

Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Renal Toksikitede Selenyum' un Koruyucu Etkisi

Sibel Güneş

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz 2009

Protective Effect of Selenium on Cyclophosphamide-Induced
Renal Toxicity in Rats

Sibel Güneş

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

July 2009

Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Renal Toksikitede Selenyum' un Koruyucu Etkisi

Sibel Güneş

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Adnan Ayhancı

Temmuz 2009

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Sibel Güneş'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Sıçanlarda Siklofosfamid Nedenli Renal Toksikitede Selenyum' un Koruyucu Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Adnan Ayhancı

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Prof. Dr. Ruhi UYAR

Üye: Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

Üye: Prof. Dr. Yavuz KILIÇ

Üye: Prof. Dr. Mehtap KUTLU

Üye: Yrd. Doç. Dr. Adnan AYHANCI

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada sıçanlarda siklofosfamid (CP)' in neden olduğu renal toksisite üzerinde selenyumun (Se) koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amaçlandı. Sprague-Dawley cinsi 84 sıçan her grupta 7 hayvan olacak şekilde 12 gruba bölündü (kontrol, 50 CP, 100 CP, 150 CP, 0.5 Se, 1 Se, 50+0.5 mg/kg CP+Se, 100+0.5 mg/kg CP+Se, 150+0.5 mg/kg CP+Se, 50+1 mg/kg CP+Se, 100+1 mg/kg CP+Se ve 150+1 mg/kg CP+Se).

Se' un böbrek homojenatlarındaki koruyuculuk derecesi lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) ve endojen antioksidan olan glutatyon (GSH) düzeyi belirlenerek değerlendirildi. Böbrekler histolojik olarak da incelendi. Se böbrekte lipid peroksidasyonunu (MDA) azaltarak ve GSH aktivitesini artırarak anlamlı derecede koruma sağladı. Bu biyokimyasal gözlemler histolojik bulgular tarafından da desteklendi.

CP dozunun artışına paralel olarak (50, 100 ve 150 mg/kg) böbrekte hasarlar saptandı. Yukarıdaki CP dozlarıyla birlikte verildiğinde, 0.5 ve 1 mg/kg Se böbrekte CP nedenli toksisiteyi büyük oranda düşürdü. 50 ve 150 mg/kg CP verilen gruplar 0.5 ve 1 mg/kg Se dozları bakımından karşılaştırıldığında; 0.5 mg/kg Se 50 mg/kg CP toksisitesini, 1 mg/kg Se ise 150 mg/kg CP toksisitesini azaltmada daha etkili oldu.

Verilerimiz, selenyum dozunun belirli oranlarda değiştirilmesiyle, artan CP dozuna karşı daha güçlü bir koruyucu etkinliğin sağlanabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Selenyum, Siklofosfamid, Böbrek, Nefrotoksisite, Sitoprotektivite, Sıçan.

SUMMARY

The present study was aimed to investigate the protective effects of selenium (Se) on cyclophosphamide (CP)-induced renal toxicity in rats. Eighty-four Sprague-Dawley rats were equally divided into twelve groups of seven rats in each (control, 50 CP, 100 CP, 150 CP, 0.5 Se, 1 Se, 50+0.5 mg/kg CP+Se, 100+0.5 mg/kg CP+Se, 150+0.5 mg/kg CP+Se, 50+1 mg/kg CP+Se, 100+1 mg/kg CP+Se and 150+1 mg/kg CP+Se).

The degree of protection produced by Se was evaluated by determining the level of malondialdehyde (MDA) and the activity of endogenous antioxidant glutathione (GSH) were estimated from kidney homogenates, and kidney were histologically examined as well. Se elicited significant kidney protective activity by decreasing the level of lipid peroxidation (MDA) and elevating the activity of GSH. Furthermore, these biochemical observations were supported by histological findings.

In accordance with increasing doses of CP (50, 100 and 150 mg/kg) there was determined toxicity in the kidney. When given together with the above CP doses, 0.5 and 1 mg/kg Se considerably reduced the CP-related toxicity in the kidney. When compared to 0.5 and 1 mg/kg Se in 50 and 150 mg/kg CP groups, 0.5 mg/kg Se was more protective on 50 mg/kg CP-induced toxicity while 1 mg/kg Se was more protective on 150 mg/kg CP-induced renal toxicity.

Our data suggest that well-adjusted selenium dose may result in more therapeutic effect against increased cyclophosphamide doses.

Keywords: Selenium, Cyclophosphamide, Kidney, Nephrotoxicity, Cytoprotectivity, Rat.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ve tüm biyoloji eğitimim süreci içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve tüm bu süreçler boyunca kendisinden çok fazla şey öğrendiğim, her konuda desteğini gördüğüm, saygıdeğer danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Adnan AYHANCI' ya asla ödeyemeyeceğimi bildiğim emeklerinden dolayı en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunması süresince beni fikir ve yorumları ile yönlendiren; bilgi ve tecrübeleriyle aydınlatan hocam Sayın Prof. Dr. Ruhi UYAR' a teşekkür ederim.

Sayın hocalarım, Prof. Dr. Yavuz KILIÇ ve Prof. Dr. Mehtap KUTLU' ya tez savunmam süresince gösterdikleri hoşgörüden dolayı saygılarımla çok teşekkür ederim.

Çalışmamda histolojik işlemlerin yorumlanmasında çok değerli bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalanma şansını bulduğum hocam Sayın Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK' e bana bu şansını verdiği için çok şey borçluyum. Kendisine verdiği emeklerden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca histolojik çalışmalarda çok büyük yardımlarını gördüğüm Histoloji-Embriyoloji Bölümü teknisyeni Huri ÇINAR' a, istatistiksel işlemlerde Arş. Gör. Ahmet MUSMUL' a ve tezin yazım aşamasında yardımlarını gördüğüm bilgisayar laboratuvarı sorumlusu Fevzi KIRAÇ' a ve arkadaşım Dr. Suzan YAMAN ' a teşekkür borçluyum.

Hayatımın her döneminde desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen; daima karşılıksız seven ve de çok sevilen, başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan; kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli annem İmmahan GÜNEŞ' e ve ağabeyim Cem GÜNEŞ' e; en zor zamanlarımda yanımda olan dostum ve manevi kardeşlerim Ersan GÜRDOĞAN' a ve Öykü İLİK' e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Sevgili Babamın anısına...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller.....	4
2.2. Antioksidanlar.....	5
2.3. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller.....	6
2.4. Alkilleyici Ajanlar	8
2.4.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide = CP).....	9
2.5. Selenyum'un Genel Özellikleri	12
2.5.1. Selenyum Kaynakları.....	13
2.5.2. Selenyumun Bedende Emilimi	14
2.5.3. Selenyumun Bedende Taşınması	14
2.5.4. Selenyumun Bedende Depolanması	15
2.5.5. Selenyumun Bedenden Uzaklaştırılması	15
2.5.6. Selenyumun Fizyolojik Rolü	15
2.5.7. Bedende Selenyum Eksikliği	16
2.5.8. Selenyum ve Kanser	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Kullanılan Gereçler	19

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)**Sayfa**

3.1.1. Deney Hayvanları	19
3.2. Yöntemlerin Uygulanması	19
3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	19
3.2.2. Siklofosfamid ve Selenyum Uygulaması	20
3.2.3. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler	22
3.2.3.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi	22
3.2.3.2. Böbrek Dokusu GSH Düzeyinin Ölçülmesi.....	22
3.2.4. Histolojik Analizler	23
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Sonuçları	24
4.2. Mikroskopik İnceleme	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	57
7. EKLER.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2.1. Glutasyon döngüsü.....	6
2.4.1.1. Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3- oksazofosforin 2-oksit.....	9
2.4.1.2. Siklofosfamid Metabolizması	10
2.5.2.1. Seleno-L-Metiyonin' in kimyasal formülü.....	13
4.2.1. Kontrol grubu: Normal histolojik görünüme sahip böbrek korteksi	35
4.2.2. Kontrol grubu: Normal histolojik görünüme sahip böbrek medullası.....	35
4.2.3. 50 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Bowman kapsül aralıkları daralmış Malpighi cisimleri	36
4.2.4. 50 mg/kg CP grubuna ait böbrek korteksinde distal tübül hücrelerin hasara uğrayarak lümene dökülmesi görülmekte	36
4.2.5. 50 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek medullası.....	37
4.2.6. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Malpighi cisimlerinde Bowman kapsül aralığında daralma.....	37
4.2.7. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde distal tübül hücrelerinin m lümene dökülmesi	38
4.2.8. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası.....	38
4.2.9. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksi	39
4.2.10. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait distal tübüller	39
4.2.11. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait distal tübül epitel hücrelerinde yassılaşma.....	40
4.2.12. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek medullası	40
4.2.13. 0.5 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görümlü böbrek korteksi....	41
4.2.14. 0.5 mg/kg Se verilen deney grubuna ait böbrek medullası.....	41
4.2.15. 1 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görümlü böbrek korteksi.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2.16. 1 mg/kg Se verilen deney grubuna ait böbrek medullası.....	42
4.2.17. 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait böbrek korteksi.....	43
4.2.18. 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait böbrek medullası.....	43
4.3.19. 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait böbrek korteksi.....	44
4.2.20. 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait böbrek medullası.....	44
4.2.21. 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Bowman kapsül aralıkları daralmış Malpighi cisimleri.....	45
4.2.22. 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek medullası.....	45
4.2.23. 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek korteksi.....	46
4.2.24. 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek medullası.....	46
4.2.25. 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek korteksi.....	47
4.2.26. 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek medullası.....	47
4.2.27. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normale yakın görünümlü böbrek korteksi.....	48
4.2.28. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünümüne sahip böbrek medullası.....	48

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
3.2.2.1. Uygulanan siklofosfamid ve selenyumun gruplara göre dağılımı.....	21
3.3.2.2. Siklofosfamid ve selenyumun gruplara uygulanma şekli.....	21
4.1.1. Tüm deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA ve GSH ortalama ve standart sapma değerleri	30
4.1.2. MDA düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri	31
4.1.3. GSH düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri	32
4.2.1. Gruplara göre histolojik skor puanları	33

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

ml	Milliliter (Mililitre)
mg	Milligram (Miligram)
kg	Kilogram
n	Denek Sayısı
μ	Micron (Mikron)
ppm	Parts Per Million (Milyonda Bir)
°C	Centigrade Degree (Santigrat Derece)

Kısaltmalar

Açıklama

CP	Cyclophosphamide (Siklofosfamid)
IP	Ifosfamide (Ifosfamid)
(PAM) FAM	Phosphoramid mustard (Fosforamid Mustard)
ACR	Acrolein (Akrolein)
Se-L-Met	Seleno-L- Methionine (Seleno-L- Metiyonin)
Se	Selenium (Selenyum)
SOR	Serbest Oksijen Radikali
MDA	Malondialdehyde (Malondialdehid)
SOD	Superoxide Dismutase (Süperoksit Dismutaz)
Cat	Catalase (Katalaz)
GSH	Glutathione (Glutatyon)
GSH-Px	Glutathione Peroxidase (Glutatyon Peroksidaz)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Etilendiamintetraasetik Asit)
DTNB	5, 5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Ellman Reaktifi)
TNB	5-thio-2-nitrobenzoic Acid (5-thio-2-nitrobenzoik Asit)
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate (Sodyum Dodesil Sülfat)
TBA	Thiobarbituric Acid (Tiyobarbitürik Asit)

1. GİRİŞ

Kanser, organizmanın savunma mekanizmalarının kesilmesi ve dengesinin bozulması durumunda, başlangıçta sağlıklı olan hücrelerin beden denetiminden çıkarak önü alınamaz bir büyüme ve yayılmasıyla karakterize olan ölümcül bir hastalıktır [Kearsley, 1986; Murray et al., 1997].

Kanser tedavisinde cerrahi ve ışın tedavi yöntemleri yaygın olarak yer almakta ve öncelikli olarak klinik tedavi işlemi uygulanmaktadır. Buna ek olarak ağrıyı azaltma, yaşam süresini bir miktar uzatma, daha kaliteli bir yaşam için cerrahi müdahale ve arkasından metastazları önlemeye yönelik kemoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapiyle geçici de olsa belli bir süre tümörü ortadan kaldıran antikanserojen ilaçlar kullanılmaktadır. Gerek antimikrobik gerekse antineoplastik kemoterapinin temel ilkesi, hastanın normal hücre ve dokusuna zarar vermeden mikroorganizma ve tümör hücrelerinin öncelikle üreme ve gelişmesini durdurmak, daha sonra da tamamen yok etmektir. Fizyolojik ve anatomik yapısı ile mikrobik (prokaryot) hücrelerin normal insan hücresinden (ökaryot) farklı olmaları nedeniyle kemoterapötik ilaç tarafından seçimli olarak inhibisyonu veya yok edilmesi mümkünken; antikanser ilaçların sağlıklı insan hücresini etkilemeden kanser hücrelerini seçimli olarak durdurması veya yok etmesi mümkün olamamaktadır ve dolayısıyla seçicilikleri çok sınırlıdır. Çünkü kanser hücresi ile insan hücresi arasında nicelik olarak çok fark yoktur. Antineoplastik ilaçlar, doz aşımı gibi durumlarda insan doku ve hücrelerinde toksisite gösterirler. Antineoplastik ilaçların en fazla kanserojenik olanları alkilleyici tipte olanlarıdır [Fairchild et al., 1979; Kinlen et al., 1981; Kayaalp, 1987; Ehrenfried et al., 1997; Furuta et al., 2000; Watanabe et al., 2001].

Siklofosfamid (CP) klinikte kanser ve non-malignant hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan, yüksek derecede etkili, alkilleyici sitotoksik bir ilaçtır [Abraham et al., 2007]. İnsan tümörlerinin antikanser ilaçlara gösterdikleri direncin üstesinden gelmek için özellikle CP gibi yüksek doz alkilleyici ajanlar kullanarak tümürlü hastaların yoğun kemoterapisi gereklidir [Cavalletti et al., 1986]. Ancak kemoterapötik yaklaşım hematoksisite, ürotoksisite, teratojenite, mutajenite,

karsinojenite ve kemik iliğinin baskılanması gibi düşündürücü toksik etkilere sahiptir. CP' nin başlıca yan etkileri; hematopoietik depresyon, hemorajik sistit ve renal toksisitedir [Kumar and Kuttan 2004; Abraham et al., 2007].

CP' nin büyük bir kısmı karaciğerde az bir kısmı da böbrek ve akciğerde metabolize edilir. Artık metabolitlerin büyük bir çoğunluğu boşaltım sistemiyle bedenden atılırken %15 'ten az bir kısmı da değişmeden kalır [Juma et al., 1981]. Böbrek anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri açısından ksenobiyotik ilaçlar dahil sayısız zehirli maddenin hedef organıdır. Bu metabolik artıklar ürotoksik ve nefrotoksik etkileriyle renal hasara yol açarlar ve CP' nin klinik yararını sınırlarlar. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada CP' nin düşük dozlarda plazma kreatinin seviyesine etki etmediği ve böbrek hasarına neden olmadığı tespit edilmiştir. CP, Ifosfamide (IP) ile karşılaştırıldığında daha az nefrotoksik etkiye sahiptir ve bu nedenle CP nedenli renal hasarın mekanizması fazla çalışılmamıştır. Ancak yapılan çalışmadaki histolojik incelemeler uzun süreli CP kullanımının lizozomal enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüşe neden olduğunu ve renal toksisiteye (glomerular nefrit ve interstisyel ödem) yol açtığını ortaya koymuştur [Abraham et al., 2007]. Diğer bir çalışmada da kısa süreli CP tedavisinin renal hasarı önlediği ancak uzun sürede akut renal hasara neden olduğu saptanmıştır [Al Salloum, 2003]. Siklofosfamidin toksik etkilerini önleyerek daha yüksek dozlarda kullanılmasına olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiş ise de halen ilaç uygulama sistemleri daha duyarlı olabilecek yöntemlerin arayışı içindedir [Pool et al., 1988, Ayhanci et al., 2008].

Kanser nedenleri arasında lipit peroksidasyonunun düşünölmeye başlanması; çalışmaları çeşitli besinsel antioksidanların kanser oluşumu üzerine etkilerini araştırmaya yöneltmiştir [Byers and Perry, 1992]. Antioksidanların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişmesini önledikleri bulunmuştur [İşcan ve Çoban, 1998].

Selenyum (Se) canlı organizmalar için esansiyel bir iz mineral olup organizmada doymamış yağ asitlerinin oto-oksidasyonunu engeller. Bu durum, Se' un serbest radikalleri (SOR) inaktive eden ve böylece lipit peroksidasyonunun oluşmasını engelleyen "glutasyon peroksidaz" enziminin merkez katalitik yapısını oluşturmasından

kaynaklanmaktadır [Tos-Luty et al., 2003]. Se, glutatyon peroksidaz enzim sisteminin esansiyel bir parçasıdır [Burk and Levander 1999; Khattap, 2007]. Glutatyon, glutatyon peroksidaz oluşturmak üzere Se ile birleşen metiyonin türevidir. Se' un lipit peroksidasyonunu baskılayarak hücre zarını koruyucu görevinin yanı sıra (Ilio et al., 1987), antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkisi olduğu (Dai et al., 1999) ve terapötik etkisini arttırdığı, sislptinin toksik yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir [Yang et al., 2000]. Yapılan bir deneysel çalışmada, Se' un hamster embriolarında kadmiyum nedenli toksisiteye karşı bir koruma sağladığı bildirilmiştir [Włodarczyk, 2000].

Biz de bu çalışmamızda deneysel olarak oluşturulmuş CP nedenli böbrek toksisitesine karşı, antioksidan özellikleri bilinen Se' un olası sitoprotektif etkilerini histolojik incelemeler ve biyokimyasal yöntemlerle (MDA ve GSH ölçümlerini yaparak) denemeyi planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Patolojik bir olayı takiben organizmada meydana gelen fizyopatolojik değişiklikler temelde belirli mekanizmaların harekete geçmesi ile oluşmaktadır. Serbest radikaller, reaktif oksijen türleri veya oksijen metabolitleri olarak da adlandırılabilen bir kısım maddelerin ortaya çıkması ile hücre ölümü, doku hasarı ve nekroz sonucunda, organ veya sistemlerde işlev yetersizliği meydana gelmektedir [Dilek, 2003].

Bedendeki fizyolojik aktivitenin doğal ürünü olan serbest radikalleri, organizma doğuştan kazandığı çok hassas bir donanımla oksidan-antioksidan denge olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmaya çalışır. Bu dengenin bozulması oksidatif strese yol açar [Dündar ve Aslan, 1999].

Ateroskleroz, diabetes mellitus, felç, yangısal hastalıklar ve kanser dahil pek çok hastalığın oluşumunda rol aldıkları bilinen serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak, bağımsız olarak var olabilen moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronun kazandırdığı en önemli özellik birçok radikal ile bu elektronun paylaşılabilinmesidir [Fantone and Ward, 1982; Dormandy, 1983; Halliwell and Gutteridge, 1989; Kaynak, 2002].

Serbest radikaller etkilerini protein, lipit, karbonhidrat ve DNA oksidasyonu yaparak; hücre zarında, hücre organellerinde ve DNA'larda patolojik değişiklikler oluşturarak gösterirler. Bunların sonucunda işlev bozukluğu veya hücre ölümü olmakta ya da mutant özellikler kazandırarak tümör oluşturabilmektedirler [Dilek, 2003].

Oksidatif stres sonrası oluşan serbest oksijen radikali (SOR); DNA, lipit ve protein hasarına yol açar. SOR ile okside olan yağ asitleri lipit peroksi radikallerine ve lipit hidroperoksitlere dönüşürler. Lipit peroksi radikalleri ise malondialdehide (MDA) dönüşür. Lipit radikalleri DNA ile de reaksiyona girerek DNA-MDA ürünleri oluşturur. SOR endojen ya da eksojen oluşabilir. Endojen SOR normal hücre metabolizması ve oksidatif fosforilasyon sonrası oluşur. İlaçlar, hormonlar ve bazı kimyasallar eksojen

SOR' u oluştururlar. Lipit radikalleri hücre zarını rahatlıkla geçerek hücredeki homeostazisi bozar [Knight, 1995].

2.2. Antioksidanlar

Organizmada esansiyel maddelerin oksidasyonuna neden olabilecek moleküllerin etkilerini önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidan (AO) denilmektedir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik aşırı derecede reaktif oksijen türlerinin yapılmasına ve oksidatif hasara neden olur. Bu durum oksidatif stres olarak belirtilir [Yeum et al., 2004; Kurutaş ve ark., 2004].

Bedende serbest radikaller meydana geldiğinde organizmayı oksidatif stresten korumak için AO sistem devreye girer. Birinci savunma hattını, peroksidaz ve metal bağlayan proteinlerin baskılanması ile serbest radikallerin meydana gelmesini önleyen antioksidanlar oluşturur.

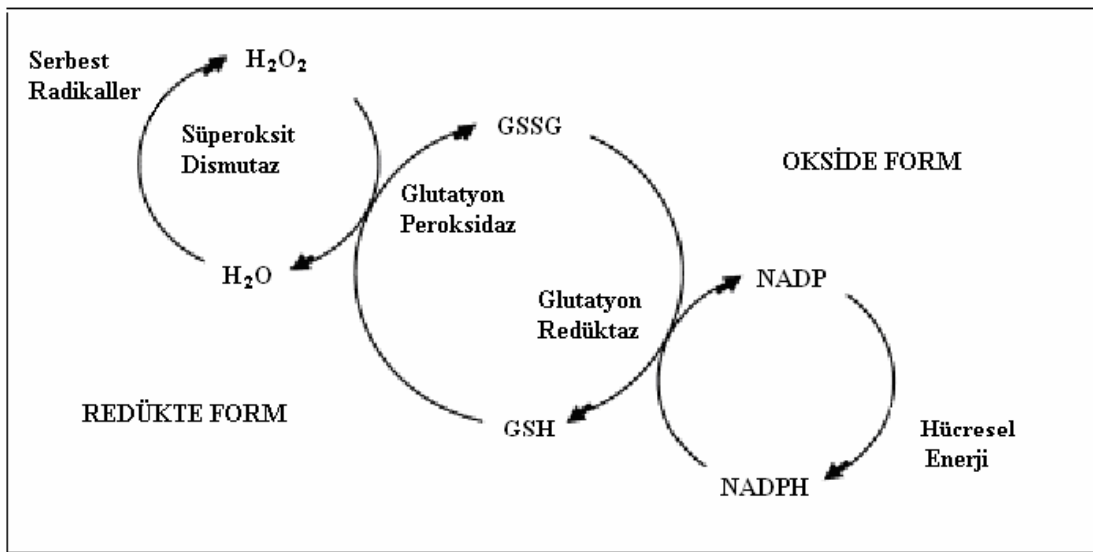
İkinci savunma hattını, vitamin C ve vitamin E gibi radikal temizleyici antioksidanların zincir oksidasyonunun başlamasını baskılaması ve zincirleme reaksiyonların yayılımını önlemesi oluşturmaktadır. Üçüncü olarak da hasarı onarma ve eski haline getirmeye çalışan onarıcı ve yeniden yapılandırıcı enzimler (lipazlar, proteazlar, DNA onarıcı enzimler ve transferazlar gibi) savunmada rol alırlar [Willcox et al., 2004].

Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (Cat) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) antioksidan enzimlerdir. AO enzimlerden; SOD, superoksit anyonunun hidrojen peroksite dönüşümünü katalize eder [Janssen et al., 1999]. Hidrojenperoksit (H_2O_2), Cat tarafından H_2O ve O_2 ' ye dönüştürülür. H_2O_2 , GSH-Px ile de detoksifiye edilir.

GSH-Px bu işlemi yaparken redükte glutatyondan (GSH) elektron alır (Şekil 2.2.1). Oksidatif stres yokluğunda bu enzimler çok düşük düzeydedir. Bu enzimlerdeki artma ve azalmalar denge durumunu değiştirerek oksidatif strese yol açar [Dreher and Junod, 1996].

Glutatyon peroksidaz, glutatyon tarafından hidroperoksitlerin ($ROOH$ ve H_2O_2) indirgenmesini sağlayarak, memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı koruyan selenyum içeren bir enzimdir [Mates and Sanchez-Jimenez, 1999]. Glutatyon peroksidaz

enziminin selenyuma bağılı ve bağımsız 2 izomeri vardır. Selenyuma bağılı izoenzimi selenosistein formunda bulunmaktadır. Bu enzim hem hidrojen peroksiti hem de organik peroksitleri kullanabilir. Selenyumdan bağımsız GSH-Px ise, hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olup, yalnızca lipit hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir [Seven ve Candan, 1996].



Şekil 2.2.1. Glutasyon döngüsü

2.3. Böbrek Dokusu ve Serbest Radikaller

Böbrekler aerobik metabolizmanın belirgin bir şekilde görüldüğü, canlılar için önemli bir organdır. Beden sıvı elektrolit dengesini korumak için, böbrekler tüm beden ağırlığının %1' ini oluşturmasına rağmen, bütün beden oksijen tüketiminin %10' undan sorumludur. Kardiyak outputun %20' sine de maruz kalan süzme organı böbrekler, bu özelliklerinden dolayı dolaşımdaki polimorfonükleer lökositlerin (PMN) ve monositlerin glomerüllere ve dokular arası boşluğa geçmesi sonucunda ek bir oksidan strese maruz kalırlar [Nath et al., 1990; Loo, 1996].

Böbrekler, yüksek O₂ tüketimi ve metabolik aktiviteye ek olarak, infiltratif hücreler ve kendi yerleşik hücrelerinden de reaktif O₂ türleri oluşması nedeniyle zaman zaman, kendi toplam antioksidan korunma mekanizmasını aşan oksidan stresle

karsılaşmakta ve böbreklerde reaktif O₂ türlerine baēlı doku hasarları oluşmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin iskemik, toksik, immünolojik kaynaklı böbrek hasarında rol oynadıēı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Deneysel böbrek iskemisinde, elektron transport zinciri, ksantin oksidaz gibi oksidan enzimler, fagositler, epinefrinin oto oksidasyonu ve araşidonik asit metabolitleri, reaktif oksijen türlerinin kaynaklarını oluşurmaktadır [Stratta et al., 1991; Baud and Ardaillou, 1993].

SOR' lar, hücre ve organel zarlarında lipit peroksidasyona neden olarak ve özellikle proksimal tübül segmentlerinde, tübül yapısını, hücre transport kapasitesini ve enerji üretimini bozarak etkilerini gösterirler [Rovin et al., 1990; Waz and Feld, 1994].

Deneysel immün glomerülonefritte SOR, PMN ve monositler gibi kan kaynaklı infiltratif hücrelerden oluşurlar ve glomerül hücrelerine ve özellikle mezensial hücelere yerleşirler. Bunların oluşması, morfolojik lezyonların meydana gelmesine, proteazların aktive olmasına, proteoglikan sentezinin düşmesine ve bunlara baēlı olarak proteinlere karşı glomerüler geçirgenlik artışının görülmesine neden olur [Stratta et al., 1991; Baud and Ardaillou, 1993].

SOR' ları prostaglandin, tromboksan, trombosit aktivite edici faktör gibi vazokonstriktör bioaktif lipitleri serbestleştirerek ve vazodilatör olan nitrik oksiti inaktive ederek glomerül kan akımının ve glomerül filtrasyon hızının düşmesini saēlarlar. Proksimal, distal ve toplayıcı segmentlerdeki böbrek tübüler hücrelerinin SOR' ları üretebildikleri bildirilmiştir [Andreoli and McAteer 1990; Paller and Neumann, 1991].

SOR' un böbrek hasarındaki rolü glomerülonefrit, nefrotik sendrom, akut böbrek yetmezliēi, toksik hasar, enfeksiyon, obstrüktif nefropati ve kronik böbrek yetmezliēi gibi patolojiler deneysel modellerle in vivo hayvan deneyleriyle gösterilmiştir [Shah, 1989; Andreoli, 1991; Waz and Feld, 1994].

Malign hastalıkların seyrinde böbrek fonksiyonları çok çeşitli nedenlere baēlı olarak bozulabilir. Kemoterapi bu nedenlerden en sık rastlananıdır. Bununla beraber, kemoterapi, malign hastalıkların seyri sırasında böbrek fonksiyonlarının bozulmasının tek sebebi deēildir.

Malign hastalıkların seyrinde böbrek fonksiyon bozukluēunun nedeni malign hastalığın bbreēi infiltre etmesi veya tümörün bası etkisine baēlı idrar yolu tıkanması

gibi hastalığın doğrudan kendisine de bağlı olabilir. Bir diğer neden, neoplastik hücre yıkımının artmasına bağlı gelişebilecek tümör lizis sendromudur. Öte yandan malign hastalıklar, değişik mekanizmalarla gelişen hiperkalseminin sık rastlanan sebeplerinden biridir ve hiperkalsemi böbrek hasarına yol açabilir [Winearls, 2003].

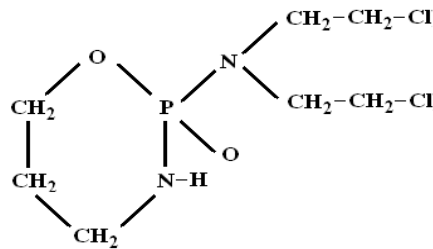
2.4. Alkilleyici Ajanlar

Bifonksiyonel sitostatikler olarak tanımlanan bu bileşikler, nükleik asitleri alkilleyerek etkilerini göstermelerine rağmen faza özel etkiden sorumlu değildirler. Bu bileşiklere iyonize ışınların etkisini artırdıkları için “radyomimetikler” de denir. Tıpkı iyonize ışınlar gibi alkilleyici ajanlar bir taraftan tümör inhibisyonu yaparken diğer taraftan normal hücrede kanserojen özellik gösterirler. Kimyasal yapılarına göre bu grup bileşikler 7 gruba ayrılarak incelenebilir: 1. Azotlu di-(2-kloroetil) türevleri, 2. Etilenimin türevleri, 3. Alkil sülfonatlar, 4. N-Nitrozoüre türevleri, 5. Karbazin grubu bileşikler, 6. Platin kompleksleri ve 7. diğer organometal bileşikler [Kayaalp, 1987].

Azotlu di-(2-kloroetil) türevleri (=Lost), Birinci Dünya Savaşı’nda harp gazı olarak kullanılan bileşiklerdir. Bu bileşikler “nitrojen mustard” olarak tanımlanırlar. Birinci Dünya Savaşı’nda Lost ile temas eden hastaların otopsielerinde ciltte ve solunum yollarında proliferasyon olmuş doku gözlenmiştir. Özellikle kemik iliğinde aşırı proliferasyon saptanmıştır. Bu bulgu, Lost’ un sitotoksik olduğunu ve tedavide kemoterapötik olabileceği sonucuna varılmasına neden olmuştur. Kükürt atomu yerine azot atomu getirilerek, Lost’un aşırı yakıcı ve toksik etkisi giderilmeye ve antikanserojen özelliği artırılmaya çalışılmış ve böylece yeni bileşikler ortaya konulmuştur. Bunlara “azotlu lostlar” denir. Bu incelemeler sonunda 1948 yılında bir azotlu hardal olan Mekloretamin adlı bir alkilleyici ilaç klinikte kullanılmaya başlanmış ve “Modern Kanser Kemoterapisi Çağı” açılmıştır [Kayaalp, 1987].

2.4.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide = CP)

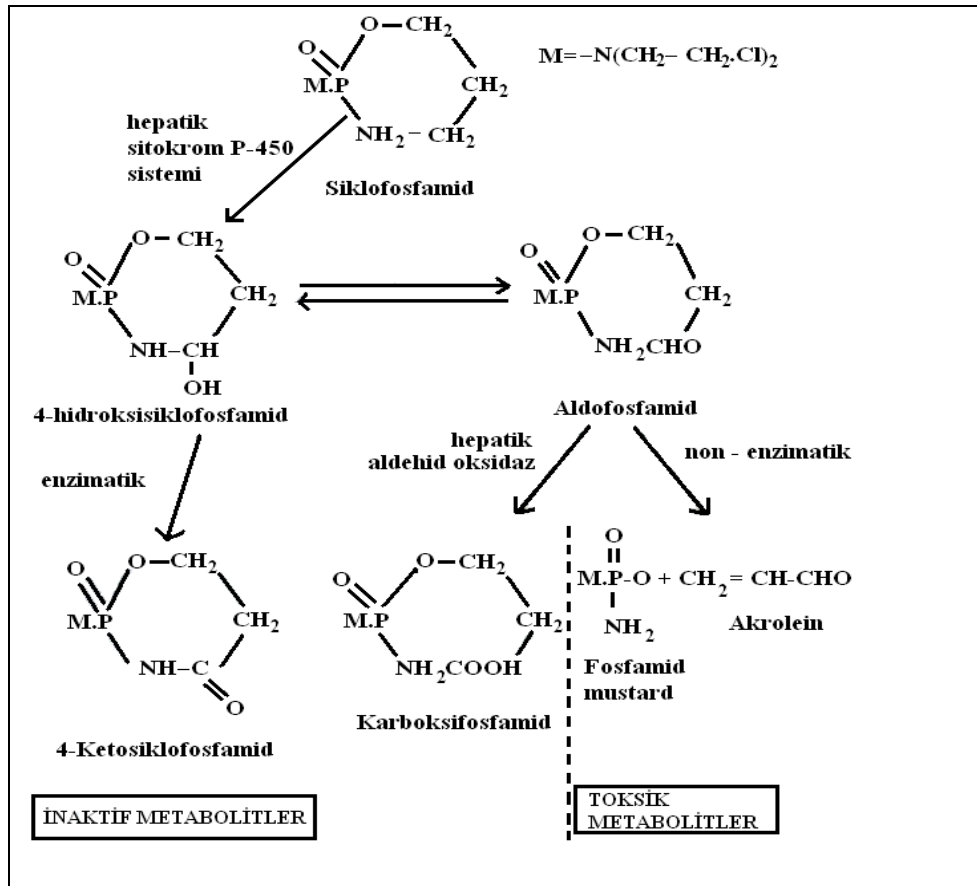
CP, kanser tedavisinde yaygın kullanılan ilaçlardan birisi olup bir oksazosfosforindir [Bernacki et al., 1987; Poll et al., 1988]. Bağışıklık baskılayıcı ve bir antitümör ajan olan CP' nin onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gerekir [Poll et al., 1988; Kawabata et al., 1990]. Humoral ve hücrel bağışıklığın CP ile baskılandığı bildirilmektedir. CP' nin kanserostatik aktivitesi fosforamid mustard (FAM) oluşumunu veren 'hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz' sistemi ile metabolizmasına bağlıdır [Bernacki et al., 1987]. CP' nin kimyasal yapısı Şekil 2.4.1.1' de gösterilmiştir [Budavari, 1987].



Şekil 2.4.1.1. Siklofosfamid; 2-bis (kloroetil) amino tetrahidro-2H-1,2,3- oksazofosforin 2 oksit

CP' nin bağışıklık baskılayıcı özelliği, ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında CP, 4-hidroksi CP' ye metabolize olur. Bu metabolit, enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide yeniden düzenlenir. Bu da FAM ve akroleine (ACR) ayrılır. FAM' ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP' nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan ACR' nin önemli makro moleküllerinin sulfidril gruplarıyla çabucak reaksiyona girdiği böylece bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir [Kwon et al., 1987; Poll et al., 1988; Kawabata et al., 1990]. Oluşan ara ürünler veya son metabolitlerin; kanser seçiciliği, sistemik toksisite,

mutajenite, teratojenite, genotoksisite, ve kanserojenite gibi farklı etkileri olabileceği ileri sürülmektedir [Poll et al., 1988]. CP' nin metabolizması Şekil 2.4.1.2'de gösterilmiştir [Gilman et al., 1999].



Şekil 2.4.1.2. Siklofosfamid metabolizması

Hematolojik ve solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunan CP, hem oral hem de parenteral olarak kullanılır. CP' nin plazmadaki yarılanma ömrü 6,5 saattir. Parenteral olarak verildiğinde aktif metabolitlerin plazma konsantrasyon pikine ulaşması 2-3 saat sürer [Akçasu ve ark., 1992]. CP' nin kullanıldığı alanlar şunlardır:

- Çocukların akut lenfositik lösemisi [Bokser et al., 1990; Morris, 1993].
- Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri [Thatcher et al., 1988].

- Hodgkin dışı lenfomalar [Glode et al., 1981; Kreuser et al., 1993].
- Pediatrik solid tümörler [Bramwell et al., 1987]

Bunun yanı sıra, güçlü bir bağışıklık baskılayıcı olduğundan romatoid artrit, çocukların nefrotik sendromu [Koyama et al., 1977], Behçet hastalığı [Özyazgan ve ark., 1992] ve diğer bazı otoimmün hastalıklarda [Kayaalp, 1989] da kullanılmaktadır.

CP' nin en sık görülen yan tesirleri bulantı, kusma ve diğer gastrointestinal bozukluklar ile kemik iliği depresyonudur [Hansen et al., 1995; Uyar ve Ayhancı, 1996]. CP' nin sınır dozunda gösterdiği toksisitenin kemik iliğini baskılayıcı (miyelosupresyon) toksisite olduğu ileri sürülmüştür [Thatcher et al., 1988; Kotlarek-Haus et al., 1995]. Kemik iliği depresyonuna bağlı olarak lökopeni, trombositopeni, ve bazı hastalıklarda alopesi gelişmektedir [Banham et al., 1985; Akçasu ve ark., 1992]. CP' nin sıçanlarda alopesi yaptığı deneysel bir çalışmada gösterilmiştir [Hussein, 1995]. CP özellikle daha önce kemoterapi görmüş hastalarda lökopeni yapmaktadır [Bramwell et al., 1987]. Klinik bir çalışmada ileri derecede melonomalı hastalara düşük dozda (350 mg/kg²) CP verildiğinde baskılayıcı T hücresi sayısının oldukça azaldığı gösterilmiştir [Mitchell, 1989].

Yapılan çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda CP' nin gonadal yetmezlik, renal yetmezlik ve özellikle hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir [Warne et al., 1973; Ataya et al., 1985; Montz et al., 1991; Kreuser et al., 1993]. CP terapisi gören meme kanserli hastalarda çoğu zaman amenore oluşmaktadır. Erkeklerde sık sık azospermi gelişmektedir [Koyama et al., 1977]. CP, ovaryum foliküllerinde epitel doku için toksiktir. Dişi sıçanlara 40 mg/100 gr CP verildiğinde ovaryum foliküllerinin normal gelişiminin inhibe olduğu gözlenmiştir [Burkl and Schiechi, 1978]. CP, spermatojenik epitelyumda da toksisite oluşturmaktadır. CP metabolitlerinden biri olan ACR 'nin de 3–10 mg/l arasındaki konsantrasyonlarının 12 günlük fare embriyosunda anormal gelişmelere sebep olduğu gözlenmiştir [Stahlmann et al., 1985]. CP, emziren kadınlarda süte geçerek bebekte immunosupresyon, gelişme geriliği ve karsinogenezis gibi toksik etkiler yapmaktadır [Dökmenci, 1988]. Bunun yanı sıra fizyolojik olmayan antidiüretik hormon salgısını arttırarak hipernatremiye yol açar [Kurtoğlu, 1992; Di

Palma and Di Gregorio, 1990]. Bu durum ise hemorajik sistit riskini artırır [Akçasu ve ark.,1992].

CP' nin kendine özgü bir yan etkisi hemorajik sistittir [Bramwell et al., 1987; Di Palma and Di Gregorio, 1990; Uyar ve ark., 1996]. Bu durum, idrar içindeki ilaçtan ve onun 4-hidroksi metabolitinden çok tahriş edici bir madde olan ACR oluşumuna bağlıdır [Al-Safi and Maddocks, 1986; Cavalletti et al., 1986; Luce and Simons, 1988; Pohl et al., 1989]. Sistit zamanla fibrozise dönüşebilir [Kayaalp, 1989]. Hemorajik sistit, nadir fakat zorlu bir CP komplikasyonudur. CP metabolitleri, özellikle akrolein, mesane mukozası için toksiktir [Luce and Simons, 1988]. Erkek Swiss farelerde yapılan deneysel çalışmalarda 200 mg/kg CP' nin hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir [Cavalletti et al., 1986]. İnsanlarda ve deney hayvanlarında CP' nin mesane kanseri yaptığı yönünde raporlar bulunmaktadır [Al-Safi and Maddocks, 1986; Pool et al., 1988; Lahdetie et al., 1990]. CP' nin kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar, bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olduğunu göstermiştir [Bramwell et al., 1987; Lahdetie et al., 1990]. Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada 100 mg/kg intraperitoneal CP uygulamasının hematopoietik sistemde tümör gelişimini uyardığı gözlenmiştir [Bloom et al., 1995]. Sıçanlarda yapılan bir başka çalışmada 20 ve 40 mg/kg intraperitoneal CP uygulamasının dalakta ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir (Moore et al., 1995). Hodgkin lenfomalı hastalara CP verildiğinde, hastalarda üreterik tümörlerin geliştiği rapor edilmiştir [Ponsot et al., 1995].

2.5. Selenyum'un Genel Özellikleri

Selenyum, oksijen serilerinde birçok oksidasyon durumunda bulunan bir ametaldir. Biyolojik sistemlerde bulunan bu element, protein yapısına katılan aminoasitlerin bir unsurudur. Element, 1930'lu yıllarda ineklerin Se bakımından zengin topraklarda yetişen bitkileri yiyerek, alkali hastalığına yakalanması üzerine ilk kez çalışıldı. Se' un koyun, domuz ve sığırlarda besinsel eksikliği ile ilgili çalışmalar,

elementin biyokimyasal fonksiyonunun bulunduğu 1973 yılına kadar devam etmiştir. Araştırmacılar Se' un, glutatyon peroksidaz enzim sisteminin esansiyel bir parçası olduğunu buldular [Burk et al., 1999]. Se, glutatyon peroksidazın yapısına katılır. Glutatyon peroksidaz. glutatyonu kullanarak yağ asidi hidroperoksitleri ve hidrojen peroksiti uzaklaştırır. Böylece hidroksil radikallerinin şekillenmesini önler. Lipit peroksidasyonunu baskılayarak hücre zararını koruyucu etkisinin yanı sıra, antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemotörapi ajanlarla sinerjistik etkisi olduğu ve terapötik etkiyi arttırdığı, sisplatinin toksik yan etkilerini azalttığı gösterildi [Ilio et al., 1987; Yang et al., 2000; Dai et al., 1999].

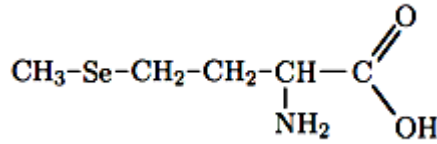
Se' un insan beslenmesindeki önemi 1979 yılında bulundu. Çin' deki bilim adamları, selenyumca fakir topraklarda büyüyen çocukların Keshan hastalığı olarak bilinen bir kardiomyopati hastalığına yakalandıklarını gözlemlediler. Diyete Se eklendiğinde ise hastalık belirtileri geriledi. Bu buluşlar, Se' un insan bedenindeki bilinmeyen etkisinin bulunması için kapsamlı çalışmalara önderlik etti. Bütün bu çalışmalar aynı zamanda, Dünya Sağlık Örgütü'nü, Se' un besinsel alınımı ile ilgili araştırma yapmaya sevk etmiştir. Elementin günlük besinsel alım miktarı (RDA: Recommended Daily Allowance) 50-350 µg olarak saptanmıştır [Groff et al., 1995; Burk et al., 1999; Cao et al., 2004].

2.5.1. Selenyum Kaynakları

Bitkiler selenyumu (Se) yetiştirildikleri topraktan alırlar [Groff et al., 1995]. Bazı besinlerin yüksek düzeyde Se içerdiği bilinmektedir. Besinsel Se çoğunlukla selenometiyonin ve selenosistein gibi organik bileşikler şeklinde olup başlıca tahıllar, et, maya ve sebzelerle alınır [Cao et al., 2004]. Genellikle hayvansal gıdalarda özellikle ette Se bileşikleri, bitkilerdekine oranla daha fazladır [Burk et al., 1999; Groff et al., 1995]. Selenyumca fakir topraklı ülkelerde hayvanların yiyeceklerine sodyum selenit eklenmesi yaygın bir uygulamadır. Bazı balıklar dışında, deniz ürünlerinin selenyumun en iyi kaynağı olduğuna inanılmaktadır [Groff et al., 1995].

2.5.2. Selenyumun Bedende Emilimi

Birçok Se formu, proteinlerin içerisindeki aminoasitlerin birer parçası olarak bedene girer. Hayvan ve bitkilerde bulunan selenomethionin ve selenosistein, bedene giren ilk önemli Se formudur [Burk et al., 1999]. Seleno-L-Metiyonin' nin kimyasal yapısı Şekil 2.5.2.1'de gösterilmiştir [Spallhoz et al., 2004].



Şekil 2.5.2.1. Seleno-L-Metiyonin' in kimyasal formülü.

İlk emilim ince barsak çevresinde meydana gelir. Emilim, midede hemen hemen hiç olmazken ince barsakta çok az olur [Groff et al., 1995]. Selenometiyonin, ince barsakta %100'e yakın bir oranda emilir. Diğer formları da selenometiyonine benzer şekilde emilir. Bu elementi inorganik formlarının emilimi luminal faktörlere bağlı olarak değişikliğe uğrar. Bu değişiklik %50 ile %100' lere kadar ulaşabilir. Beden selenyum düzeyi bu emilimi engellemez. Se' un emiliminin azalması ya da teşvik edilmesi birçok besinsel faktörle yakından ilişkilidir. İndirgenmiş glutatyon ile birlikte E vitamin, A ve C vitaminleri elementin emilimini artırır. Bunların aksine, ağır metaller (cıva gibi) çöktürme yoluyla elementin emilimini azaltır [Groff et al., 1995].

2.5.3. Selenyumun Bedende Taşınması

Se' un taşınma mekanizması henüz tam olarak açıklanamamış değildir. Bir varsayıma göre; difüzyon yoluyla kırmızı kan hücrelerine girdiği ve bedende bu yolla taşındığı sanılmaktadır. Serbest Se bedende, VLDL (Very Low Density Lipoproteins) ve LDL (Low Density Lipoproteins) gibi lipoproteinlere bağlanır. İkinci bir taşıyıcı

olarak selenoprotein P adı verilen bir plazma proteine tarafından taşındığı düşünülmektedir [Groff et al., 1995]. Diğer bir görüşe göre, selenosistein varlığı proteinin taşıma özelliğini inhibe eder [Burk et al., 1999].

2.5.4. Selenyumun Bedende Depolanması

Kalp, karaciğer, böbrek, akciğer, pankreas ve kas glutatyonun bir parçası olarak Se'u yüksek düzeyde içerir. Bedende en çok karaciğerde bulunur [Burk et al., 1999, Groff et al., 1995]. Kırmızı kan hücrelerinin plazmaya göre 4 kat daha fazla glutatyon içeriyor olması dikkate değer bir gerçektir [Powers and Ji, 1999].

2.5.5. Selenyumun Bedenden Uzaklaştırılması

Se iki temel yolla bedenden uzaklaştırılır; boşaltım sistemi yoluyla (%50-67) ve dışkı yoluyla (%40-50) [Groff et al., 1995]. Yüksek doz Se alımı, elementin solunum yoluyla dimetilselenit şeklinde uzaklaştırılmasına yol açar. Akciğer yoluyla kayıp, uçucu Se bileşiklerinin neden olduğu sarımsak kokusu ile karakterizedir. Dışkı ile atılması çok fazla görülmez, bunun yerine boşaltım sistemiyle normal fizyolojik süreçte izlenen temel yoldur [Groff et al., 1995; Burk et al., 1999].

2.5.6. Selenyumun Fizyolojik Rolü

Hayvanlarda Se içeren 11 proteinin (selenoproteinler) bulunduğu bilinmektedir. Bu proteinlerin birçoğu, enzimatik fonksiyonları ile karakterize edilir. Buna karşın biyokimyasal fonksiyonları daha yeni belirlenebilmiştir. Bazı hipotezlere göre, sitokrom P450 sisteminin korunmasında, DNA onarımında, enzim aktivasyonunda ve immün sistemin işleyişinde fonksiyonları vardır. Se' un iyi bilinen bir diğer fonksiyonu, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim sistemindeki rolüdür. Bugüne kadar 4 farklı glutatyon peroksidaz tanımlanmıştır. Hücre içerisindeki toplam (GSH-Px), 2:1

oranında sitozol ve mitokondriyal matriks arasında dağılmıştır. Bu enzimlerin bedendeki temel antioksidan savunma sistemleri olduğu saptanmıştır. İndirgenmiş glutatyon, bedende serbest radikallere karşı ilk savunma hattıdır. Glutatyon enzim sistemi su ve yağda çözünebilen AO savunma sistemlerinin koordinasyonunda anahtar rolü oynar. Peroksidazlar, indirgenmiş glutatyon peroksidazı kullanıp hidrojen peroksidi ve lipit peroksitleri parçalayarak hücrenin peroksidasyonunu engeller [Groff et al., 1995; Burk et al., 1999]. Hücre içindeki substratın ve indirgenmiş glutatyonun yeterli düzeyi, antioksidan özellik gösterebilmek için GSH-Px formunda ihtiyaç duyar [Ji, 1995]. İndirgenmiş glutatyon bedenden hidrojen peroksidi uzaklaştırmak üzere kullanıldığında yükseltgenmiş glutatyon oluşur. Glutatyon redüktaz enzimi tarafından okside glutatyon tekrar antioksidan olmak üzere indirgenmiş glutatyona dönüştürülür. Daha spesifik olarak bu enzim, tiroksinin (T4) triiyodotironine (T3) dönüşümünü de katalizler ve bu olayın selenyum bağımlı olduğu görülür [Del Maestro, 1991]. Powers ve Ji, (1999) yayımladıkları bir özetinde, indirgenmiş glutatyonun, bedendeki antioksidanları yeniden şarj etme yeteneğine sahip olduğunu iddia ettiler. Bu yayına göre; glutatyon C ve E vitaminlerinin orijinal elektron konfigürasyonlarına kavuşması için elektron vericisi görevi yapar.

2.5.7. Bedende Selenyum Eksikliği

Se eksikliği insanlarda, bazıları ölümcül olabilen oldukça geniş kapsamlı semptomlara yol açar. Buna ilişkin ilk kanıtlar 1979 yılında Çin’de bilim adamlarının Se eksikliği ile karakterize olan Keshan ve Kashin-Beck’s hastalığını bulmaları ile elde edildi. Keshan hastalığı kardiyojenik şoka ve bazı durumlarda konjestiv (kan göllenmesine neden olan) kan yetmezliğine neden olabilen bir kardiyomiyopatidir (kalp kası patolojisi). Kronik durumlarda hasta çeşitli derecelerde kalp yetmezliği ve kalp büyümesi ile karşı karşıya kalır [Groff et al., 1995; Burk et al., 1999]. Keshan hastalığı genellikle çocukları ve genç bayanları etkilerken, Kashin-Beck’s hastalığı erken gençlik döneminde etkisini gösterir. Bu hastalık çeşitli tiplerde kireçlenme ile sonuçlanır. Hastalık genellikle sinirlerin ve kıkırdak doku hücrelerinin bozulması ile karakterizedir.

Kıkırdak doku hücrelerinin harabiyeti, cücelik ve eklem bozulmalarına neden olur [Burk et al., 1999]. Se eksikliği belirtileri; kas ağrıları, kilo kaybı, saç ve deride pigment kaybı, tırnak yataklarında beyazlaşmadır [Groff et al., 1995]. Se eksikliği diğer elementlerle etkileşimden de meydana gelebilir. Kurşun (Pb) Se ile etkileşir ve elementin dokudaki düzeyini belirgin şekilde azaltır. Bu olayın mekanizması tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, her iki elementin de sülfidril gruplarına bağlanıyor olmasından kaynaklandığına ilişkin görüşler öne sürülmektedir. Görünüşe göre demir (Fe) ve bakır (Cu) da Se ile etkileşerek elementin dokuya alınımını engellemektedir. Beden azalmış metiyonin düzeyi ile karşı karşıya kaldığında bu açığı beden proteinlerine selenometiyonin bağlayarak kapatır ve bu da bedende erişilebilir serbest selenyum düzeyini düşürür [Burk et al., 1999].

2.5.8. Selenyum ve Kanser

1949'da Clayton ve Baumann ve onlardan yirmi yıl sonra da Shamberger (1969) hayvan modelleriyle yaptıkları çalışmalarda Se' un kimyasal karsinogenezisi baskıladığını kanıtladılar. Takip eden yıllarda insanlarda kanser ve Se arasında ters bir orantı olduğunu belirten epidemiyolojik bulgulara rastlandı. Bununla ilgili ilk raporlar Shamberger (1970), Shapiro (1972) ve Schrauzer (1976)'den geldi.

1980'lerde Se' un hayvanlarda kanseri engellediği yolunda yayınlar gündeme gelmeye başladı. Griffin ve Lane (1981) Se' un inorganik formları olan selenit ve selenyum dioksitin kanserden koruma etkilerini özetlediler. İkinci yayın, Milner ve arkadaşlarından geldi (1981). Milner ve arkadaşları, Se' un yalnızca inorganik formlarının değil, organik formlarının da kanser hücresinin çoğalmasını önlediğini kanıtladılar. Farelerle yapılan çalışmalarda; kanserli hücre çoğalmasını selenometiyonin ve selenosisteine gibi selenoaminoasitler kadar selenit, selenat ve selenyum dioksitin de baskıladığı görüldü.

Son 20 yılda hücre kültürü ve hayvan modelleri çalışmalarında birçok Se bileşiğinin karsinostatik aktivitesi belirlendiyse de tüm Se bileşiklerinin bu etkiye sahip

olmadığı da bulgular arasındaydı. Örneğin hayvanlarda 1-1,5 ppm' in altındaki besinsel Se desteklemesinin karsinostatik etkinliğinin olmadığı görüldü [Combs and Grey, 1998].

Yapılan deneysel bir çalışmada, bitkilerde çok düşük düzeylerde bulunan L-Se-metilselenosisteinin (SeMC), hayvan meme kanseri modellerinde, besinsel olarak uygulandığında, karsinostatik bir potansiyeli olabileceği belirtilmiştir [Ip, 1998]. Daha sonra Finley ve ark. (2000) SeMC' nin, kolon kanserini azaltmada etkili olduğunu saptadılar.

Clark ve ark. (1996), insanlarda günde 200 mikrogram Se' un, özellikle selenometiyonin ve az bir miktar selenometilselenosistein içermek suretiyle selenize maya ile besinsel alımının akciğer, prostat ve kolorektal kanser sıklığında %50'ye varan azalma sağladığını belirttiler.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda 3-4 aylık, 180-220 gram ağırlığında sağlıklı, Sprague-Dawley cinsi, albino dişi ve erkek sıçanlar kullanıldı. Bütün deney hayvanları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda normal musluk suyu ve pellet yemle standart bir çevre yaşamında beslendi. Bu çalışma ESOĞÜ Deney Hayvanları Etik Kurulu' nun 16.06.2009 tarihli ve 117/2009 nolu kararı ile kabul edilmiştir. Karar örneği ektedir.

3.2. Yöntemlerin Uygulanması

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bütün deney hayvanları enjeksiyondan önce bir haftalık karantinaya alındı ve deney süresince 12:12 aydınlık/ karanlık ışıklandırması olan, ısı (22 °C) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Sıçanlar tablo 3.2.2.1' de gösterildiği gibi her grupta 7 hayvan olacak şekilde 12 ayrı gruba ayrıldı ve her kafeste 4 hayvan olacak şekilde yerleştirildi. Hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptandı.

Deney bittiğinde, tüm sıçanların etik kurallarına uygun olarak, eter anestezisi altında toraksı açılıp yüreğe enjektörle girilerek kalp kanı yapılacak işleme göre, normal ve EDTA' lı tüplere alındı.

3.2.2. Siklofosfamid ve Selenyum Uygulaması

Deneyde 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12. gruplara tek doz intraperitoneal (i.p) olarak uygulanan CP Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)' dan alındı (Cyclophosphamide Monohydrate, katalog no: C0768). CP dozları önceki çalışmalara göre (50, 70, 100, 120, 150 ve 200 mg/kg) düzenlendi [Lerza et al., 1988; Uchida et al., 1994; Le Bricon et al., 1995; Slattery et al., 1995; Ayhanci et al., 2008]. Deneylerimizde CP' nin üç farklı dozu (50, 100, 150 mg/kg) kullanıldı (Tablo 3.2.2.1).

Deneyde 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. gruplara i.p olarak uygulanan Se Sigma' dan alındı (Seleno-L-metiyonin, katalog no: S3132). Deneylerimizde Se' un iki farklı dozu (0.5 ve 1 mg/kg) kullanıldı (Tablo 3.2.2.1). Sıçanlarda Se' un i.p letal dozu (LD₅₀) 4.25 mg/kg olarak belirlenmiştir [Reid et al., 2004].

CP' nin (Endoxan=Cytosan) 500 mg 25 ml bidistile suda eritilerek 25 ml/500 mg CP içeren çözelti hazırlanmıştır. Se' un ise 0.5 ve 1 mg/kg' ı 0.5 ml serum fizyolojikte (SF) eritilerek çözelti hazırlanmıştır. Bu kimyasal maddeler ve kontrol gruplarına uygulanan gerekli dozlardaki serum fizyolojik i.p olarak verilmiştir. Bütün hayvanlar ilk enjeksiyondan ve öldürülmeden önce tartılarak ağırlıkları saptanmıştır. Sadece CP verilen ilk üç gruptaki hayvanlar CP enjeksiyonundan 3 gün sonra anestezi edilmiştir.

Se ile birlikte CP verilen gruplarda, Se uygulamasına CP uygulamasından üç gün önce başlanmış ve deney sonuna kadar devam edilmiştir. Dördüncü günde hayvanlar tekrar tartılarak uygulanacak CP dozu belirlenmiş böylece dördüncü gün CP+Se verilmiştir. Yedinci gün hayvanlar anestezi edilerek böbrekleri alınmıştır. Se' un CP ile birlikte 0.5 ve 1 mg/kg' lık dozlarından başka, 0.5 ve 1 mg/kg' lık dozları da tek başına kullanılmıştır (Tablo 3.2.2.2).

3.2.3. Örneklerin Toplanması ve Biyokimyasal Analizler

Tüm hayvanlar öncelikle kg başına 60 mg sodyum pentobarbiton verilerek anestezi edildi ve daha sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü. Böbrekler alınarak serum fizyolojik ile yıkandı ve analiz yapılana kadar -20 °C' de saklandı. Tüm dokular deneyler boyunca +4°C de korundu. Böbrek dokularının birer parçası (1:9w/v) MDA ve GSH ölçümleri için %0.9' luk NaCl çözeltisi içinde Kinematica Status Homogenizator kullanılarak homojenize edildi. Doku homojenatları 15.000 g' de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki açık süpernatant uzaklaştırıldı.

3.2.3.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeyinin Ölçülmesi

Doku MDA düzeyinin ölçülmesi lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)' in reaksiyonu temeline dayanan Ohkawa' nın yöntemiyle spektrofotometrik olarak yapıldı [Ohkawa et al., 1979].

Deneyde %8.1' lik sodyum dodesil sülfat (SDS), %20' lik asetik asit ve %0.09' luk tiobarbitürik asit (TBA) karışımının 0,2 ml' si her bir örneğe ilave edildi ve son hacim 4 ml olacak şekilde distile suyla tamamlandı. Bu karışım 1 saat boyunca 95° C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışım tüplere alındı çeşme suyuyla soğutularak üzerine 1 ml distile su ve 5 ml n-bütanol-piridin karışımından (15:1 v/v) eklendi. Daha sonra santrifüj edilerek süpernatant alındı ve 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Standart olarak 1,1,3,3-Tetraetoksipropan kullanıldı. MDA düzeyleri nmol/gr protein olarak hesaplandı.

3.2.3.2. Böbrek Dokusu GSH Düzeyinin Ölçülmesi

Doku GSH aktivitesinin ölçümünde Tietze [Tietze, 1966] ve Anderson [Anderson, 1985] yöntemi kullanıldı. Bu yöntem GSH' ın sülfidril grubunun 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asitle (DTNB, Ellman reaktifi) reaksiyona girerek sarı renkli 5-

thio-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturması ve oluşan bu renkli ürünün 412 nm' de absorbansının ölçülmesi ile GSH konsantrasyonunun belirlenmesi esasına dayanır. Her bir doku homojenatının 100 µl' si 3 ml' lik küvete yerleştirildi ve üzerine 750 µl 10 mM DTNB eklenerek 3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 150 µl 1.47 mM β-NADPH eklenerek santrifüj edildi. DTNB miktarı 412 nm' de spektrofotometrik olarak ölçüldü. GSH düzeyleri µ mol/gr protein olarak hesaplandı.

3.2.4. Histolojik Analizler

Mikroskopik inceleme için hayvanların sağ böbrekleri %10' luk formaldehitte fikse edildikten sonra olağan doku takip işlemleri yapılarak parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 5 µm' lik seri kesitler alınarak hematoksilin-eosin boyası ile boyandı. Boyanan kesitler binoküler mikroskopta incelenerek; nekroz, ödem, kanama, proksimal tübül hasarı, iltihabi hücre artışı, tübül lümeninde eozinofilik materyal birikimi ve Bowman kapsül aralığında daralma açısından değerlendirilerek 0 (normal) - 1 (hafif-orta değişiklikler) -2- (şiddetli-tehlikeli değişiklikler) hasar puanları verildi. Tüm mikrograflar Olympus marka DP70 kamera ile elde edildi.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi 13.0 paket programı kullanılarak test edilmiştir. Bütün sonuçlar aritmetik ortalama ± standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Çalışmamızda 12 grup olması ve verilerimizdeki değerşkenlerin normal dağılım göstermesi nedeniyle tek yönlü varyans analizi (One-Way Anova) uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda ise gruplar arasında herhangi bir farklılık olup olmadığını saptamak için nonparametrik Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Daha sonra iki grup arasındaki karşılaştırmada Tukey HSD yönteminden yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada, antioksidan savunma sisteminin unsurlarından biri olan GSH aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlendi. Bunun yanı sıra, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan ve oksidatif hasarın ortaya konmasında önemli bir parametre olarak kullanılan MDA düzeyleri de yine aynı yöntemle ölçüldü.

Tüm gruplara ait MDA nmol/gr protein, GSH düzeyi ise $\mu\text{mol/gr}$ protein olarak hesaplandı.

4.1. Böbrek Dokusu MDA ve GSH Sonuçları

50, 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarının ve serum fizyolojik (SF) verilen kontrol grubunun MDA ve GSH ortalama değerleri Tablo 4.1.1.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1.1.' de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA seviyesinde %13 oranında bir artış olduğu görülmüş ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bu grupta GSH düzeyi kontrol grubuna göre %9 oranında azalmış olmakla birlikte bu azalma istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır.

100 ve 150 mg/kg CP verilen deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinin kontrole göre %45 oranında arttığı görülmüş ve bu artış istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu iki grupta GSH düzeyleri kontrol grubuna göre %39 oranında ileri düzeyde bir azalma göstermiştir ($p < 0.001$).

Kontrol grubu ile 0.5 ve 1 mg/kg Se verilen deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında (Tablo 4.1.1) MDA ve GSH seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir ve MDA ve GSH seviyelerindeki küçük değişiklikler istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

50+0.5, 100+0.5 ve 150+0.5 mg/kg CP + Se verilen deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol grubunun MDA ve GSH ortalama değerleri Tablo 4.1.1.' de gösterilmiştir.

Tablo 4.1.1.' de görüldüğü gibi 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA seviyesinde %10 oranında bir düşüş gözlenmiş ancak bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Aynı Şekilde 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla GSH düzeyinde karşılaştırıldığında GSH miktarı %9 oranında artmış ancak bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA seviyesinde %19' luk bir artış olmuş ve bu artış istatistiksel bakımdan ileri derecede anlamlı bir fark olarak bulunmuştur ($p<0.001$). Yine aynı grup kontrolle kıyaslandığında GSH seviyesinde %4 oranında bir düşüş gözlenirse de bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA seviyesi %36 gibi büyük bir oranda artmış ve istatistiksel olarak da ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Aynı grupta GSH seviyesi kontrole göre %32 oranında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı lde düşmüştür ($p<0.001$).

50+1, 100+1 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarının ve serum fizyolojik verilen kontrol grubunun MDA ve GSH ortalama değerleri Tablo 4.1.1.' de gösterilmiştir.

50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu serum fizyolojik verilen kontrol grubuyla MDA düzeyi bakımından karşılaştırıldığında, 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda MDA seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$). Aynı grup kontrolle kıyaslandığında GSH düzeyinde de anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p>0.05$).

100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla MDA düzeyi bakımından karşılaştırıldığında, 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda MDA seviyesinde %27 oranında bir artış olmuş ve bu durum istatistiksel olarak da ileri derecede anlamlı olarak yorumlanmıştır ($p<0.001$). 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney

grubunda GSH seviyesi kontrole göre %4 oranında azalmış ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu kontrol grubuyla MDA düzeyi bakımından karşılaştırıldığında, 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda MDA seviyesi %40 oranında artarak ileri derecede anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0.001$). Bu gruptaki GSH düzeyi kontrolle kıyaslandığında %34 oranında azalmış ve istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir fark olarak bulunmuştur ($p<0.001$).

50 mg/kg CP verilen deney grubu 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney grupları ile MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarında MDA düzeylerinin oldukça arttığı saptanmış (sırasıyla %27 ve %37 oranlarında) ve bu artış istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Bu iki deney grubunda GSH düzeyleri 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre (sırasıyla %21 ve %37 oranlarında) oldukça önemli miktarda bir azalma göstermiştir ($p<0.001$).

100 mg/kg CP verilen deney grubu 150 mg/kg CP verilen deney grubuyla MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında 150 mg/kg CP verilen deney grubunda MDA düzeyi 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %14 oranında artarak istatistiksel açıdan ileri derecede önemli bir artış göstermiştir ($p<0.001$). 150 mg/kg CP verilen deney grubunda GSH düzeyi 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %15 oranında önemli derecede azalmıştır ($p<0.01$).

50+0.5, 100+0.5 ve 150+0.5 CP+Se verilen deney grupları kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

50 +0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu 100+0.5 ve 150+0.5 mg/kg CP+ Se verilen deney gruplarıyla karşılaştırıldığında 100+0.5 ve 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarındaki MDA seviyesinde sırasıyla %27 ve %42 oranlarında önemli bir artış olduğu gözlenmiş ve bu artışın da istatistiksel açıdan ileri derecede anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).

50 +0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubu ile karşılaştırıldığında 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda GSH seviyesinde %12 oranında bir düşüş görülmüş ve bu düşüş istatistiksel açıdan önemli bir fark olarak değerlendirilmiştir ($p<0.01$). 50+0.5 mg/kg CP+ Se verilen deney grubu

150+0.5 mg/kg CP + Se verilen grupla karşılaştırıldığında ise 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda GSH seviyesinde %38 oranında önemli bir azalma olduğu saptanmış ve bu azalma istatistiksel olarak ileri derecede önemli fark olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).

150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki MDA seviyesi 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna göre %22 oranında artış göstermiş ve bu artış istatistiksel bakımdan ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH seviyesi 150+0.5 mg/kg CP+ Se verilen deney grubuna göre %30 oranında artmış ve bu artış istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p<0.01$).

Tablo 4.1.1.' de görüldüğü gibi 50 mg/kg CP verilen deney grubu 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla MDA düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında 50+1 mg/kg CP+Se verilen grupta sadece 50 mg/kg CP verilen gruba göre MDA düzeyinde %10 oranında bir azalma olduğu görülmüş ancak bu azalış istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu iki deney grubu GSH düzeyi bakımından karşılaştırıldığında ise 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH düzeyinin 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %19 oranında arttığı görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

100 mg/kg CP verilen deney grubu 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla karşılaştırıldığında 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun MDA seviyesinin %13 oranında düştüğü görülmüş ve bu düşüş istatistiksel açıdan önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH düzeyinin 100 mg/kg CP verilen gruba göre %25 gibi oldukça önemli bir oranda arttığı ve ve bu artışın istatistiksel olarak da ileri derecede anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.001$).

150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunki MDA seviyesi 150 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %8 oranında azalmış olmakla birlikte bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Yine 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH düzeyi 150 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %7 oranında artmış olmasına rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla MDA düzeyi açısından karşılaştırıldığında 100+1 mg/kg CP+Se verilen gruptaki MDA seviyesinin %25 oranında arttığı görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak

ileri derecede önemli fark var şeklinde yorumlanmıştır ($p<0.001$). Bu iki grup GSH düzeyi bakımından karşılaştırıldığında 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda GSH düzeyi 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna göre %14 oranında ileri derecede bir azalma göstermiştir ($p<0.001$).

50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla MDA düzeyi açısından karşılaştırıldığında 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruptaki MDA' nın %38 oranında ileri derecede önemli bir artış gösterdiği görülmüştür ($p<0.001$). 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda GSH seviyesi 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna göre %41 oranında ileri derecede düşüş göstermiş ve bu düşüş istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p>0.001$).

Tablo 4.1.1.' de görüldüğü gibi 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubu MDA düzeyi açısından karşılaştırıldığında 150+1 mg/kg CP+Se verilen gruptaki MDA' nın %18 oranında arttığı görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak da doğrulanmıştır ($p<0.001$). Benzer şekilde 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH aktivitesi de 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna göre %32 oranında oldukça fazla bir düşüş göstermiş ve bu düşüş istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

50 mg/kg CP verilen deney grubu 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla karşılaştırıldığında 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda MDA düzeyinde %22 oranında önemli bir azalma olduğu görülmüş ve bu azalış istatistiksel bakımdan ileri derecede önemli bir azalma olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$). 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda GSH düzeyi 50 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %17 oranında oldukça önemli bir şekilde artmış ve bu artış istatistiksel bakımdan ileri derecede önemli bir artış olarak kabul edilmiştir ($p<0.001$).

100 mg/kg CP verilen deney grubu 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla karşılaştırıldığında 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunda MDA düzeyi sadece 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %22 gibi önemli bir derecede azalma göstermiştir ve bu azalış istatistiksel bakımdan ileri derecede anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH seviyesi 100 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %25 gibi önemli bir oranda artış

göstermiş ve bu artış istatistiksel olarak ileri derecede önemli bir artış olarak kabul edilmiştir ($p>0.001$).

150 mg/kg CP verilen deney grubu 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuyla MDA düzeyin bakımından karşılaştırıldığında 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubunun MDA düzeyinde %14 oranında önemli derecede bir azalma olduğu görülmüştür ($p<0.001$). 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubundaki GSH seviyesi 150 mg/kg CP verilen deney grubuna göre %10 oranında artış göstermiş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

50+0.5 ve 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grupları kendi aralarında MDA ve GSH düzeyleri bakımından kıyaslandıklarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

100+0.5 ve 100+1 mg/kg CP verilen deney grupları kendi aralarında MDA ve GSH düzeyleri bakımından kıyaslandıklarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

150+0.5 ve 150+1 mg/kg CP verilen deney grupları kendi aralarında MDA ve GSH düzeyleri bakımından kıyaslandıklarında istatistiksel bakımdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4.1.1. Tüm deney grupları ve bunların kontrol gruplarının MDA ve GSH ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar (n=7)	MDA($\bar{X}\pm SD$)	GSH ($\bar{X}\pm SD$)
Kontrol	14,22 \pm 1,36	38,20 \pm 1,65
50 CP	16,27 \pm 1,24	34,82 \pm 2,68
100 CP	22,17 \pm 1,24	27,79 \pm 0,97
150 CP	25,63 \pm 1,44	23,65 \pm 1,94
0.5 Se	14,35 \pm 0,93	40,80 \pm 2,14
1 Se	14,81 \pm 0,78	41,14 \pm 1,36
50 CP + 0.5 Se	12,80 \pm 1,01	41,74 \pm 3,13
100 CP + 0.5 Se	17,36 \pm 1,13	36,86 \pm 0,88
150 CP + 0.5 Se	22,05 \pm 0,95	26,12 \pm 1,78
50 CP + 1 Se	14,70 \pm 0,61	42,67 \pm 1,80
100 CP + 1 Se	19,37 \pm 0,96	36,87 \pm 1,12
150 CP + 1 Se	23,59 \pm 1,88	25,27 \pm 2,68

Tablo 4.1.2. MDA düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri.

MDA											
GRUPLAR	50 CP	100 CP	150 CP	0,5 Se	1Se	50CP+0.5Se	100CP+0.5Se	150CP+0.5Se	50CP+1Se	100CP+1Se	150CP+1Se
Kontrol	0,069 ^{ns}	0,000*	0,000*	1.000 ^{ns}	0,998 ^{ns}	0,515 ^{ns}	0,000*	0,000*	1.000 ^{ns}	0,000*	0,000*
50CP		0,000*	0,000*			0,000*			0,359 ^{ns}		
100CP			0,000*				0,000*			0,002*	
150CP								0,000*			0,071 ^{ns}
0.5Se					1,000 ^{ns}	0,380 ^{ns}	0,001*	0,000*			
1Se									1.000 ^{ns}	0,000*	0,000*
50CP+0.5Se							0,000*	0,000*	0,125 ^{ns}		
100CP+0.5Se								0,000*		0.082 ^{ns}	
150CP+0.5Se											0.094 ^{ns}
50CP+1Se										0,000*	0,000*
100CP+1Se											0,000*

ns: anlamlı fark yok

*: anlamlı fark var

Tablo 4.1.3. GSH düzeylerinin gruplar arasında karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri.

GSH											
GRUPLAR	50 CP	100 CP	150 CP	0.5 Se	1 Se	50CP+0.5Se	100CP+0.5Se	150CP+0.5Se	50CP+1Se	100CP+1Se	150CP+1Se
Kontrol	0,079 ^{ns}	0,000*	0,000*	0,373 ^{ns}	0,206 ^{ns}	0,052 ^{ns}	0,981 ^{ns}	0,000*	0,004	0,981 ^{ns}	0,000*
50 CP		0,000*	0,000*			0,000*			0,000*		
100 CP			0,010				0,000*			0,000*	
150 CP								0,456 ^{ns}			0,927 ^{ns}
0.5 Se					1,000 ^{ns}	0,999 ^{ns}	0,018*	0,000*			
1 Se									0,949 ^{ns}	0,007*	0,000*
50 CP+0.5 Se							0,001*	0,000*	0,999 ^{ns}		
100CP+0.5Se								0,000*		1,000 ^{ns}	
150CP+0.5Se											1,000 ^{ns}
50CP+1Se										0,000*	0,000*
100CP+1Se											0,000*

ns: anlamlı fark yok

*: anlamlı fark var

4.2. Mikroskopik İnceleme

Tüm hayvanlara ait seri doku kesitlerinin binoküler mikroskop altında değerlendirilmesiyle elde edilen bulgularımız aşağıda belirtilmiştir. Nekroz, kanama, ödem, iltihabi hücre artışı, proksimal tübül hasarı ve tübül lümeninde eozinofilik materyal birikimi hiçbir kesitte gözlenmemiştir. Bowman kapsül aralığında daralma (BKAD) ve distal tübül hasarları bazı gruplara ait bazı hayvanların kesitlerinde gözlenmiştir. Bu gözlemlere ilişkin skor puanları Tablo 4.2.1 'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.1. Gruplara göre histolojik skor puanları (puanlar o gruptaki tüm hayvanların toplam puanlarını göstermektedir).

Gruplar (n=7)	BKAD (Toplam puan)	Tübül Hasarı (Toplam puan)
Kontrol	0	0
50 CP	7	5
100 CP	9	7
150 CP	7	8
0.5 Se	4	4
1 Se	2	0
50 CP + 0.5 Se	0	0
100 CP + 0.5 Se	1	0
150 CP + 0.5 Se	5	0
50 CP + 1 Se	0	0
100 CP + 1 Se	1	0
150 CP + 1 Se	3	0

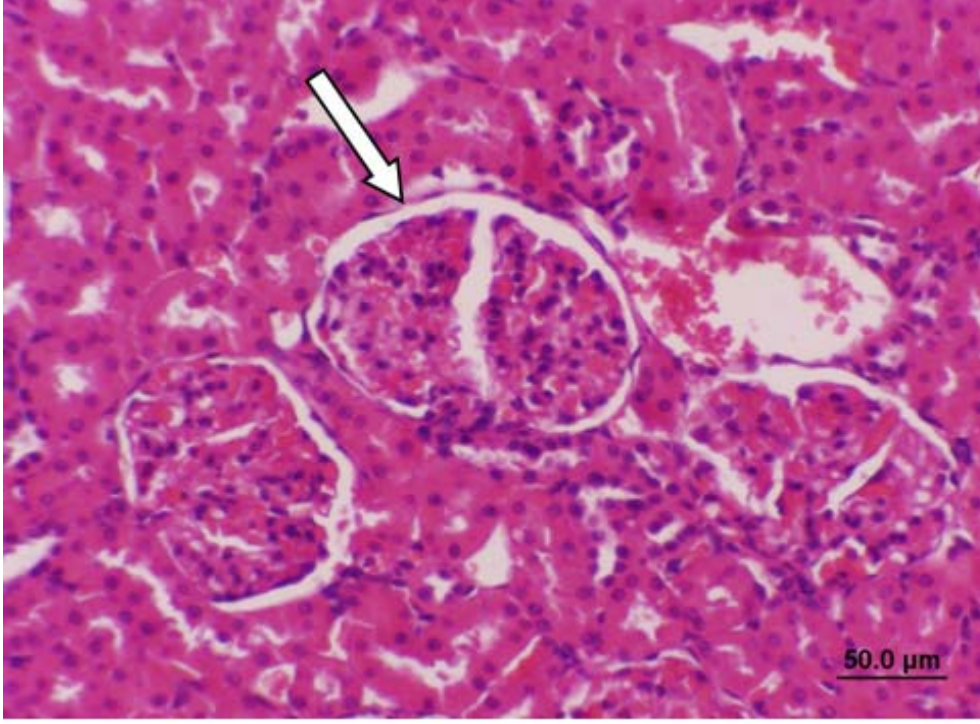
Tablo 4.2.1' de yer alan veriler değerlendirildiğinde kontrol grubuna ait hayvanların hiç birinde BKAD ve tübül hasarının olmadığı (Şekil 4.2.1 ve 4.2.2) görülmektedir.

Tablo 4.2.1' de görüldüğü gibi en fazla BKAD ve tübül hasarı CP' nin tek başına verildiği 50, 100 ve 150 mg/kg CP gruplarında (Şekil 4.2.3 – 4.2.5) gözlenmiştir.

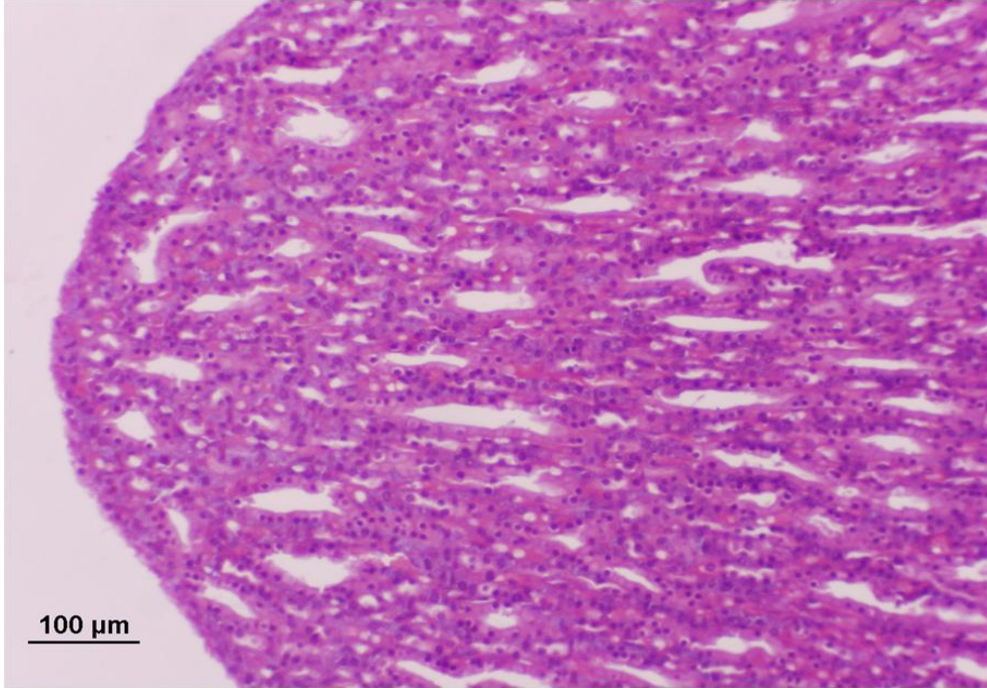
Sadece Se verilen deney gruplarına ait skor puanlarına bakıldığında 0.5 ve 1 mg/kg Se verilen deney gruplarındaki hayvanların bazılarında BKAD ve distal tübül hasarı görülmesine karşın, hayvanların çoğunda mikroskop altında incelendiğinde her iki deney grubunda da BKAD ve tübül hasara rastlanmamıştır (Şekil 4.2.14 – 4.2.16).

50+0.5, 100+0.5 ve 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarına ait skor puanları incelendiğinde bu grupların hiç birinde distal tübül hasarı olmadığı, ancak verilen CP dozu arttıkça bazı hayvanlarda BKAD görüldüğü dikkati çekmektedir (Şekil 4.2.17 – 4.2.22).

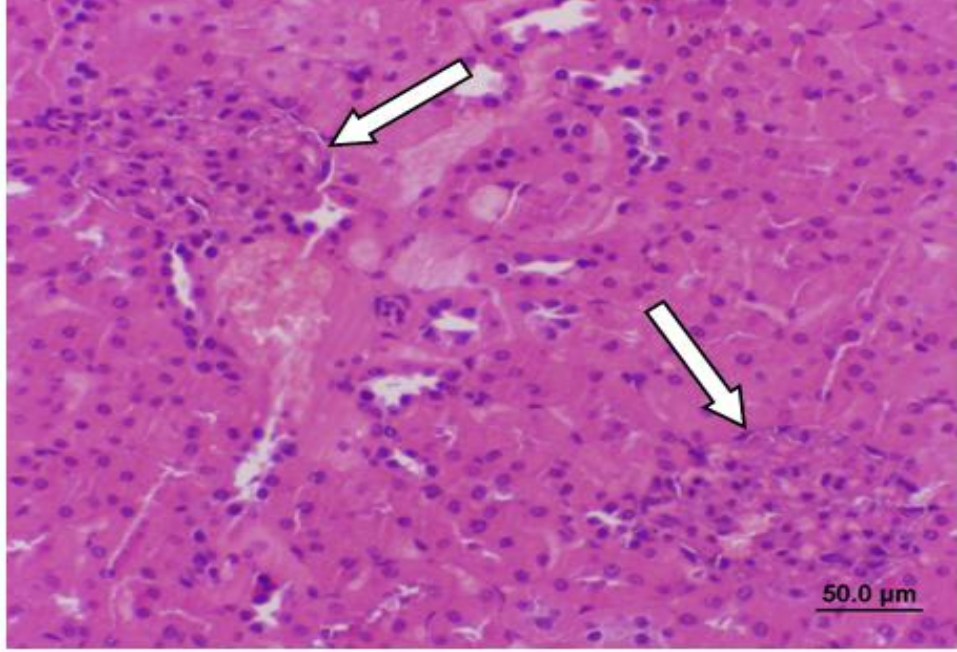
50+1, 100+1 ve 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarına ait skor puanlarına bakıldığında 0.5 Se ile birlikte verilen 50, 100 ve 150 CP gruplardakine benzer histolojik bulgular olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.23 – 4.2.28).



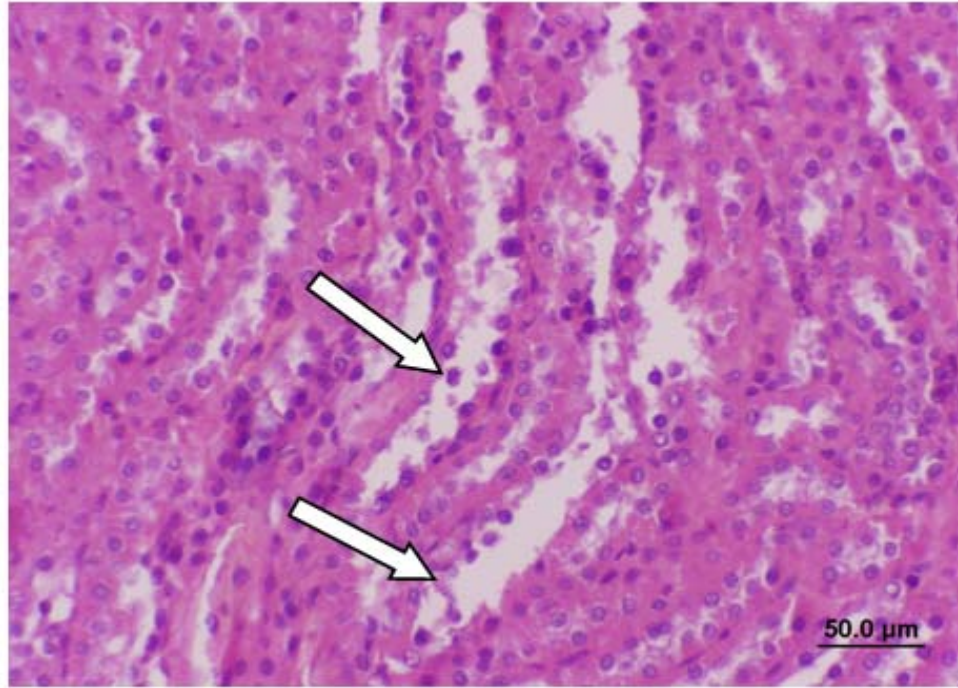
Şekil 4.2.1. Kontrol grubuna ait böbrek korteksinde normal Malpighi cisimleri (→) ve tübüller görülüyor, bar = 50 µm.



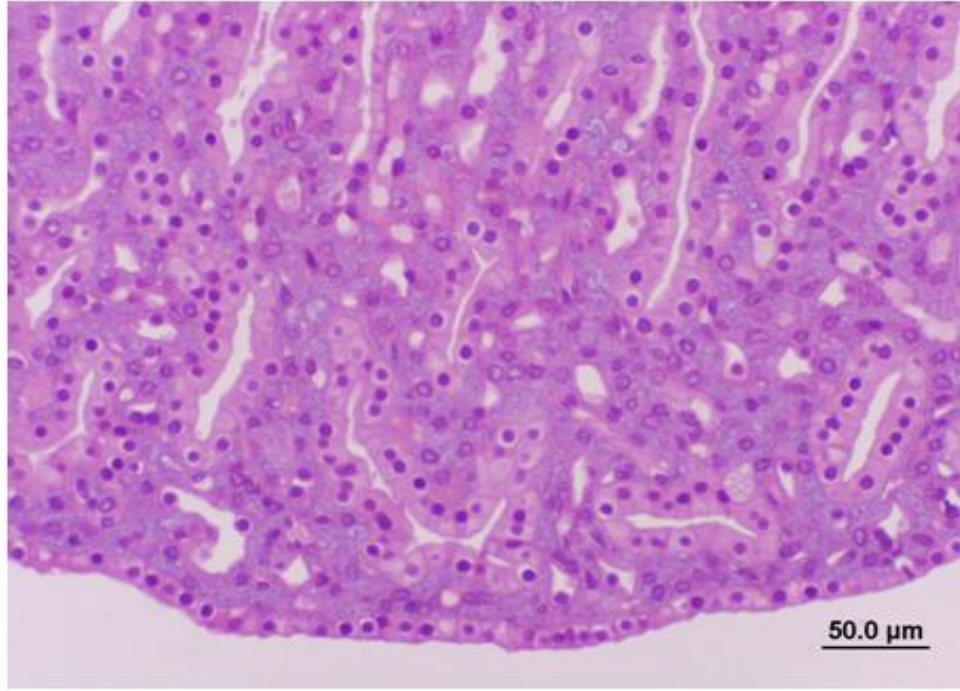
Şekil 4.2.2. Kontrol grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülüyor, bar = 100 µm.



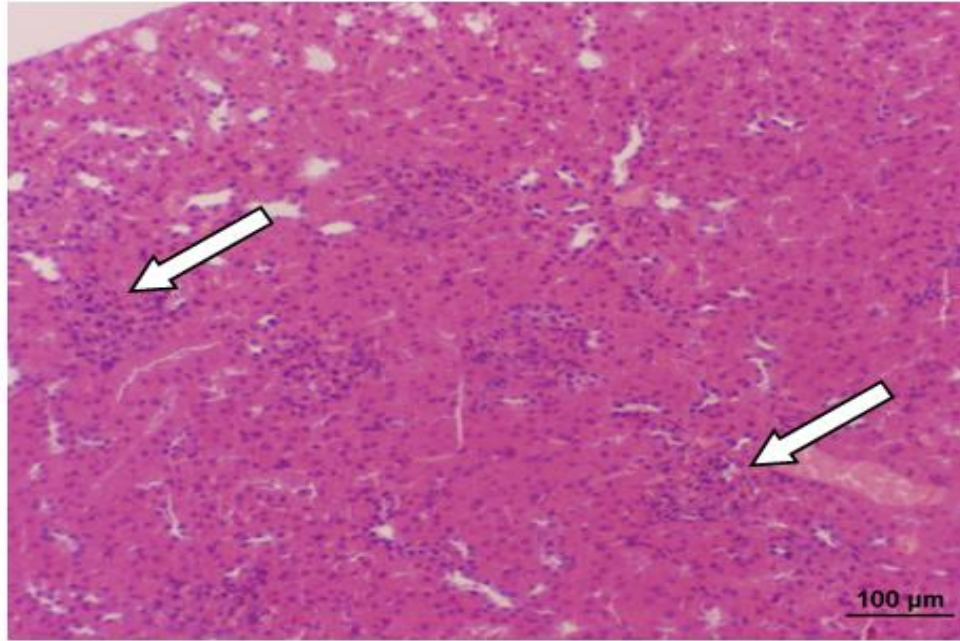
Şekil 4.2.3. 50 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Bowman kapsül aralıkları daralmış Malpighi cisimleri (→) görülmektedir, bar = 50 µm.



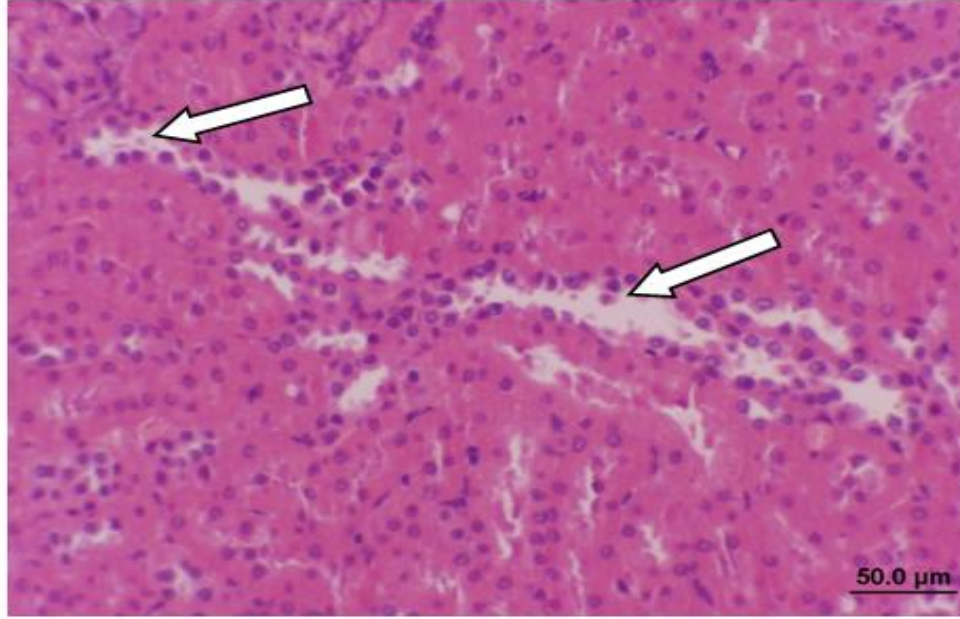
Şekil 4.2.4. 50 mg/kg CP grubuna ait böbrek korteksinde distal tübül hücrelerin hasara uğrayarak lümene döküldüğü (→) görülmektedir, bar = 50 µm.



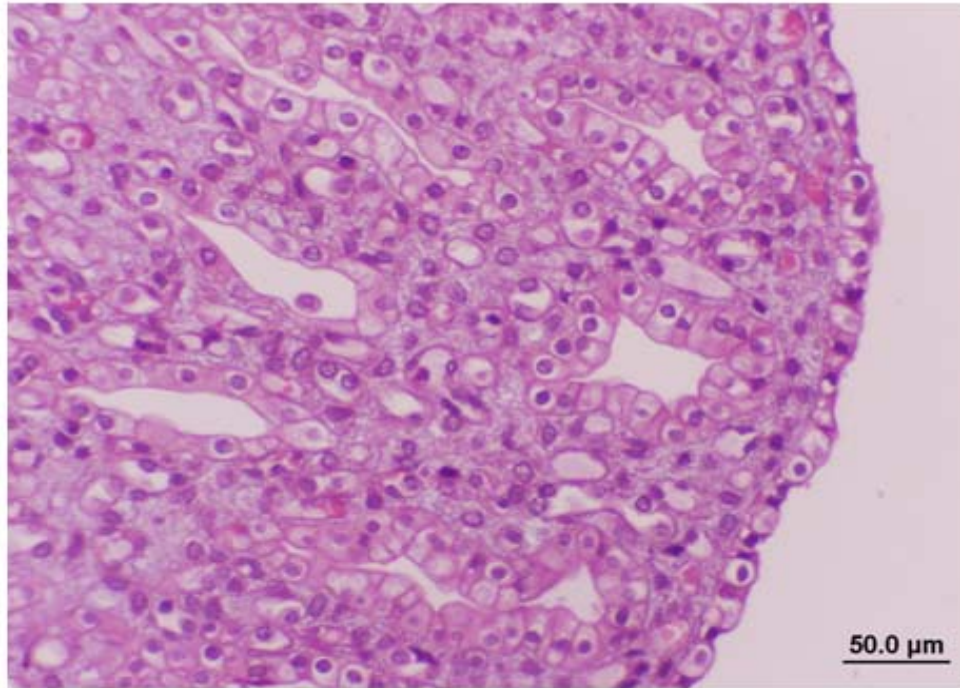
Şekil 4.2.5. 50 mg/kg CP verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 50 µm.



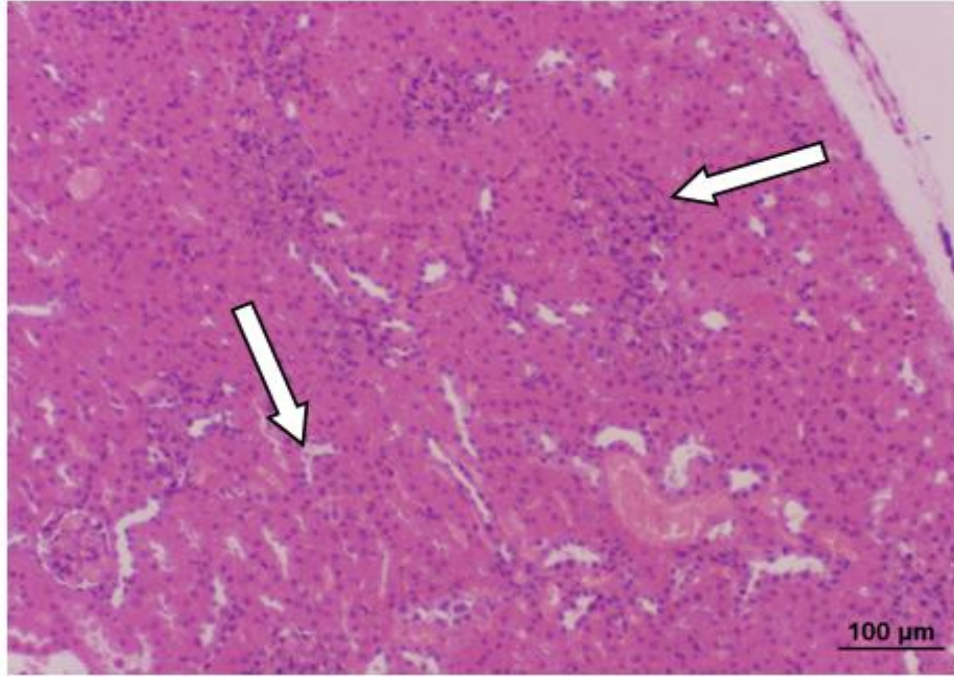
Şekil 4.2.6. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Malpighi cisimlerinde Bowman kapsül aralığında daralma (→) görülmektedir, bar = 100 µm.



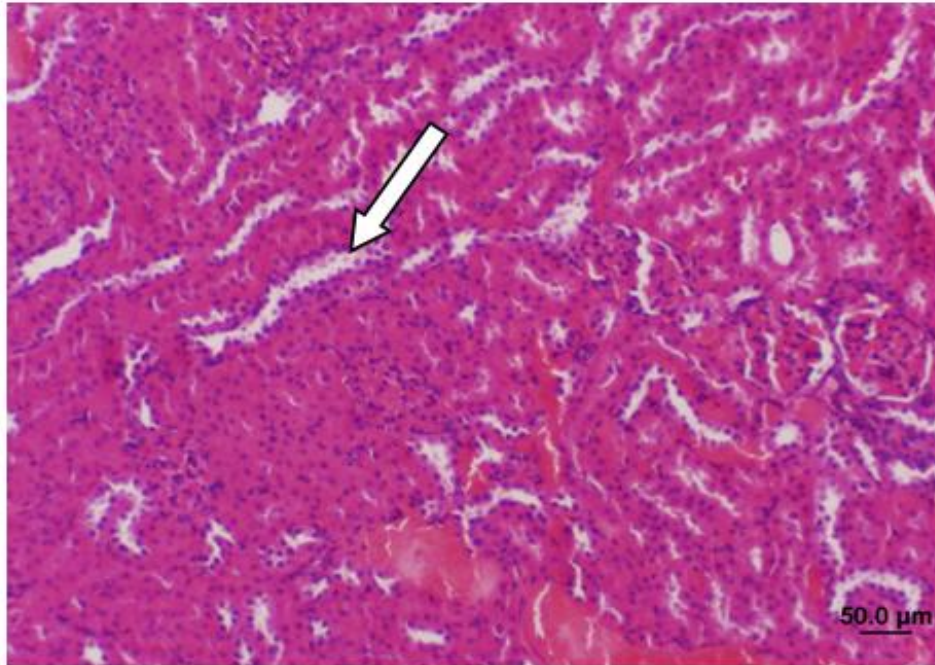
Şekil 4.2.7. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde distal tübül hücrelerinin lümenine döküldüğü (→) görülmektedir, bar = 50 µm.



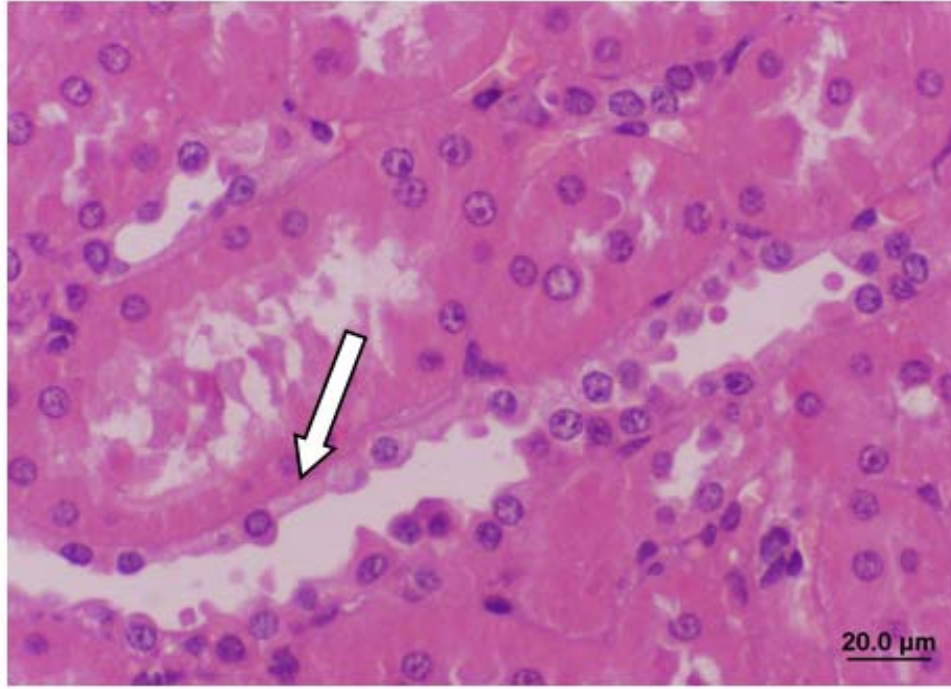
Şekil 4.2.8. 100 mg/kg CP verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 50 µm.



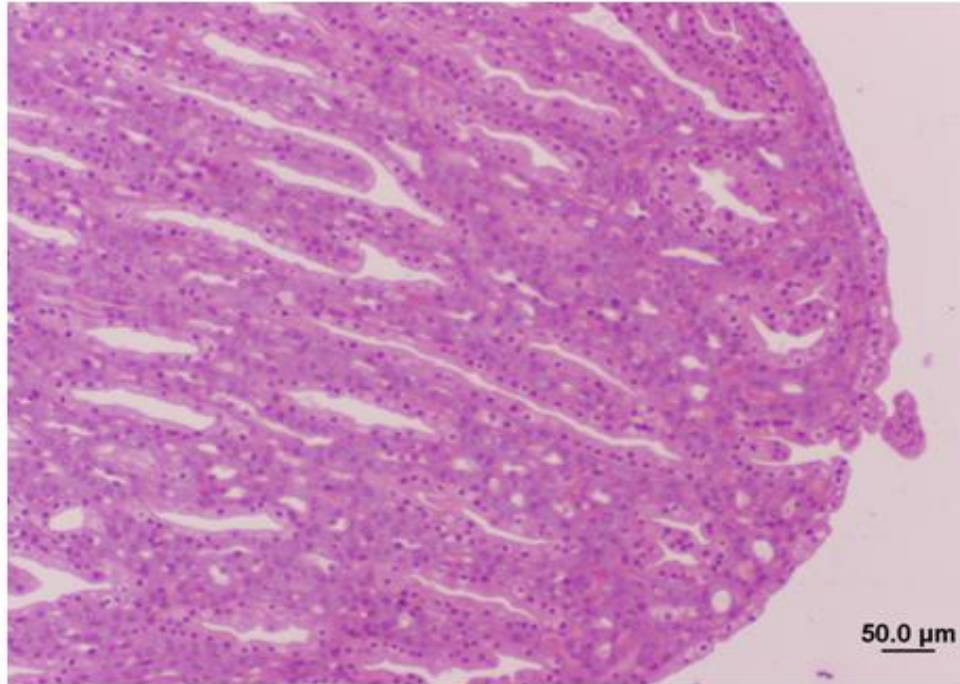
Şekil 4.2.9. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Malpighi cisimlerinde Bowman kapsül aralığında daralma ve distal tübüllerde hasar görülmektedir (→), bar = 100 µm.



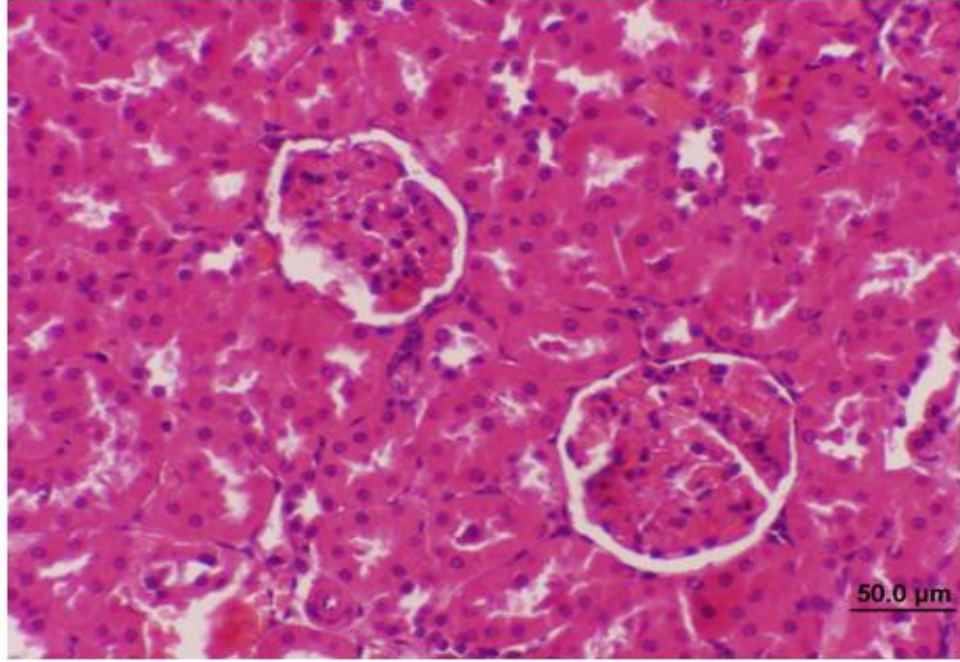
Şekil 4.2.10. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait distal tübüllerde lümene dökülen hücreler görülmektedir (→), bar = 50 µm.



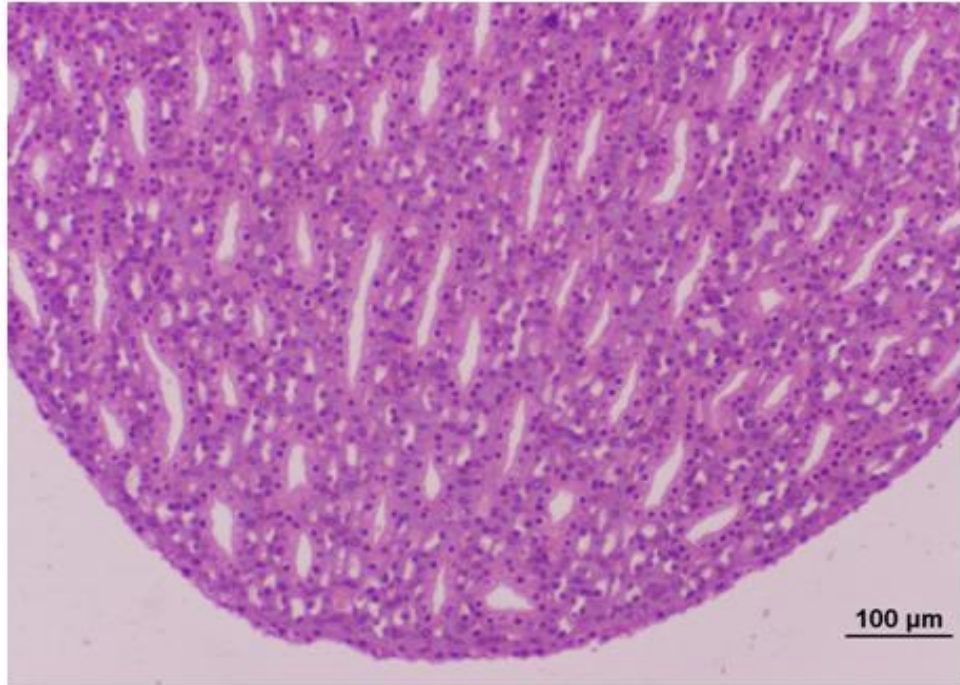
Şekil 4.2.11. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait distal túbül epitel hücrelerinde yassılaşma (→) görölmektedir, bar = 20 μm.



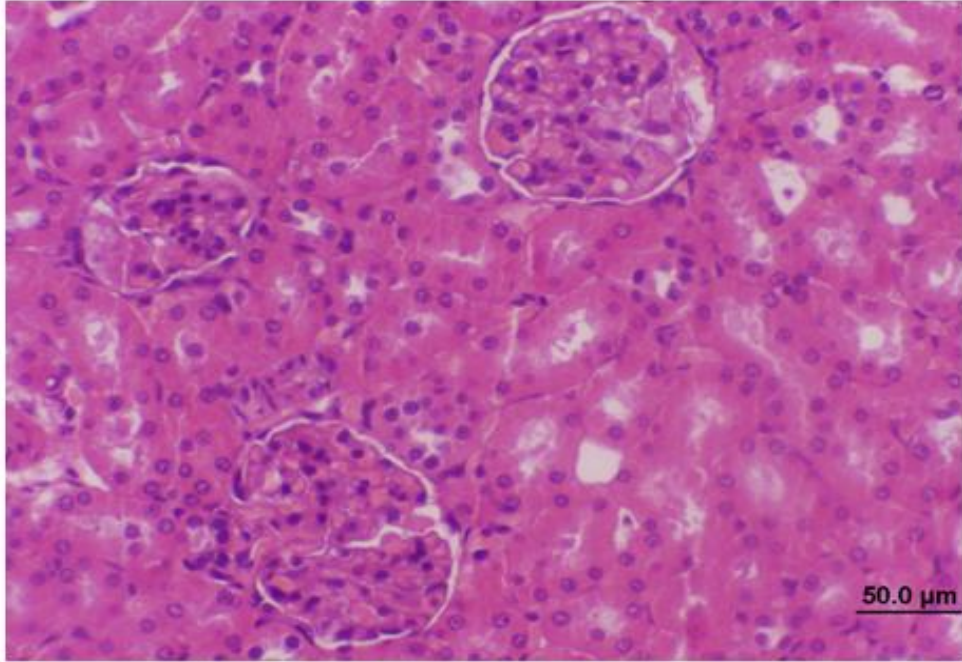
Şekil 4.2.12. 150 mg/kg CP verilen deney grubuna ait normal görünlü böbrek medullası görölmektedir, bar = 50 μm.



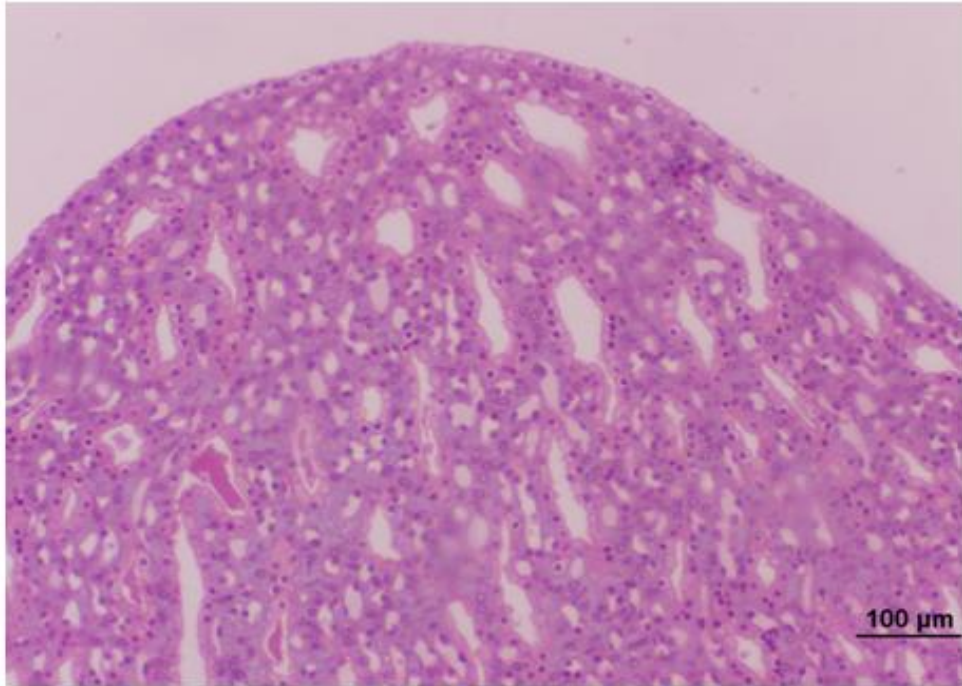
Şekil 4.2.13. 0.5 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görünümlü böbrek korteksi görülmektedir, bar = 50 µm.



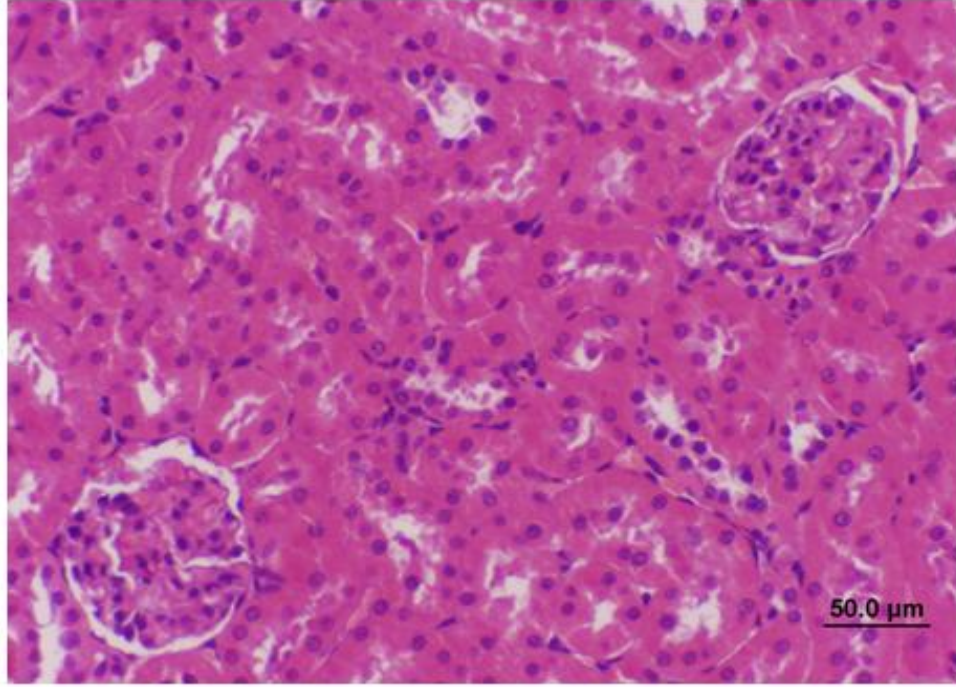
Şekil 4.2.14. 0.5 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 100 µm.



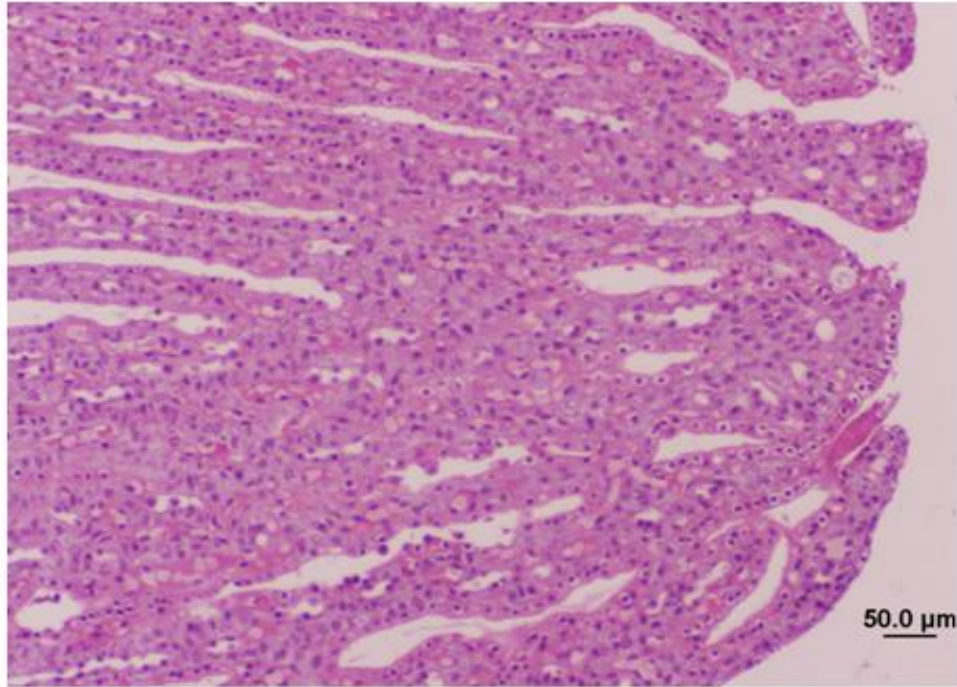
Şekil 4.2.15. 1 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görünümlü böbrek korteksi görülmektedir, bar = 50 μm.



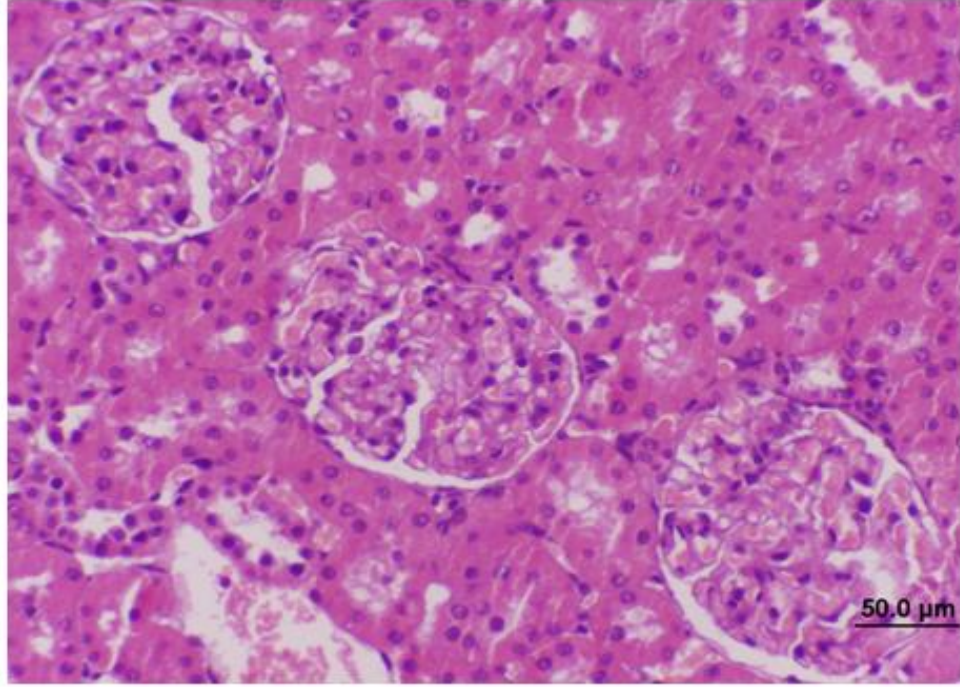
Şekil 4.2.16. 1 mg/kg Se verilen deney grubuna ait normal görüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 100 μm.



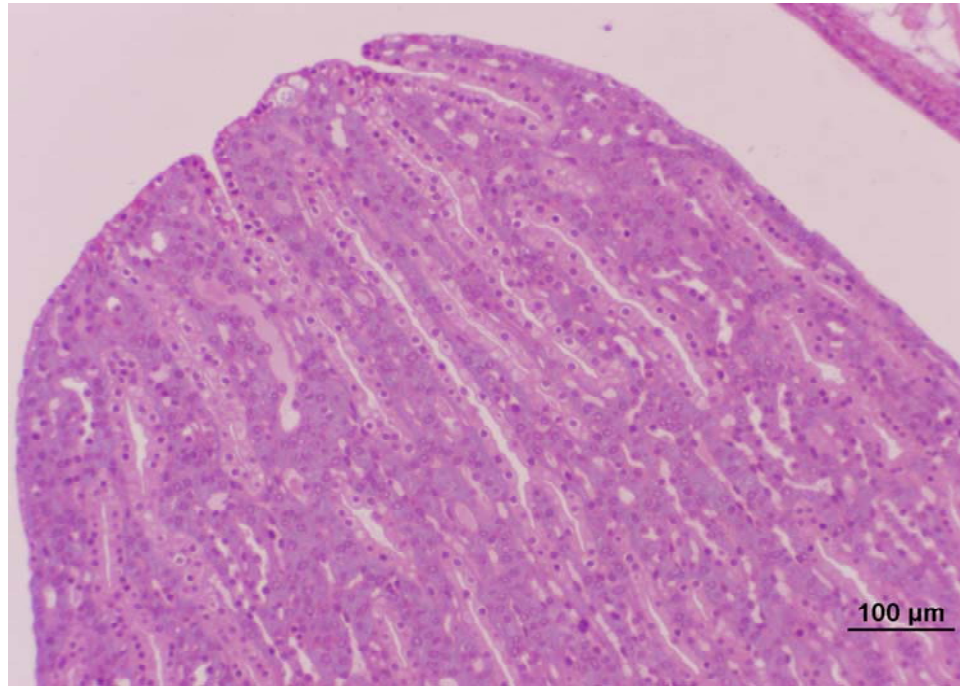
Şekil 4.2.17. 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait normal görünümlü böbrek korteksi görülüyor, bar = 50 µm.



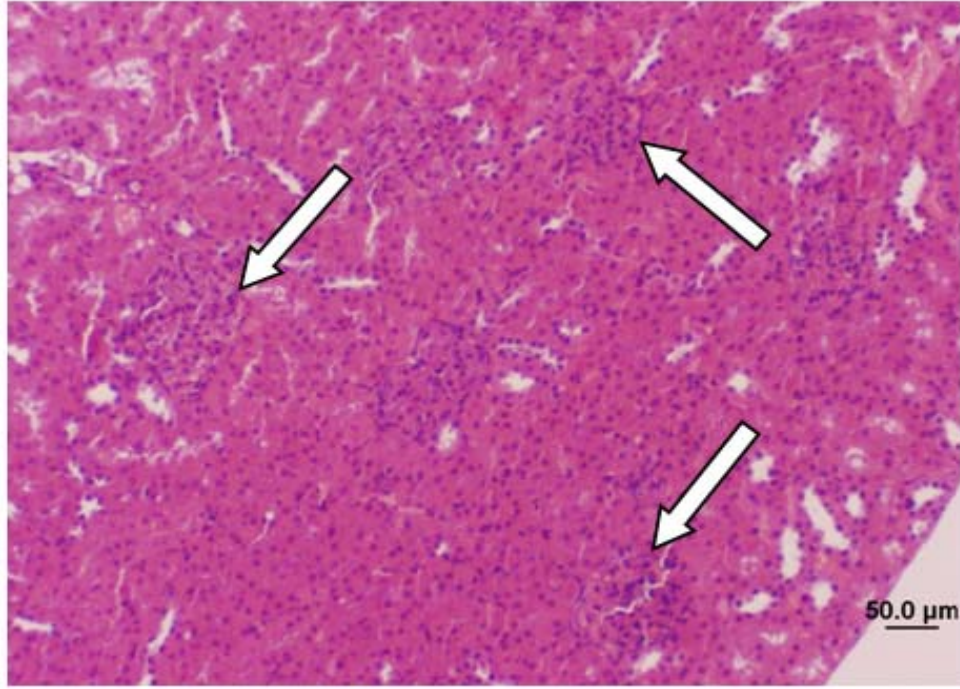
Şekil 4.2.18. 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülüyor, bar = 50 µm.



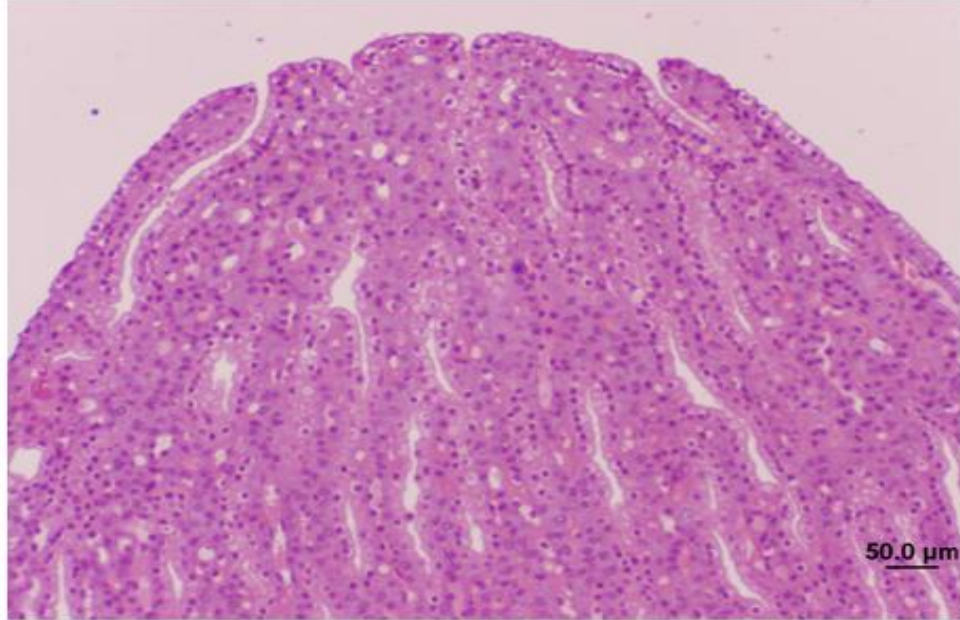
Şekil 4.2.19. 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait normal görünümüne sahip böbrek korteksi görülüyor, bar = 50 µm.



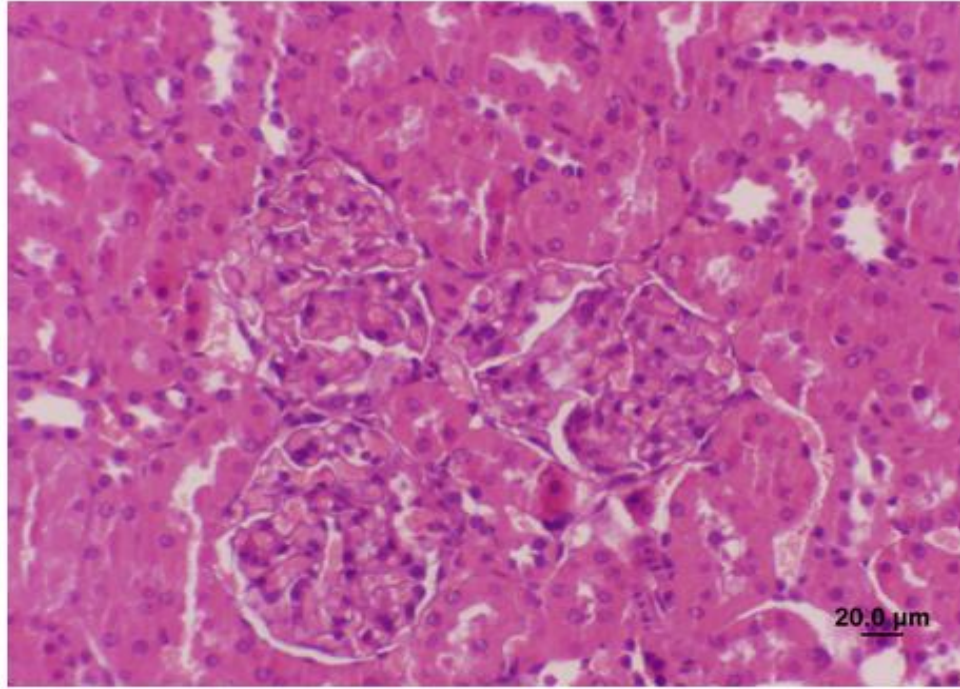
Şekil 4.2.20. 100+0.5 mg/kg CP+Se verilen gruba ait normal görünümüne sahip böbrek medullası görülüyor, bar = 100 µm.



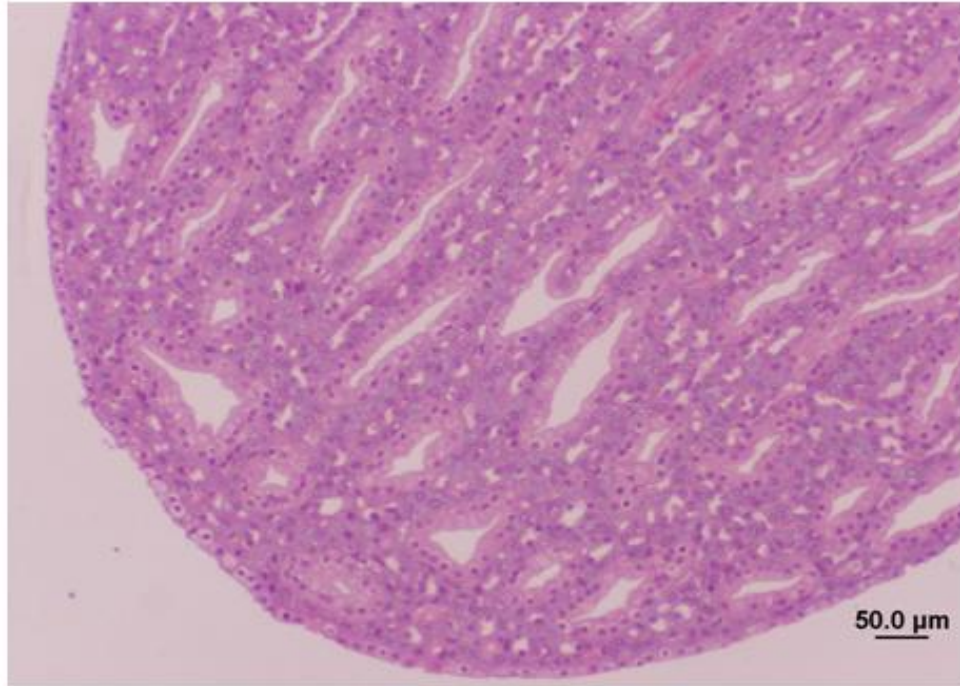
Şekil 4.2.21. 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait böbrek korteksinde Bowman kapsül aralıkları daralmış Malpighi cisimleri (→) görülmektedir, bar = 50 µm.



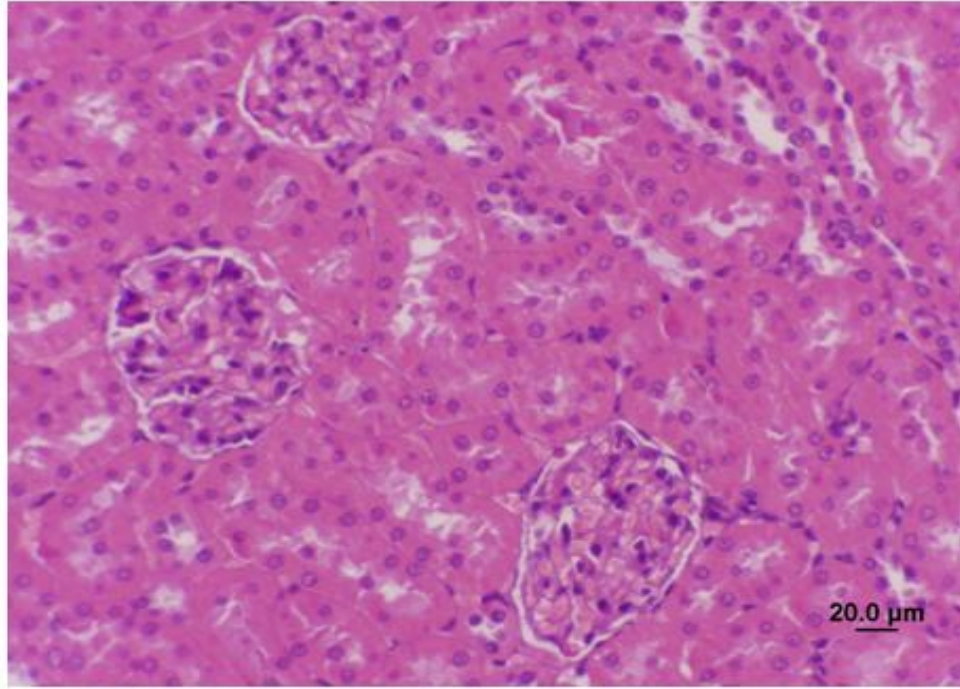
Şekil 4.2.22. 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 50 µm.



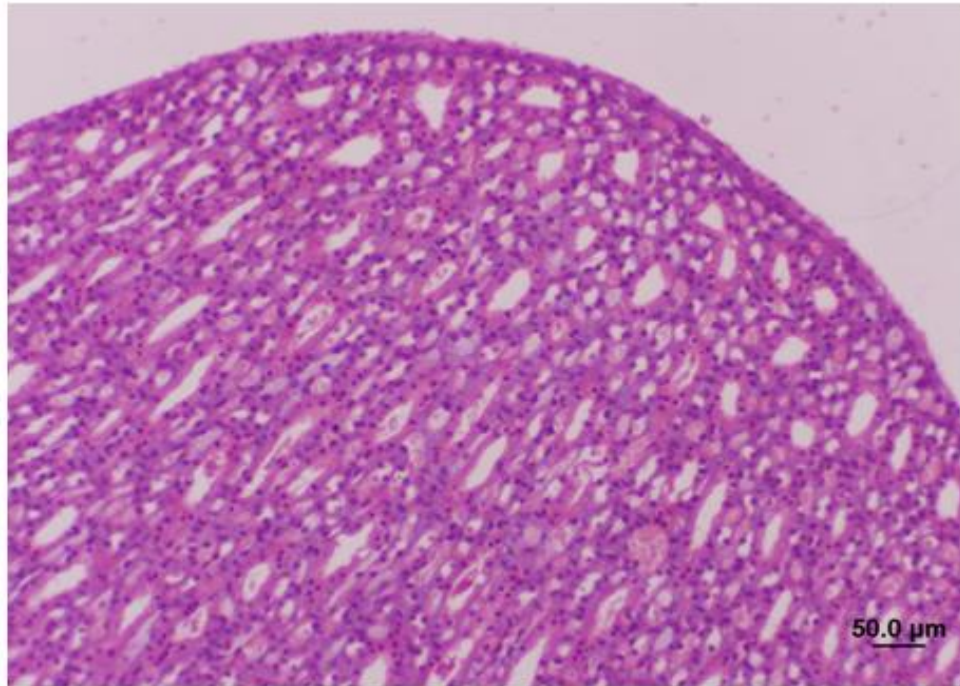
Şekil 4.2.23. 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek korteksi görülmektedir, bar = 20 µm.



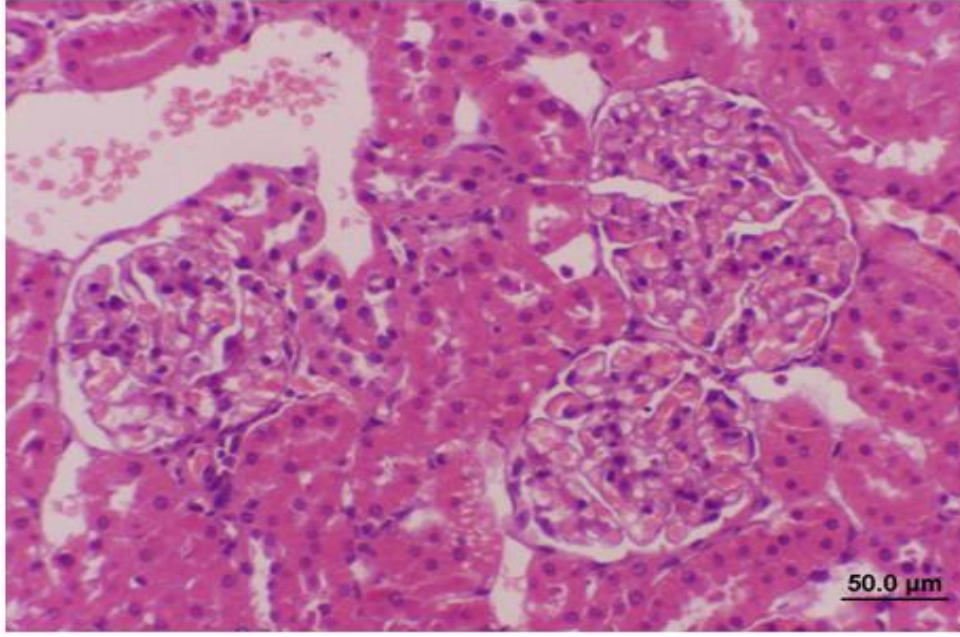
Şekil 4.2.24. 50+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 50 µm.



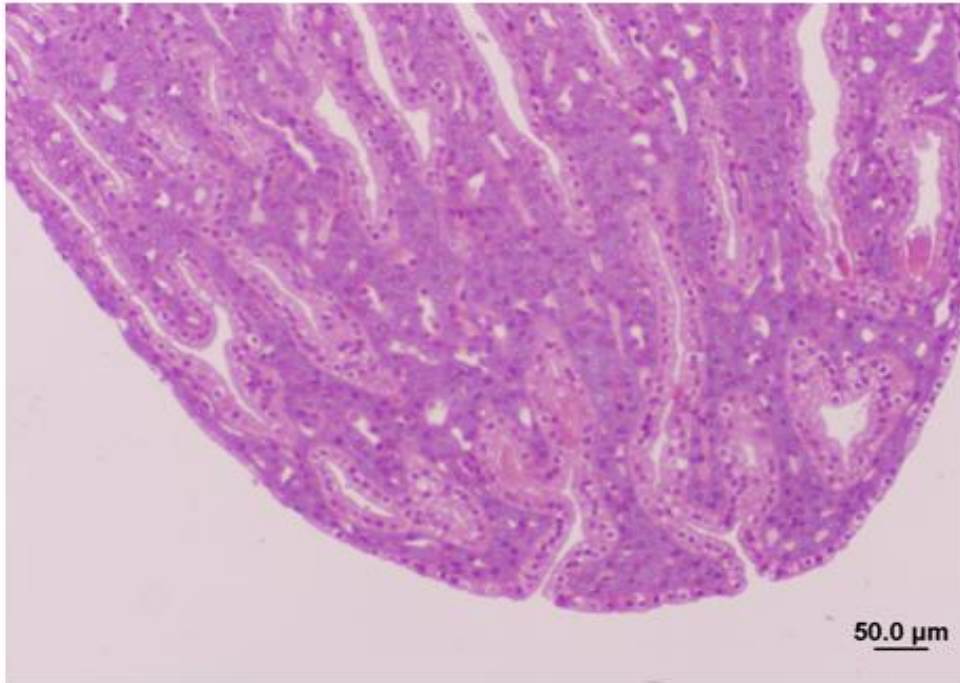
Şekil 4.2.25. 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek korteksi görülmektedir, bar = 20 µm.



Şekil 4.2.26. 100+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülmektedir, bar = 50 µm.



Şekil 4.2.27. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normale yakın görümlü böbrek korteksi görülüyor, bar = 50 µm.



Şekil 4.2.28. 150+1 mg/kg CP+Se verilen deney grubuna ait normal görünüme sahip böbrek medullası görülüyor, bar = 50 µm.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada CP' nin böbrekteki toksik etkisini ve dolayısı ile koruyucu ajana (Se) bağlı olarak gelişen değişiklikleri belirlemek için biyokimyasal değişkenler (GSH ve MDA) kullanarak histolojik incelemeler yapılmıştır.

CP kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir kemoterapötik ajandır [Büyüknacar et al., 2008]. İdeal olarak, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar kanser hücrelerini yok ederken, normal dokuları olumsuz biçimde etkilememelidir. Ancak bugün de kullanılan CP gibi yüksek doz alkilleyici (DNA' yı etkileyen) ajanlar bu koşulu tam olarak yerine getirmemektedir [Katzung, 2001].

CP' nin antitümöral etkinliği yüksek dozda kullanılabilmesine bağlıdır [Osborne et al., 1987]. Ancak yüksek doz CP kullanımı mesanede akut inflamasyona, böbrek hasarına ve karaciğer hasarına neden olur [Kopečna, 2001; Kumar and Kuttan, 2004; Abraham, 2009].

Hemorajik sistit, siklofosfamid tedavisinin iyi bilinen bir ürolojik komplikasyonudur. Öte yandan, siklofosfamide bağlı en önemli renal yan etkilerden biri de hiponatremidir. Hiponatremi, antidiüretik hormon (ADH)' un artmış etkisi nedeniyle su ekskresyonunun bozulmasına bağlı gelişir. Hiponatremi daha çok intravenöz yüksek doz siklofosfamid tedavisi sonrası izlenebilir. Hiponatremi genellikle akut gelişir ve ilacın kesilmesiyle 24 saat içinde düzelir. Kemoterapi ilaçları glomerül, tübül veya interstisyum düzeyinde etkili olarak böbrek fonksiyonlarını bozabilir [Bode et al., 1980; Bressler and Huston, 1985].

Plazma kreatinin seviyesi böbrekteki glomerular fonksiyonun göstergesidir [Sugumar et al., 2007]. Nefrotoksisite ise serum kreatinin konsantrasyonunun plazmada normal seviyenin üstüne çıkması (≥ 0.5 mg/dl) olarak tanımlanır [Caglar et al., 2002]. Sıçanlarla yapılan bir deneyde CP' nin düşük dozlarda plazma kreatinin seviyesine etki etmediği ve renal hasara neden olmadığı tespit edilmiştir [Sugumar et al., 2007]. Abraham ve Rabi (2009) tarafından yapılan çalışmada ise i.p olarak uygulanan 150 mg/kg CP' nin plazma kreatinin seviyesinde değişmeye neden olmadığı ancak histolojik incelemelerde renal hasara rastlandığı bildirilmiştir. Bizim deneysel bulgularımızda da böbrek dokusundaki hasar 50, 100 ve 150 mg/kg CP verilen deney gruplarında doz

artışına paralel olarak hem histolojik incelemelerde hem de biyokimyasal değişkenlerde ortaya çıkmıştır (Tablo 4.1.1 ve 4.2.1).

CP analogu olan Ifosfamid (IP) ile karşılaştırıldığında daha az nefrotoksik etkiye sahiptir ve bu nedenle CP' nin neden olduğu böbrek hasarının mekanizması fazla çalışılmamıştır [Abraham and Rabi, 2009]. CP' nin nefrotoksik mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak tübül hücrelerinde serbest radikal ve lipid peroksidasyonu oluşumuna neden olduğu öne sürülmektedir [Naziroglu et al., 2004; Yilmaz et al., 2005].

Çalışmamızda sadece CP uygulanması nefrotoksisiteye neden olmuştur; düşük AO aktivitesi (GSH azalması) ve artan lipid peroksidasyonu (MDA artışı) ile birlikte saptadığımız histolojik değişimler de bunu kanıtlamaktadır (Tablo 4.1.1). Nitekim sadece 50, 100 ve 150 mg/ kg CP verilen deney gruplarında AO GSH düzeyleri doz artışına paralel olarak sırasıyla %9, %28 ve %39 oranlarında azalmış, lipid peroksidasyon ürünü MDA ise sırasıyla %13, %36 ve %45 oranlarında artmıştır. Diğer taraftan aynı dozlardaki CP böbrek dokusunda BKAD ve tübül hücrelerinde hasara neden olmuştur. Bu parametreler böbreğin CP kemoterapisi sırasında hasarlandığını göstermektedir. 150 mg/kg CP verdiğimiz sıçanlarda 50 ve 100 mg/kg CP verilen gruplara göre ortaya çıkan hasar böbreğin CP varlığında gördüğü zararın doza bağlı olduğu anlamına gelebilir.

Philips ve ark. (1961) tarafından yapılan deneysel bir çalışmada erkek sıçanlara i.p olarak tek doz uygulanan CP (222 mg/kg)' nin renal papiller nekroza (RPN) neden olduğu bildirilmiştir. Daha sonraları CP' nin nefrotoksisiteye neden olduğuna dair bir kaç çalışma daha yapılmıştır. Bu çalışmaların tümünde uzun süreli CP kullanımının renal tübüler nekroza, glomerular değişikliklere ve lizozomal enzim aktivitesinde anlamlı ölçüde düşüğe neden olarak renal hasara yol açtığından bahsedilmiştir [Levine and Sowinski 1974; Lavin and Koss, 1971; Hsu and Tsai, 1982; Abraham et al., 2007]. 10 günlük yüksek doz CP uygulamasının ölüme bile sonuçlanabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [Gharib and Burnett, 2002]. Ancak CP' nin akut böbrek hasarına neden olduğuna dair yapılan çalışma sayısı çok azdır.

Yapılan bazı çalışmalarda 6, 12, 24 ve 48 saat sonra anestezi edilen sıçanlarda 150 mg/kg CP uygulamasının böbrek dokusundaki hasarı çok fazla artırdığı

kaydedilmiştir [Al Salloum et al., 2003; Senthilkumar et al., 2006; Cayir et al., 2009]. Bizim çalışmamızda da böbrekte gözlenen hasarın beklenenden az olması CP toksisitesinin akut olduğu anlamına gelebilir. Nitekim biyokimyasal parametrelerde saptadığımız artmış MDA düzeyi ve azalmış GSH seviyesi böbrek hasarını çok net bir şekilde ortaya koymuştur. Sıçanlar CP uygulamasından 3 gün sonra anestezi edilmiştir. Bu süre içerisinde böbrek dokusu kendisini onarmış olabilir.

CP' nin iki aktif metaboliti fosforamid mustard (FAM) ve akroleindir (ACR). CP' nin antineoplastik etkileri FAM ile ilişkilidir. FAM' ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP' nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir [Kawabata et al., 1990]. CP' nin toksik etkisi aktif metaboliti olan ACR ile ilgilidir. ACR doku AO savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda SOR oluşumuna yol açar ve memeli hücreleri için mutajeniktir. ACR kaynaklı oluşan serbest radikaller; enzim, reseptör, iyon pompaları gibi moleküllerle birleşerek onların fonksiyonlarını bozarlar [Senthilkumar et al., 2006].

Oksijenli solunum yapan canlılarda, serbest oksijen radikalleri kaçınılmaz bir şekilde oluşmaktadır. Bu aktif oksijen radikalleri süperoksit, hidrojen peroksit, serbest hidroksil radikali ve bunların etkisiyle oluşan lipid peroksitleri ve diğer benzer türevleri hücrenin farklı kısımlarında bulunan protein, karbonhidrat, lipid ve DNA gibi molekülleri etkileyerek önemli değişikliklere neden olurlar. Özellikle hücrelerde bulunan doymamış yağ asitleri bunlar için çok iyi birer hedeftirler [Karataş ve ark., 2006].

Serbest radikaller; ortaklanmamış elektron içeren, reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir. Bu moleküller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de ilaçların ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisiyle oluşabilmektedir. Birçok hastalık, doku yıkımı, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşur. Organizmada serbest radikal reaksiyonları birçok AO sistemi ile kontrol edilir [Kurt et al., 2005]

AO' lar serbest radikal oluşumunu önleyen veya zincir kıran yapılar olarak iş görürler. Serbest radikallerin oluşum hızı, bunları etkisiz hale getiren veya azaltan katalaz (Cat), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi bazı

endojen AO enzimlerden oluşan savunma sistemlerinin hızı ile dengede olduğu sürece, organizma etkilenmez. Ancak bu denge bozulursa, serbest radikaller zararlı olmaya başlar ve oksidatif stres şeklinde etkilerini gösterirler [Kurt et al., 2005].

Kanser, anormal vücut hücrelerinin kontrolsüz üremeleri ile meydana gelen bir doku kitlesi olarak tanımlanmaktadır. Dünyada her yıl binlerce kişi kanser nedeniyle ölmektedir. Günümüzde antioksidanların kanser üzerine etkileri yaygın olarak araştırılmaktadır [Hulka and Stark, 1995].

Neoplastik hastalıklarda, CP kemoterapisi boyunca, ACR' nin toksik yan etkilerinden kaçınmak için bazı AO ajanlar kullanılarak bu toksik etkilerin detoksifiye edilmesi gerekir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda da AO' ların karsinogenezin başlama ve gelişme dönemini baskıladıkları, hücre ölümü ve değişimini önlediklerini göstermiştir [İşcan ve Çoban 1998].

Bir klinik çalışmada platinum nedenli böbrek hasarına karşı bir tiyol antioksidant olan amifostinin sitoprotektif etkileri olduğu belirlenmiş ancak hipokalsemi, anksiyete ve hipotansiyon gibi toksisitelerinden dolayı bundan kaçınılmaktadır. Sodyumtiyosülfat, mesna ve procainamide gibi diğer sitoprotektif ajanlar etkinliklerinin yetersizliği yüzünden geniş klinik kullanımlar için onaylanmamaktadır. Bu bileşikler aynı zamanda tümör dokusunda platin ve alkilleyici ajanlar tarafından oluşturulan toksisiteye karşı sitoprotektivitede seçici değildir [Senthilkumar et al., 2006]. Bu yüzden tümör koruyucu ve tümör büyümesini uyarıcı özellikler olmaksızın normal dokuları kemoterapi nedenli toksisitelerden koruyabilecek yeni ajanlara ihtiyaç vardır.

Bazı in vivo ve in vitro bulgular sitotoksik ajanların neden olduğu hücrel toksisitelerin bu AO' lardan biri olan selenyumun kullanılmasıyla önemli ölçüde önlenebileceğini göstermektedir. Se' un, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek hücre zararını koruyucu rolünün yanı sıra [Ilio et al., 1987], antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkili olduğu [Dai et al., 1999] ve antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini arttırdığı, sisplatin gibi sitotoksik ajanların toksik yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir [Yang et al., 2000].

Se bileşiklerinin yoğun bir şekilde kimyasal önleyici ajanlar olarak değerlendirilmesine rağmen, bu ajanın potansiyeli ile ilgili bazı yayınlarda antikanser ilaçların koruyucu etkileri ve toksisitelerinin modifikasyonlarında etkili olduğu değerlendirilmektedir [Cao et al., 2004].

Se, canlı organizmalar için esansiyel bir iz mineral olup organizmada doymamış yağ asitlerinin oto-oksidasyonunu engeller. Bunun nedeninin, selenyumun serbest radikalleri inaktivite eden ve böylece lipid peroksidasyonunun oluşmasını engelleyen “glutasyon peroksidaz” enziminin merkez katalitik yapısını oluşturmasından kaynaklandığı belirtilmektedir [Tos-Luty et al., 2003].

Araştırmacılar Se’ un, glutasyon peroksidaz enzim sisteminin esansiyel bir parçası olduğunu buldular [Burk et al., 1999]. Glutasyon, glutasyon peroksidazın koenzimi olup SOR’ un giderilmesinde anahtar rolü oynamaktadır. Se’ un lipid peroksidasyonunu baskılayarak hücre zararını koruyucu rolünün yanı sıra, antioksidanlarla etkileşimi sayesinde kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkili olduğu ve antineoplastik ilaçların terapötik etkinliğini artırdığı, sisplatin gibi sitotoksik ajanların toksik yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir [Ilio et al., 1987; Dai et al., 1999; Yang et al., 2000]. Bizim çalışmamızda da güçlü antioksidan etkisi bilinen Se’ un 0.5 ve 1 mg/kg’ lık dozlarının 50, 100 ve 150 mg/kg CP nedenli böbrek hasarını önemli oranda düzelttiği gözlenmiştir.

GSH-Px aktivitesi için gerekli bir metal olan selenyumun diyetle alınmamasının, sıçan böbreklerinde yapısal ve fonksiyonel hasara yol açması böbrek hastalıklarında AO enzimlerin önemini göstermesi açısından iyi bir deneysel model olmuştur [Nath and Paller, 1990].

Nath ve Paller (1990) iskemi-reperfüzyon modelinde selenyum ve vitamin E diyetinden yoksun bırakılan deney hayvanlarında, yapısal ve fonksiyonel böbrek hasarını göstermiş ayrıca bu hayvanlarda yüksek MDA seviyeleri tespit ederek, kontrollerde hiç görülmeyen mortalitenin diyetten yoksun bırakılan sıçanlarda %50 seviyelerine çıktığını ortaya koymuşlardır.

Düşük doz ve yüksek doz Se’ un diyetle eksik ya da aşırı alınımı Keshan ve Kashin Beck’s hastalıklarını içeren klinik belirtilere neden olmaktadır. Se eksikliği semptomları; kas ağrıları, kilo kaybı, saç ve deride pigment kaybı, tırnak yataklarında

beyazlamadır [Groff et al., 1995]. Se eksikliği diğer elementlerle etkileşimden de meydana gelebilir. Kurşun (Pb) selenyum ile etkileşir ve elementin doku düzeyini belirgin şekilde azaltır. Bu olayın mekanizması tam olarak açıklanmamış olmakla birlikte, her iki elementin de sülfidril gruplarına bağlanıyor olmasından kaynaklandığına ilişkin görüşler öne sürülmektedir. Görünüşe göre demir (Fe) ve bakır (Cu) da Se ile etkileşerek elementin dokuya alınımını inhibe etmektedir. Beden azalmış metiyonin düzeyi ile karşı karşıya kaldığında bu açığı beden proteinlerine Se bağlayarak kapatır ve bu da bedende erişilebilir serbest Se düzeyini düşürür [Burk et al., 1999].

Se normal büyüme ve hücre fonksiyonları için gerekli olan bir iz elementtir. Hem eksikliği hem de fazlalığı hastalık ya da toksisiteye neden olur ve eksikliği ile toksisitesi arasındaki sınır çok dardır. Se' un besinsel gerekliliği hücrel redoks süreçlerine katılan tiyoredoksin redüktaz, glutatyon peroksidaz ve diğer birçok kritik enzim ile ilişkilidir. Bu selenoproteinler, memelilerde tümör gelişiminin baskılanmasında rol alır. Bu etkiyi hücre döngüsünün redokslarını, büyümeyi teşvik eden transkripsiyon faktörlerini ve apoptozisini kontrol ederek yaparlar [Ramos et al., 2004].

Se' un verilmesi ile klinik bulguların normale dönmesi selenyumun sitoprotektif etkileri olduğu yönündeki düşünceleri güçlendirmektedir. Sıçanlarla yapılan çalışmalarda, selenyumun diyetle eksik alınmasının normal sıçanların tübüler epitelinde GSH-Px aktivitesinin azalmasına neden olduğu bildirilmektedir. Se' un antikanser rolüne ek olarak, çeşitli ağır metallerin (Cd, Hb, Pb, Ar gibi) belirgin toksik etkilerine karşı dayanıklılık sağlama yeteneği tespit edilmiştir. Se' un kadmiyum ile birlikte uygulandığı deneysel bir çalışmada, kadmiyum tarafından karaciğer ve böbrekte oluşturulan hasar Se tarafından anlamlı bir şekilde azaltılmıştır [Khattab, 2007]. İnsan baş, boyun ve kolon karsinomu taşıyan genç farelere uygulanan antikanser ilaçlara karşı 0.2 mg/kg Se' un oldukça yüksek bir koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır [Cao et al., 2004]. Clayton ve Baumann, (1949) tarafından yapılan bir çalışmada p-aminoazobenzene maruz bırakılan sıçanlardaki tümörlerin Se ile anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir.

Bu çalışmada 50+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarında 0.5 mg/kg Se, GSH seviyesini %17 oranında artırarak, böbrek dokusunda önemli derecede koruma sağlamıştır. Böbrekteki bu koruma büyük olasılıkla ACR' nin neden olduğu serbest radikal artışının ve buna bağlı olarak gelişen böbrek hasarının Se varlığında GSH-Px enzim aktivitesinin artırılarak serbest radikallerin önemli ölçüde yok edilmesiyle açıklanabilir. Diğer taraftan 150+0.5 mg/kg CP+Se verilen deney gruplarında, 0.5 mg/kg Se GSH seviyesini %10' luk bir oranda artırmış olsa da koruma sağlayamamıştır. 1 mg/kg Se ise aynı dozdaki CP toksisitesini 0.5 mg/kg Se' dan daha az korumakla birlikte sadece 50 mg/kg CP alan deney grubundan daha iyi korumuştur. Bu sonuç, düşük doz CP ile birlikte düşük doz Se (0.5 mg/kg) ve yüksek doz CP ile birlikte ise yüksek doz Se (1 mg/kg)' un daha koruyucu olduğu anlamına gelebilir.

Wlodarczyk ve ark., (2000)' nin hamsterlarda yaptıkları bir deneysel çalışmada; düşük dozda Se (1 mg/kg)' un kadmiyum nedenli gelişimsel toksisiteye karşı çok koruyucu olduğu, buna karşılık daha yüksek dozdaki Se (2 mg/kg)' un böyle ciddi bir koruma sağlamadığını belirlemişlerdir. Se 'un yüksek dozlarının hayvanlarda bir gelişim toksikantı olduğu ispatlanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Bulgularımızda hiç bir grupta sitolojik olarak nekroz, kanama, ödem, iltihabi hücre artışı, proksimal tübül hasarı ve tübül lümeninde eozinofilik materyal birikimi görülmezken; Bowman kapsülü aralığında daralma ve tübül hasarına rastlanmıştır. 0.5 mg/kg Se 50 ve 100 mg/kg CP nedenli nefrotoksisitenin önlenmesinde etkili olurken 150 mg/kg CP' nin neden olduğu böbrek hasarının önlenmesinde 1 mg/kg Se 0.5 mg/kg Se' a göre daha etkili olmuştur. Ancak 50 mg/kg CP ile birlikte 0.5 mg/kg Se kullanıldığında parametrelerin kontrol grubu ile aynı olduğu ve böylece tam bir koruma yaptığı saptanmıştır. Deneysel bulgularımız bu dozlardaki Se' un tek başına toksik olmadığını göstermiştir.

Bu gözlemlerden CP uygulamasının toksik metabolitlerinden dolayı böbrekte oksidatif strese ve doku hasarına neden olduğu sonucunu çıkartmak mümkündür. CP' nin her üç dozu (50, 100 ve 150 mg/kg) ile birlikte kullanılan her iki doz (0.5 ve 1 mg/kg) Se böbreği önemli oranda korumuştur. Bu durum Se' un AO kapasiteyi

artırarak CP' nin toksik metabolitlerinin etkilerini ortadan kaldırdığı şeklinde yorumlanabilir.

Sonuçlarımız literatür bildirimleriyle uygunluk göstermekle birlikte bu konuda daha kapsamlı araştırmalar yapılması gerektiğine inanıyoruz.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

Abraham P, Indirani K, Sugumar E (2007) Effect of cyclophosphamide treatment on selected lysosomal enzymes in the kidney of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59 143–149.

Abraham P, Rabi S (2009) Nitrosative stress, protein tyrosine nitration, PARP activation and NAD depletion in the kidneys of rats after single dose of cyclophosphamide. *Clin Exp Nephrol*. DOI 10.1007/s10157-009-0160-z

Akçasu A, Banoğlu N, Berkarda Ş, (1992) *Farmakoloji, İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar*, Nobel Tıp Kitabevi, S: 822.

Al Salloum AA (2003) Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: poor renal survival in Arab children. *Pediatr Nephrol* 18:357–361.

Al-Safi SA and Maddocks JL (1986) Does 2 - Mercaptoethane Sulphonate Prevent Cyclophosphamide and Azathioprine Induced Immunosuppression In Vitro Studies. *Br. J. Clin. Pharmac.* 21: 267 – 270.

Al Salloum AA (2003) Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: poor renal survival in Arab children. *Pediatr Nephrol* 18:357–361.

Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548–555.

Andreoli SP, McAteer JA (1990) Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro. *Kidney. Int* 38: 785-794,.

Andreoli SP (1991) Reactive oxygen molecules, oxidant injury and renal disease. *Pediatr Nephrol* 5: 733-742,.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ayhanci A, Uyar R, Aral E, Kabadere S, Appak S (2008) Protective Effect of Zinc on Cyclophosphamide-Induced Hematotoxicity and Urotoxicity, *Biol. Trace Elem. Res.*, 126: 186-193.

Banham S, Dorward A, Hutcheon A, Ahmedzai S (1985) The Role of VP-16 in the Treatment of Small-Cell Lung Cancer Group. *Seminars in Oncology*, Vol: No: 1 Suppl: 2 (March), pp: 2-6.

Baud L, Ardaillou R (1993) Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *British Med Bulletin* 49: 621-630,.

Bernacki RJ, Bansal SK, Gurtoo HL (1987) Combination of Mesna with Cyclophosphamide or Adriamycin in the Treatment of Mice with Tumors. *Cancer Research*, 47: 799–802.

Bloom JM, Tamarkin L, Shiber JR, Nelson RJ (1995) Learned Immunosuppression is Associated with an Increased Risk of Chemically Induced Tumors. *Neuroimmunomodulation*, 2 (2): 92–99.

Bode U, Seif SM, Levine AS (1980) Studies on the antidiuretic effect of cyclophosphamide: vasopressin release and sodium excretion. *Med Pediatr Oncol*;8(3):295-303.

Bokser L, Szende B, Schally AV (1990) Protective Effects of D-Trp-luteinising Hormone-Releasing in Female Microcapsules Against Cyclophosphamide-Induced Gonadotoxicity in Female Rats. *Br. J. Cancer*; 61: 861-865.

Bramwell VCH, Mourisden HI, Santaro A (1987) Cyclophosphamide versus Ifosfamide: Final Report of a Randomized Phase 2 Trial in Adult Soft Tissue Sarcomas, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 23 (3): 311–321.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Bressler RB, Huston DP (1985) Water intoxication following moderate- dose intravenous cyclophosphamide. Arch Intern Med;145(3):548-9.

Budavari S, (1987) An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, The Merck Index. Elevent Edition Centennial Edition, USA., p: 429 – 430, 1563.

Burk RF, Levander OA (1999) In: Modern Nutrition in Health and Disease, Ninth Edition, Edited by M. Shils, J olson, M. Shike and A. C. Ross. Baltimore: Williams & Wilkinis, p. 265-276.

Burkl W, Schiechl H (1978) The Growth of Follicles in the Rat Ovary Under the Influence of Busulfan and Endoxan, Cell Tiss. Res., 186: 351–359.

Büyüknacar HS, Kumcu EK, Göçmen C, Önder S (2008) Effect of phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram on cyclophosphamide-induced cystitis in rats, European Journal of Pharmacology 586:293–299.

Byers T, Perry G (1992) Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. Annu Rev Nutr.; 12: 139–159.

Caglar K, Kinalp C, Arpacı F (2002) Cumulative prior dose of cisplatin as a cause of the nephrotoxicity of high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation. Nephrol Dial Transplant; 17:1931– 5.

Cao S, Durrani FA, Rustum YM (2004) Selective Modulation of the Therapeutic Efficacy of Anticancer Drugs by Selenium Containing Compounds against Human Tumor Xenografts, Clinical Cancer Research, Vol. 10: 2561-2569.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F (1986) Comparison of Reduced Glutathione with 2 – Mercaptoethane Sulfonate to Prevent Cyclophosphamide Induced Urotoxicity, Cancer letters, 32: 1 – 6.

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

Clark LC, Combs Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis L S, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshar JL, Park HK, Sanders BB, Smith CL, Taylor JR (1996) Effects of Selenium for Cancer Prevention in Patients with Carcinoma of the Skin. Journal of the American Medical Association, 276: 1957-1985.

Clayton CC, Bauman CA (1949) Diet and Azo Dye Tumors: Effect of Diet During a Period When the Dye is Not Fed. Cancer Research, Volume 9, Number 10.

Combs GF, Gray WP (1998) Chemopreventive Agents: Selenium. Pharmacology Therapeutics, 79: 179-192.

Dai, J., Weinberg, R. S., Waxman, S., Jing, Y., 1999, Malignant Cells Can Be Sensitized to Undergo Growth Inhibition and Apoptosis by Arsenic Trioxide Through Modulation of the Glutathione Redox System, The American Society of Hematology, 0006-4971/99/9301-0016.

Di Palma JR, Di Gregorio, G.I., (1990) Basic Pharmacology in Medicine, Third Edition, 558-559.

Dilek ON Serbest Radikaller ve Cerrahi. Serbest Radiakaller ve Antioksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi. Afyon, 23-30 Mart 2003:6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Dreher D, Junod AF (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur. J. Cancer. 32A(1): 30-8.

Dormandy TL (1983) An approach to free radicals. Lancet; 322:1010-1013.

Dökmenci İ (1988) Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Toksikoloji, S: 158-355.

Dündar Y, Aslan R (1999) Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü, Hayvancılık Araştırma Dergisi; 9(1-2): 32-39

Ehrenfried JA, Ko TC (1997)Thompson, E.A. and Evers, B.M., , Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. Surgery;122, 5, 927-935, p.

Fairchild WV, Spencer CR, Solomon HD, Gangai MP (1979) The Incidence of Bladder Cancer After Cyclophosphamide Therapy, J. Urol; 122, 163 – 164.

Fantone JC, Ward PA (1982) Role of oxygen derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am J Pathol; 107: 397-418.

Finley JW, Davis CD, Feng Y (2000) Seleniumfrom High Selenium Broccoli Protects Rats from Colon Cancer, Journal of Nutrition; 130: 2384-2389.

Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, Fujiwara K (2000) Experimental study on liver regeneration after simultanous partial hepatectomy and pancreatectomy, Hepatology Research; 17, 223-236, p.

Gharib MI, Burnett AK (2002) Chemotherapy induced cardiotoxicity: current practice and prospects of prophylaxis. Eur J Heart Fail; 4:235– 42.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Gilman AG, Goodman A (1999) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, P: 2-17.

Glode M, Robinson J, Gould FS (1981) Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone, *The Lancet*, May 23, 1132-1136.

Griffin AC, Lane HW (1981) Selenium Chemoprevention of Cancer in Animals and Human Implications, In, *Selenium in Biology and Medicine*, Chapter 14, pp. 160-170.

Groff JL, Gropper SS, Hunt SM (1995) *Microminerals in Advanced Nutrition and Human Metabolism*, Minneapolis: West Publishing Company, Minneapolis, p. 381-384.

Halliwell B, Gutteridge JM (1989) *Free radicals in biology and medicine*. 2th Ed. Oxford: Clarendon Pres., 125

Hansen F, Stenbygaard L, Skovsgaard T (1995) Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF), on Hematologic Toxicity Induced by High-Dose Chemotherapy in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Acta. Oncol.*, 34 (7): 919-924.

Hussein AM (1995) Protection Against Cytosine Arabinoside-Induced Alopecia by Minoxidil in a Rat Animal Model, *Int. J. Dermatol.*, 34 (7): 470-473.

Hsu HC, Tsai HM (1982) Cyclophosphamide-induced glomerular injury in newborn mice. *Lab. Invest.* 47, 281-285.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ilio CD, Boccio GD, Casaccia R, Aceto A, Giacomo F, Federici G (1987) Selenium Level and Glutathione- Dependent Enzyme Activities in Normal and Neoplastic Human Lung Tissues, *Carcinogenesis* vol. 8 no. 2 pp. 281-284.

Ip C (1998) Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention. *Journal of Nutrition*, 128: 1845-1854.

İşcan M, Çoban T (1998) Normal ve neoplastik meme dokusunda antioksidan enzimler. *Klinik Gelişim.*; 11: 392–395.

Janssen AM, Bosman CM, Kruidenier L (1999) Superoxide dismutases in the human colorectal cancer sequence. *J.Cancer.Res.Clin.Oncol.*; 125:327-35.

Ji LL (1995) Exercise and Oxidative Stress: Role of the Cellular Antioxidant Systems. In: *Exercise and Sport Science Reviews*, edited by J. Holloszy. Baltimore: Wilkins and Wilkins, p. 135-166.

Juma FD, Rogers HJ, Trounce JR (1981) Effect of Renal Insufficiency on the Pharmacokinetics of Cyclophosphamide and Some of its Metabolites. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 19, 443-451

Karataş F, Aşkın U, Halifeoğlu İ, Dönder E (2006) Guatrlı Hastalarda Antioksidan Vitaminler (A, E ve C), Selenyum Gulutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Düzeylerinin Araştırılması, *F.Ü. Sağ. Bil. Der.*, 20 (4) : 277-280.

Katzung BG (2001) *Basic & Clinical Pharmacology*. 8th Ed. Appleton & Lange, Stamford,.

Kayaalp SO (1987) *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*, Feryal Matbaacılık, Ankara, Cilt: I, S: 954.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kaynak K (2002) Akciğer kanserinde oksidatif hasarın rolü. *Solunum*;4(4);468-473

Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple MP (1990) Mechanism of in vitro Immunosuppression by Hepatocyte Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4 – Hydroxycyclophosphamide, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 40: No. 5, pp. 927 – 935.

Kearsley JH (1986) Cytotoxic Chemotherapy for Common Adult Malignancies: ‘ The Emperor’ s New Clothes’ Revisited., *Brit. Med. S.* 293: 871.

Khattab FKI (2007) Effects of Sodium Selenite on the Ultrastructure of the Kidney Cortex in Normal Rats, *Journal of Applied Sciences Research*, 3 (9) : 803-810.

Kinlen LJ, Peto J, Doll R, Snel AGR (1981) Cancer in Patient treated with Immunosuppressive Drugs., *Br. Med. J.*, 282, 474.

Knight JA (1995) Disease related to oxygen-derived free radicals. *Ann .Clin.Lab.Sci.*; 25(2): 111-21.

Kopecna L (2001) Late effects of anticancer therapy on kidney function in children with acute lymphoblastic leukemia. *Bratisl LekListy*; 102: 357-60.

Kotlarek-Hause S, Gabrys K, Potoczek S (1995) Evaluation of Early Treatment Results in Hodgkin’s Disease During the Cytostatic Protocol Containing Methotrexate., *Pol. Arc. Med. Wewn.*, 93 (3): 228-233.

Koyoma H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T (1977) Cyclophosphamide-Induced Ovarian Failure and its Therapeutic Significance in Patiens with Breast Cancer, *Cancer*, 39: 1403-1409.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Kumar KBH, Kuttan R (2004) Chemoprotective Activity of an Extract of *Phyllanthus Amarus* Against Cyclophosphamide Induced Toxicity in Mice, *Phytomedicine* 12 (2005) 494-500.

Kurt H, Başaran A, Aral E (2005) Sıçanlarda Karbon Tetrakloritin (CCl₄) Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kateşin ve Likopen İle Önlenmesi, Doktora Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Kurtoğlu S (1992) Zehirlenmeler, Teşhis ve Tedavi, Erciyes Üniversitesi Yayınları No:30, Kayseri S: 121-491.

Kurutaş Belge E, İnanç Güler F, Kılınç M (2004) Serbest Radikaller. *Arşiv*,; 13: 120-13.

Kwon HC, Borch RF, Engel J, Niemeyer U (1987) Activation Mechanism of Mafosfamide and The Role of Thiols in Cyclophosphamide Metabolism, *J. Medchem.*, 30: 395-399.

Lahdetie J, Rety R, Sorsa M (1990) Interaction of Mesna (2–Mercaptoethane sulfonate) with the Mutagenicity of Cyclophosphamide in vitro and in vivo, *Mutation Research*, 245: 27–32.

Lavin P, Koss LC (1971) Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. IV. Electron microscopic study of the renal tubules. *Am. J. Pathol.* 62, 169-180.

Le Bricon, T, Gugins S, Cyoneber L, Baracos VE (1995) Negative Impact of Cancer Chemotherapy on Protein Metabolism in Healthy and Tumor–Bearing Rats., *Metabolism*, 44 (10): 1340–1348.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Lerza R (1998) Studies on Hemotoxicity of Cyclophosphamide, Doxorubicin and Cis-Diamminodichloroplatinum Combined with Sodium-2-Mercaptoethane Sulfonate, *Tumori*, 74: 333-337.

Levine S, Sowinski R (1974) Cyclophosphamide-induced cerebral and visceral lesions in rats. *Arch. Pathol.* 98, 177-182.

Luce JK, Simons JA (1988) Efficacy of Mesna in Further Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis, *Medical and Pediatric Oncology*, 16: 372-374.

Loo G (2003) Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation. *J Nutr Biochem.* 14: 64-73.

Mates JM, Sanchez-Jimenez F (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci.* 4: 339-345.

Mitchell MS (1989) Low-Dose Cyclophosphamide and IL-2 in the Treatment of Advanced Melanoma Division of Medical Oncology, *Compr. Cancer Center, University of Southern California*, 85-89.

Moore FR, Urda GA, Krishna G, Theiss JC (1995) An in vivo/in vitro Method for Assessing Micronucleus and Chromosome Aberration Induction in Rat Bone Marrow and Spleen 1. Studies with Cyclophosphamide, *Mutat. Res.*, 335 (2): 191-199.

Montz FI, Wolff AJ, Gambone JC (1991) Gonadal Protection and Fecundity Rates in Cyclophosphamide-Treated Rats, *Cancer Research*, 2124-2126.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Murray CJL, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global burden of disease study. *Lancet*; 349:1498-504.

Nath KA, Croatt AJ, Hostetter TH (1990) Oxygen Consumption and oxidant stress in surviving nephrons. *Am J Physiol* 258: F1354-F1362.

Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO (2004) Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatininduced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology*; 195, 221—230.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*; 95: 351-358.

Ozyazgan Y, Yurdakul S, Yazıcı S, Tuzun B (1992) Low Dose Cylosporin A Versus Pulsed Cyclophosphamide in Behçet's Syndrome: a Single Masked Trial, *British Journal of Ophthalmology*, 76 (4): 241-243.

Paller MS, Neumann TV (1991) Reactive oxygen species and renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation *Kidney Int* 40: 1041-1049.

Pohl J, Steaker J, Hilgard P (1989) Chloroacetaldehyde and its Contribution to Urotoxicity During Treatment with Cyclophosphamide or Ifosfamide, *Arzneim Forsch./Drugs Res.*, 39 (1): Nr. 6.

Ponsot Y, Guerin JG, Carmel M (1995) Transitional Cell Carcinoma of the Ureter and Cyclophosphamide: A Propos of a Case. *Prog. Urol.*, 5 (4): 578–579.

Pool BL, Bos RP, Niemeyer U, Theuws JLG, Schmahl D (1988) In vitro/ In vivo Effect of Mesna on the Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide A Study Aimed at Clarifying the Mechanism of Mesna's Anticarcinogenic Activity, *Toxicology Letters*, 41: 49–56.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ramos A, Lane AN, Hollingworth D, Fan TWM (2004) Secondary structure and stability of the selenocysteine insertion sequences (SECIS) for human thioredoxin

reductase and glutathione peroxidase, *Nucleic Acids Research*, Vol. 32: No. 5, 1746-1755.

Rovin BH, Wurst E, Kohan DE (1990) Production of reactive oxygen species by tubular epithelial cells in culture. *Kidney Int.* 37: 1509-1514.

Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T (2006) Attenuation of Cyclophosphamide induced Toxicity by Squalene in Experimental Rats, *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006) 252-260.

Seven A, Candan G (1996) Antioxidan Defense Systems. *Cerrahpasa J Med.*; 27: 41–50.

Shah SV (1989) Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* 35: 1093-1106,.

Slattery JI, Sanders JE, Buckner CD, Schaffer RL (1995) Graft–Rejection and Toxicity Following Bone Morrow Transplantation in Relation to Busulfan Pharmacocinetics, *Bone Morrow Transplant.*, 16 (1): 31–42.

Stahlmann R, Bluth U, Neubert D (1985) Effect of the Cyclophosphamide Metabolite Acrolein in Mammalian Limb Bud Cultures, *Arch. Toxicol.*, 57: 163-167.

Stratta P, Canavessa C, Dogliani M, Mazzucco G, Manga G, Vercellone A (1991) The role of free radicals in the progression of renal disease. *Am J Kid Diseases* 17 (Supl.1): 33-37.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Sugumar E, Kanakasabapathy I, Abraham P (2007) Normal plasma creatinine level despite histological evidence of damage and increased oxidative stress in the kidneys of cyclophosphamide treated rats. *Clin Chim Acta.*376:244–5.

Tez M (1999) Sıçanlarda hepatektomi sonrası oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına tokoferolün etkisi: Uzmanlık Tezi. Ankara.

Thatcher N, Smith DB, Lind MJ, Anderson H, Barclay J, Chopra MP, Fitzgerald MD (1988) Double Alkylating Agent Therapy with Ifosfamide and Cyclophosphamide for Advanced Non–Small Cell Lung Cancer from the Manchester Lung Tumour Group., *Cancer*, 61: 14 – 18.

Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione, applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.

Tos´-Luty S, Obuchowska-Przebdrowska, Latuszynska, J, Musdk, I., Tokarska Rodak (2003) Comparision of Histological and Ultrastructural Changes in Mice Organs After Supplementation with Inorganic and Organic Selenium, *Ann Agric Environ Med.*, 10:87-91.

Uchida S, Suziki K, Akıyama S, Miyamoto M, Juji T, Fujiwara M (1994) Suppressive Effect of Cyclophosphamide on the Progression of Lethal Graft–Versus–Host Disease in Mice: A Therapeutic Model of Fatal Post–Transfusion GVHD., *Ther. Immunol.*, 1 (6): 313–318.

Uyar R, Ayhancı A (1996) Kemik İliği ve Kandaki Siklofosfamid Toksisitesini Verapamil Azaltabilir mi?, *Osmangazi Ü. Tıp Dergisi*, 17 (2).

Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FIR (1973) Cyclophosphamide–Induced Ovarian Failure, *The New England Journal of Medicine*, 1159–1162

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M (2001) FR167653 Improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats, *Journal of Surgical Research*, 101, 146-151, p.

Waz WR, Feld LG (1994) Reactive oxygen molecules in the kidney. *Adv Exp Med Biol* 366:171-183.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 44: 275–295

Winearls CG (2003) Myeloma Kidney. In: Johnson RJ, Feehally J (Eds), *Comprehensive Clinical Nephrology*, Mosby, pp 235-243.

Wlodarczyk B, Minta M, Biernacki B, Szkoda J, Zmudzki J (2000) Selenium Protection Against Cadmium Toxicity in Hamster Embryos, *Polish Journal of Environmental Studies*, Vol. 9, No. 4, 323-327.

Yang Z, Faustino PJ, Andrews PA, Monastra R, Rasmussen AA, Ellison CD, Cullen KJ (2000) Decreased Cisplatin/DNA Adduct Formation is Associated with Cisplatin Resistance in Human and Neck Cancer Cells Lines, *Cancer Chemother Pharmacol* 46:255-262.

Yeum K-J, Russell MR, Krinsky IN, Adlini G (2004) Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*;430: 97-103.

Yilmaz HR, Sogut S, Ozyurt B, Ozugurlu F, Sahin S, Isik B (2005) The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: Protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicol. Indust. Health*. 21, 67–73.

7. EKLER

EK 1: Etik Kurul Raporu



ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :16. 06. 2009
TOPLANTI SAYISI :20
DOSYA KAYIT NUMARASI :117
KARAR NUMARASI :117
ARAŞTIRMACILAR: Yrd.Doç.Dr. Adnan AYHANCI
Sibel GÜNEŞ
HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI :Sprague Dawley Sıçan (HER İKİ CİNS) 84 adet

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarından Yrd.Doç.Dr. Adnan AYHANCI'nin araştırma yürütücüsü olduğu 117/2009 kayıt numaralı ve "Siklofosamid Nedenli Nefrotoksisitenin Selenyum ile Önlenmesi" konulu çalışma; Dency Hayvanları Etik Kurulu Yönergesi'ne göre değerlendirilmiş ve gerçekte belirtilen öneriler doğrultusunda yapılması kabul edilerek onaylanmasına karar verilmiştir

Prof. Dr. Kevser EROL (Başkan)

Prof. Dr. Kubilay UZUNER (Üye)

Doç. Dr. Emel ULUPINAR. (Üye)

Prof. Dr. Hasan V. GÜNEŞ (Üye)

Doç. Dr. Ömür E. ÇİOĞLU (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Unal ÖZELMAS (Üye)

Yrd. Doç. Dr. Engin YILDIRIM (Üye)

Vet. Hek. Sümmani BEMİRCİ (Üye)

Avukat Şükrü KIRDEMİR (Üye)

Vet. Hek. Refik ARTAN (Üye)



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI

Belge No :06-08

Sayın, Sibel GÜNEŞ,

15 - 26 Eylül 2008 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Kullanımı İle İlgili Eğitim Programı"
teorik ve pratik uygulamalarına katılarak başarıyla
tamamlamıştır.

Prof. Dr. Kevser EROL
Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı

Prof. Dr. Fazıl TEKİN
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Rektörü

