür. Bu durum koyu renkli meyvelerin daha yüksek fenolik içeriğe sahip olabileceği tezini desteklemektedir (Turan vd., 2017). Karadut meyvesinin temel içeriğinde şeker (glikoz % 52, fruktoz % 48), malik asit (%8) ve sitrik asit (%92) gibi organik asitler, fenolik asitler ve antosiyaninler, C, E vitaminleri bulunmaktadır (Elmacı ve Altuğ, 2002; Ercişli ve Orhan, 2007).

Morus'un farklı türlerinin meyve ve yapraklarının antimikrobiyal, antioksidan, antidiyabetik, anti-HIV, antienflamatuvar, hipolipidemik, hepatoprotektif, antiobezite, nöroprotektif, antihiperlipidemi, antiaterojenik ve antikanser etkisi gibi geniş bir biyolojik aktivite sergilediği pek çok çalışmada gösterilmiş, karadut meyvesinden elde edilen ekstralardan rutin, kuersetin, astragalin, kaemferol, kuersetin-3-O-glukozit gibi flavonoidler yoluyla antienflamatuvar ve antioksidan özellikleri gösteren çeşitli prosesler rapor edilmiştir (Chan vd., 2013; Chen vd., 2006; Natic vd., 2015; Sakagami vd., 2007; Khalid vd., 2011; Kostic vd., 2013; Ramesh vd., 2014; Grajek vd., 2015). Eu-Ri jo (2019) ve arkadaşları bir çalışmada fenolik asit olan ve karadutun fitokimyasal içeriğinde de bulunan ferulik asidin, ROS oluşumunu önleyerek ve endojen antioksidanların üretimini indükleyerek cisplatin kaynaklı sitotoksisteyi inhibe ettiğini ve ferulik asidin cisplatin kaynaklı ototoksisteye karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtilmiştir. Yine başka çalışmalarda yine karadutun bileşminde de bulunan vanilik asit, kuersetin, C vitamini gibi bileşiklerin

cisplatinin üzerindeki etkilerine bakılmış, bu bileşiklerin nefroprotektif etkileri gözlenmiştir (Satyanarayana, 2001; Sindhu, 2014).

Karadutun fitokimyasal açıdan zengin polifenolik içeriğe sahip olması, bu kimyasalların bazılarının önemli ölçüde antioksidan ve anriinflamatuvar özelliik göstermeleri, benzer içeriğe sahip başka bitkisel elemanların nefrotoksisite üzerinde koruyucu etkilerinin ortaya çıkarılması gibi sebeplaerden dolayı çalışmamızda tercih edilmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Giriş

2.1.1. Kullanılan Cihaz Alet ve Malzemeler

Bu çalışma için kullanılan cihaz ve aletler Tablo 2.1’de, kullanılan kimyasallar ise Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan cihaz ve aletler

Kullanılan cihaz ve aletler	Marka/Model
Buzdolabı +4 °C	Beko
Derin dorucu -80 °C	Thermo Electron Corporation
Derin dorucu -20 °C	Beko
Değirmen	IKA A10 Basic
Blender	Waring 8011 EB
Hassas Terazi	Shimadzu
Etüv	Memmert
Çalkalayıcı İnkübatör	Shel Lab
Vorteks	Heidolph
Soğutmalı santrifüj	Allegra X-30R
pH-metre	Hanna Instruments
Manyetik Karıştırıcı	IKA RH Basic 2
Biyokimya tüpü	BD vacutainer
Doku takibi cihazı	Thermo Scientific Excelsior
Doku gömme cihazı	Leica HistoCare Arcadia
Mikrotom	Leica EG 1150 H
Işık mikroskobu	Leica RM 2255
Boyama cihazı	Leica ST5020
Tüp sporu	Lp Italiana Spa
Cam malzemeler (beher, erlen, balonjoje)	ISO Lab
Pudrasız eldiven	Kımtex
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Eppendorf tüpü	ISO Lab
Çeşitli hacimlerde mikrosant. Tüpleri	Eppendorf
15 mL ve 50 mL’lik steril falkon tüpleri	ISO Lab
96’lık pleyt	Bioscience
ELISA yıkama cihazı	VERSA max
Homojenizatör cihazı	Ultra-Turrax T25
Evaporatör	Heidolph
Spektrofotometre	Shimadzu
Mikropleyt Okuyucu	Molecular Devices

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Tablo 2.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Marka/Model	Kodu
Etanol	Sigma Aldrich	32205
Troloks	Sigma Aldrich	238813
Asetik asit	Sigma Alrich	T48885
Gallik asit	Sigma Aldrich	G7384
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck	1.09001.0100
Askorbik asit (C vitamini)	Merck	A5960
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma Aldrich	D9132
TOS(total antioksidan kiti)	Rel Assay	ST20105A
TAS (total antioksidan kiti)	Rel Assay	MS201170
Hidroklorik asit (HCl %37)	Sigma Aldrich	07102
TNF-alfa	Abcam	GR33244251
SOD Kiti	USCN	SEB960Ra
Kaspaz-3	USCN	SEA626Ra
Fosforik asit (H ₃ PO ₄)	Sigma Aldrich	695017
Sodyum klor (NaCl)	Sigma Aldrich	P9333
Potasyum klor (KCl)	Sigma Aldrich	S9888
Nitroblue tetrazolium (NBT)	Sigma	97596L5
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck	Art 6398
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma	058K0726
Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck	Art 1216
Potasyumdihidrojenfosfat(KH ₂ PO ₄)	Merck	Art 4871
Disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	Art 6576
Ksantin oksidaz	Sigma	SLBB1574V
Ksantin	Sigma	X-0626
Bakır klorür (CuCl ₂)	Lancaster	13167
Triton X-100	Merck	Art 11869
Tiyobarbitürik asit (TBA)	Sigma	S42774-018
1,1,3,3-tetrametoksipropan	Sigma	76H3424, %99
Tris-HCl	AppliChem	5X002338
EDTA	Carlo Erbo Reagent	303227

2.2. Metod

2.2.1. Karadut Meyvesinin Toplanması ve Kurutulması

Karadut meyvesi olgunlaşma döneminde haziran-temmuz ayı başında Elazığ ilinde yerel halkın yara iyileştirici etkisi nedeni ile tercih edilen bir ağaçtan toplandı. Çalışma yapıldığı kadar 100' er gramlık kilitli poşetler -20 °C'de saklandı.

Yüzde kuru ağırlık tayini için örneklerden yüzer gram ağırlıkta paketler hazırlandı. Hassas terazide tartım yapılarak ve liyofilizator (Heidolph Almanya) cihazında kurutma işlemine tabi tutuldu. Kurutma işleminin tamamlandığının belirlenmesi için belirli periyotlarla tartımlar yapılarak ve ağırlığın sabit kaldığı son tartımla birlikte örnekler cihazdan çıkarıldı. Daha sonraki işlemler için karadut örnekler öğütücüde öğütülüp toz haline getirildi ve Gümüşhane Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik laboratuvarında hava geçirmez kilitli poşetlere konarak +4°C’de muhafaza edildi.

2.2.2. Ekstraksiyon

Örneklerin ekstraksiyonu için en verimli sonuçları veren su, metanol, etanol, çözücülerini seçilmiştir. Bunlar içerisinde en yüksek antioksidan sonuç veren metanol ekstraktı seçildi ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarından bu ekstrakt kullanıldı. Ekstraksiyon yöntemleri aşağıda kısaca açıklanmıştır (Ozgen vd., 2006; Ercisli ve Orhan, 2008).

I- Sulu Ekstraksiyonu: Örneklerden 1,25 gram tartıldı ve saf su 25 ml ‘e tamamlandı. Örnekler iyice vortekslendikten sonra 45 °C’de 150 rpm’de 24 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Supernatanlar 0,2 µm’lik siteril filtrede süzülerek ve -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

II- Metanol Ekstraksiyonu: Örneklerden 1,25 gram tartıldı ve metanolle 25 ml’e tamamlandı Örnekler iyice vortekslendikten sonra 45 °C’de 150 rpm’de 24 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Supernatanlar 0,2 µm’lik siteril filtrede süzülerek ve -20 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

III- Etanol Ekstraksiyonu: Örneklerden 1,25 gram tartıldı ve etanolle 25 ml’e tamamlandı Örnekler iyice vortekslendikten sonra 45 °C’de 150 rpm’de 24 saat boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Supernatanlar 0,2 µm’lik siteril filtrede süzülerek ve -20 °C’de’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

2.2.3. Karadut Meyvesinin Ekstraktlarının Antioksidan Belirlenmesi

2.2.3.1. Toplam Polifenol İçerik Tayini

Toplam polifenolik içerik Folin-Ciocalteu metoduna göre spektrofotometrik olarak belirlendi. Fosfotungstik asit bazik çözeltide fosfotungstik mavisine indirgenmesine dayanır. Oluşan mavi renk absorbansı ortamdaki aromatik fenolik grubu ile doğru orantılıdır. Toplam polifenol içeriğinin belirlenmesi amacıyla standart olarak gallik asit kullanıldı (Kasangana vd., 2015).

Çözeltilerin hazırlanması

%10'lik Na_2CO_3 çözeltisi: 10 g Na_2CO_3 tartılıp saf su ile çözünüp üzeri 100 mL'ye tamamlandı.

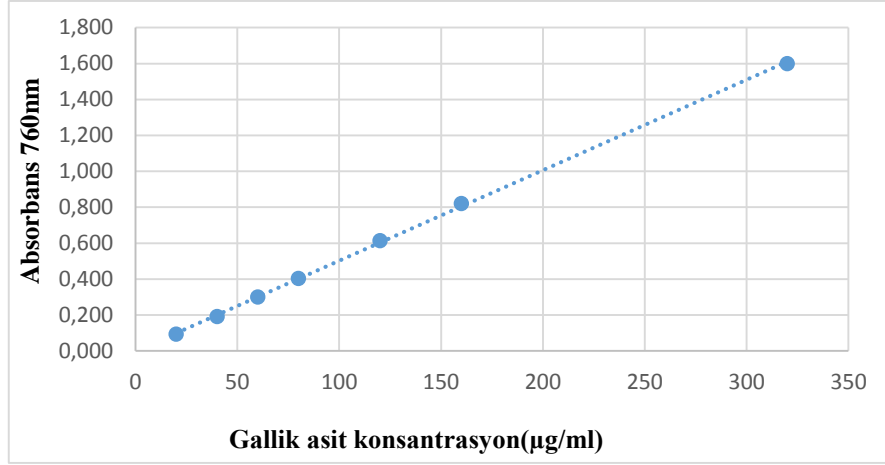
Standartlar: 25 mg gallik asit tartıldı ve 25ml saf su ile çözülerek 10.000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak 20, 40, 60, 80, 120, 160 ve 320 $\mu\text{g/mL}$ 'lik gallik asit standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Tablo 2.3' de Toplam Fenolik Miktar (TFM) tayini için yapılan işlemler sırasıyla verildi.

Tablo 2.3. Karadut ekstraktlarında TFM tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/etanol/metanol	300 μL	-	-
Ekstrakt	-	300 μL	-
Standart	-	-	300 μL
Deiyonize su	3.4 ml	3.4 ml	3.4 ml
Folin-Ciocalteu Reaktifi	200 μL	200 μL	200 μL
Metanol	0.5 mL	0.5 mL	0.5 Ml
Karışım vortekslenip sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dakika inkübe edildi.			
%10'luk Na_2CO_3	600 μL	600 μL	600 μL
Karışım vorteksledikten sonra 120 dakika oda şartlarında karanlıkta inkübe edilip inkübasyon süresinin sonunda 760 nm deki absorbansta okundu.			

Sonuçlar Şekil 2.1'deki gallik asit standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.1. Gallik asit standart grafiği

2.2.3.2. DPPH Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi Tayini

Karadut ekstraktlarının DPPH (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) radikali temizleme aktivitesinde DPPH radikali 517 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine karşılık gelir. Antioksidan madde veya maddelerle muamele edildiğinde, DPPH 'den kaynaklanan mor rengin şiddeti azalarak absorbans değerlerinin düşmesine neden olur (Ahmet vd., 2013).

Reaktiflerin Hazırlanması

Standartlar: 10 mg trolaks tartıldı ve 10 ml metanol ile çözülerek 10.000 µg/mL'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak;

Trolaks çalışma çözeltisi için: 25, 50, 100, 200 400 µg/ml standartları hazırlandı. Ana stok DPPH (10 mM) Reaktifinin hazırlanması: 39.5 mg DPPH 10 ml metanol içinde çözüldü. Elde edilen çözelti daha sonraki kullanımlar için buzdolabında saklandı.

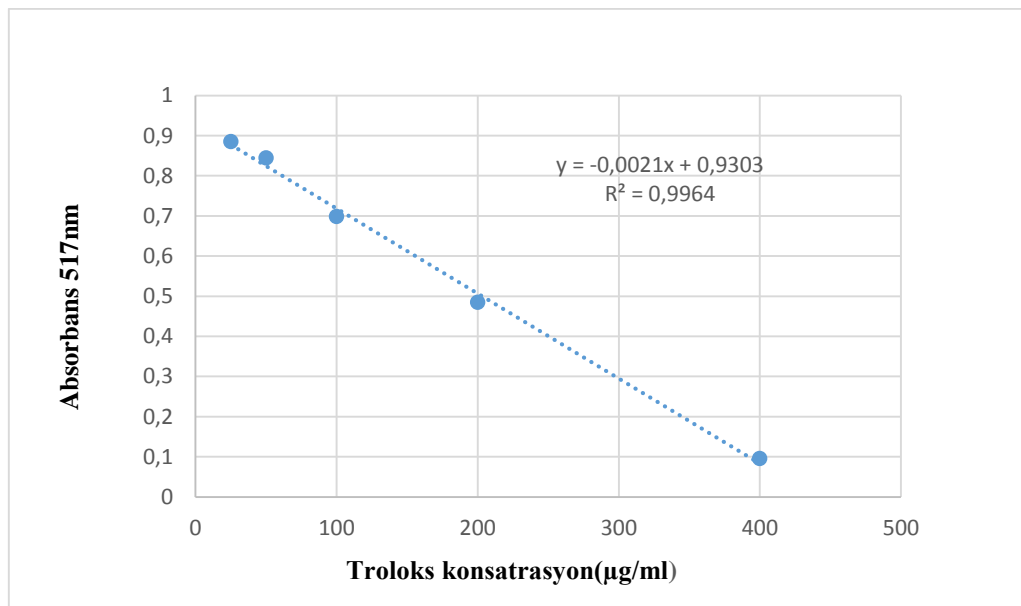
DPPH çalışma çözeltinin hazırlanması: Ana stok çözeltisinden 2.5 ml alınıp 250 ml'ye metanol ile tamamlandı. Tamamlanan çözeltinin absorbansı 517 nm de okunduğunda 0.980 ± 0.02 ayarlandı. Duruma göre seyreltme ya da ana stoktan ilave edilerek absorbansı 0.980 ± 0.02 değere ayarlanır.

Deneyin Yapılışı: DPPH analizinde yapılan işlemler Tablo 2.4'de veridi.

Tablo 2.4. Karadut ekstraktlarında DPPH tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/metanol/etanol	100 µL		
Standart			100 µL
Ekstrakt		100 µL	
DPPH çözeltisi	3000 µL	3000 µL	3000 µL
Karışım vortekslenip 30 dk karanlıkta beklendi. Sonra çözelti 517 nm’de Spektrofotometre absorbansı okundu.			

Sonuçlar Şekil 2.2’deki troloks standart grafiğinden yararlanılarak mg troloks/100g ekstrakt troloks eşdeğeri olarak verildi. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.2. DPPH troloks standart grafiği

2.2.3.3. Toplam Demir İndirgeme Antioksidan Kapasitesi

Benzei ve Strain (1996) tarafından geliştirilen bu yöntemde demir (III)’in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanlarının toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük miktarlarda oluşan Fe(III)’ün, tripiridiltiazin (TPTZ) ile reaksiyonu sonucu oluşan [Fe(III)-TPTZ] kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltiazin [Fe(II)-TPTZ] kompleksine

indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavi olup 593 nm’de maksimum absorbands verir.

Reaktiflerin Hazırlanması

300 mM asetat buffer: Litrelik balona 3.1 g Sodyum asetat trihidrat tartılır. Bir miktar saf su ile çözüldü. Üzerine 16 ml Glasial asetik asit ilave edildi. pH’sı 3.60 ayarlandı.

40 mM HCl çözeltisi: d 1.19, % 37 ‘lik derişik HCl ‘den 3.4 ml alınarak hacmi 1 litreye tamamlandı.

10 mM TPTZ çözeltisi: 3.123 g TPTZ 40 mM HCl çözeltisi ile hacmi 1 litreye tamamlandı.

20 mM FeCl₃.6H₂O çözeltisi: 5.406 g FeCl₃.6H₂O saf su ile hacmi litreye tamamlandı.

FRAP çözeltisi: 10:1:1 (Asetat buffer çözeltisi: 10 mM TPTZ çözeltisi: 20mM FeCl₃.6H₂O). FRAP çözeltisi kullanılmadan önce 37 °C de 15 dk inkübe edildi.

Ana Stok 1000 mg/L Demir iki sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) çözeltisi: 0.1830 g FeSO₄.7H₂O tartılarak 100ml tamamlandı.

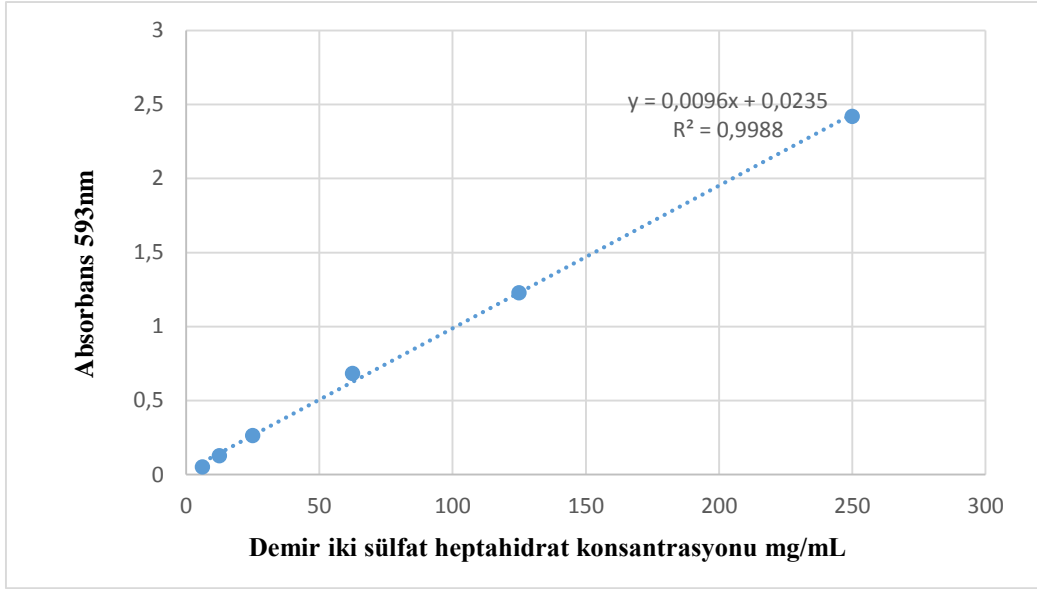
Çalışma standartları: Ana stok Demir iki sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) çözeltisinden 6.2, 12.50, 25.00, 62.50 ve 125.00 µg/ml çözeltiler hazırlandı.

Deneyin Yapılışı: Tablo 2.5’de FRAP analizinde yapılan işlemler sırasıyla verildi.

Tablo 2.5. Karadut ekstraktlarında FRAP tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/metanol/etanol	250 µL		
Standart			250 µL
Ekstrakt		250 µL	
DPPH çözeltisi	2750 µL	2750 µL	2750 µL
Karışım vortekslenip 30 dk karanlıkta beklendi. Sonra çözelti 593 nm’de Spektrofotometre absorbandsı okundu.			

Sonuçlar Şekil 2.3’deki Demir iki sülfat heptahidrat (FeSO₄.7H₂O) standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.3. FRAP standart grafiği

2.2.3.4. ABTS Radikal Katyonu Süpürücü Etki Tayini

ABTS⁺(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit) antioksidan kapasite tayininde radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorbansının engellenmesi temeline dayanan bir yöntemdir (Re vd.,1999).

Reaktiflerin Hazırlanması

Standartlar: 25 mg sakorbik asit tartıldı ve 25 ml metanol ile çözülerek 10.000 µg/mL'lik stok elde edildi. Stok çözeltiden 1000 µg/mL'lik standart çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden seri dilüsyon yapılarak;

Askorbik çalışma çözeltisinde 20, 50, 100, 150 ve 200 µg/ml standartları hazırlandı.

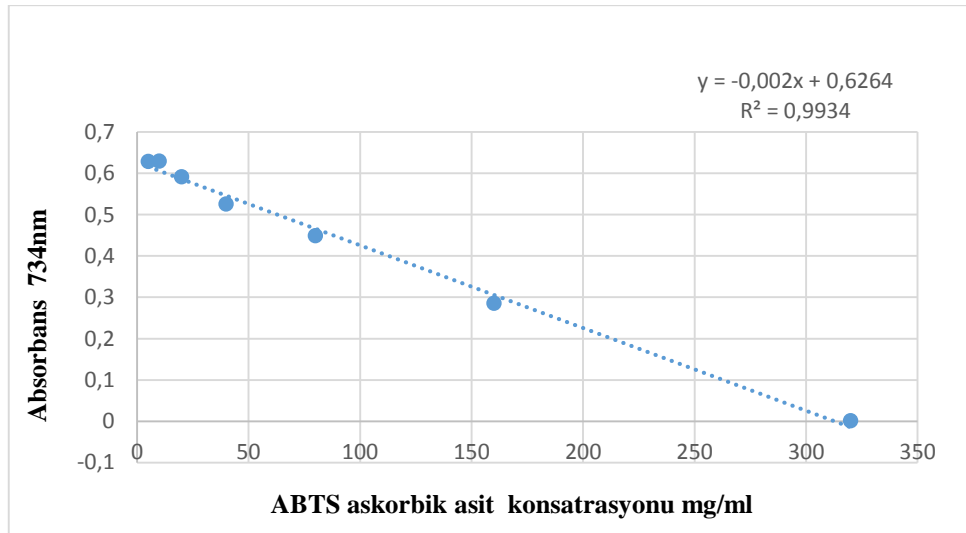
Ana stok ABTS⁺ Çözeltisi Reaktifinin Hazırlanması: 0.0384 mg ABTS ve 0.0134g Potasyum persulfat 10 ml distile saf su içinde çözdürüldü. Elde edilen çözeltiden 10 ml alınıp 100 ml balonjojeye distile saf su ile sulandırıldı(1:9 v/v). Kararlı hale gelmesi için 12 saat karanlıkta saklandı.

ABTS⁺ Çalışma Çözeltinin Hazırlanması: Ana stok çözeltisinden 1 ml alınıp 60 ml metanol ile seyreltildi. Çözeltinin absorbansı 734 nm de okunduğunda absorbansı 0.706 ± 0.001 getirildi. ABTS deneyinde yapılan işlemler sırasıyla Tablo 2.6'da verildi. Duruma göre metanol ile seyreltme ya da ana stoktan ilave edilerek absorbansı 0.706 ± 0.001 değere ayarlanır.

Tablo 2.6. Karadut ekstraktlarında ABTS tayini için yapılan pipetlemeler

	Kör	Numune	Standart
Su/metanol/etanol	150 µL		
Standart			150 µL
Ekstrakt		150 µL	
ABTS çözeltisi	2850 µL	2850 µL	2850 µL
Karışım vortekslendi sonra 120 dk karanlıkta beklendi. Elde edilen çözelti 734 nm’ de Spektrofotometre absorbansı okundu.			

Sonuçlar Şekil 2.4’deki askorbik asit standart grafiğinden yararlanılarak mg/mL olarak hesaplandı. Her örnek için ölçümler üç kere tekrarlandı (n=3).



Şekil 2.4. ABTS standart grafiği

2.2.4. Deney Hayvanları ve Kullanılan İlaçlar

Çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 53488718-93 sayılı ve 24.01.2019 tarihli yazısıyla onaylandı (EK1). Çalışmada 225 ± 15 g arasında değişen 35 adet dişi wistar rat KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi’nden sağlandı. Çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenmesi, barınması ve takibi aynı merkezde yapıldı. Bu sebeple deney sırasında sıçanlarda çevresel değişikliklerden kaynaklanan stres veya uyum problemi yaşanmadı. Ratlar çalışma süresince her zamanki standart beslenme ve barınma koşullarına tabi tutuldu (içme suyu olarak cerrahi

araştırma merkezinde normal şartlarda da kullanılan çeşme suyu verildi ve standart sıçan yemi ile beslendi, ilave bir besin verilmedi ve Tip III kafesler kullanıldı). Deney süresi boyunca laboratuvardaki sıcaklık ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, nisbi nem ortalama $\%50 \pm 5$ olarak ölçüldü. Cisplatin (Cisplatin-Kocak 50 mg/100 ml IV infüzyon- Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. Türkiye), Ketamin (Ketalar 500 MG- Pfizer, İstanbul, Türkiye), Ksilazin (Rompun % 2, Bayer, İstanbul, Türkiye) temin edildi.

2.2.4.1. Çalışma Grupları

Çalışmada randomize seçilmiş 7 adet rat içeren 5 grup oluşturuldu (7x5). Grupları özellikleri ve çalışma sırasında gruptaki sıçanlara uygulanan işlemler aşağıdaki gibi düzenlendi.

- 1. Grup:** Kontrol grubu
- 2. Grup:** Karadut grubu
- 3. Grup:** Cisplatin grubu
- 4. Grup:** Cisplatin+200 mg/kg Karadut grubu
- 5. Grup:** Cisplatin+400 mg/kg Karadut grubu

1. Gruba (kontrol) deney süresince serum fizyolojik oral yol ile uygulandı
2. Gruba (karadut 400 mg/kg) deney süresi boyunca (12 gün) karadut 400 mg/kg/gün oral yol ile uygulandı.
3. Gruba (Cisplatin) tek doz 7.5 mg / kg 5. Gün cisplatin i.p (intraperitoneal) olarak uygulandı
4. Gruba (Cisplatin+200mg/kg karadut) 5. Gün tek doz 7.5 mg / kg cisplatin i.p. olarak uygulandı, deney süresi boyunca (12 gün) karadut 200 mg/ kg/gün oral yol ile verildi.
5. Gruba (Cisplatin+400 mg/kg karadut)) 5. Gün tek doz 7.5 mg / kg cisplatin i.p. olarak uygulandı, deney süresi boyunca (12 gün) karadut 400 mg/ kg/gün oral yol ile verildi.

2.2.4.2. Kan ve Doku Örneklerinin Toplanması

Anestezi altında ratlardan intrakardial enjeksiyonla yaklaşık 4-5 ml kan biyokimya tübüne alındı. Kan numuneleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi ve çalışma yapılana kadar -80°C 'de saklandı. Ratlar sakrifiye edilerek cerrahi koşullarda böbrekler çıkarıldı. Böbrek dokuları serum fizyolojik ile yıkandı, biyokimyasal çalışmalar (SOD, CAT, MDA, TAS, TOS, TNF- α ve Kaspaz-3) için deney tüpleri içerisine alınarak alıgotlandı. Böbrek dokusunun bir kısmı histopatolojik analizler için %10' luk formaldehit

solüsyonu içerisine alındı. Biyokimyasal analizler Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümü ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na ait araştırma laboratuvarında yapıldı. Histopatolojik analizler ise Rize Recep Tayip Erdoğan Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji anabilim dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.2.5. Biyokimyasal Analizler

2.2.5.1. Serum Biyokimya Analizleri

Çalışma grupları serum örneklerinden KTÜ TIP Fakültesi Biyokimya Merkez Laboratuvarı otoanalizörlerinde (Beckman USA) enzimatik spektrofotometrik olarak Serum Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CRE) düzeyleri tespit edildi.

2.2.5.2. Doku Homojenizatlarının Hazırlanması

Biyokimyasal analizler için doku homojenizasyonunda üç farklı tampon kullanıldı. Bunlar;

- Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) tamponu
- Potasyum Klorür (KCl) Tamponu
- Fosfat Tamponu

I- PBS tamponunu hazırlanması (pH:7.4)

PBS Tamponu hazırlamak için aşağıdaki maddeler belirtilen miktarlarda tartılarak bir beherin içine alındı.

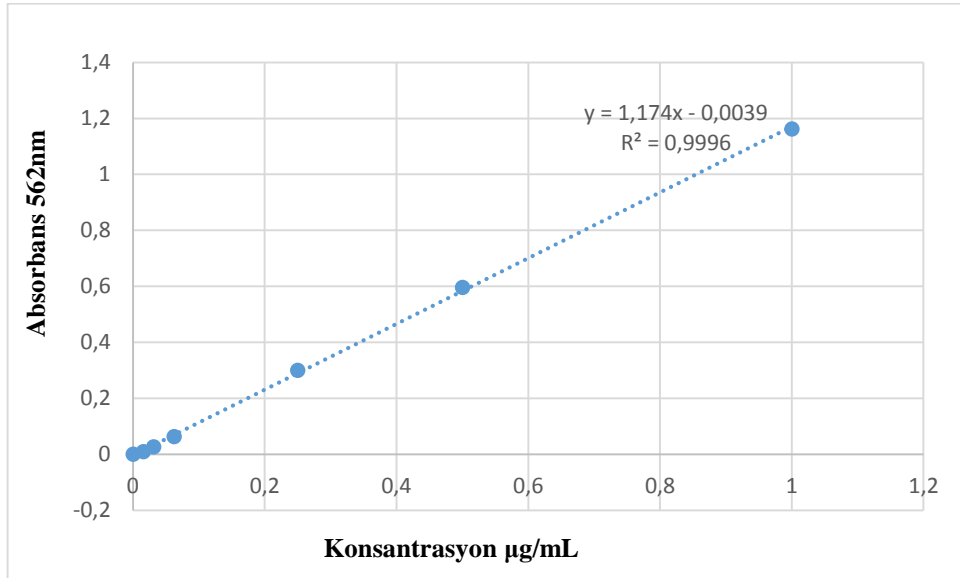
NaCl 8.0 g/L, KCl 0.2 g/L, Na₂HPO₄ 1.44 g/L, KH₂PO₄ 0.24 g/L beherin üzerine 800 mL distile su eklendi. Daha sonra manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırıldı. pH :7.4'e ayarlandı ve distile su ile çözelti 1000 mL'ye tamamlandı. Deneylerde kullanmak üzere +4°C buzdolabında saklandı.

II- KCl tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.

III- Fosfat tamponu (pH=7.0; 50 mM): 3.405 g KH₂PO₄ deiyonize suda çözülerek son hacmi 500 mL'ye tamamlandı. 4.45 g Na₂HPO₄.2H₂O deiyonize suda çözülerek son hacmi 500 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0 'ye ayarlandı.

2.2.5.3. Protein Miktar Tayini

Böbrek dokusundan elde edilen fazlardan protein tayini, katalog numarası 71285-3 olan bisinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti (Novagen, Merck Millipore, Almanya) protokolüne uygun olarak yapıldı. Kit prosedürünün esası Cu^{+2} 'nin alkali çözeltide bulunan protein tarafından Cu^{+1} 'e indirgenmesi olan Biüret reaksiyonuna ve oluşan Cu^{+1} 'in konsantrasyona bağımlı ölçümüne dayanır. BCA, indirgenmiş Cu ile şelat yapan renkli bir reaktiftir. Bu şelatlaşma sonucu oluşan mor kompleksin 562 nm'de ölçümü yoluyla protein miktarı belirlenmektedir. Çalışmada stok standart olarak 2 mg/mL'lik sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Böbrek dokularından elde edilen protein fazların konsantrasyonları Şekil 2.5'deki standart grafiğine göre $\mu\text{g/mL}$ cinsinden hesaplandı.



Şekil 2.5. Doku protein ölçünde kullanılan standart grafiği

2.2.5.4. SOD Aktivite Tayini

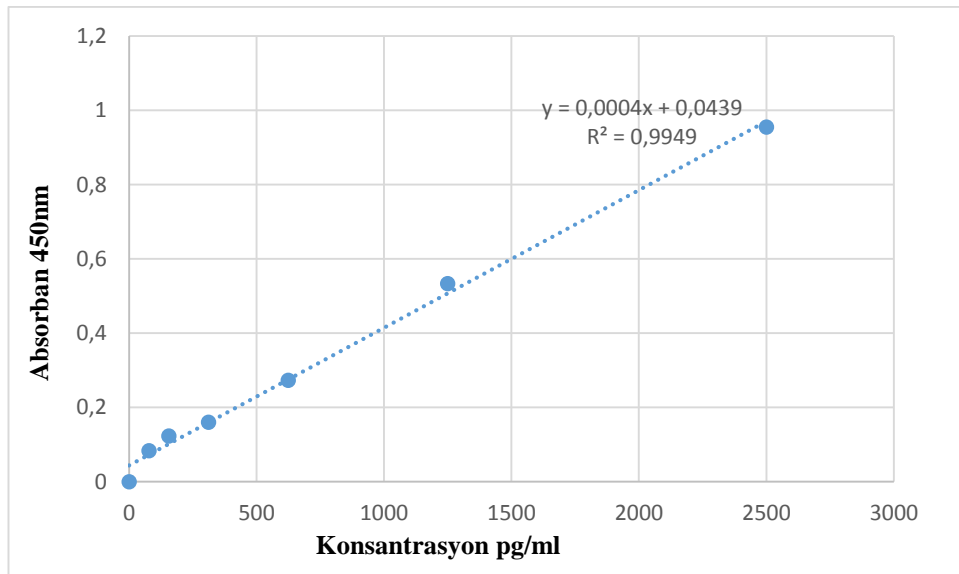
Çalışmamızda rat SOD analizi için enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kiti (USCN, Cat No SEB960Ra, Wuhan, Çin) kullanıldı. ELISA kitinin plaklarındaki 96 kuyucuk, rat SOD'larına spesifik antikorlarla kaplı durumdadır. Böbrek dokusu örnekleri -80°C'den, ELISA kitinin içerisinde hazır bulunan 96 kuyucuklu ELISA plağı ve diğer reaktifler kullanım öncesinde +4°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına (18-25°C) gelmeleri beklenmiştir. Doku örneklerinin SOD seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda

ELISA kit kullanılarak belirlendi. Bunun için Tablo 2.7.'de verilen işlemler sırasıyla 96'lık elisa pleyt içinde gerçekleştirildi.

Tablo 2.7. SOD aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler

Reaktifler	Numune	Standart
Numune	100 µL	-
Standart	-	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyon ardından aspire edildi		
Reaktif A (Biyotinle işaretli antikör)	100 µL	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 3 defa yıkandı.		
Reaktif B (Streptavidin-HRP) çözeltisi	100 µL	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 5 defa yıkandı.		
TMB substrat çözeltisi	90 µL	90 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 15 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL
Pleyt 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.		

Elde edilen veriler doğrultusunda standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanıldı ve Şekil 2.6'da verilen standart eğri grafiği oluşturuldu. Bu grafik kullanılarak numunelerdeki SOD seviyeleri hesaplandı. Doku örneklerinin sonuçları pg/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 2.6. SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

2.2.5.5. Katalaz Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi (Aebi, 1987) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler

1-Hidrojen Peroksit: 0.36 mL %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL 'ye tamamlandı (günlük hazırlandı). Doku homojenatları fosfat tamponu ile 20 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 2.8'ye göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 2.8. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler(mL)	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.25	
Numune	0.5	0.5
H_2O_2		0.25

H_2O_2 eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm'de 30 s süreyle her 10 s'de bir absorbanlar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslarda ki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır. CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s'lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

A1= Başlangıç absorbansı

A2= 10 s sonraki absorbans

$$k = (2.3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1} \quad (2.1)$$

Eş. 1'e göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından böbrek dokularında g protein başına CAT aktivitesi hesaplandı.

2.2.5.6. MDA Analizi

Bu metotta MDA bir lipid peroksidasyon aldehit ürünü olan ve yönteme göre Tiyoarbitürik asit (TBA) ile analiz sırasında pembe renkli olan bir yapı oluşur. Analiz sonrası oluşan bu çözeltinin absorbansı spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçülür ve standart grafiğe göre hesaplandı (Mihara vd.,1978).

Çıkarılan böbrek dokuların 50 mg'lık kısmı MDA ölçümü için kullanıldı. MDA ölçümü için kullanılan dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisi içinde homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

• **Kullanılan çözeltiler**

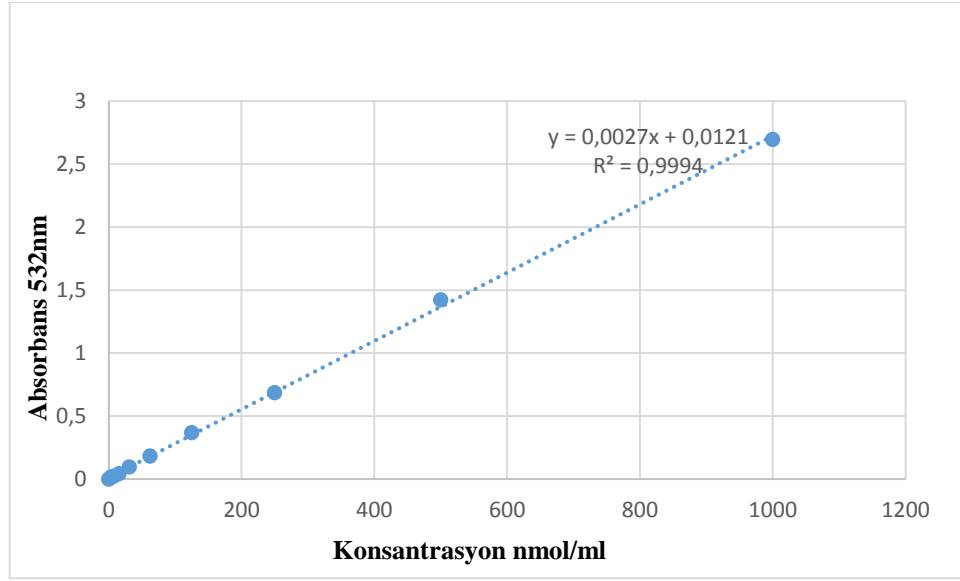
1- %1'lik H_3PO_4 : Bir miktar saf su üzerine 2.94 ml % 85'lik H_3PO_4 eklendi ve son hacmi saf su ile 250 ml 'ye tamamlandı.

2- Tiobarbitarenmelik Asit (TBA) çözeltisi: 0.67g TBA 50ml suda manyetik bar yardımıyla 30°C'de yaklaşık 20 dk karıştırıldı. TBA tamamen soğuduktan sonra üzerine 50 ml asetik asit ilave edildi.

3- Standart çözeltiler: 82.5µl tetrametoksiopropan 50 ml 0.01 M HCl eklendi ve 50 ° C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan 10000 nmol/ml'lik stok MDA standardından 1000nmol/ml'lik ara stok çözelti hazırlandı. Ara stoktan 500 nmol/ml'lik çözelti elde edildi ve bu çözeltiden seri seyreltme ile 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062 ve kör nmol/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı. Doku homojenatları potasyum klor ile 2 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. MDA analizinde yapılan işlemler sırasıyla Tablo 2.9'da varıldı.

Tablo 2.9. MDA analizi için yapılan pipetler

	Kör	Numune	Standart
Saf su	500 µL		
Standart			500 µL
Örnek		500 µL	
TBA çözeltisi	1mL	1mL	1 mL
%1'lik H_3PO_4	3 mL	3 mL	3 mL
Tüpler 100°C'de 45 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine 300µl pipetlendikten sonra 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.			



Şekil 2.7. Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

2.2.5.7. Kaspaz-3 Analizi

Böbrek dokusundan 100 mg örnek alındı ve bir deney tüpüne 2 ml PBS tamponu (pH:7.4) eklendi ve doku homojenizatörü yardımı ile homojenize edildi. Homojenizasyon işlevi bittikten sonra 10000 g de 5 dk santrifüj edilerek numunelerin üst fazları ependorf tüplerinde alıgotlandı (Bolcal vd., 2007). Bu supernatlar Kaspaz-3, TNF- α , TAS ve TOS analizler için kullanıldı.

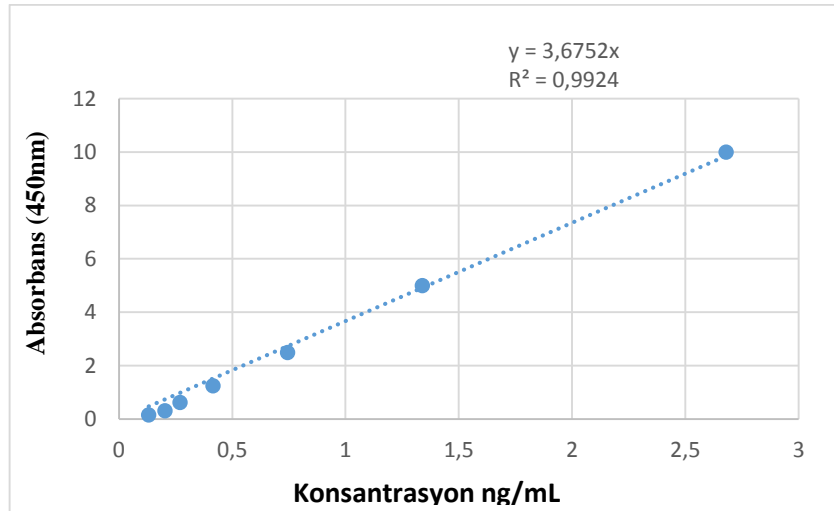
Çalışmamızda kullanılan Kaspaz-3 tayini rat doku Eliza kiti (Cloud-Clone) kullanılarak sandviç ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. ELISA kitinin plaklarındaki 96 kuyucuk, rat Kaspaz-3'larına spesifik antikorlarla kaplı durumdadır. Böbrek dokusu örnekleri -80°C'den, ELISA kitinin içerisinde hazır bulunan 96 kuyucuklu ELISA plağı ve diğer reaktifler kullanım öncesinde +4°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına (18-25°C) gelmeleri beklenmiştir. Böbrek doku örnekleri ELISA işlemi öncesinde PBS tampon çözeltisi ile dilüe edildi.

Doku örneklerinin Kaspaz-3 seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit kullanılarak belirlendi. Bunun için Tablo 2.10'da verilen işlemler sırasıyla 96'lık elisa pleyt içinde gerçekleştirildi.

Tablo 2.10 Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler

Reaktifler	Numune	Standart
Numune	100 µL	-
Standart	-	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyon ardından aspire edildi		
Reaktif A (Biyotinle işaretli antikor)	100 µL	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C’de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 3 defa yıkandı.		
Reaktif B (Streptavidin-HRP) çözeltisi	100 µL	100 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C’de 30 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 5 defa yıkandı.		
TMB substrat çözeltisi	90 µL	90 µL
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C’de 15 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
Stop çözeltisi	50 µL	50 µL
Pleyt 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.		

Elde edilen veriler doğrultusunda standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanıldı ve Şekil 2.8’de verilen standart eğri grafiği oluşturuldu. Bu grafik kullanılarak numunelerdeki Kaspaz-3 seviyeleri hesaplandı. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 2.8. Kaspaz-3 ölçümünde kullanılan standart grafiği

2.2.5.8. TNF-α Analizi

Çalışmamızda kullanılan Rat TNF-α kitinde sandviç ELISA yönteminden yararlanıldı. ELISA kitinin plaklarındaki 96 kuyucuk, rat TNF-α’larına spesifik antikorlarla kaplı

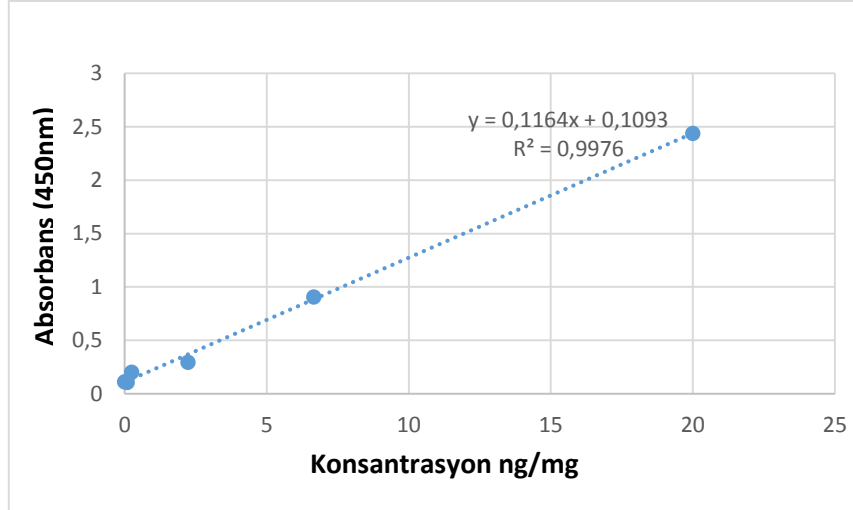
durumdadır. Böbrek dokusu örnekleri -80°C'den, ELISA kitinin içerisinde hazır bulunan 96 kuyucuklu ELISA plağı ve diğer reaktifler kullanım öncesinde +4°C'den çıkarılarak oda sıcaklığına (18-25°C) gelmeleri beklenmiştir. Böbrek doku örnekleri ELISA işlemi öncesinde PBS tampon çözeltisi ile dilüe edildi.

Doku örneklerinin TNF- α seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit kullanılarak belirlendi. Bunun için Tablo 2.11'de verilen işlemler sırasıyla 96'lık elisa pleyt içinde gerçekleştirildi.

Tablo 2.11. TNF- α aktivitesinin belirlenmesi için gerekli olan işlemler

Reaktifler	Numune	Standart
Numune	100 μ L	-
Standart	-	100 μ L
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyon ardından aspire edildi		
Reaktif A (Biyotinle işaretli antikor)	100 μ L	100 μ L
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 1 saat çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 3 defa yıkandı.		
Reaktif B (Streptavidin-HRP) çözeltisi	100 μ L	100 μ L
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
İnkübasyonun ardından aspire edildi ve pleyt 5 defa yıkandı.		
TMB substrat çözeltisi	90 μ L	90 μ L
Pleyt folyo ile kapatılıp 37°C'de 15 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.		
Stop çözeltisi	50 μ L	50 μ L
Pleyt 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.		

Elde edilen veriler doğrultusunda standart konsantrasyonlarına karşı absorbans değerleri kullanıldı ve Şekil 2.9'da verilen standart eğri grafiği oluşturuldu. Bu grafik kullanılarak numunelerdeki TNF- α seviyeleri hesaplandı. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein birimiyle verildi.



Şekil 2.9. TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği

2.2.5.9. Toplam Antioksidan (TAS) ve Toplam Oksidan (TOS) Kapasitesi

Genel oksidatif stress belirteçlerinde olan dokuda ve serumda TAS ve TOS ölçümü için relleassay kitleri kullanılarak ölçüldü. TOS seviyeleri mikromol H_2O_2 eş değeri /L, TAS değerleri ise minimal troloks eş değeri / L birimi şeklinde verildi. Thermo Scientific (USA) marka mikro plaka okuyucuda okundu.

2.2.5.10. Oksidatif Stres İndekslerinin (OSI) Hesaplanması

Serum ve doku örneklerindeki OSI seviyeleri aşağıdaki denklem formülü kullanılarak hesaplandı (Yuluğ vd., 2014).

$$OSI = [(TOS, \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L})] \times 100 \quad (2.2)$$

2.2.6. Histopatolojik Analizler

Sıçanlardan alınan böbrek dokuları 1.5 cm 3 hacminde parçalara ayrılarak %10'luk formalin (Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonunda 36 saat boyunca fiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon aşamasından sonra böbrek dokusuna ait örnekler doku takip kasetlerine (Isolab GmbH, Almanya) konularak doku takip cihazında (ThermoScientific™ Citadel 2000, Birleşik Krallık) %50, %70, %80, %96, %100 (2 kez)'lük etanol (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) serilerinde bekletilerek dehidratasyon aşaması gerçekleştirildi. Daha sonra ksilol (Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) serileri ile dokuların şeffaflaştırma işlemi uygulandı ve daha sonra parafin bloklama cihazından (Leica EG 1150 H, Almanya) metal baz kalıplar kullanılarak doku gömme kasetleri kullanılarak bloklandılar.

Elde edilen parafin bloklardan Rotary mikrotom (Leica RM2255, Almanya) ile dokulardan alınan 4-5 µm kalınlığındaki kesitler Harris Hematoksilen ve Eosin G boyaları (H&E, Merck GmbH, Darmstadt, Almanya) ile boyama cihazında (Leica ST5020, Almanya) boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyanan preparatlar ışık mikroskopu altında incelendi ve olypus DP20 kamerası ile fotoğrafları çekildi.

2.2.6.1. Semikantitatif Analiz

Çalışmamızda H+E ile boyanmış böbrek dokusuna ait kesitler Jeong Sung ve arkadaşlarının Tübüler Nekrozis Skorlaması (TNS) metodunda modifiye edilmiş skorlama yöntemi ile skorlandı. TNS skorlaması her bir sıçana ait böbrek dokusu kesitlerinde rastgele olarak seçilmiş 10 farklı alanda çalışmanın deney grupları bakımından karşılaştırılmış iki kör histopatolog tarafından skorlanmıştır. Çalışmamızda renal korpüskül, proksimal ve distal tübül yüzey alanlarının (µm²) ölçümü Olympus DP2-BSW (Ver.2.1 to Ver.2.2, Build 6212, Tokyo, Japonya) programı kullanılarak ölçüldü. Bu ölçüm sistemi kamera (Olympus DP20, Olympus Corporation, Tokyo, Japonya) yerleştirilmiş bir ışık mikroskobu (Leica DM6200, DM6200, Mannheim, Almanya) ve Olympus DP2-BSW yazılımlı bir bilgisayardan oluşmaktadır. H&E boyanmış preparatların ölçüm sınırları histopatolog tarafından belirlendi.

2.2.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmada 5 farklı deney grubu bulunmakta ve her grupta bulunan 6 deney hayvanına ait olan biyokimyasal parametrelerine ait sonuçlar SPSS 22.0 (SSPS Inc., Chicago, IL) istatistiksel analizler gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Her grup için $p > 0,05$ olduğu durumlarda verilerin normal dağılım gözlemlendi. Normal dağılım gözlemlendikten sonra parametrik test olan One way ANOVA testi uygulandı. Bu testte homojenlik için Levene Statistic değerine bakıldı ve p değeri 0,05 ten büyük olduğu için homojenliğin olduğu gözlemlendi. Bu nedenle One way ANOVA testinde post hoc testlerinden olan Tukey testi uygulandı. Histolojik analiz sonuçları Semikantitatif sonucu elde edilen veriler SPSS 18.00 (IBM Corp. IL, Chicago, Amerika Birleşik Devletleri) istatistik programı kullanılarak medyan, 25% ve 75% interquartile range şeklinde hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar sırası ile Kruskal Wallis ve Tamhane T2 testleri ile değerlendirildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Farklı analizlerde kullanılmak üzere karadut meyve ekstraktları su, metanol ve etanol olmak üzere üç farklı çözücü ile hazırlandı.

3.1. Antioksidan Analiz Sonuçları

Antioksidan analizleri ile ilgili yapılan deney sonuçları aşağıdaki Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Ekstraktların antioksidan sonuçları

PARAMETRELER	EKSTRAKSİYONLAR		
	Su ekstraktı	Metanol ekstraktı	Etanol ekstraktı
FRAP (mgFeSO ₄ /100g)	14298.33±34.10 ^{a,b}	14874.72±33.9 ^c	14806.67±25.34 ^c
TFM (mgGAE/100g)	834.29 ± 18.95 ^{a,b}	1066.83± 44.50 ^{b,c}	724.16± 24.8 ^{a,c}
ABTS (mg TE./100g)	1988.00 ± 3.07 ^{a,b}	2023.90 ± 1.77 ^c	2017.74±6.40 ^c
DPPH (mg TE./100g)	733.30 ± 2.19 ^{a,b}	760.921± 2.74 ^c	757.3 ± 1.64 ^c

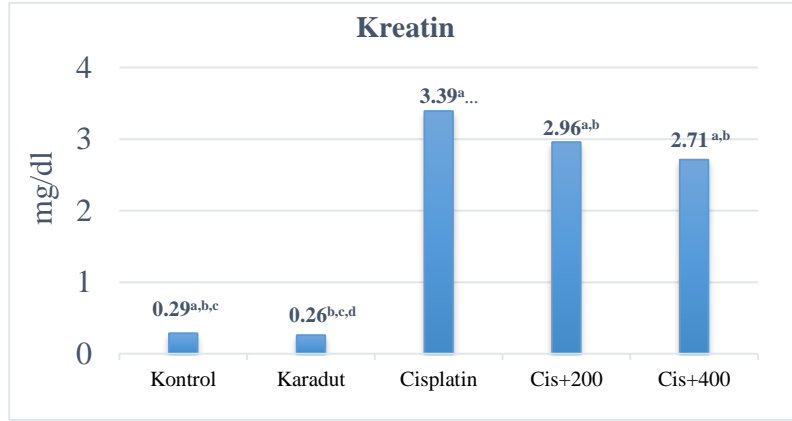
Meyve ekstraktlarının sonuçları arasındaki farklılıklar tukey karşılaştırma testi ile analiz edildi ve $p<0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi. ^aMetanol, ^betanol ve ^csafsu grubunun diğer gruplarla ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$).

Tablo 3.1 ‘e bakıldığında ekstraktlar içerisinde en yüksek antioksidan sonuç veren metanol ekstraktıdır ve çalışmanın diğer aşamalarından metanol ekstraktı kullanıldı.

3.2. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

3.2.1. Kreatinin Düzeyleri

Serumda yapılan kreatin analiz sonuçları gruplar arasında önemli fark bulunmuştur ($p=0,000$). Cisplatin grubundaki kreatin düzeyi (3,39 mg/dl), kontrol grubundaki kreatin düzeyine (0.29 mg/dl) göre anlamlı olarak bir artış saptandı ($p=0,000$). Cisplatin grubunu cisplatin+200 mg/kg karadut grubu ile karşılaştırıldığında kreatin düzeylerinde anlamlı bir fark görülmedi ($P=0,75$) Ancak cisplatin+400 mg/kg karadut grubuna göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,00$). Kontrol grubu ile karadut grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Gruplardaki kreatinlerin düzeylerin ortalaması Şekil 3.1’de gösterilmiştir

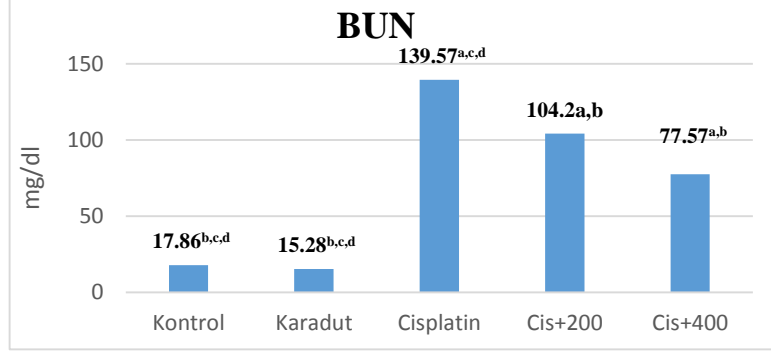


Şekil 3.1. Serum örneklerinin kreatin değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

3.2.2. BUN Düzeyleri

Serumdaki BUN düzeyleri gruplar arasındaki önemli fark bulunmuştur ($p=0,000$). Cisplatin grubundaki BUN değeri, kontrol grubundaki BUN değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p=0,000$). Cisplatin grubu cisplatin+200 mg/kg grubu ile karşılaştırıldığında BUN düzeylerinde anlamlı bir fark görüldü ($P<0,05$). Cisplatin+400 mg/kg grubu Cisplatin grubuna göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,00$). Karadut grubu cisplatin grubuna göre anlamlı bir fark gözlemlendi. Gruplardaki BUN düzeylerinin ortalaması Şekil 3.2’de gösterilmiştir.

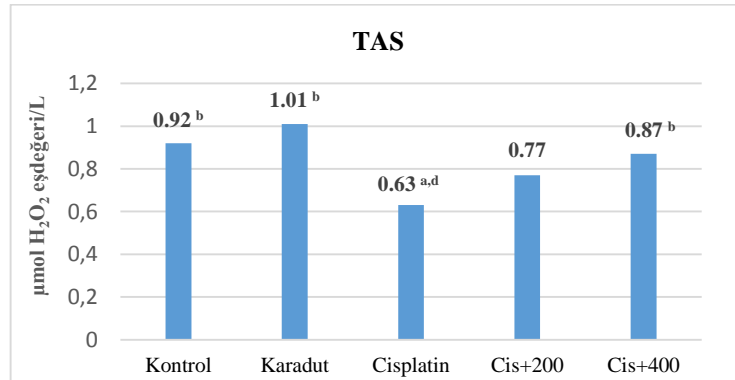


Şekil 3.2. Serum örneklerinin BUN değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

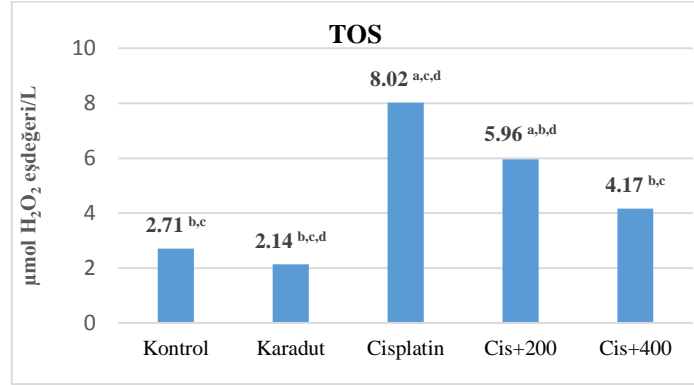
3.2.3. TAS-TOS ve OSİ Değerleri

Deney gruplarından elde edilen serum örneklerinin TAS-TOS ve OSİ değerleri Şekil 3.3, 3.4 ve 3.5’de ve doku örnekleri TAS-TOS ve OSİ değerleri ise şekil 3.6, 3.7 ve 3.8’de verildi.



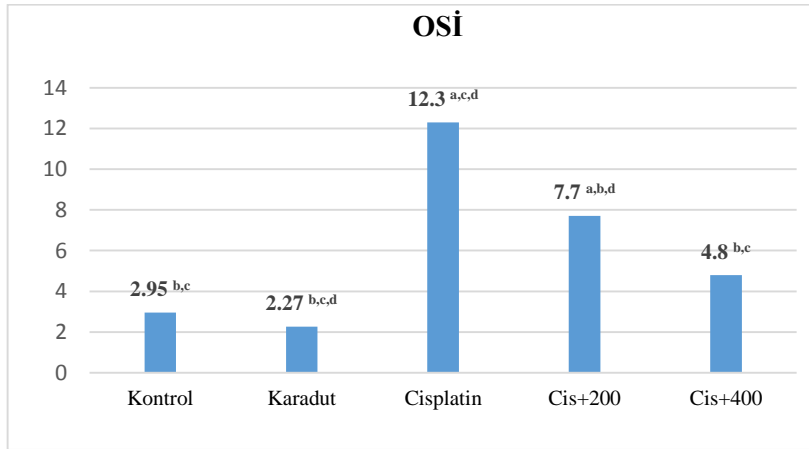
Şekil 3.3. Serum örneklerinin TAS değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.



Şekil 3.4. Serum örneklerinin TOS değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

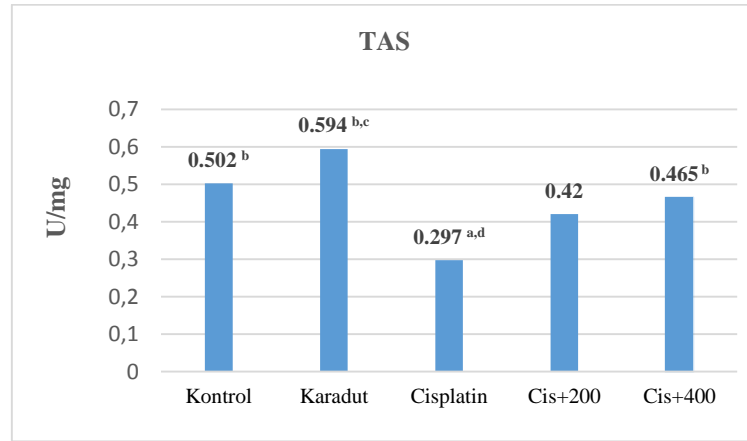


Şekil 3.5. Serum örneklerinin OSİ değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

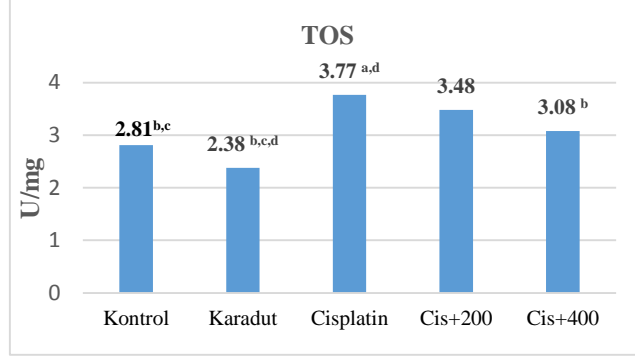
TAS-TOS ve OSİ değerleri için deney grupları karşılaştırıldığında kontrol grupları ile karadut grupları arasında serum örneklerinde anlamlı fark görülmedi. Serum örneklerindeki TOS değerleri kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun

anlamli düzeyde arttiğı gözlemlenmiş (p=0.000) olup karadut gruplarının cisplatin grubuna göre anlamli olarak azaldığı gözlemlendi. TAS değerleri kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun anlamli düzeyde azaldığı gözlemlenmiş (p=0.013) olup Cisplatin grubunu cisplatin+200 mg/kg karadut grubu arasında anlamli bir fark görölmedi. Ancak cisplatin+400 mg/kg karadut grubunda ise cisplatin grubuna göre anlamli fark görölldü (p=0,043). TAS ve TOS sonuçlarından elde edilen serum örneklerinin OSI değerleri ise; kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun anlamli düzeyde arttiğı gözlemlenmiş (p=0.000) olup karadut gruplarının cisplatin grubuna göre anlamli olarak azaldığı gözlemlendi.



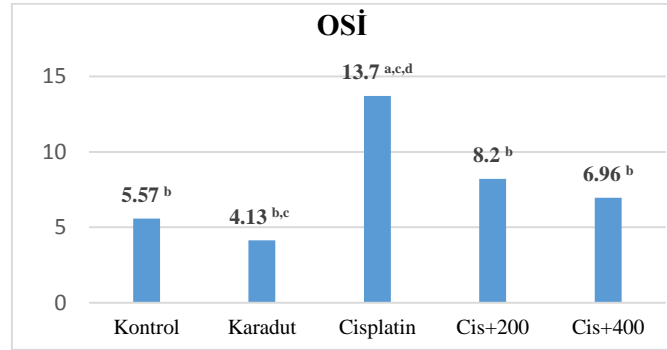
şekil 3.6. Doku örneklerinin TAS değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamli fark (p<0.05), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamli fark (p<0.05), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamli fark (p<0.05); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamli fark (p<0.05) istatistiksel olarak anlamli fark kabul edildi.



Şekil 3.7. Doku örneklerinin TOS değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.



Şekil 3.8. Doku örneklerinin OSİ değerleri

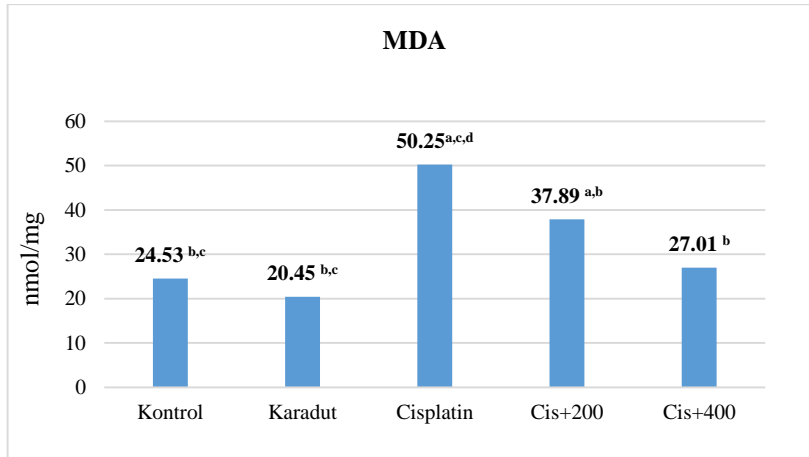
(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

TAS-TOS ve OSİ değerleri için deney grupları karşılaştırıldığında kontrol grubu ile karadut grupları arasında doku örneklerinde anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$). Doku örneklerindeki TOS değerleri kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiş ($p=0.000$) olup karadut gruplarının cisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

TAS değerleri kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiş (p=0.000) Cisplatin grubunda cisplatin+200 mg/kg karadut grubuna göre anlamlı bir fark görülmedi. Ancak cisplatin+400 mg/kg karadut grubu ile anlamlı fark görüldü (p=0,044). TAS ve TOS sonuçlarından elde edilen doku örneklerinin OSI değerleri ise; kontrol grubu ile cisplatin grubu karşılaştırıldığında cisplatin grubunun anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiş (p=0.000) olup karadut gruplarının cisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi.

3.2.4. Dokuda MDA Düzeyleri

Cisplatin grubunda MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı artış gösterirken (p=0,000), Cisplatin+400 mg/kg karadut ve cisplatin+200 mg/kg karadut gruplarında ise cisplatin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü (p=0,000). Kontrol ile karadut grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Cis+400mg/kg karadut grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir bulunmazken Cisplatin+200 mg/kg karadut grubu ile hem kontrol hemde karadut grubu arasında anlamlı fark vardı (p=0,00). Deney gruplarına ait doku MDA düzeylerinin bulguları şekil 3.9’da verildi.

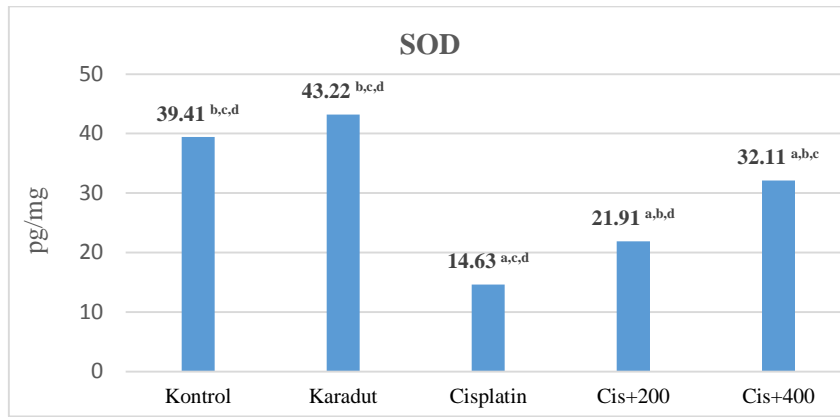


şekil 3.9. Doku örneklerinin MDA değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark (p<0.05), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark (p<0.05), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark (p<0.05); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark (p<0.05) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

3.2.5. Dokuda SOD Düzeyleri

Dokuda SOD düzeyleri gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir ($p=0,000$). Cisplatin grubunun SOD düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdi ($p=0,000$). Cisplatin+400 mg/kg karadut ($p=0,000$) ve cisplatin+200 mg/kg karadut ($p=0,045$) gruplarında ise cisplatin grubuna göre anlamlı fark vardı. Bununla beraber Cis+düşük ve yüksek doz karadut grupları ile karadut ve kontrol grupları arasında da anlamlı bir fark mevcuttu. Deney gruplarına ait doku SOD düzeylerinin bulguları Şekil 3.10'da verildi.

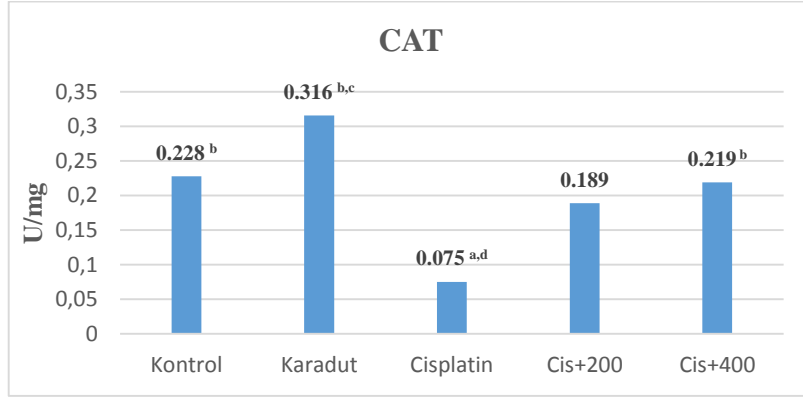


Şekil 3.10. Doku örneklerinin SOD değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0,05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0,05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0,05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0,05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

3.2.6. Dokuda CAT Düzeyleri

Dokudaki CAT düzeyleri gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir ($p=0,000$). cisplatin grubunda CAT değeri kontrol ve karadut grubuna göre anlamlı bir fark görüldü. Cisplatin+400 mg/kg karadut ve cisplatin+200 mg/kg karadut gruplarında ise cisplatin grubuna göre yükseldi. Ancak cisplatin+400 mg/kg karadut anlamlı bir fark görüldü ($p=0,019$). Karadut grubu ile cisplatin+200 mg/kg karadut grubu arasında anlamlı bir fark gözlenildi. Cisplatin+400 mg/kg karadut grubu kontrol ve karaduta göre anlamlı bir fark görülmeydi. Kontrol ile karadut grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Deney gruplarına ait doku CAT düzeylerinin bulguları Şekil 3.11'de verildi.

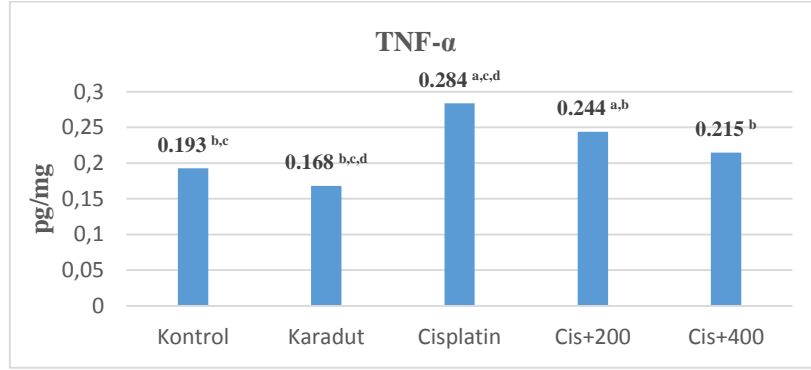


Şekil 3.11. Doku örneklerinin CAT değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

3.2.7. Dokuda TNF- α Düzeyleri

Dokuda TNF- α düzeyleri gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir ($p=0,000$). cisplatin grubunda TNF- α düzeyi kontrol ve karadut grubuna göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,00$). Cisplatin+400 mg/kg karadut ($p=0,000$) ve cisplatin+200 mg/kg karadut ($p=0,037$) gruplarında ise cisplatin grubuna göre bir düşüş saptandı. Karadut grubu cisplatin+200 grubuna göre anlamlı bir fark gözlenildi. Cisplatin+400 mg/kg karadut grubu karaduta göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,011$). Kontrol ile Karadut grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Deney gruplarına ait doku TNF- α düzeylerinin bulguları şekil 3.12’de verildi.

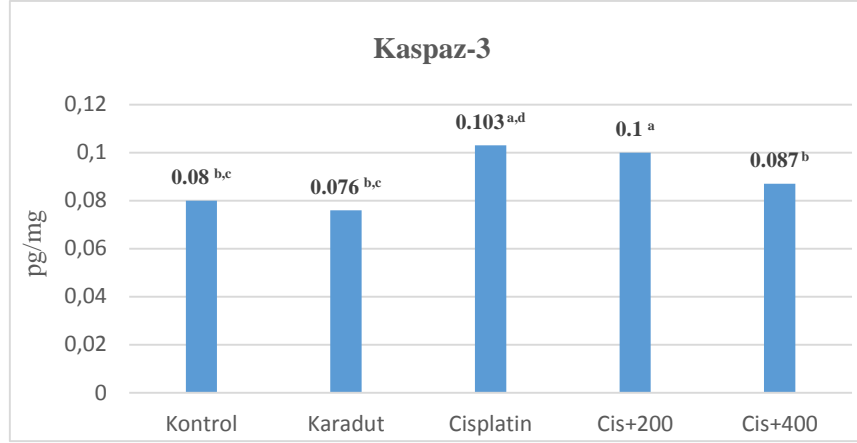


Şekil 3.12. Doku örneklerinin TNF- α değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

3.2.8. Dokuda Kaspaz-3 Düzeyleri

Dokuda kaspaz-3 düzeyleri gruplar arasında anlamlı fark göstermiştir ($p=0,000$). cisplatin grubunda kaspaz-3 düzeyi kontrol ve karadut grubuna göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,00$). Cisplatin+400 mg/kg karadut grubu cisplatin grubuna göre anlamlı sonuç verdi ($p=0,00$) ancak cisplatin+200 mg/kg karadut grubu cisplatine göre anlamlı görülmedi. Karadut grubu ile cisplatin+200 mg/kg karadut grubu arasında anlamlı bir fark gösterdi. Cisplatin+400 mg/kg karadut grubu karaduta göre anlamlı bir fark görüldü ($p=0,047$). Kontrol ile Karadut grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Deney gruplarına ait doku Kaspaz-3 düzeylerinin bulguları Şekil 3.13’de verildi.

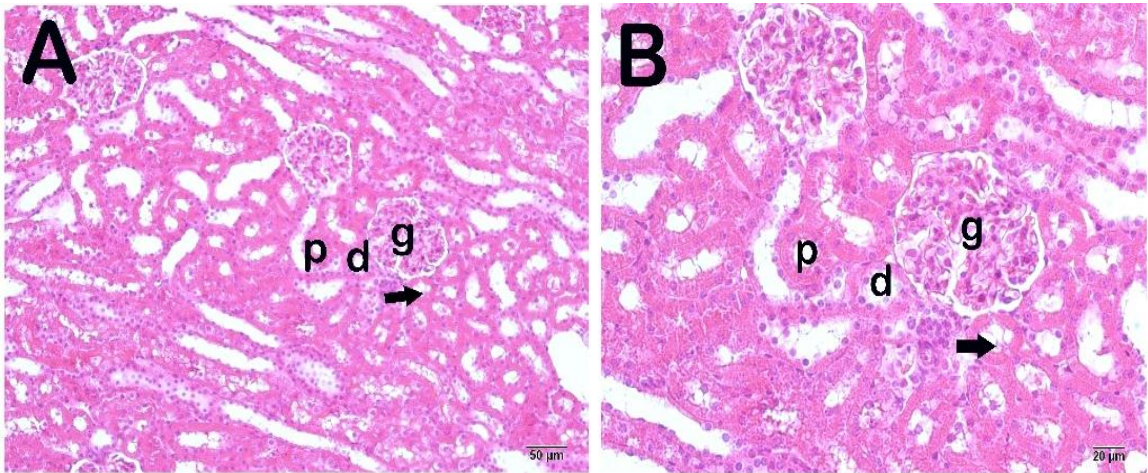


Şekil 3.13. Doku örneklerinin Kaspaz-3 değerleri

(a.b.c.d.): ^aKontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^bCisplatin grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$), ^cCis+200 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$); ^dCis+400 ile kıyaslandığında anlamlı fark ($p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.

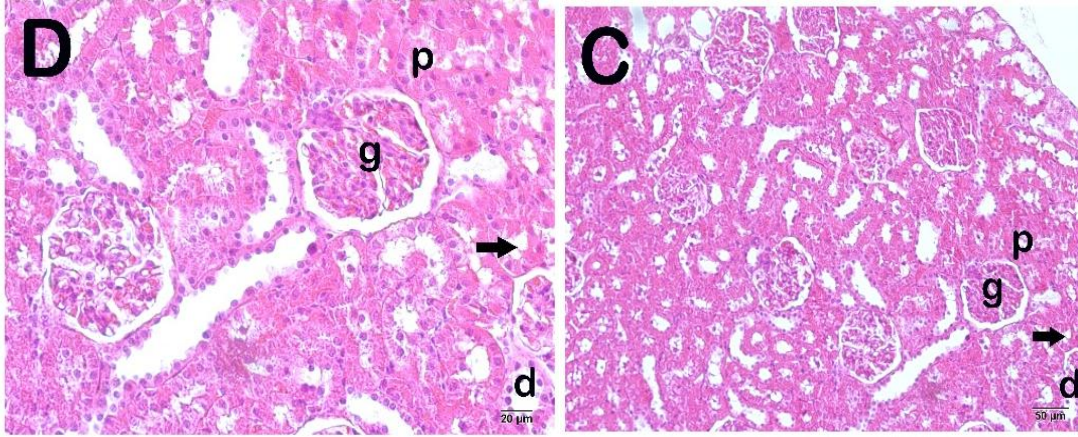
3.3. Histopatolojik Bulgular

Aşağıdaki şekiller Böbrek dokusuna ait kesitlerin ışık mikroskopundaki görüntüleri. Şekil 3.14’de Kontrol grubuna ait kesitlerde normal yapıdaki glomerul (g), proksimal (p) ve distal tübül (d) yapıları gözlenmektedir (TNS median: 1(0-1)).



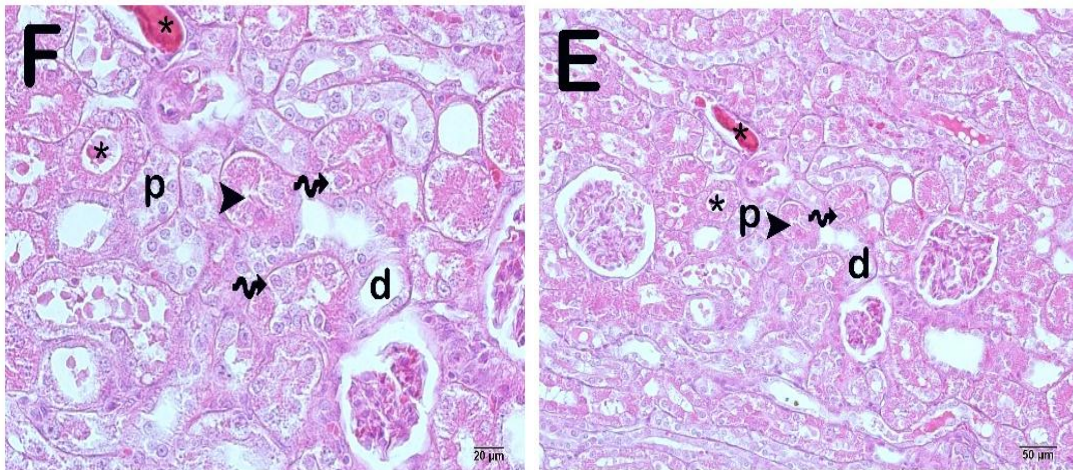
Şekil 3.14. Kontrol grubu (H&E A(x20), B(x40))

Şekil 3.15’de Karadut uygulama grubuna ait kesitlerde proksimal (p) ve distal tübül (d) epitel hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlemlenmektedir (TNS median: 1(1-1)).



Şekil 3.15. Karadut grubu (H&E C(x20), D(x40))

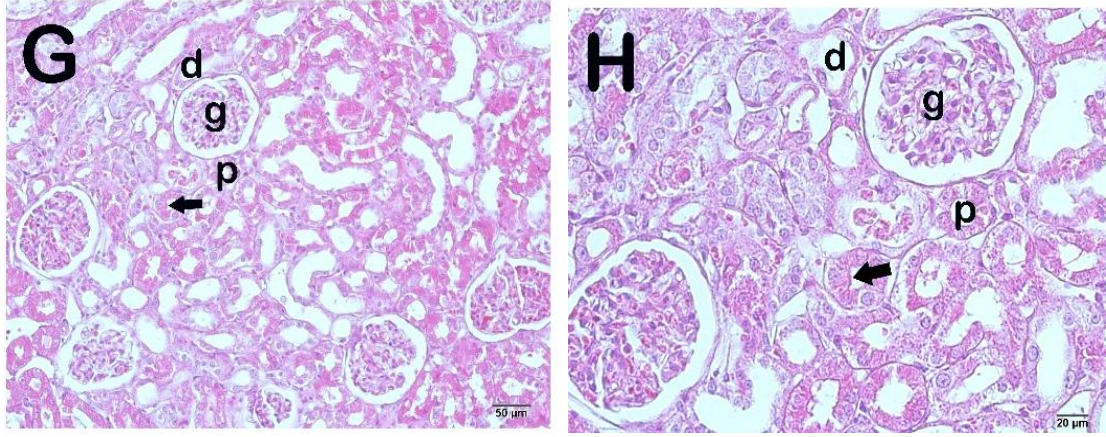
Şekil 3.16’de Cisplatin grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde tübüler epitel hücrelerinde kayıplar (ok başı) ile eşlik eden tübül lümenlerinde debris birikimleri izlenmekte. Bunun yanında özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde fırçası kenar (spiral ok) yapılarında kayıplar gözlenmekte. (TNS median: 8(7-8)).



Şekil 3.16. Cisplatin grubu (H&E E(x20), F(x40))

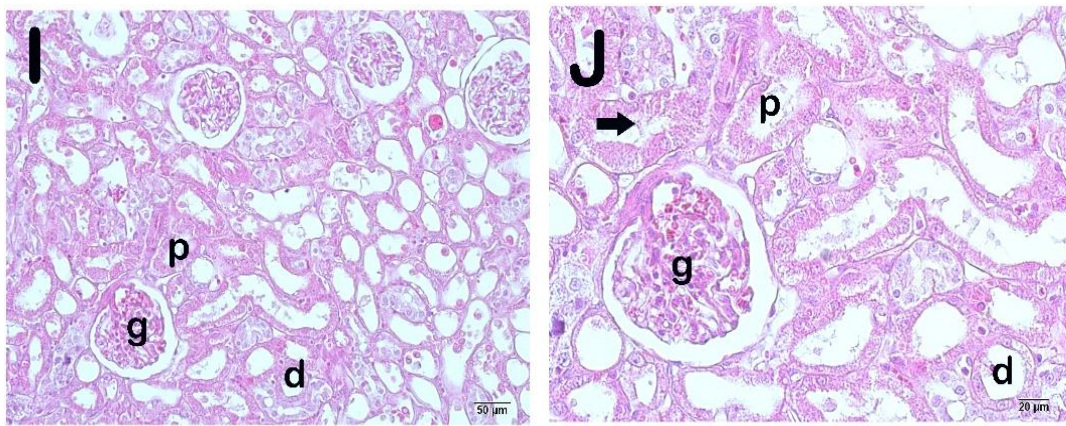
Şekil 3.17’de Cisplatin+200 mg/kg karadut grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde kayıplar da ve tübül lümenlerinde debris

birikimlerinde azalma ve bunun yanında proksimal tübülerde tipik yapıdaki fırçamsı kenar yapıları gözlenmektedir (ok) (TNS median: 3(3-5).



Şekil 3.17. Cis+200 mg/kg (H&E G(x20), H(x40))

Şekil 3.18’de Karadut 400 mg tedavi grubuna ait böbrek dokusu kesitlerinde tübül epitel hücrelerinde kayıplar da ve tübül lümenlerinde debris birikimlerinde azalmalar izlenmekle beraber tipik yapıdaki epitel hücreleri içeren proksimal (p) ve distal tübül (d) hücreleri gözlemlenmekte. Proksimal tübülerde tipik yapıdaki fırçamsı kenar yapıları gözlenmektedir (ok) (TNS median: 3(2-3).



Şekil 3.18.Cis+400 mg/kg (H&E I(x20), J(x40))

Tablo 3.2’de böbrek dokuların tübül nekroz skor aralıkları ve Tablo 3.3’de TNS sonuçları verildi.

Tablo 3.2. Tübüler Nekroz Skor (TNS) metodu

Proksimal tübülün fırça kenar yapısının bozulması		Lümende enkaz birikimi		Tübüler epitel hücreleri arasında bağlantı kaybı	
Skor	Yüzde(%)	0	Hasar yok	0	Hasar yok
0	Hasar yok	1	$\leq 10\%$	1	$\leq 10\%$
1	$\leq 10\%$	2	10-25%	2	10-25%
2	10-25%	3	26-75%	3	26-75%
3	26-75%	4	$\geq 75\%$	4	$\geq 75\%$
4	$\geq 75\%$				

Tablo 3.3. TNS sonuçları (ortalama (25%-75% interquartile alan)

Gruplar	Fırça sınırı hasar skoru	Luminal Debris birikim skoru	Tübüler epitel hücrelerinin kayıp skoru	TNS
Kontrol	0(0-1)	0(0-0)	0(0-0)	1(0-1)
Karadut	0(0-1) ^d	0(0-1) ^d	0(0-1) ^d	1(1-1) ^d
Cisplatin (Cis)	3(3-3) ^a	2(2-2) ^a	3(3-3) ^{a,d}	8(7-8) ^a
Cis+200mg dut	1(1-2) ^{b,d}	1(1-1) ^e	1(1-2) ^{a,d}	3(3-5) ^{a,d}
Cis+400mg dut	1(1-1) ^{c,d}	1(1-1) ^d	1(1-1) ^d	3(2-3) ^{f,d}

^a $p=0.000$ Kontrol grubuna göre, ^b $p=0.015$ Kontrol grubuna göre, ^c $p=0.041$ Kontrol grubuna göre, ^d $p=0.000$ Cis grubuna göre, ^e $p=0.013$ Cis grubuna göre, ^f $p=0.001$ kontrol grubuna göre, Kruskal Wallis/Tamhnae T2 test.

Böbrek histolojisine bakıldığında kontrol grubuna ait böbrek dokusunun kesitlerini ışık mikroskobu altında incelendiğinde normal yapıdaki glomerul, proksimal ve distal tübül epitel hücreleri normal yapıda olduğunu gözlemledi (şekil 3.14 a-b; Tablo 3.3; TNS orta değeri: 1(0-1). Özellikle proksimal tübülerde fırçası kenar yapılarının belirgin olması dikkat çekiciydi. Benzer olarak yalnızca karadut uygulama grubuna ait kesitler normal yapıdaki glomerul, proksimal ve distal tübüller mevcuttu (şekil 3.15 c-d; Tablo 3.3;

TNS orta değeri: 1(1-1). Bunun aksine, cisplatin uygulama grubunda ise proksimal ve distal tübül epiteliyal hücrelerinde yaygın vakuolizasyonlar ve kayıplar mevcuttu. Bununla beraber tübül epiteliyal hücrelerinde kayıpları ile eşlik eden tübüler debris birikimleri görüldü. Proksimal tübüllerde fırçamsı kenar yapılarında yaygın bozulmalar izlendi (şekil 3.16 e-f; Tablo 3.3; TNS orta değeri: 8(7-8). Cisplatin+200 mg/kg ve cisplatin+400 mg/kg tedavi gruplarında ise proksimal ve distal epitel hücrelerinin kayıplarında ve debris birikimlerinde azalma olduğu saptandı (şekil 3.17 g-h; Tablo 3.3; TNS orta değeri: 3(3-5). Özellikle cisplatin+400 mg/kg tedavi gruplarında başta proksimal tübülerin fırçamsı kenar yapıları olmak üzere tipik tübül epitel hücreleri gözlemlendi (şekil 3.18 i-j; Tablo 3.3; TNS orta değeri: 3(2-3).

4.TARTIŞMA

Cisplatin [cis-diaminodichloroplatin (II)] başta malingnant (serviks, over, testis, baş, boyun, akciğer ve göğüs) kanser türlerine karşı kemoterapi tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü bir anti-tümör ilaçtır (Goldstein vd., 1983). Etkisini DNA' ya bağlanarak hücrenin transkripsiyon ve replikasyon mekanizmasını bozmak suretiyle gösterir. DNA hasarının düzeltilememesi sonucunda hücre apoptoza uğrar. Gerek malingn gerekse cisplatin uygulanmış dokularda çeşitli biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler meydana geldiği görülmüştür. SOD, CAT, TNF- α , GSH, GSPx, MDA ve Kaspaz gibi hücre- doku hasarının derecesini belirtiren markırlar ile hücre kaybı, belirli dokularda hücre boyutta morfolojik değişiklikler lökosit infiltrasyonu, hücreler arası bağlantı kaybı, nekroz gibi histopatolojik göstergeler bu değişiklikleri göstermek için yoğun biçimde kullanılmaktadır.

Cisplatinin tümör dokusunun yanında sağlıklı dokular üzerinde de yıkıcı etkileri olduğu bilinmektedir. Başta nefrotoksisite olmak üzere ototoksisite, nörotoksisite, mukozit, ülseratif lezyonlar, myelotoksisite, hepatotoksisite, kardiyomiyopati, tat duyusunda kayıp ve kısmi immün yetmezlik gibi sendromlar cisplatinin çeşitli yan etkilerine örnek olarak verilebilir (Arany vd., 2003;Cooley vd.,1994; Boulikas vd., 2003). Her ne kadar cisplatin ve metabolitleri büyük ölçüde böbreklerden atılsa da bu ajanın böbrekler üzerindeki etkisi tedavinin sınırlamasına yol açmaktadır. Nefrotoksisite deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda cisplatin tedavisi sırasında ortaya çıkan ilk yan etkilerden biri olarak görülmüştür (Nematbakhsh vd., 2012). Cisplatinin böbrekler üzerinde lipid peroksidasyonu, serbest radikal üretimini uyarmak ve renal tübüler yapıyı değiştirmek suretiyle böbrek fizyolojisine ve yapısına zarar verdiği, tübüler apoptoz ve inflamatuvar sinyalizasyonu artırdığı belirtilmektedir (Hassan vd., 2012; An vd., 2011). Cisplatin uygulanan deney hayvanlarında böbrekte hidrojen peroksit, superoksit anyonu ve hidroksil radikallerinde artış görülmüştür. Oluşan bu serbest radikaller hücre membranı lipidlerinin peroksidasyonuna neden olmakta ve proteinlerin yapısını bozarak hücre hasar oluşturmaktadır (Yılmaz vd., 2004; Shino vd., 2003).

Mannitol ve hipertonik kullanımına bağlı hidrasyon ve diürez tedavi yöntemleri de dahil olmak üzere tek başına veya başka ajanlarla kombine olarak kullanılabilen cisplatinin böbrekler üzerindeki bu olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak kesin bir tedavi yöntemi henüz bulunmamıştır. Bununla beraber cisplatinin reaktif oksijen türlerini (ROS) ve lipid peroksidasyonunu arttırıcı etkisi dikkate alınarak bu yan etkilerin giderilmesine yönelik,

başta tıbbi bitkiler olmak üzere antioksidanlarca zengin çeşitli ajanların (E ve C vitamini, quercetin, likopen, soya fasulyesi, susam, sitron, yeşil çay, lif ekstraktları, buğday, taurinin, aksantin, ferulik asit, kurkumin, N-asetisistein, nar, propolis vb) kullanıldığı çalışmalara rastlanmaktadır (Atessahin vd., 2005; Ueki vd., 2013; Bami vd., 2017). Bami ve arkadaşlarının (2017) ratlarda cisplatin kaynaklı nefrotoksisite üzerine ferulik asitin etkisini tespiti yönelik yaptığı bir çalışmada, ferulik asitin antioksidan durumu artırarak oksidatif hasarı anlamlı derecede engellediği gösterilmiştir. Aynı şekilde Ma ve arkadaşları (2017) Amerikan ginseng berry ekstraktlarının farelerde oluşturulan cisplatin kaynaklı nefrotoksisiteyi ROS'un aracılık ettiği MAPK ve NF- κ B sinyal yolunu baskılamak sureti ile azalttığını göstermişlerdir.

Yirminin üzerinde türe sahip olan dutgiller ailesi (moraceae) içinde koyu renkli olanların, özellikle karadutun daha yüksek antioksidan-antiradikal aktiviteye sahip olduğu ifade edilmektedir (Turan vd., 2017). Bununla beraber beyaz dutta da dahil olmak üzere dutların fenolik içerik ve buna bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin, dutun yetiştiği coğrafi bölgeye, genetik farklılıklara, çevre şartlarına ve olgunluk aşamalarına göre değişebilmektedir. Natic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Sırbistan'ın Voyvodina bölgesinden elde edilen beyaz dut ekstraktlarının antioksidan-antiradikal özelliklerinin diğer ülkelerde yapılan benzer çalışmalardaki verilere göre daha yüksek olduğu görülmüş ve bu durum farklı fenolik içeriğe bağlanmıştır (Natic vd., 2015).

Polifenolik bileşikçe zengin bitkisel ürünlerin (yaprak, kök, meyve gibi) toplam fenolik içeriği ve buna bağlı olarak antioksidan özellikleri aynı zamanda ekstraksiyon yöntemlerine göre de değişkenlik gösterebilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda en iyi antioksidan kapasiteyi veren ekstrakt çeşidini belirlemek için su, metanol ve etanol çözücülerini kullanarak DPPH, FRAP, toplam fenolik içerik ve ABTS analiz yöntemleri ile antioksidan kapasite tayini yapıldı. Toplam fenolik içerik sonuçları sulu, metanol ve etanolik ekstraktları için sırasıyla 834.3, 1066.8 ve 724.2 mg GAE/100g olarak bulundu. Toplam fenolik içerik açısından en iyi sonucu metanol ekstraktın verdiği görüldü ($p=0,05$). Ekstrakt yöntemlerinde çözücü polaritesi arttıkça ekstrakt verimi de artmaktadır. Kamiloğlu ve arkadaşları (2013) metanolik karadut ekstraktının toplam fenolik içeriğini 976.4 mg GAE/100 g kuru ağırlık olarak bulurken başka bir çalışmada ise karadutun polifenolik içeriği 1033mg GAE/100g kuru ağırlık olarak bulunmuştur (Tomas vd., 2014).

Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızdaki kurutulmuş karadutun metanolik ekstraktının daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü. Ekstraktların antioksidan özelliklerini belirlemek için kullanılan bir diğer analiz yöntemi olan Fe^{3+} iyonunu indirgeme gücü (FRAP) analizinde de anlamlı bir fark olmamakla birlikte metanolik ekstraktın etanolik ve sulu ekstrakta göre daha yüksek değere sahip olduğu görüldü (sırasıyla 14874.7, 14806.7 ve 14298.3 $FeSO_4/100g$) . Kamiloğlu ve arkadaşları FRAP sonucunu 1016.2 mg /100 g kuru ağırlık olarak tespit ederken, Tomas ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada FRAP değeri 911 TE mg/100g karadut kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Çalışmamızda DPPH analiz sonuçlarına bakıldığında ise su 733,3, metanol 760,9 ve etanolik ekstraktda 757,4 mg TE./100g olarak bulundu. Kamiloğlu ve arkadaşlarının (2013) yukarıda belirtilen çalışmada DPPH sonucu 580 mg TE/100 g kuru ağırlık olarak bulmuştur. 2010 yapılan başka çalışmada ise DPPH sonuçları 144 mg Trolox/100g -147 mg Trolox/100g kuru ağırlık olarak bulunmuştur (Bilenler., 2010). Yine Tomas ve arkadaşlarının yukarıda bahsedilen aynı çalışmasında DPPH sonuçlarına baktığımızda karadut 609 TE mg/100g kuru ağırlık olarak bulmuşlar (Tomas vd., 2014). ABTS sonuçları ise su 1988, metanol 2023, etanol 2017 mg A.A./100g olarak görüldü. ABTS sonuçlarımızda bulunan değerlerin Kamiloğlu (2686.3 mg/100g) ve Tomas (2575 mg/100g)'ın yaptıkları çalışmalarda bulunan değerlere göre biraz düşük olduğu görüldü.

Cisplatin nefrotoksitesisi üzerinde çeşitli ajanların etkilerini görebilmek için cisplatinin dozuna, bu ajanların konsantrasyonları ve sakrifiye süreleri arasındaki ilişkiye dikkat edilmelidir. Cisplatinin ratlar üzerinde uygulanan doz konsantrasyonların genel olarak 5-20 mg/kg arasında değişmektedir. Doz artıkcı ratların-farelerin deney başından sakrifiye edilmelerine kadar olan süre kısalmaktadır.

Cisplatinin hayvan modellerinde vücuda veriliş biçimi doz açısından önemlidir. Literatürde ratlara cisplatinin veriliş biçimi ağırlık olarak intraperitoneal (İP) daha az olarak ise intravenöz (i.v.) ve cilt altı (subkutan) şeklindedir (Perse vd., 2018). Cisplatinin 5-10 mg/kg aralığındaki dozlarının ratlarda akut böbrek hasarı oluşturmak için yeterli olduğu görülmektedir. Genel olarak bu doz aralığında böbrek fırçamsı kenarlarında, tübüler hücrelerde dejenerasyon, GFR kayıp, tübüler lümen, nekrotik hücre görünümü, artmış sitoplazmik veziküller, BUN-kreatin düzeyinde artış, lipid peroksidasyona bağlı MDA artışı, mitokondriyal disfonksiyon, SOD, CAT, GSH gibi antioksidan enzimlerde azalma hücre hasarına bağlı caspaz-3 aktivitesinde artış, inflamantuar olaylara bağlı olarak TNF- α

düzeyinde artış gibi histolojik ve biyokimyasal değişikliklere 3-7 gün içinde rastlanmaktadır (Santos vd., 2007; Perse vd., 2018; Sabuncuoğlu vd., 2010).

Kreatinin ve kan üre azotu (BUN) böbrek fonksiyon testlerinde sıklıkla kullanılan parametrelerdir. Böbrekten reabsorbe olmayan ve böbrek yoluyla atılan kreatinin plazmadaki kreatinle ilişkili olması ve plazma kreatin düzeyinin artması böbreklerde bir sorun olduğunu gösterir. Protein metabolizması yıkım ürün olan amonyağın, karaciğerde karmaşık bazı reaksiyonlar sonunda daha az zararlı üreye (BUN) çevrilerek böbrekten atılım söz konusudur. Dolayısıyla artmış BUN düzeyleri dekaraciğer ve böbrek fonksiyonların bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Salazar, 2014; Mert 1996).

Santos ve arkadaşlarının (2007) yaptığı çalışmada ratlara 10mg/kg cisplatin dozu uygulanmış, 72 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilmiş ve nefrotoksisite ile ilgili çeşitli parametreler incelenmiştir. Burada BUN ve kreatinin düzeylerinde artış, mitokondriyal disfonksiyon NADPH ve GSH gibi antioksidan sistemlerinde enzim aktivitelerinde azalma hücre ölümü ile alakalı caspaz-3 aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. Bir başka çalışmada Cisplatin (5mg/kg) ile tedavi edilen hayvanlarda renal glutatyon peroksidaz aktivesinde azalma, lipid peroksidasyonunda ve serum kreatinin seviyelerinde anlamlı bir artış ($P < 0.05$) gözlemiştir (Antunes vd., 2001). Akça ve arkadaşları (2018) ise cisplatin kaynaklı nefrotoksisitede böbrek doku TAS seviyesinin düştüğünü, TOS seviyesinin ise arttığını göstermiştir. 16 mg/kg üzerindeki cisplatin dozunun öldürücü olduğu ve genel olarak ratların üçüncü günden itibaren öldüğü görülmektedir. Bu nedenle yüksek doz çalışmalarda üçüncü günü geçmemesi tavsiye edilmektedir. Çalışmamızda ağırlıklı olarak tercih edilen 7.5 mg/kg cisplatin dozu uygulandı ve yukarıda bahsedilen cisplatin nefrotoksisitesinin etkileri görüldü. Özetle cisplatin grubunda antioksidan enzim aktivitelerinde düşüş, MDA, BUN ve kreatin düzeylerinde artış, TAS'da düşüş TOS'da artışı caspaz- 3 aktivitesinde artış ve histopatolojik olarak bulgulara belirgin bir bozulma tespit edildi.

Cisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin yan etkilerini giderilmesine - azaltılmasına yönelik çeşitli antioksidan etken maddelerin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin bu etken maddelerden biri olan ve karadutun da içeriğinde bulunan ferulik asit ile ilgili çalışmada Bami ve arkadaşları (2017) ferulik asidin cisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı etkisine bakmış ve cisplatin (10 mg/kg) uygulanan grupta BUN, kreatinin, MDA ve TOS düzeylerinin yüksek olduğu gözlenmiş ve histolojik parametrelerde anormal böbrek morfolojisi saptamıştır. Tüm parametreler açısından ferulik asit+cisplatin grubunun cisplatin

grubuna göre anlamlı düzelme gösterdiği tespit edilmiştir. Cisplatinin oksidatif stresle alakalı nefrotoksisiteye neden olduğunu gösteren başka çalışmada ise Çetin ve arkadaşları (2006), tek doz 10 mg/kg cisplatin uygulanan rat grubunda antioksidan enzimlerden olan GSH-PX ve CAT enzimlerinin renal aktivitelerinde bir düşüş gözlemlenmiş ve bu bulgular histopatolojik olarak desteklenmiştir. Ueki ve arkadaşları (2013)'nın yaptığı bir çalışmada ise 72 saat 20 mg/kg cisplatin uygulanan rat grubu ile etken madde kurkuminin (zerdaçal) kullanıldığı cisplatin + kurkumin (100mg/kg) grupları karşılaştırıldığında böbrek dokularında ve serumda TNF- α , BUN ve kreatinin düzeylerinin azaldığı histopatolojik olarak ise tübüler nekrozun gerilediği böbrek fonksiyon bozukluğunun ise azaldığı bildirilmiştir. Badary ve arkadaşları (2015) cisplatin (7 mg / kg) ve cisplatin + Nar (20 mg / kg) gruplarının karşılaştırıldığında cisplatin-Nar kombine grubunda, cisplatin grubuna göre antioksidan enzimler SOD ve CAT'ın yükseldiğini, serum üre ve kreatinin konsantrasyonlarında önemli azalma meydana geldiğini göstermiştir. Başka bir çalışmada cisplatin 7 mg/kg grubu ile cisplatin + vanilik asit (50 mg/kg düşük doz) ve cisplatin + vanilik asit (100 mg/kg yüksek doz) grupları karşılaştırılmış vanilik asit gruplarında antioksidan enzimlerden böbrek dokusunda SOD ve CAT aktivitelerinin arttığı MDA, BUN ve ürenin azaldığı gösterilmiştir (Sindhu vd., 2015). Fareler üzerinde vitaminlerin (C ve E) cisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı proktektif etkisini görmeye yönelik yapılan bir çalışmada ise vitamin (C veya E; 250 mg/kg - 500 mg/kg) + cisplatin (10mg/kg ip) gruplarının cisplatin grubuna göre üre ve kreatinin konsantrasyonlarında düşüş, sadece 500 mg/kg uygulanan vitamin+ cisplatin gruplarında ise SOD ve CAT düzeylerinde belirgin bir artış olduğu belirtilmiştir (Ajith vd., 2007). E vitamininin ratlarda cisplatinin renal histopatolojisi üzerine etkilere yönelik başka çalışmada ise cisplatin nefrotoksisitesinde sıklıkla görülen kortikomedüller tübülerde genişleme, Bowman aralığında genişleme, fırçamsı kenarlarda deformasyon ve mitokondriyal fonksiyon bozuklukları bulgularının gerilediği görülmüştür (Kanter vd., 2007).

Cisplatin ile ilgili yukarıda bahsedilen çalışmalarda cisplatinin böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu MDA, inflammatuar markırı TNF- α ve apoptotik belirteci Kaspaz-3 antioksidan enzimleri SOD ve CAT aktiviteleri, serum ve dokuda TAS, TOS düzeylerinde oksidan/antioksidan parametrelerde anlamlı değişikliklere yol açtığı ve antioksidanların bu değişikliklerin nefrotoksisitede oluşturduğu hasarı anlamlı şekilde düzeltildiği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamız kontrol, karadut, cisplatin gruplarının yanı sıra dozun etkisini görebilmek için, cisplatin+200 mg/kg karadut ve cisplatin+400 mg/kg karadut gruplarından oluşturuldu. Çalışmamızda cisplatin verdiğimiz gruplarda kontrol grubuna göre serumda BUN ve kreatin düzeyleri literatürle uyumlu olarak anlamlı bir şekilde yükseldi. Karadut + cisplatin gruplarında cisplatin grubuna göre bu parametrelerin değerlerinde bir azalma meydana gelmiş, bu azalma BUN için cisplatin+200 mg/kg grubunda istatistiksel olarak anlamlı iken kreatinin düzeyinde ise anlamlı bir fark görülmedi. Serumda ve dokuda TAS seviyesi cisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken TOS seviyesi artmıştır. Yine cisplatin+200 mg/kg ve cisplatin+400 mg/kg karadut gruplarında TAS seviyesi anlamlı olarak artarken TOS seviyesinde anlamlı olarak azalma görüldü. Bu durum, karadut verdiğimiz gruplarda antioksidan kapasitenin arttığını göstermektedir. Lipid peroksidasyon belirteci olan MDA'nın ise cisplatin grubunda literatürle uyumlu olarak kontrol ve antioksidan etken madde içeren gruba göre (bizde karadut) anlamlı olarak arttığı, ayrıca cisplatin + düşük ve yüksek doz karadut gruplarında ise cisplatin grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Antioksidan enzimlerinden SOD ve CAT doku aktivitelerine bakıldığında cisplatin grubunda diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde azalma cisplatin+karadut gruplarında ise cisplatin grubuna göre anlamlı bir yükselme tespit edildi. Burada karadut grubunun kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber daha yüksek olması dikkat çekicidir. Nitekim karadutun bu etkisi düşük ve yüksek doz karadut içeren cisplatin gruplarında da anlamlı yükseliş olarak kendini göstermiştir. İnflamantuar belirteci olan TNF- α doku düzeylerinin cisplatin grubunda anlamlı şekilde arttığı, cisplatin + karadut gruplarında ise anlamlı derecede azaldığı görüldü. SOD, CAT ve TNF- α düzeylerindeki bu anlamlı değişkenlik karadutun yüksek antioksidan ve antiinflamatuvar kapasitesinin göstergesi olarak kabul edildi. Apoptik belirteç olan kaspaz-3'ün doku düzeyinde ise cisplatin grubunda kontrol grubuna göre artış gösterirken Cisplatin + düşük ve yüksek doz karadut gruplarında azalmıştır. Bu azalma cisplatin+400 mg/kg karadut grubunda istatistiksel olarak anlamlıdır. Biyokimyasal analizlerde kaspaz-3, CAT ve TAS analizleri değerlendirildiğinde Cisplatin+200 mg/kg karadut gruplarında cisplatin grubuna göre farklılık görülmüş olmakla beraber bu farklılık cisplatin+400 mg/kg karadut gruplarındaki gibi anlamlı değildi.

Böbrek histolojisine bakıldığında cisplatin grubunda tübül hücrelerinde, fırçamsı kenar yapılarının morfolojilerinde bozulma ve kayıplar, debris birikimleri şeklinde öne çıkan

patolojik bulguların cisplatin + düşük ve yüksek doz karadut gruplarında belirgin düzeltilmeler gösterdiği tespit edilmiş, özellikle cisplatin+400 mg/kg yüksek doz karadut grubunda düşük doza göre daha anlamlı bulgular görülmüştür. Kısaca çalışmamızda cisplatinin böbreklerde hasar oluşturduğu görülmüş, biyokimyasal ve histopatolojik analizler sonunda, 400 mg/kg dozun 200 mg/kg doza göre nefrotoksisiteye karşı protektif etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Karadutun histopatolojik sonuçlar açısından nefroprotektif etkisini gösteren bulguların bu alanda yapılan benzer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir (Ojha vd., 2016; Zhi-na vd, 2017) .

ROS'in gibi oksidan sistemleri hasar verici etkilerini gidermek üzere polifenolik bileşikler açısından zengin çeşitli bitkisel ürünlerinde kullanıldığı çalışmada rastlanmıştır (Zhi-na vd, 2017; Ganapathy vd, 2015; Turan vd, 2017). Fenolik asitler (kafeik asit, fenolik asit, gallik asit...) ve flavonoidler (naringenin, quersetin, siyanidin, apigenin, kateşin...) gibi fenolik bileşiklerin serbest radikallerin oluşumunu ve zararlı etkilerini engelleyici ve/veya azaltıcı özellikleri tespit edilmiştir. Kanser oluşumunun da başlıca sebeplerinden olan DNA üzerinde ROS etkilerini engellenmesinin hücre içerisine serbest radikallerin alınımının inhibe edilmesinin bu fitokimyasal bileşikler sayesinde gerçekleştirildiği ifade edilmektedir (Vasatha vd., 2014; Turan vd, 2017). Her ne kadar bu fitokimyasalların başlıca etkilerinin endojen antioksidan enzim sistemlerini arttırmak yoluyla olduğu belirtilse de aromatik yapıdaki bu bileşiklerin serbest radikalleri yakalama ve divalent (2 değerlikli) katyonların şelasyonu ve stabilizasyonu yoluyla da korucu etkilerinin olduğu bilinmektedir (Nijveldt vd., 2001). Flavonoidler sadece antioksidan enzimleri değil proteinkinaz C, ksantin oksidaz, myeloperoksidaz, protein tirozin kinaz gibi farklı özellikteki enzimlerin aktivitelerini de modifiye etme özelliğine sahiptir (Prakash vd., 2009). Bununla beraber, quercetin, epikateşin gibi fenolik bileşiklerin, inflamasyonda ve radikal oluşumunda etkin olduğu düşünülen nükleer faktör kappa B (NF- κ B), indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) gibi faktörlerin inhibisyonlarını gerçekleştirdiği belirtilmiştir (Rupasinghe vd, 2014). Apoptotik yolun önemli bir gösterge proteini olan kaspaz-3, ekstremsel ve intrinsik aktivasyon mekanizmasında etkin hale gelmektedir. Böbrek tübül hücrelerinde görülen kaybın bu apoptotik etki ile meydana gelmesi muhtemeldir (Tsuruya vd., 2003).

Karadutun geleneksel tedavide kullanımı ile ilgili oldukça eski bir geçmişi bulunmaktadır. Karadutun polifenolik kompozisyon analizlerinde klorajenik asit, gallik asit,

sinapik asit, neoklorojenik asit, ferulik asit, vanilik asit, kafeik asit, rutin, çeşitli quersetin türevleri, siyanid- 3-O glikozik, gibi çeşitli polifenolikler açısında zengin olduğu aynı zamanda E, D, C gibi antioksidan vitaminler içerdii tespit edilmiştir (Kamiloğu vd., 2012).

Sonuç olarak çalışmamızda karadutun farklı dozlarının cisplatin kaynaklı nefrotoksisiteyi ve buna bağlı olarak oluşan hasarı çeşitli antioksidan enzimler üzerinden inhibe ettiği, yüksek doz karadut + cisplatin grubunun daha etkili olduğu görüldü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Cisplatin ile böbrek hasarı oluşturulan ratlarda karadutun tedavi edici etkinliğinin biyokimyasal ve histolojik yöntemlerle incelendiği bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Karadutun antioksidan kapasitenin belirlenmesinde uygulanan testlerde kullanılan farklı ekstraktlar (metanol, etanol ve su) içerisinde metanolik ekstraktın en yüksek kapasitrye sahip olduğu görüldü ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarda metanol ekstraktı kullanıldı.
2. 7,5 mg/kg tek doz Cisplatin uygulamasının ratlarda akut böbrek hasarı oluşturmak için yeterli olduğu görüldü.
3. Hem Cis+200 mg/kg karadut hemde Cis+400 mg/kg karadut gruplarında serum BUN, kreatinin ve TOS düzeylerinde cisplatin grubuna göre azalma, TAS'da ise artış görüldü. Böbrek dokusunda ise cisplatin grubuna göre yüksek doz ve düşük doz karadut gruplarında TAS, CAT ve SOD düzeylerinde artış, MDA ve TOS düzeylerinde azalma gözlemlendi. İnflamantuar (TNF- α) ve apoptotik (Kaspaz-3) markırları cisplatin grubunda (kaspaz-3 için düşük doz karadut grubu hariç) tüm gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu.
4. Histopatolojik değerlendirmede tübüler nekroz, renal korteksteki nekrotik alanlar ve vasküler konjesyon oranının karadut gruplarında cisplatin grubuna göre iyileşme gösterdiği tespit edildi.
5. Histopatolojik ve biyokimyasal analizlerin çoğunda yüksek doz karadut grubun düşük doz karadut grubuna göre dokulardaki hasarı daha çok iyileştirdiği gözlemlendi.
6. Biyokimyasal sonuçlar histopatolojik verilerle desteklenmektedir.
7. Nefrotoksisitede üzerinde karadut meyvesinin taze çalışılması önerilir.
8. Hastalara cisplatin tedavisi sırasında belirli oranda karadutun tüketilmesi önerilebilir.
9. Karadutun bir antinefrotoksik veya protektif ilaç kullanımı tasarlanabilir
10. Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen verilere göre, geniş kullanıma sahip bir antineoplastik ilaç olan cisplatin ile birlikte karadut kullanıldığında cisplatinin nefrotoksik etkisine bağlı olarak böbreklerde patolojik olarak meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin şiddetinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar literatürde ki bilgilerle uyum sağlamaktadır

6. KAYNAKLAR

- Abdelrahman, A.M., Salam S., Mahruqi, A.S., husseni, I.S., Mansour, M.A. ve Ali, B.H., 2010. Nacetylcysteine improves renal hemodynamics in rats with cisplatin-induced nephrotoxicity, J. Appl. Toxicol, 30(1), 15-21.
- Aebi, H.E., 1987. Catalase, Methods of Enzymatics Analysis, In: Bergmeyer, H.U. (ed), Verlag Chemie, Weinhem, 273-286p.
- Ahmed, M. ve Saeed, F., 2013. Evaluation of Insecticidal and Antioxidant activity of selected Medicinal plants, Journal of Pharmacognosy & Phytochemistry, 2(3), 153-158.
- Aitken, R.J. ve Roman, S.D., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 1, 15-24.
- Ajith, T.A., Usha, S. ve Nivitha, V., 2007. Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study, Clinica Chimica Acta, 375(1-2), 82-86.
- Akca, G., Eren, H., Tumkaya, L., Mercantepe, T., Horsanali, M.O., Deveci, E. ve Yilmaz, A., 2018. The protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, Biomedicine & Pharmacotherapy, 100, 575-582.
- Akdemir, N., 2004. Kanser Tedavileri ve Hemşirelik Bakımı. In: Birol, L. (ed), İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı, İkinci Baskı: Ankara, 265-306s.
- Alibakhshia, T., Javad, M., Layasadat, K.K., Rashnoe, M. ve Zeidoonib, L., 2018. Protective effects of zingerone on oxidative stress and inflammation in cisplatin-induced rat nephrotoxicity, Biomedicine & Pharmacotherapy, 105, 225–232.
- Antunes, L.M., Darin, J.D. ve Bianchi, N.L., 2001. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats, Pharmacol, 43, 145-150
- Aramwit, P. ve Bang, T., 2010. SrichanaThe properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits Food Research International, 43(4), 1093-1097.
- Arany, I. ve Safirstein, R.L., 2003. Cisplatin nephrotoxicity, Semin Nephrol, 23(5), 460–4.
- Arslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş. ve Yılmaz, B., 2019. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü- Süperoksid dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon peroksidaz (GPx), SDÜ. Tıp. Fak. Derg., 26(3), 362-369.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D. ve Fuhrman, B., 2000. Pomegranate juice consumption reduces

oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice, Am. J. Clin. Nutr., 71, 1062–1076.

Badary, O.A., Abdel-Maksoud, S., Ahmed, W.A. ve Owieda, G.H., 2005. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats, Life Science, 76, 2125-2135.

Baliga, R., Ueda, N., Walker, P.D. ve Shah, S.V., 1999. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure, Drug Metab Rev, 31, 971-997.

Bami, E., Ozakpınar, O.B., Ozdemir-Kumral, Z.N., Köroğlu, K., Ercan, F., Cıraklı, Z., Sekerler, T., Vehbi Izzettina, F., Sancara, M. ve Okuyana, B., 2017. Protective effect of ferulic acid on cisplatin induced nephrotoxicity in rats, Environmental Toxicology and Pharmacology, 54, 105–111.

Benzie, I.F.F. ve Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay, Biochem, 239, 70– 76.

Bhosle, J. ve Hall, G., 2009. Principles of cancer treatment by chemotherapy, Surgery, 4(27), 173- 177.

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

Brillet, G., Deray, G., Jacquiaud, C., Mignot, L., Bunker, D. ve Meillet, D., 1994. Longterm renal effect of cisplatin in man, Am. J. Nephrol, 14(2), 81–4.

Carlos, L. ve Junqueira-Jose, C.R., 1993. Temel Histoloji, Barış kitabevi, Ankara, 72-78s.

Chabner, B.A., Ryan, D.P., Paz-Ares, L., Carbonero, R.G. ve Calabresi, P., 2001. Antineoplastic Agents, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 1,1432-1434.

Chan, K.C., Yang, M.Y., Lin, M.C., Lee, Y.J., Chang, W.C. ve Wang, C.J., 2013. Mulberry leaf extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits and in cultured aortic vascular smooth muscle cells, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(11), 2780–2788.

Chang, T.S., 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors, International Journal of Molecular Sciences, 10 (6), 2440-2475.

Chanjirakul, K., Wang, S.Y., Wang, C.Y. ve Siriphanich, J., 2007. Natural volatile treatments increase free-radical scavenging capacity of *strawberries* and *blackberries*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 87, 1463-1467.

Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Kuo, W.H., Chiang, C.L. ve Hsieh, Y.S., 2006. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an

- inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line, Cancer Letters, 235(2), 248–259.
- Cheung, C.M., Ponnusamy, A. ve Anderton, J.G., 2008. Management of acute renal failure in the elderly patient: A clinician's guide, Drugs and Aging, 25(6), 455– 76.
- Chu, E. ve Sartorelli, A.C., 2014. Kanser Kemoterapisi (Çev. Zeliha Yazıcı), Temel ve Klinik Farmakoloji, Katzung B.G, Masters S.B, Trevor A.J (eds), Lange, Edition, 12s.
- Cooley, M.E., Davis, L.E., DeStefano, M. ve Abrahm, J., 1994. Cisplatin: a clinical review, Part Current uses of cisplatin and administration guidelines, Cancer Nursing, 17, 173-184.
- Cullen, K.J., Yang, Z., Schumaker, L. ve Guo, Z., 2007. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer, J Bioenerg Biomembr, 39(1), 43–50.
- Çetin, R., Devrim, E., Kılıçoğlu, B., Avcı, A., Çandır, Ö. ve Durak, İ., 2006. Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods, Journal of Applied Toxicology, 26(1), 42-46.
- Dalay, N., 2006. Hücre: Moleküler Yaklaşım, Sakızlı, M. ve Atabey, N. (eds), 3. Baskı. İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 631-671s.
- Dasari, S. ve Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, Eur. J. Pharmacol, 740, 364–378.
- DosSantos, N.A.G., Rodrigues, M.A.C., Martins, N.M. ve DosSantos, A.C., 2012. Cisplatininduced nephrotoxicity and targets of nephroprotection, An update Arch Toxicol, 86(8), 1233–50.
- Sánchez-Salcedo, E.M., Mena, P., Garcí, C., Viguera, J.J., Martínez, N.M. ve Hernández, F., 2015. Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties, Journal of Functional Foods, 12, 399-408.
- Elmacı, Y. ve Altuğ, T., 2002. Flavour Evaluation of Three Black Mulberry (*Morus nigra*) Cultivars Using Gc/Ms, Chemical And Sensory Data, Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 632-635.
- Ercisli, S. ve Orhan, E., 2007. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits, Food Chemistry, 103(4), 1380-1384.

- Eren, E., Ata, A. ve Arıcan, A., 2012. (Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaçlar Ve Nefrotoksisite) Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı, Deü Tıp Fakültesi Dergisi, 26(3), 229 – 235.
- Fadıllıoğlu, Ç. ve Soğukpınar, N., 1996. Kanserli hastada hemşirelik bakımı, Ege Üniversitesi hemşirelik yüksekokulu yayınları, N0:8 İzmir_yayın_basımevi, 12-13.
- Florea, A.M. ve Büsselberg, D., 2011. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, Cancers, 3, 1351–1371.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Michels, J., Brenner, C., Szabadkai, G. ve Harel-Bellan, A., 2014. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future, Cell Death Dis, 5(5), 1257.
- Ganapathy, S., Emayavaramban, N. ve Ramalingam, S., 2015. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: A biochemical and molecular study, Environmental toxicology and pharmacology, 39 392–404.
- Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I. ve Trakhtenberg, S., 2000. Mechanism of cardioprotective effect and the choice of alcoholic beverage, American Journal of Cardiology, 85(2), 280-281.
- Grajek, K., Wawro, A. ve Kokocha, D., 2015. Bioactivity of *Morus alba* L. extracts, IJPSR, 6, 3110–3122.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Çipak, A., Eckl, P.M. ve Huc, L., 2010. Lipid peroksidasyon ürünlerinin kimyası ve biyokimyası, Free Radic Res, 44, 1098 – 1124.
- Gullans, S.R. ve Mande, L.J., 2000. Coupling of energy transport in proximal and distal nephron, Physiology and Pathophysiology, 3(1), 445–482.
- Gündoğdu, F., 2014. Tedavi Yaklaşımları: Kemoterapide Tedavinin Planlanması ve Uygulanması. Can, G. (ed), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 191-204s.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view, Nutrition Reviews, 52(8), 253-265.
- Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, New York, 10-121p.
- Hanigan, M.H. ve Devarajan, P., 2003. Cisplatin nephrotoxicity, Molecular Mechanisms Cancer, 1, 47–61.
- Hartmann, J.T. ve Lipp, H.P., 2003. Toxicity of platinum compounds, Expert Opin Pharmacother, 4(6), 889–901.

- Hill, J.M. ve Speer, R.J., 1982. Organo-platinum complexes as antitumor agents (Review), Anticancer Research, 2, 173–85.
- Hou, Y.Z., Yang, J., Zhao, G.R. ve Yuan, Y.J., 2004. Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II, Eur. J. Pharmacol, 499 (1–2), 85–90.
- Hye, K.M.A., Abdul, S.M., Abdullah, N.A. ve Johns, E.J., 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity causes altered renal hemodynamics in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats: Role of augmented renal alpha-adrenergic responsiveness, Exp Toxicol Pathol, 59(3–4), 253–60.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J. ve Kelley, R., 1998. Temel Histoloji, Aytekin, Y. (Ed), Barış Kitabevi, Ankara, 359s.
- Kahraman, A., Serteser, M. ve Köken, T., 2002. Flavonoidler, Kocatepe Tıp Dergisi, 3, 01-08.
- Kanter, M., Tarladaçalışır, Y.T. ve Uygun, M., 2007. Cisplatin nefrotoksitesinde E vitamininin koruyucu etkileri: Işık ve elektron mikroskopik çalışma, Tıp Araştırmaları Dergisi, 5(3), 83-90.
- Karabulut, H. ve Gülay, M.Ş., 2016. Antioksidanlar, MAE. Vet. Fak. Dergi, 1 (1), 12-13.
- Kasangana, P.B., Haddad, P.S. ve Stevanovic, T., 2015. Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) Root Bark Extracts, Antioxidants, 4, 410-426.
- Kaur, C. ve Kapoor, H.C., 2001. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health, International Journal of Food Science and Technology, 36, 703-725.
- Kayaalp, S.O., 2000. Tıbbi farmakoloji, Cilt-1. 9. Baskı, Ankara: Hacettepe, 200-215s.
- Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy, Nat.Rev. Cancer, 7, 573-584.
- Khalid, N., Fawad, S.A. ve Ahmed, I., 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice, Pak. J. Bot. 43, 91–96.
- Kinhikar, R.A., Pawa, A.B., Mahantshetty, U., Murthy, V., Dheshpande, D.D. ve Shrivastava, S.K., 2014. Rapid Arc, helical tomotherapy, sliding window intensity modulated radiotherapy and three dimensional conformal radiation for localized prostate cancer: a dosimetric comparison, J Cancer Res Ther, 10(3),575-82.
- Kintzel, P.E., 2001. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management, Drug Safety, 24, 19-38.

- Kostic, D.A., Dimitrijevic, D.S., Mitic, S.S., Mitic, M.N., Stojanovic, G.S. ve Zivanovic, A., 2013. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morus nigra* L. (Moraceae) from Southeast Serbia, Trop. J. Pharm, 12 (1), 105-110.
- Kriz, W. ve Kaissling, B., 2013. Structural Organization of the Mammalian Kidney, Seldin and Geibisch's The Kidney, 12, 595–691.
- Kroning, R., Lichtenstein, A.K. ve Nagami, G.T., 2000. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines, Cancer Chemother Pharmacol, 45,43-9.
- Kuhlmann, M.K., Burkhardt, G. ve Kohler, H., 1997. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application, Nephrol Dial Transplant, 12, 2478-2480.
- Lau, J.K.C. ve Ensing, B., 2010. Hydrolysis of cisplatin—a first-principles metadynamics study, Phys. Chem. Chem .Phys, 12(35), 10348.
- Lebwohl, D. ve Canetta, R., 1998. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update, Eur. J. Cancer 34, 1522-1534.
- Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K. ve Hishida, A., 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats, J.Lab.Clin.Med, 131(6), 518–26.
- Miaskowski, C. ve Buchsel, P., 1999. Oncology Nursing, First edition, Missouri, Mosby Year Book, 1, 12-13.
- Mihara, M. ve Uchiyama, M., 1978. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, Anal Biochem, 86, 271-278.
- Miller, D.M., Buettner, G.R. ve Aust, S.D., 1990. Otoksidasyon reaksiyonlarının katalizörleri olarak geçiş metalleri, Radic Biol Med, 8, 95-108.
- Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G. ve Reeves, W.B., 2010. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity, Toxins, 2(11), 2490–518.
- Natic, M. M., Dabic, D. C., Papetti, A., Fotiric Aksic, M. M., Ognjanov, V., Ljubojevic, M. ve Tesic, Z., 2015. Analysis and characterisation of phytochemicals in mulberry (*Morus alba* L.) fruits grown in Vojvodina, North Serbia, Food d.Chemistry, 171, 128–136.
- Nijveldt, R.J., Nood, E., Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Norren, K. ve Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications, American Journal of Clinical Nutrition, 74(4), 418-425.

- Oh, G.S., Kim, H.J., Shen, A., Lee, Bin., Yang, S.H. ve Shim, H., 2016. Onco-nephrology: Renal toxicities of chemotherapeutic agents, Biomed. (9), 994–1007.
- Ojha, S., Venkataraman, K. A., Mahgou, E., Sadek, B. ve Rajesh, M., 2016. Plant-Derived Agents for Counteracting Cisplatin-Induced Nephrotoxicity, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 6, 1-27.
- Olivero, O.A., Chang, P.K., Lopez-Larrazza, D.M., Semino-Mora, M.C. ve Poirier, M.C., 1997. Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA Mutat Res, Genet Toxicol Environ Mutagen, 391(1–2), 79–86.
- Ozyurt, H., Yildirim, Z., Kotuk, M., Yilmaz, H.R., Yağmurca, M., Iraz, M., Söğüt, S. ve Gergerlioglu, S., 2004. Cisplatininduced acute renal failure is ameliorated by erdosteine in a dose-dependent manner, J. Appl. Toxicol, 24, 269-275.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, Journal of Clinical and Experimental Investigations, 6(3), 331-336.
- Özgen, M., Serçe, S. ve Kaya, C., 2009. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits, Scien Horticul, 119, 275–279.
- Pabla, N. ve Dong, Z., 2008. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies, Kidney international, 73(9), 994-1007.
- Pandey, K.B. ve Rizvi, S.I., 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, Oxid. Med. Cell. Longev, 2(5), 270–278.
- Parker, R.J., Gill, I., Tarone, R., Vionnet, J.A., Grunberg, S. ve Muggia, F.M., 1991. Platinum DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy measured by atomic absorption spectrometry, Carcinogenesis, 12, 1253-1258.
- Pavlopoulou, A. ve Spandidos, D.A., 2015. Michalopoulos I Human cancer databases, Oncol, 33(1), 3-18).
- Pawlowska, A.M., Oleszek, W. ve Braca, A., 2008. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (9), 3377-3380.
- Pawlowska, C., Favre, E., Dubois, C., Baptiste, B., Bubacco, L., Carrupt, P.A. ve Jamet, H., 2013. Unsymmetrical binding modes of the HOPNO inhibitor of tyrosinase: from model complexes to the enzyme, Chemistry, 19 (11), 3655-3664.

- Qian, W., Nishikawa, M., Haque, A.M., Hirose, M., Mashimo, M. ve Sato, E., 2005. Mitochondrial density determines the cellular sensitivity to cisplatin-induced cell death, Am J Physiol Cell Physiol, 289(6), 1466-75.
- Ramesh, H.L., Sivaram, V. ve Yogananda Murthy, V.N., 2014. Antioxidant and medicinal properties of mulberry (Morus sp.), WJPR, 3, 320–343.
- Rathinam, R., Ghosh, S., Neumann, W.L. ve Jamesdaniel, S., 2015. Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4, Cell death Discov, 1, 1–18.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice, E.C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, Free Radicale Biology and Medicine, 26, 1231-1237.
- Rosenberg, B., Van, C.L. ve Krigas, T., 1965. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode, Nature, 205, 698-707.
- Rossof, A.H., Slayton, R.E. ve Perlia, C.P., 1972. Preliminary clinical experience with cisdiamminedichloroplatinum (II), Cancer, 30, 1451-1457.
- Ruphasinghe, H.P.V., Nair, S.V.G. ve Robinson, R.A., 2014. Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions Studies in, Natural Products Chemistry, 42(1), 229-266.
- Rybak, L.P., 2007. Vestibüler ve işitsel Toksisite, Karahatay, S, Yetişer, S. ve Koç, C. (eds), Cummings otolarinoloji baş ve boyun cerrahisi'nde, cilt-4, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, 2933-44s.
- Sakagami, H., Asano, K., Satoh, K., Takahashi, K. ve Kobayashi, M., 2007. Anti-stress, anti-HIV and vitamin Csnergized radical scavenging activity of mulberry juice fractions, In vivo, 21, 499–506.
- Sánchez-González, P.D., López-Hernández, F.J., López-Novoa, J.M. ve Morales, A.I., 2011. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity, Crit. Rev. Toxicol, 41(10), 803–21.
- Santos, N.A.G., Catao, C.S., Martins, N. M., Curti, C., Bianchi, M.L.P. ve Santos, A.C., 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria, Archives of toxicology, 81(7), 495-504.
- Sastry, J. ve Kellie, S.J., 2005. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine, Pediatr Hematol Oncol, 22(5), 441–5.


- Satyanarayana, P.S., Singh, D. ve Chopra, K., 2001. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats, Methods Find Exp Clin Pharmacol, 23(4), 175-81.
- Scheerens, J.C., 2001. Phytochemicals And The Consumers: Factors Affecting Fruit And Vegetable Consumption And The Potential For Increasing Small Fruit In The Diet, Horttech, 11,547-556.
- Sekhon, H.L., Gupta, K.Y. ve Agarwal, A., 2010. Female infertility and antioxidants, Curr Women's Health, 6(2), 84 – 95.
- Shinde, A., Ganu, J. ve Naik, P., 2012. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A review, J Dental Allied Sciences, 1(2), 63-66.
- Shino, Y., Itoh, Y., Kubota, T., Yano, T., Sendo, T. ve Oishi, R., 2003. Role of poly (ADP-ribose) polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells, Free Radic Biol, 35, 966-977.
- Siddik, Z.H., 2003. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, Oncogene, 22(47), 7265-79.
- Simopoulos, A.P. ve Salem, N., 1996. Fatty Acids and Lipids From Cell Biology to Human Disease, Lipids, 1, 31.
- Sindhu, G., Nishanthi, E. ve Sharmila, R., 2015. Nephroprotective effect of vanillic acid against cisplatin induced nephrotoxicity in wistar rats: a biochemical and molecular study, Environ Toxicol Pharmacol, 39(1), 392-404.
- Sonis, S.T., Elting, L.S. ve Keefe, D., 1995. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients, Cancer, 100, 1995-2025.
- Sun, Y., Oberley, L.W. ve Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, Clin Chem, 34, 497.
- Fukai, T. ve Ushio-Fukai, M., 2011. Superoksit dismutazları: redoks sinyalizasyonunda, vasküler fonksiyonda ve hastalıklarda rolü Antioksid Redoks Sinyali,15, 1583–1606.
- Tarladaçalışır, Y.T., Uygun, M., Akpolat, M. ve Uz, Y.H., 2005. E ve C Vitaminlerinin Cisplatin Hepatotoksitesini Önlemedeki Etkilerinin Histolojik Olarak İncelenmesi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 22 (3), 124- 131.
- Tomas, M., Toydemir, G., Boyacioglu, D., Hall, R., Beekwilder, J. ve Capanoglu, E., 2014. The effects of juice processing on black mulberry antioxidants, Food Chemistry, 11, 151.

- Travis, L.B., Fossa, S.D., Sesso, H.D., Frisina, R.D., Herrmann, D.N. ve Beard, C.J., 2014. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity and ototoxicity: New paradigms for translational genomics, Journal of the National Cancer Institute, 1, 4-5.
- Tsuruya, K., Ninomiya, T., Tokumoto, M., Hirakawa, M., Masutani, K., Masutani, K., Taniguchi, M., Fukuda, K., Kanai, H., Kishihara K., Hirakata, H. ve Lida, M., 2003. Direct Involvement Of The Receptor-Mediated Apoptotic Pathways in Cisplatin-Induced Renal Tubular Cell Death, Kidney Int, 63, 72–82.
- Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N.A., Yaman, S.O., Akbulut, K. ve Deger, O., 2017. Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells, Saudi Pharmaceutical Journal, 25(2), 241–248.
- Ueki, M., Ueno, M., Morishita, J. ve Maekawa, N., 2013. Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice, Journal of bioscience and bioengineering, 115(5), 547-551.
- Valko, M., Leibfritz, D. ve Moncola, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, J Biochem Cell Biol, 39, 44-84.
- Wainford, R.D., Weaver, R.J., Stewart, K.N., Brown, P. ve Hawksworth, G.M., 2008. Cisplatin nephrotoxicity is mediated by gamma glutamyltranspeptidase, not via a C-S lyase governed biotransformation pathway, Toxicology, 249(2–3), 184– 93.
- Wang, D. ve Lippard, S.J., 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs, Nat. Rev. Drug. Discov, 4, 307-320.
- Willcox, J.K., Ash, S.L. ve Catignan, G.L., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease, Crit. Rev. Food. Sci. Nutri, 44,275-95.
- Wu, T., Tang, Q., Gao, Z., Yu, Z., Song, H., Zheng, X. ve Chen,W., 2013. *Blue berry* ve mulberry juice prevent obesity development in C57BL/6 mice, PLoS ONE, 8(10), 775-85.
- World Health Organization, 2018. Pricing of cancer Medicines and Its Impacts, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>, accessed 18 November 2019.
- Yaltirik, F., 1982. Morus in Flora of Turkey, In Davis, P.H. (Ed.) Edinburgh, Edinburgh University, 7, 640–642.
- Yang, Z., Schumaker, L.M., Egorin, M.J., Zuhowski, E.G., Quo, Z. ve Cullen, K.J., 2006. Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: Possible role in apoptosis, Clin Cancer Res, 12(19), 5817–25.

- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N. ve Nugent, K., 2007. Cisplatin nephrotoxicity, Am. J. Med. Sci., 334(2), 115-124.
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U. ve Aktaş, A.E., 2007. Karadut (*Morus nigra* L.)'un antikandidal aktivitesi, Türk Mikrobiyol Cem Dergi, 37 (3), 169-173.
- Yildirim, Z., Sogut, S., Odaci, E., Iraz, M., Ozyurt, H., Kotuk, M. ve Akyol, O., 2003. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats, Pharmacol., 47, 149-156.
- Young, I. ve Woodside, J., 2001. Antioxidants in health and disease, J.Clinic.Path., 54,176-86.
- Yuluğ, E., Türedi, S., Karagüzel, E., Kutlu, O., Menteşe, A. ve Alver, A., 2014. The Short Term Effects of Resveratrol on İschemia-Reperfusion İnjury in Rat Testis, J. Pediatr. Surg., 49, 484-489.
- Zhang, J., Wang, L., Xing, Z., Liu, D., Sun, J. ve Li, X., 2018. Status of bi- and multi-nuclear platinum anticancer drug development, Anticancer Agents Med Chem, 10(4), 272–82.
- Zhi-na, M., Zhi, L., Zi, W., Shen, R., Shan, T., Ying-ping, W., Sheng-yuan, X., Chen, C. ve Wei, L., 2017. Supplementation of American ginseng berry extract mitigated cisplatin-evoked nephrotoxicity by suppressing ROS-mediated activation of MAPK and NF-κB signaling pathways, S0278-6915(17), 30584-7.
- Zhu, S., Pabla, N., Tang, C., He, L. ve Dong, Z., 2015. DNA damage response in cisplatininduced nephrotoxicity, Arch Toxicol, 89(12), 2197–205.
- URL-1: <https://www.yeniakit.com.tr/haber/karadutun-oyle-bir-faydasi-var-ki-386755.html>
14 Aralık 2020.

7. EKLER

Ek-1. Hayvan deneyleri için etik kurul onayı

 T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

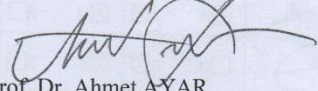
Sayı : 53488718 - 93
Konu: Onay Belgesi

24.01.2019

Sayın; Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi

“Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Hepatotoksisite Nefrotoksisite ve Mukozit Gelişimi
Üzerine Karadut (Morus nigra) Ekstraktının Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi” başlık ve
2018/50 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup; yürürlükteki etik ilke
ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

ASLININ AYNIDIR
Şerafettin YILMAZ
Etik Kurul Sekreteri

61080 – Trabzon / TÜRKİYE
Tel: +90 (462) 377 5403 Faks: +90(462)325 2270 Elektronik Ağ: www.ktu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat
Şerafettin YILMAZ
e posta:
serafettinyilmaz@ktu.edu.tr

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon
	TELEFON	0462- 3775853—0462-3775403
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr

BASVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:	2018 / 50
	ÇALIŞMANIN ADI	“Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Hepatotoksisite Nefrotoksisite ve Mukozit Gelişimi Üzerine Karadut (Morus nigra) Ekstraktının Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi”
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	ÜNVANI/ADI/SOYADI Dr. Öğr. Üyesi Kağan KILINÇ
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÜNVANI/ADI/SOYADI	UZMANLIK ALANI Genetik ve Biyomühendislik
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Doç.Dr.İbrahim TURAN, Doç.Dr.Levent TÜMKAYA, Dr.Öğr.Üyesi Meltem MALKOÇ, Dr.Öğr.Üyesi Arif Burak ÇEKİÇ, Yük.Lis.Öğr.Rahime ALTINTAS

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 6	Tarih: 23.01.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.	
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	35 Adet Sıçan
	BASLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma İle İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYILMAZ Başkan V.	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Ah CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Tamer TÜZÜNER Üye	Pedodonti	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI
Prof.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balıkçılık Teknolojisi	KTÜ Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr.İsmail ABİDİN Üye	Biyofizik	KTÜ Tıp Fakültesi Biyofizik ABD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Dr.Öğr.Üyesi Emel ÇAKIR Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Uzm.Dr.Nuran AYDIN Üye	Nöroloji	Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Bölümü	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI
Ecz.Hazım ÖZTUNA Üye	Eczacı			<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	KATILMADI

ÖZGEÇMİŞ

1995 tarihinde Şanlıurfa'da doğdu. 2009-2013 yılları arasında Şanlıurfa H. Sabiha Özlek Anadolu Lisesi'nde eğitim gördükten sonra 2013-2017 yıllarında Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa bilimleri Fakültesi Genetik Bölümünde üniversite de eğitim gördü. 2017 yılında Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans programına başladı. Orta düzeyde İngilizce bilmektedir.

Proje deneyimi

Ratlarda Cisplatin Kaynaklı Nefrotoksisite ve Hepatotoksisite Üzerine Karadut (*Morus nigra L.*) Ekstraktının Koruyucu Etkisinin İncelenmesi. GÜBAP 2902 Proje No: 19.F5119.02.02 **Araştırmacı**