

**SİSPLATİN UYGULANAN RATLARDA OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTEDE MELATONİNİN NAMPT/SIRT-1
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Zeynep TUZCU

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Ökkeş YILMAZ
(İkinci Danışman: Prof.Dr. Kazım ŞAHİN)**

TEMMUZ-2012

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SİSPLATİN UYGULANAN RATLARDA OLUŞTURULAN NEFROTOKSİSİTEDE
MELATONİNİN NAMPT/SIRT-1 SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Zeynep TUZCU

(08110204)

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 10 Temmuz 2012
Tezin Savunulduğu Tarih: 25 Temmuz 2012**

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN (F.Ü)
Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN (G.Ü)
Doç. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü)
Yrd. Doç. Dr. Seher GÜR (F.Ü)

TEMMUZ-2012

ÖNSÖZ

Antikanserojen ilaç olarak klinikte sıklıkla kullanılan ksenobiyotik özellikli sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisitede NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağındaki mekanizmalar üzerine melatoninin etkileri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında sisplatin nefrotoksisitesine karşı antioksidan özelliğı olan melatoninin NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, sisplatin ile oluşturulmuş böbrek hasarında melatoninin NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağını düzenleyerek ve COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α inhibisyonu yoluyla yangıyı azaltarak bir iyileşme sağlayabildiğini göstermektedir. Melatonin kullanılarak NAMPT/SIRT-1 yolağının düzenlenmesi, oksidatif stres kaynaklı hücrel hasarın tedavi ve önlenmesinde ideal bir strateji olabilecektir.

Bu tez çalışmasının oluşumunda bana her zaman yol gösteren, doktora öğrenimim süresince desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ ve Sayın Prof. Dr. Kazım ŞAHİN hocalarıma; tezime değerli katkıları olan Sayın Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN'e, Sayın Prof. Dr. İbrahim H. ÖZERCAN'a, Sayın Prof. Dr. Necip İLHAN'a, Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığı'na, tez çalışmalarım sırasında gerekli izinleri sağlayan personeli olduğum Bingöl Üniversitesi Rektörlüğü'ne, FF.11.21 no'lu proje ile destek sağlayan FÜBAP Birimi Koordinatörlüğü'ne; bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan aileme, eğitimim süresince bana her zaman ve her konuda desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren sevgili eşime ve canım oğluma en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Zeynep TUZCU

Elazığ-2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Sisplatin	2
1.2. Melatonin	5
1.3. Malondialdehit (MDA)	6
1.4. 8-iso-prostaglandin F2 α (8-iso-PGF2 α)	7
1.5. Nicotin Amide Phosphoribosyl Transferase (NAMPT)	7
1.6. Sirtuin-1 (SIRT-1)	8
1.7. Siklooksijenaz-2 (COX-2)	9
1.8. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)	10
1.9. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)	10
2. MATERYAL ve METOT	13
2.1. Hayvan Materyali	13
2.2. Deneme Düzeni	13
2.3. Laboratuvar Analizleri	14
2.3.1. Serum Üre Kreatinin Analizleri	14
2.3.2. MDA Analizi	14
2.3.3. 8-iso-PGF ₂ α Analizi	14
2.3.4. Western Blot Analizleri	15
2.4. Histopatolojik Değerlendirme	15
2.5. İstatistiksel Analizler	16
3. BULGULAR	17
3.1. Üre Düzeyleri	17

3.2. Kreatinin Düzeyleri	18
3.3. MDA Düzeyleri	19
3.4. 8-iso-PGF2 α Düzeyleri.....	20
3.5. Western Blot Analizleri	21
3.5.1. NAMPT Düzeyleri	22
3.5.2. SIRT-1 Düzeyleri	23
3.5.3. COX-2 Düzeyleri.....	24
3.5.4. TGF- β 1 Düzeyleri	25
3.5.5. TNF- α Düzeyleri	26
3.6. Histopatolojik Bulgular	27
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	29
KAYNAKLAR.....	33
ÖZGEÇMİŞ	45

ÖZET

Nefrotoksisite, geniş kullanım alanına sahip antineoplastik bir ilaç olan sisplatinin en yaygın yan etkisidir. Bu nedenle bir doz sisplatin alındıktan sonra renal fonksiyonlarında gerileme meydana gelen hastalarda sisplatin kullanımı % 25–35 oranında kısıtlanmaktadır. Sisplatinden kaynaklanan nefrotoksisite böbrekte artış gösteren oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu çalışmada sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede bir antioksidan olarak melatoninin, sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeyde nasıl etki gösterdiğini araştırdık. Bu çalışma, tek doz intraperitoneal (i.p.) sisplatin uygulamasıyla oluşturulan bir rat nefrotoksisite modelinde melatonin uygulamasının böbreklerde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Melatonin verilen hayvanlarda serum üre ve kreatinin değerleri, renal bozulmanın sisplatin enjekte edilen gruba oranla belirgin biçimde azaldığını ortaya koymuştur. Böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂ α seviyeleri sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Melatonin tedavisi alan ratlarda, SIRT–1 protein ekspresyon seviyesi belirgin biçimde artış yönünde düzenlenirken NAMPT, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ise azalmıştır. Histopatolojik bulgular; melatoninle ön tedavinin, sisplatin kaynaklı tübüler nekroz başta olmak üzere sisplatin tarafından oluşturulan çoğu değişimi de önlediğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, sisplatin ile oluşturulmuş böbrek hasarında melatoninin NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağını düzenleyerek COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α inhibisyonu yoluyla yangıyı azaltarak bir iyileşme sağlayabildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, Nefrotoksisite, Melatonin, NAMPT, SIRT–1, COX–2, TGF- β 1, TNF- α , 8-iso-PGF₂ α

SUMMARY

The Effect of Melatonin on NAMPT/SIRT-1 Signaling Pathway on Cisplatin Induced Nephrotoxicity in Rats

Nephrotoxicity is most relevant side effect of widely used antineoplastic drug cisplatin. Therefore use of cisplatin is limited with about 25–35% of patients experiencing a significant reduction in renal function after a single dose of cisplatin. Cisplatin-induced nephrotoxicity is related to an increase in oxidative stress in the kidney. In the present study, we investigated biochemically, histopathologically and at the molecular level how melatonin as an antioxidant effect the cisplatin-induced nephrotoxicity. The present study demonstrates that the administration of melatonin exerts a renal protective effect in a rat model of nephrotoxicity provoked by a single intraperitoneal (i.p.) injection of cisplatin. In the animals that receive melatonin the levels of serum urea and creatinine indicating reduced renal injury were significantly lower as compared to the cisplatin injected group. The renal tissue MDA and 8-iso-PGF₂ α levels showed a significant increase in cisplatin-treated rats compared the control rats. SIRT-1 protein expression level were significantly up-regulated while NAMPT, COX-2, TGF- β 1 and TNF- α protein expression level were down-regulated in rats treated with melatonin. Histopathological findings showed that melatonin pretreatment decreased the cisplatin-induced tubular necrosis and most of the changes produced by cisplatin. Taken together, results of this study indicate that melatonin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating NAMPT/SIRT-1 signaling, and reducing the inflammation by inhibiting COX-2, TGF- β 1 and TNF- α .

Key words: Cisplatin, Nephrotoxicity, Melatonin, NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1, TNF- α , 8-iso-PGF₂ α

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Serum üre düzeyleri.....	17
Şekil 2. Serum kreatinin düzeyleri	18
Şekil 3. Böbrek dokusu MDA düzeyleri	19
Şekil 4. Böbrek dokusu 8-iso-prostaglandin F2 α düzeyleri	20
Şekil 5. Böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α düzeylerini ifade eden Western blot bantları	21
Şekil 6. Böbrek dokusu NAMPT düzeyleri.....	22
Şekil 7. Böbrek dokusu SIRT-1 düzeyleri.....	23
Şekil 8. Böbrek dokusu COX-2 düzeyleri	24
Şekil 9. Böbrek dokusu TGF- β 1 düzeyleri.....	25
Şekil 10. Böbrek dokusu TNF- α düzeyleri.....	26
Şekil 11. Gruplarda böbreğin histopatolojik görünümü	28

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. Melatonin uygulamasının rat böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler üzerine etkisi.....	27
---	----

SEMBOLLER LİSTESİ

BHT	: Buthilat Hidroksitoluen
CDDP	: Cis-diamminedichloroplatinum (sisplatin)
Cox-2	: Siklooksijenaz-2
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FDA	: Food and Drug Administration
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
FÜHADEK	: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
GLUT-4	: Glukoz Taşıyıcı Protein 4
GSSG	: Okside glutatyon
HClO₄	: Perklorik Asit
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HO-1	: Hemoksijenaz-1
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IL-1	: İnterlokın-1
i.p.	: İntraperitoneal
KCl	: Potasyum klorür
KH₂PO₄	: Potasyumbifosfat
MDA	: Malondialdehit
MgCl₂	: Magnezyum klorür
Melatonin	: N-asetil 5-metoksitriptamin
NaCl	: Sodyum Klorür
NAD	: Nicotinamide adenine dinucleotide
NAMPT	: Nicotin Amide Phosphoribosyl Transferase
NF-κβ	: Nuclear Factor Kappa Beta
PBEF1	: Pre-B cell colony-enhancing factor 1
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PGG₂	: Prostaglandin G ₂

8-iso-PGF₂α	: 8-iso-prostaglandin F ₂ α
pH	: Power Hydrogen
PMSF	: Fenil Metil Sülfonil Florid
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAS	: Statistical Analysis Software
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SIRT1	: Sirtuin-1
SOD	: Süperoksit dismutaz
TGF-β1	: Transforming growth factor beta 1
TNF	: Tümör nekrozis faktör
8-iso-PGF₂α	: 8-iso-prostaglandin F ₂ α

1. GİRİŞ

Kanser dünyada en sık ölüme yol açan hastalıklar arasında yer almaktadır. Genel olarak kanser tedavisi üç temel strateji üzerine kurulmuştur. Bunlardan en önemlisi kemoterapi uygulamalarıdır. Diğerleri ancak lokal tedaviye imkan sağlayan radyoterapi ve cerrahi girişimlerdir. Kemoterapi uygulamaları kanser tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Cerrahi ve radyoterapi ile hastalığın çoğu zaman lokal kontrolü sağlanabilirken, sistemik etki yalnızca kemoterapi uygulamaları ile mümkün olabilmektedir. Kanser kemoterapisinde amaç; normal hücrelere zarar vermeden ya kanser hücresinin büyüme ve çoğalmasını durdurmak ya da mümkünse yok etmektir. Ancak kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri, antibiyotiklerin bakteri hücresine karşı olan seçiciliklerinden daha azdır. Çünkü kanser hücresi ile normal hücre arasında kalitatif bakımdan fazla bir fark yoktur. Daha çok kantitatif yönde farklılık söz konusudur. Antineoplastik ilaçlar vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok ederken hızlı biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok ederler. Dolayısıyla birçok kanser ilacının normal hücre ve kan dokusu üzerine de yan etkileri vardır (Gilman, 1963; Kintzel, 2001). Bazı ilaçlar kanser tedavisinde oldukça yaygın kullanılmalarına rağmen sıklıkla kanser dokusu dışındaki diğer dokuları da etkilemekte ve ciddi yan etkiler meydana getirmektedir. Bu yan etkilerin görülmesi farklı alternatiflere yönelmeyi gerektirmektedir. Tedavi protokolünün değiştirilmesi bunlardan biridir. Bu durumda çok etkili olan bir ilaç yerine daha az etkili bir ilaca geçilmektedir. Diğer bir alternatif tedavi dozunda kısıtlamaya gidilmesidir. Bu durumda tedavide dozun istenen oranda sınırlandırılmasına engel olabilmektedir. Bir diğer alternatif ise istenmeyen bu yan etkileri önleyecek veya azaltacak diğer bir ajanın kullanılmasıdır. Bu durumda maliyet oldukça artmaktadır (Weichert-Jacobsen vd., 1999). Böbrek hücreleri, yüksek bölünme hızına sahip olmamalarına rağmen, yüksek kan akımına maruz kalmaları, toksinleri konsantre etme yetenekleri ve spesifik taşıyıcılara sahip olmaları nedeniyle toksik harabiyete karşı oldukça duyarlıdırlar (Boogaard vd., 1990). Sitotoksik ilaçların neden olduğu nefrotoksisite kemoterapinin en sık görülen yan etkilerindendir (Kintzel, 2001). Nefrotoksisiteye neden olan ilaçların başında antimetabolitler, alkilleyici ilaçlar ve antrasiklinler gelmektedir. Kanser ilaçlarının nefrotoksik etkileri; serum elektrolit seviyelerinde düzensizlik, serum kreatinin

düzeylerinde artış ve glomeruler filtrasyon oranında azalma şeklinde olabileceği gibi kalıcı böbrek yetmezliğiyle karakterize ciddi boyutta da olabilir (Fillastre ve Godin 1998). Kemoterapi ilaçları böbrek dokusunda başlıca proksimal tübül, distal tübül ve glomerül olmak üzere üç ana nefron bölgesinde hasarlanmaya ve fonksiyon bozukluğuna neden olur (Ikarashi vd., 2004). Kanseri ilaçları içinde oldukça önemli bir yere sahip olan sisplatin; yüksek antitümöral aktivite gösteren ve oldukça geniş spektruma sahip antineoplastik bir ajandır. Ancak oldukça etkili olan bu ajanın, doza bağlı olarak hastaların % 25'inde gelişen nefrotoksisite nedeniyle kullanım alanı sınırlanmaktadır (Dillioglugil vd., 2005; Loehrer ve Einhorn 1984; Taguchi vd., 2005). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin; serbest oksijen radikallerinin üretimi ve antioksidan enzimlerin baskılanması ile antioksidan sistemin çökmesine yol açmak suretiyle oluştuğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Kuhlmann, 1997). Sisplatin, süperoksit anyon ve hidroksil radikalleri gibi serbest oksijen radikallerinin üretimini artırıp böbrek dokusunda lipid peroksidasyonu meydana getirir (Meyer ve Medias, 1994). Sisplatin uygulamasıyla oluşan serbest oksijen radikalleri oksidatif stresin şiddetiyle paralel doğrultuda artış gösterir. Oksidatif stress sonucunda protein, lipid, nükleik asit gibi biyomoleküllerin yapısında anormal değişiklikler meydana gelir (Packer ve Landvik, 1990). Kanseri, oksidatif stres ve lipid peroksidasyon ürünlerini artırarak antioksidan sistemin çökmesine yol açmaktadır. Kanseri hastalarda beslenmenin azalması ve antikanserojenlerin kullanılmasıyla birlikte antioksidan sistem daha da zayıflamaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesini ve diğer yan etkileri azaltmak için deneysel ve klinik çalışmalarda çeşitli ilaçlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda sisplatinin daha çok aşırı serbest radikal üretimiyle oksidatif renal hasar yaptığına dair kanıtlar ileri sürülmüştür. Bu nedenle çeşitli antioksidan maddelerin deney hayvanlarında sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede önleyici rolleri çalışılmıştır (Anand ve Bashey, 1993; Matsushima vd., 1998; Yildirim vd., 2003).

1.1. Sisplatin

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum(II) =CDDP) önemli bir sitotoksik maddedir ve insanlarda birçok solid tümörün tedavisinde yaygın biçimde kullanılan etkili bir antikarsinogenidir (Cvitkovic vd., 1977; Osanto vd., 1992; Safirstein vd., 1986; Schrier, 2002). Sisplatinin antikarsinogenik aktivitesi tesadüfen ortaya çıkarılmıştır. Deneysel olarak amonyum klorür içeren ortama bırakılan platin elektrotlar arasında elektrik akımı ilerlerken üretilen elektroliz ürünlerinin analiziyle ilk olarak ammonium chloroplatinate

elde edilmiş, daha sonra bu ajanın, nötral türleri olan –trans ve –cis izomerlerine dönüşmesiyle cis-diamminedichloroplatinum II elde edilmiştir (Kuhlmann vd., 1997; Rosenberg vd., 1969). İlk denemelerde, sisplatinin nefrotoksik etkisinden dolayı kullanımından vazgeçilmek üzere iken; özellikle testiküler kanserlerde elde edilen başarılı sonuçlar, su ile birleşebilme özelliği ve mannitol kullanımı ile nefrotoksisitenin azaltılabileceğinin görülmesi üzerine tekrar ilaç üzerinde çalışmalar yapıp, geliştirildikten sonra, 1978’de Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA=Food and Drug Administration)’nin onayıyla klinik uygulama alanına hızla girmiştir. Sisplatin günümüzde de; daha çok baş, boyun, akciğer, testis, over, böbrek ve mesane kanserleri gibi solid tümörlerde ve lenfoma gibi hematolojik kanserlerde kullanılan geniş spektrumlu bir antitümoral ilaçtır (Cvitkovic vd., 1977; Links ve Lewis, 1999; Loehrer ve Einhorn, 1984). Sisplatin molekülü ‘–cis’ yapılanması sayesinde deoksiribonükleik asitlere (DNA) bağlanabilmekte ve aktivitesi bu şekilde gerçekleşmektedir. Bu bakımdan molekülün ‘–cis’ yapılanmasının etkisi oldukça önemlidir (Roberts ve Thomson, 1979; Rosenberg vd., 1969). Molekülün ‘–cis’ yapılanması, kan plazması gibi klorür içeriği 100 mM’dan yüksek olan ortamlarda stabildir. Hücre içi klorür yoğunluğunun az olduğu ortamlarda ise molekül yapısındaki klorür atomlarını kaybederek, DNA ve diğer büyük moleküllerle kovalent olarak bağlanabilir. DNA ile reaksiyonu DNA fragmentasyonlarının oluşmasına sebep olur. Sisplatin DNA etkileşimi sonucunda zincir içi çapraz bağlanmaları oluşur. Bu bağlar ile DNA sarmalında yerel kıvrımlanmalar ve açılmalar gerçekleşir. Bu şekilde hücre hasarı meydana getirip, apoptozis düzeyindeki değişikliklerle etkisini gerçekleştirir. Tümör ve diğer bölünen hücrelerde, sisplatin DNA ile birleşerek sitotoksik etki gösterir. Bu moleküler mekanizmaların kanserli hücrelerin çoğalmasını önlemede rolü olduğuna inanılır (Barry vd., 1990; Den Hartog vd., 1985; Faubel vd., 2004; Galea ve Murray, 2002; Jamieson ve Lippard, 1999; Kelman ve Peresie, 1979; Luke vd., 1992; Ramesh ve Reeves, 2002; Scovell vd., 1987; Winston ve Safirstein, 1985).

Sisplatin gastrointestinal kanaldan emilemediği için oral yolla kullanılmaz. Yaygın olarak plazma proteinlerine bağlanır. Ratlarda sisplatin uygulamasından 30 dakika sonra böbrek, mesane, karaciğer, femur, böbrek üstü bezi, ince bağırsak, prostat ve overlerde plazmadan daha yüksek oranda sisplatin saptanır. Sisplatinin merkezi sinir sistemine geçiş oranı düşüktür. Deneysel çalışmalarında ilacın % 80’inin ilk 24 saatte idrarla atıldığı tespit edilmiştir. Sonraki 24 saatte ilacın % 8’i atılır. Safra kanalı yoluyla sisplatinin atılım oranı % 10’un altındadır. Böbrek yetmezliklerinde sisplatinin yarı ömrü uzar. Sisplatinin atılımı

öncelikli olarak böbrek yolu ile olduğundan ve böbrek dokusunda diğer organlardan daha fazla biriktiğinden en fazla böbreğe zarar vermektedir (Casper vd., 1979; Cooley vd., 1994; Daugaard ve Abildgaard, 1989; DeConti vd., 1973; Kuhlmann vd., 1997; Sleijfer vd., 1985; Zhang ve Lindup, 1993).

Sisplatin uygulamasıyla birlikte bulantı-kusma, nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite ve daha seyrek olarak da oküler toksisite meydana gelebilir. Sisplatin kümülatif ve doza bağımlı olarak etki eder. Düşük dozlarda böbrek hasarı genellikle geri dönüşümlü iken daha yüksek dozlarda böbrek hasarı geri dönüşümsüz olabilir. Sisplatin kullanan hastalarda 1/3 oranında böbrek hasarı görülebilir. Nefrotoksisite açısından klinik bulgular serum üre ve kreatinin yüksekliğidir (Casper vd., 1979; Madias ve Harrinton, 1978; Sadzuka vd., 1992; Sadzuka vd., 1994). Sisplatin tedavi esnasında serbest oksijen radikalleri üreterek nefrotoksisiteye neden olur. Serbest radikaller, sıklıkla hücre membranındaki lipid komponentlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır. Ayrıca, protein sentezinde azalmaya sebep olduğu, hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek hücrenin asli görevlerini yapmasını engellediği ve DNA'yı bloke eden organik peroksitlerin oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir. Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara da sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda sisplatinin, lipid peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir. Sisplatinin *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda oksijen radikallerinin düzeylerini artırdığı bilinmektedir. Sisplatinin deney modellerinde lipid peroksidasyona bağlı olarak dokularda MDA ve GSH düzeylerinde ve bazı koruyucu enzimlerin aktiviteleri ile antioksidan maddelerin düzeylerinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir. Sisplatin uygulamasıyla gözlenen nefrotoksisite renal peroksidasyonla ilgilidir. Ratlarda sisplatin uygulamasından sonra böbrekte lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu enzim aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir. Lipid peroksidasyonu ve okside glutatyon (GSSG) seviyelerinde ise belirgin bir artış söz konusudur (Barry vd., 1990; Bompert vd., 1990a; Bompert vd., 1990b; Davis vd., 2001; Kotins vd., 2004; Nagwani ve Tripathi, 2010; Rahman vd., 2006; Rao ve Nammi, 2006; Sahin vd., 2010a; Santos vd., 2007; Shimeda vd., 2005; Tuzcu vd., 2010; Weiner ve Jacobs, 1982). Sisplatin özellikle proksimal tübülüs hücrelerinde nekroz ve apoptozis yoluyla toksisiteye neden olur (Sahin vd., 2010b; Townsend vd., 2003; Zhang ve Lindup, 1993). Sisplatin nefrotoksisitesinin en önemli göstergesi renal bozulmadır. Renal bozulma insidansı uygulanan sisplatin dozu ve frekansı ile birlikte nefrotoksisiteyi tanımlada kullanılan kriterlere göre değişmektedir.

Renal bozulmanın bu insidansı daha sonraki dönemlerde artarak devam etmekte ve daha da şiddetlenerek geri dönüşümsüz bir hal almaktadır (Cvitkovic vd., 1977; Kim vd., 2001; Portilla vd., 2006).

1.2. Melatonin

Melatonin 1958 yılında Lerner ve arkadaşları tarafından bir çalışmada pineal bezden salgılanan bir hormon olarak tespit edilmiştir. Ayrıca immün sistem hücreleri, beyin, solunum epiteli, kemik iliği, bağırsak, ovaryum, erbezleri, ve benzer diğer dokular tarafından da salgılanır (Reiter vd., 2009). Melatonin'in temel fizyolojik fonksiyonları uyku, davranış ve sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesi ile immün sistem ve reproduksiyon ile ilişkili etkileridir (Arendt, 1997; Klein, 1993; Reiter, 1996; Reiter vd., 2005). Melatonin, ışık-karanlık ritmine göre vücut fonksiyonlarını düzenlemede önemli bir role sahiptir. Gündüz minimum, gece maksimum düzeydeki salınımı ile sirkadiyen bir salınım ritmi göstermektedir. Salgılanması büyük oranda gece olması nedeniyle karanlık hormonu olarak da bilinir. Bu nedenle serum melatonin konsantrasyonu geceleri yüksek, gündüzleri ise düşüktür (Baydas vd., 2001; Lerner vd., 1958; Reiter, 1998). Sistemik dolaşım ile pineal bez arasında kan-beyin bariyeri olmadığı için, kandaki triptofan pinealositlere kolayca ulaşabilmektedir. Pinealosit sitoplazmasına aktif transport ile alınan triptofan'dan triptofan 5-hidroksilaz enzimi etkisiyle 5-hidroksitriptofan oluşur. Bu da 5-hidroksi triptofan dekarboksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi triptamin yani serotonine dönüştürülmekte ve N-asetil transferaz enzimi etkisiyle N-asetil serotonin halini almaktadır. N-asetil serotoninden, hidroksi indol-O-metil transferaz enzimi aracılığıyla, N-asetil 5-metoksitriptamin yani melatonin meydana gelmektedir (Cardinali vd., 1997; Reiter, 1991). Melatonin hormonu hedef dokulara, bu dokularda yer alan melatonine benzer şekilde sirkadiyen bir ritim ile fonksiyon gösteren spesifik reseptörler aracılığı ile etki etmektedir. Hücre membranındaki melatonin reseptörlerine ilaveten nükleusta da benzer reseptörlerin bulunduğu ve bu yolla DNA üzerinde bir etki oluşturduğu ileri sürülmektedir. Melatonin, pineal bezden salındıktan sonra sistemik kan dolaşımında 2/3 oranında albumin'e bağlı, 1/3 oranında ise serbest olarak taşınmaktadır. Primer olarak karaciğer ve sekonder olarak da böbrekte metabolize olan melatonin, karaciğerde bulunan mikrozomal enzimler tarafından 6-hidroksimelatonin'e dönüştürülerek deaktivasyon-detoksifikasyona uğratılıp daha sonra idrarla atılmaktadır (Reiter, 1996). Melatonin vücuda her yoldan uygulanabilen, hızla absorbe olabilen ve ileri derecede "lipofilik" özelliği

nedeniyle tüm dokulara kolayca yayılabilen güçlü bir antioksidandır. Melatonin hem reseptör aracılı, hem de reseptörden bağımsız etkilere sahiptir ve tüm hücrelerde etki gösterdiği düşünülmektedir. Melatoninin direkt olarak serbest radikalleri giderici, indirekt olarak antioksidan etkisi vardır. Melatonin uygulamasıyla birlikte antioksidan enzimlerin mRNA ekspresyonu artmaktadır (Baykal ve Kocabalkan, 2000; Hardeland vd., 2009; Kilic vd., 2012; Reiter, 1993; Reiter vd., 2007; Tan vd., 2007). Melatonin kolay ve ucuz elde edilmesi, ciddi yan etkisine rastlanmamış olması ve toksik dozunun yüksek olması nedeniyle, kanser gibi kronik hastalıklarda destekleyici ve sisplatinin olumsuz etkilerine karşı koruyucu olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi önem arz etmektedir.

1.3. Malondialdehit (MDA)

Oksijenli solunum esnasında, kullanılan oksijen'in % 1'i serbest radikal adı verilen ve ileri derecede reaktif olan; hidroksil radikali, hidrojen peroksit radikali, superoksit anyon radikali ya da singlet oksijen radikali adı verilen toksik maddeler meydana gelmektedir. Bunlardan hidroksil radikali hücre zarında bulunan membran fosfolipidleri ile lipid peroksidasyonu denilen bir reaksiyona girerek, malondialdehit (MDA) adı verilen bir ürünün oluşmasına neden olmaktadır. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stres olarak ta bilinen bu reaksiyon sonucu, hücre membranının stabilitesi bozulmakta ve hücre içinde fazla miktarda kalsiyum birikmesi neticesi hücre ölümü gerçekleşmektedir (Barber ve Harris, 1994; Halliwell ve Arouma, 1991; Ianas vd., 1991).

Serbest oksijen radikalleri sağlıklı kişilerde normal metabolizma sonucunda da oluşmaktadır. Bu normal olan bir durumdur ve vücuttaki antioksidan sistemler tarafından bertaraf edilmektedir. Oksidatif hasar, bu son ürünlerin yapımında artış veya antioksidan sistemlerin yetersizliği durumunda ortaya çıkan hücre hasarı veya hücrenin ölümü ile sonuçlanan durumdur. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran geçirgenliğinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünleri, aynı hücrenin birçok komponenti ile reaksiyona girerek, hücresel ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etki gösterirler. Böylece membrana bağlı reseptör ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Membran bileşenlerinde polimerizasyon ve çapraz bağlanmalar oluşturan MDA; membranlarda yapısal bozukluklar meydana getirerek, iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi, bazı membran özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca

diffüze olabilme özelliğinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmektedir. Bu özelliklerinden dolayı MDA, mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (Cadenas,1989; Cheeseman ve Slater, 1993; Frank ve Massaro 1980; Freeman ve Crapo, 1982; McQueen ve Williams, 1990).

1.4. 8-iso-prostaglandin F₂α (8-iso-PGF₂α)

İsoprostanlar, oksijen radikalleri tarafından doku fosfolipidlerinin oksidasyonu sonucu eikosanoidlerden non-enzimatik yolla ortaya çıkan bir gruptur. Bu grubun üyelerinden olan ve lipid peroksidasyonu sonucu non-enzimatik olarak araşidonik asitten üretilen 8-iso-prostaglandin F₂α (8-iso-PGF₂α) son yıllarda oksidatif hasarın güvenilir bir göstergesi olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. 8-iso-PGF₂α, araşidonik asitin serbest radikal-katalizli peroksidasyonu tarafından oluşan çok sayıda prostandan biridir. Serbest radikal hasarlı hayvan modellerinde 8-iso-PGF₂α miktarının yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (Cavalca vd., 2012; Davi vd., 1999; Dogukan vd., 2011; Liang vd., 2003; Tsikas, 2004; Ulu vd., 2012).

1.5. Nicotin Amide Phosphoribosyl Transferase (NAMPT)

Nicotin Amide Phosphoribosyl Transferase (NAMPT) veya visfatin olarak bilinen enzim, ilk olarak Samal ve ark. (1994) tarafından B lenfosit öncülleri için bir büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, visfatinin, IL-7 ve kök hücre faktörünün B hücreleri üzerine olan etkilerini artırdığı belirlenmiş ve bu nedenle de, “pre-B hücre koloni artırıcı faktör” olarak isimlendirilmiştir (Samal vd., 1994). Visfatin insan metabolizmasında PBEF1 (pre-B cell colony-enhancing factor 1) geni tarafından regüle edilmektedir. Visfatin son yıllarda keşfedilen adiposit-salınımlı bir protein olarak bilinmekle beraber ayrıca insan ve kemirgenlerde vücut yağ oranı dengesinde de önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Visfatin, başlıca visceral beyaz yağ dokusu tarafından sentezlenen bir adipostokin/adipokindir. Yapılan çalışmalarda, visfatinin obezite, insülin direnci ve inflamasyonda rol aldığı gösterilmiştir. Dolaşımdaki visfatin düzeyinin visceral yağ kitlesi ile korele olduğu belirlenmiştir (Fukuhara vd., 2005; Garten vd., 2009; Sethi ve Vidal-Puig, 2005). Visfatin enzimi memeli biyokimyasında temel olarak nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) biyosentezinde rol almaktadır (Revollo vd., 2007). Visfatinin sadece beyaz adipoz doku tarafından değil, endotoksinle uyarılan nötrofiller tarafından da üretildiği gösterilmiştir. Ayrıca lenfositler, kemik iliği, karaciğer, kas, trofoblast ve fetal

membranlarda da bulunmaktadır (Mamali vd., 2012). Visfatinin, fare deneylerinde, immün cevabın başlatılması ve düzenlenmesinde önemli rolü olan nükleer transkripsiyon faktör (NF- κ B) aktivasyonunda görev aldığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, visfatinin inflamatuvar sürece katılıyor olduğunu göstermektedir. Böbrekteki mesanjiyal hücrelerin aynı zamanda visfatin salınımında yüksek yeteneğe sahip olduğu bildirilmiştir (Song vd., 2008). Visfatin; nefropati patogenezinde önemli bir parakrin rolü ve böbrek iltihabı varlığında seviyesi anlamlı derecede yüksek olan bir enzimdir (Fouda vd., 2011; Kang vd., 2010).

1.6. Sirtuin-1 (SIRT-1)

Sirtuin-1 (SIRT1) sirtuin ailesinin bir üyesi olan ve hücrel düzenlemede görev alan proteinlerin deasetilasyonundan sorumlu bir enzimdir. Sirtuin 1 insanlarda SIRT1 geni tarafından regüle edilir ve ayrıca NAD-bağımlı deasetilaz sirtuin-1 olarak tanımlanır. Çeşitli hücrelerde SIRT-1 esas olarak çekirdekte lokalize olur, sitoplazmik lokalizasyonu da ayrıca bildirilmiştir. Birçok önemli hücrel süreçlerin düzenlenmesinde SIRT-1'in önemi yakın zamanda dikkatleri üzerine çekmiştir. Örneğin, kendi deasetilaz faaliyetleri yoluyla SIRT-1; hücre çoğalması, farklılaşması, hayatta kalma ve yaşlılık, gen ekspresyonu düzenlenmesi, hücrel metabolik dengesinin kontrolü gibi birçok konuda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Ayrıca SIRT-1 aktivasyonunun nöroprotektif rol oynadığı öne sürülmektedir. Bakterilerden ökaryotlara kadar bulunmaktadır. Memeli sirtuin ailesi, yedi üyeden oluşur. Memeli sirtuin proteinleri (SIRT1-SIRT7) gen baskılanması, DNA tamiri ve metabolik regülasyon gibi önemli hücrel ve biyokimyasal proseslerde rol almaktadırlar. SIRT-1 yaşlanma ve uzun ömür kontrolünde önemlidir. Ayrıca mitokondriyal biyogenezi, yağ asidi oksidasyonu ve solunumla ilgili genleri aktive ederek lipid ve glikoz dengesinin düzenlenmesinde yer almıştır. SIRT-1 doğrudan P53 üzerinde etkili olduğundan kanser biyolojisinde önemli rolü vardır. p53 içerisinde Lys382 asetilasyonu; SIRT-1'in doğrudan bir hedefi olarak saptanmıştır. Çeşitli çalışmalardan elde edilen bulgular SIRT-1 modölatörleri (inhibitörleri veya aktivatörleri) diyabet, obezite, kanser gibi inflamasyon ve metabolik bozukluklar için iyi bir tedavi etkeni olarak düşünülmektedir. SIRT1'in hücrel farklılaşma, apoptozis, otofaji, gelişim, kanser, sirkadiyen ritim ve metabolizmada önemli rol oynadığı bilinmektedir. SIRT-1'in substratları arasında bulunan NF- κ B, inflamatuvar hücre hasarında merkezi bir rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda SIRT-1'in ekspresyonunun artması ile sisplatinle bağlı hücre hasarını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. SIRT-1'in katalaz ekspresyonunu

azaltarak renal tübüler hücrelerde ROS seviyelerinde düzelme göstermektedir. Sirtuin'in böbrek koruyucu etkisi ve renal yaşlanmayı geciktirici etkisi muhtemeldir. Beslenme şekilleri ve farklı stres şekilleri, farklı dokularda farklı hücre tipinde sirtuin'i aktive eder. Birden fazla lokal ve sistemik etkileri bu sonucu vermektedir. SIRT-1, glomerüler mesanjiyal hücrelerde TGF- β 1 kaynaklı apoptozisi inhibe eder. Böylece SIRT-1 böbrek glomerüler hastalıkların önlenmesi için yeni bir strateji sağlayabilir. SIRT-1 aynı zamanda reaktif oksijen türleri hücresel detoks yeteneğini artırır. Son zamanlardaki çalışmalarda obezite ile bağlantılı birçok metabolik adaptasyonu düzenlediği gösterilmiştir. SIRT-1'in adipokinlerin ifadesini düzenlediği görülmüştür. SIRT-1 yağ hücrelerinin olgunlaşması için gerekli faktörlerin etkinliğini baskılar, insülin salgısını düzenler, plazma glukoz düzeylerini ayarlar ve insülin duyarlılığı ve mitokondriyal kapasiteyi değiştirebilir. SIRT-1 kromatin yapısı ve gen ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisidir ve bu şekilde hücre faaliyetlerin düzenlenmesi ile önemli bir hücresel kimlik belirleyici olduğu ortaya çıkabilir. Kromatinin kompleks yapılaraya sahip olmasına rağmen, sadece histon sarılı DNA son derece organize olarak görülebilir. Farklı epigenetik mekanizmalarla kromatinler yeniden oluşur, gen ifadesinin farklı bir model olmasına öncülük eder. SIRT1'in bu genlerin ifadelerini hem normal hem anormal olarak düzenlendiği bilinmektedir. SIRT1 adipogenik programda önemli moleküler anahtar faaliyetlerini düzenler. Sirtuinin farklı organizmalarda hücresel yaşamın düzenleyicisi olması şaşırtıcı değildir. Örneğin, diyabete bağlı ölüm nedenlerinden biri diyabetik nefropatidir, özellikle son dönemdeki böbrek hastalıklarının sorumlusu olarak görülür. Diyabetik nefropatinin bir tipinde, diyabetik sıçanların böbreklerinde SIRT1'in azaldığı görülmüştür (Baur, 2010; Dong vd., 2011; Gillum vd., 2011; Hao ve Haase, 2010; Hasegawa vd., 2008; Jin vd., 2009; Jung vd., 2012; Kalle vd., 2010; Kanfi vd., 2008; Li vd., 2010; Matsui vd., 2012; Metoyer ve Pruitt, 2008; Nogalska vd., 2010; Price vd., 2012; Uhla vd., 2010; Yi ve Luo, 2010; Zhang vd., 2012).

1.7. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

Siklooksijenazların en belirgin izoformlarından olan cox-2, daha çok kanser, yangı ve iltihabi reaksiyonlarda fazla oranda sentezlenen normal dokularda sentez oranı oldukça zayıf olan bir enzimdir. Kanser hücrelerinin gelişimi ve farklılaşmasında cox-2 enziminin büyük rolü vardır ve bu mekanizmada oldukça önem arz etmektedir (Dannenberg vd., 2001; Baek, 2006). Siklooksijenaz-2 sentezi dokularda, hormonlar, büyüme faktörleri,

endotoksinler, sitokin benzeri tümör nekrozis faktör (TNF), interleokinler ve interferonlar tarafından indüklenmektedir. Herhangi bir patolojik durumda bu uyarıcı faktörlere bağlı olarak cox-2 sentezinde bulunduğu dokuya göre büyük artışlar görülmektedir. Bu uyarıcı faktörler, hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlandığında, bazı protein kinazlar aktive olmakta buna bağlı olarak da NF- κ B aktifleşerek çekirdekte cox-2 gen promotor bölgesinden cox-2 enzim sentezini teşvik etmektedir. Siklooksijenazlar, prostaglandin sentezleyici enzimler olarak da bilinmektedirler. Özellikle de araşidonik asidin prostaglandinlere dönüşümünde etkilidirler. Hücre zarında bulunan araşidonik asit metabolizması fosfolipaz A₂ enzimi tarafından katalizlenmektedir (Tuynman, 2004). Mekanizmada öncelikle fosfolipitlerin fosfolipaz A₂ ile hidrolizi sonucu araşidonik asit oluşmaktadır, sonra cox-2 enzimi katalizörlüğünde moleküler oksijen araşidonik asite aktararak kararsız bir bileşik olan prostaglandin G₂ (PGG₂) oluşmakta, bu da hemen cox-2 enziminin peroksidaz aktivitesi katalizörlüğünde PGH₂'ye dönüşmekte ve spesifik izomerazlar da PGH₂'yi farklı prostaglandinlere dönüştürmektedir (Dannenberg vd., 2001; Fernandez-Martinez vd., 2012).

1.8. Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) sitokinlerin transforming büyüme faktörü beta familyasının polipeptid üyesidir. TGF- β 1 proteini hücresel büyüme, çoğalma, farklılaşma ve programlı hücre ölümü (apoptozis) gibi birçok hücre ve moleküler işlevde rol almaktadır. İnsanlarda bu protein TGF- β 1 geni tarafından regüle edilir. TGF- β 1 geninin aktivasyonunda veya sinyalizasyonundaki düzensizliğin apoptozis ile sonuçlanabileceği birçok önemli çalışma tarafından gösterilmiştir. Birçok hücre TGF- β 1 proteinini sentezlemekte ve bu hücrelerin hemen hepsi bu proteine spesifik reseptörlere sahiptirler. TGF- β 1, TGF- β 2, ve TGF- β 3, hepsi aynı sinyal yolağı üzerinden regüle edilmektedirler. TGF- β 1 proteini ayrıca bağışıklık sisteminin kontrolünde de aktif bir şekilde rol oynamaktadır (Assoian ve ark., 1983; Li ve ark., 2010; Taylor, 2009).

1.9. Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

Tümör nekroz faktör (TNF) normal şartlar altında birçok hücre tarafından üretilen ve spesifik olarak tümörleşmiş hücrelerin degradasyonunu sağlayan bir sitokindir. Yapısal olarak 185 aminoasitten oluşan glikoprotein hormonudur. TNF- α makrofajlar ve diğer çeşitli hücre tipleri, TNF- β ise T hücre lenfositleri tarafından sentezlenir. TNF, interleokin-

1 (IL-1) ile beraber veya ayrı bir şekilde sistemik inflamasyonu aktive etmektedir. Birçok çalışmadan alınan bulgulara göre bu protein insulin direncini arttırmaktadır. Makrofajlar tarafından üretilen TNF- α yağ dokusundan salgılanan çok fonksiyonlu bir sitokindir. Hücre çoğalması ve değişimi, apoptozis, lipid metabolizması, pıhtılaşma gibi geniş bir biyolojik spektrumda görev alırlar. TNFRSF1A/TNFR1 ve TNFRSF1B/TNFR2 olarak adlandırılan reseptörleri aracılığıyla fonksiyon görmektedir. İnflamasyon, septik şok, otoimmün hastalıklar, obezite ve insülin rezistansı ile birliktelik gösterir. Bu peptidin soluble form ve membrana bağlı form olmak üzere iki formu vardır. Akut inflamasyon ve obezitede TNF- α ekspresyonu artar. TNF- α ; lipolize neden olarak adipositlerin apoptozise ilerlemesine, insülin rezistansına, Glukoz Taşıyıcı Protein 4 (GLUT 4) inhibisyonuna, insülin reseptör sentezinde azalmalara neden olan bir yangı belirleyici sitokindir (Fantuzzi, 2005; Hotamisligil, vd., 1994; Hotamisligil, 2003).

Antikanserojen ilaç olarak klinikte sıklıkla kullanılan ksenobiyotik özellikli sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisitede NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağındaki mekanizmalar üzerine antioksidan özellikli melatoninin etkileri ile ilgili herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır. Bu çalışmada melatoninin, sisplatin nefrotoksisitesi oluşturulan ratlarda;

- Böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α düzeyleri üzerine etkileri,
- Serum üre, kreatinin değerleri üzerine etkileri,
- Böbrek dokusu lipid peroksidasyonu (MDA) üzerine etkileri,
- Böbrek dokusu 8-iso-prostaglandin F₂ α üzerine etkileri,
- Böbrek dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikler üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen ve ağırlıkları 200-215 g arasında değişen erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı (n=40, 8 haftalık). Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (FÜHADEK), onay alındıktan sonra (Tarih: 20.01.2011, Toplantı: 2011/1, Karar No: 21), çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal musluk suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelet yemle beslendi. Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının bulundukları nisbi nem %55 $\pm$ 5, ortam sıcaklığı 22 $\pm$ 2 °C ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde takip edildi. Hayvanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi.

2.2. Deneme Düzeni

Nefrotoksisite tek doz intraperitoneal (i.p.) sisplatin enjeksiyonu ile oluşturuldu. Sisplatin (Sigma Chemical Co, USA), % 0.9 salin (1 ml/100 gr/kg i.p.) içinde 7 mg/kg olacak şekilde i.p. enjeksiyon yoluyla araştırmanın 3. gününde tek dozda uygulandı.

Ratlar rastgele aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

1. Kontrol grubu (n=10): Sisplatin uygulanmayan, araştırmanın 3. gününde i.p. olarak sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solüsyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve bazal diyetle beslenen ratlar.
2. Melatonin grubu (n=10): Sisplatin uygulanmayan, 12 gün süreyle Melatonin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (4 mg/kg/gün) verilen ratlar.
3. Sisplatin grubu (n=10): Sisplatinin araştırmanın 3. gününde % 0.9 salin içinde 7 mg/kg olacak şekilde i.p. enjeksiyon yoluyla tek dozda uygulandığı ratlar.
4. Melatonin + Sisplatin grubu (n=10): Sisplatin uygulanan ve uygulamadan 2 gün önce ve uygulamadan sonra 10 gün süreyle Melatonin (4 mg/kg/gün) verilen ratlar.

Melatonin, % 0.1 etil alkol içeren serum fizyolojikte hazırlanarak her bir rata 4 mg/kg/gün dozunda karanlık periyoda geçmeden hemen önce intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonla sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 10 gün toplam 12 gün süreyle günde 1 kez olacak şekilde verildi. Sisplatin uygulamasından 10 gün sonra

ratlar anestezi altında dekapite edilerek analizler için doku örnekleri alındı ve analizler yapılmaya kadar -80°C de saklandı. Böbrekler fosfat tamponlu solüsyon ile (PBS; 0.15 M NaCl ve 0.01 M sodyum fosfat tamponu, pH 7.4) aorta yoluyla perfüze edilerek histolojik inceleme için çıkarıldı. Serum üre-azotu ve kreatinin ölçümleri için kan alındı.

2.3. Laboratuvar Analizleri

2.3.1. Serum Üre Kreatinin Analizleri

Kan örnekleri 3000 g'de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum üre nitrojeni ve kreatinini biyokimyasal analizör ile (Olympus AU-660, Japonya) ölçüldü.

2.3.2. MDA Analizi

Doku malondialdehit (MDA) seviyeleri, Karatepe'den (2004) modifiye edilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) analiz edildi.

- Her denekten 150'şer mg böbrek dokusu alındı.
- Üzerine 450 μl deiyonize su ve 50 μl butilat hidroksitoluen (BHT) eklenerek cam homojenizatörde doku parçalandı.
- 0.5 M'lık HClO_4 ' den 500 μl ilave edilerek proteinler çöktürüldü.
- Karışım 4500 devir/dk hızla soğutmalı santrifüjde 5 dakika boyunca santrifüjlendi.
- Süpernatant kısımlar alınarak dikkatlice alınarak HPLC viallerine dizildi.

Tüm işlemlerde homojenatlar ve kimyasallar ışıktan korundu ve soğuk zincire riayet edildi.

- Hareketli faz olarak 30 mM KH_2PO_4 - metanol (% 82.5 – 17.5; pH: 4) kullanıldı.
- 250 nm'de İnertsil 5 μ C-18 (15 cm x 4,6 mm) kolonu kullanıldı.
- Akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlendi.
- MDA için geri kazanım % 98.8 olarak bulundu.

2.3.3. 8-iso-PGF₂ α Analizi

8-iso-prostaglandin F₂ α düzeyleri enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemine göre çalışan ticari kitlerle (Cayman Chemical, MI, USA) ölçüldü. ELISA sistemi (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Vermont) kullanılarak okundu.

2.3.4. Western Blot Analizleri

Böbrek dokusu 1:10 (w/v)‘ luk soğuk hipotonik tampon [10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)] içinde homojenize edildi. Doku homojenatlarına % 10’luk Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinden 80 µl ilave edildi ve karışım 14.000 g’de 2 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni tüplere alındı. Pellet, 40 µl %10’luk NP-40 ilaveli soğuk hipotonik tamponun [10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)] 500 µl’si ile bir kez yıkandı. Daha sonra 200 µl tampon [50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF,% 20 gliserol] içerisinde yeniden süspanse edildi ve 14.800 g’de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Elde edilen süpernatant yeni tüplere alındı (Farombi vd., 2008). Protein konsantrasyonu Lowry prosedürüne uygun şekilde protein ölçüm kiti kullanılarak (Sigma, St. Luis, MO, USA) ölçüldü. Süpernatantlara, % 2’lik β-merkaptetanol içeren sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) elektroforezi tamponu eklendi. SDS-PAGE jel içinde eşit miktarlarda (50 µg) protein, elektroforez için kullanıldı (Laemmli, 1970). Arkasından nitrosellülöz membranlara (Schleicher and Schuell Inc, Keene, NH, USA) aktarıldı. Nitrosellülöz membranlar PBS içinde 5 dakika süreyle 2 kez yıkandı ve % 1’lik sığır serum albümini içerisinde primer antikor uygulamasından önce 1 saat bekletildi. Primer antikor [Namt, Sirtuin-1, Cox-2, TGF-β1, TNF-α (Abcam, Cambridge, UK)] % 0.05 Tween-20 içeren aynı tampon içinde 1:1000 oranında dilüe edildi. Nitrosellülöz membran gece boyunca 4°C’de primer antikorları ile inkübe edildi. Blotlar yıkandı ve sekonder antikor [horseradish peroksidaz-conjugated goat anti mouse IgG (Abcam, Cambridge, UK)] ile inkübe edildi. Spesifik bağlanma, diaminobenzidin ve H₂O₂ substratları kullanılarak tespit edildi. Protein yükleme β-aktin antikoruna (A5316; Sigma) karşı monoklonal bir mouse antikor kullanılarak kontrol edildi. Protein düzeyleri bir görüntü analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) ile dansitometrik olarak analiz edildi.

2.4. Histopatolojik Değerlendirme

Her bir rattan alınan sol böbrek histolojik inceleme için hemen %20’lik nötral tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edildi. Daha sonra yavaş yavaş dehidrate edilip parafine gömüldü. Parafin bloklar standart işlemlere uygun olarak 5µM’lik kesitler halinde kesilerek hematoksilin- eosin boyası ile boyandı (Ross vd., 1989). Her bir böbrek lamı için

minimum 10 alan incelendi. Vaküoler dejenerasyon, tübüler atrofi ve dilatasyon, tübüler nekroz, interstisyel ödem ve inflamasyon tedavi gruplarından haberdar olmayan bir patolog tarafından semikantitatif olarak değerlendirildi. Değişimin şiddetini belirlemede kullanılan derecelendirme sistemi: (-): yok, (+): hafif derece hasar, (++): orta derece hasar, (+++): şiddetli hasar olarak belirlendi.

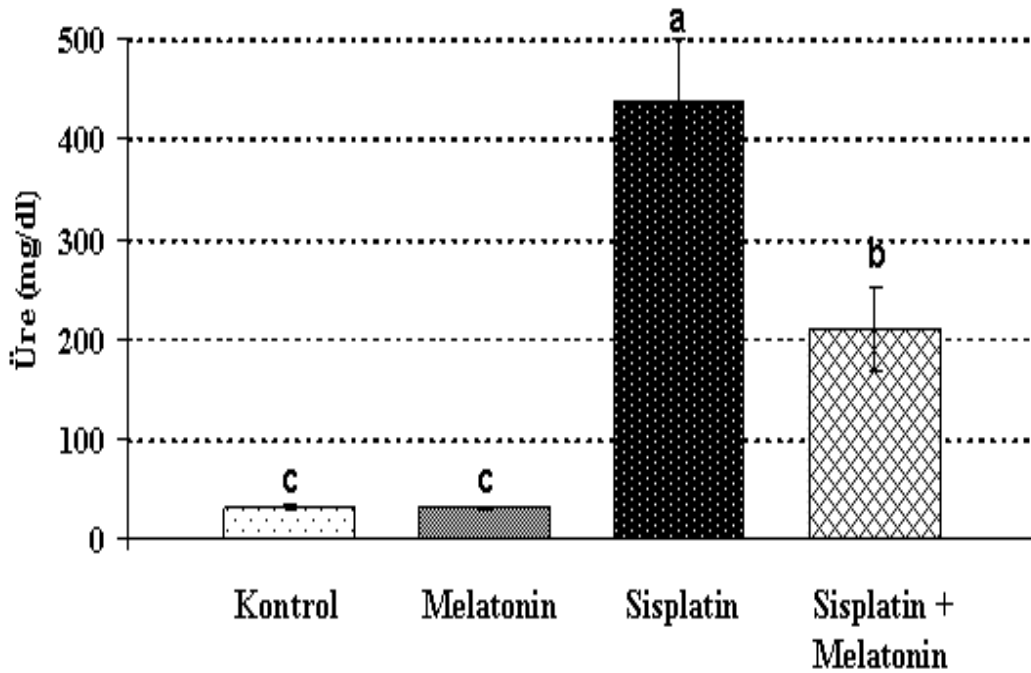
2.5. İstatistiksel Analizler

Veriler SAS (2002) paket programında PROC GLM (General Linear Model) prosedürü ile analiz edildi. Grup içi farklılığı ortaya koymak amacıyla Fisher post hoc testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Üre Düzeyleri

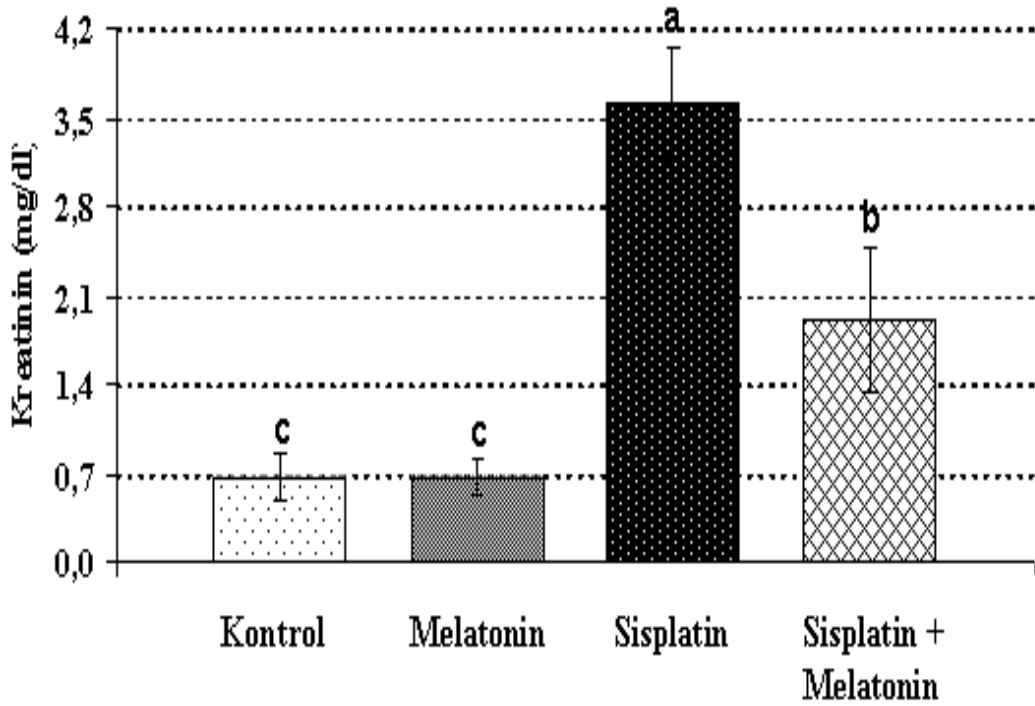
Serum üre düzeyleri incelendiğinde şekil 1’de görüldüğü gibi gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Gruplar içi farklılığa bakıldığında ise sisplatin grubunun (438.9 ± 60.1 mg/dl), kontrol grubuna (31.5 ± 3.4 mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.0001$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu (209.0 ± 42.5 mg/dl) üre düzeyleri önemli bir düşüş göstermiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile melatonin grubu (30.9 ± 2.0 mg/dl) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Melatonin+sisplatin grubunda üre değerleri sisplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol ve melatonin grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 1. Serum üre düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.2. Kreatinin Düzeyleri

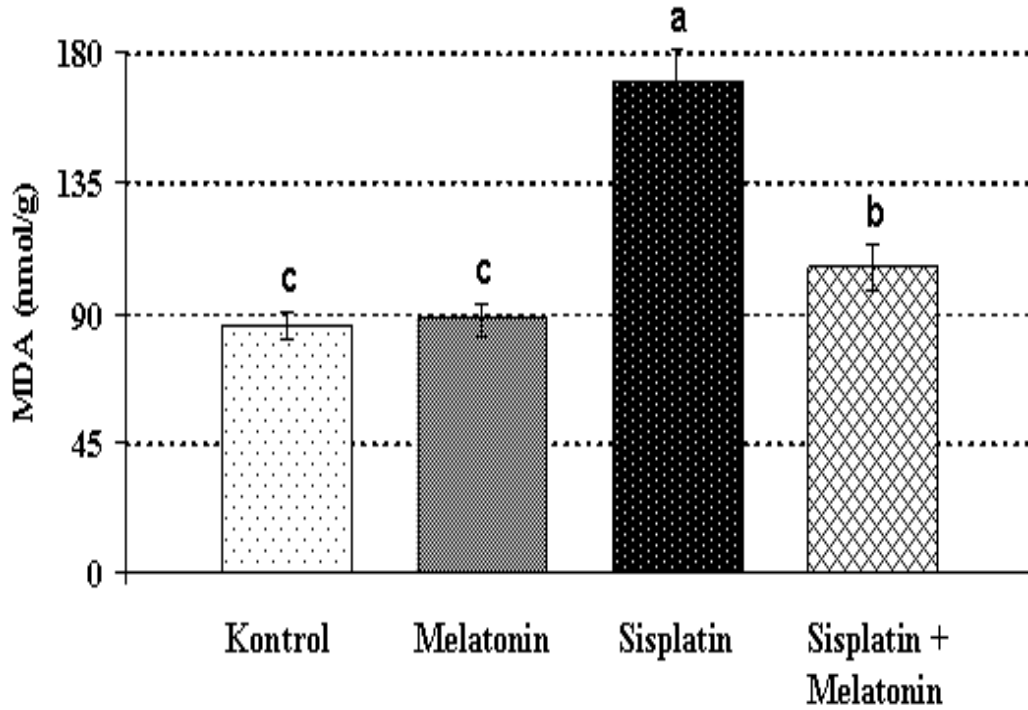
Serum kreatinin düzeyleri incelendiğinde şekil 2’de görüldüğü gibi gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Gruplar içi farklılığa bakıldığında ise sisplatin grubunun (3.61 ± 0.43 mg/dl), kontrol grubuna (0.68 ± 0.19 mg/dl) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu (1.91 ± 0.57 mg/dl) kreatinin düzeyleri önemli bir düşüş göstermiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile melatonin grubu (0.67 ± 0.14 mg/dl) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Melatonin+sisplatin grubunda kreatinin değerleri sisplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol ve melatonin grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 2. Serum kreatinin düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.3. MDA Düzeyleri

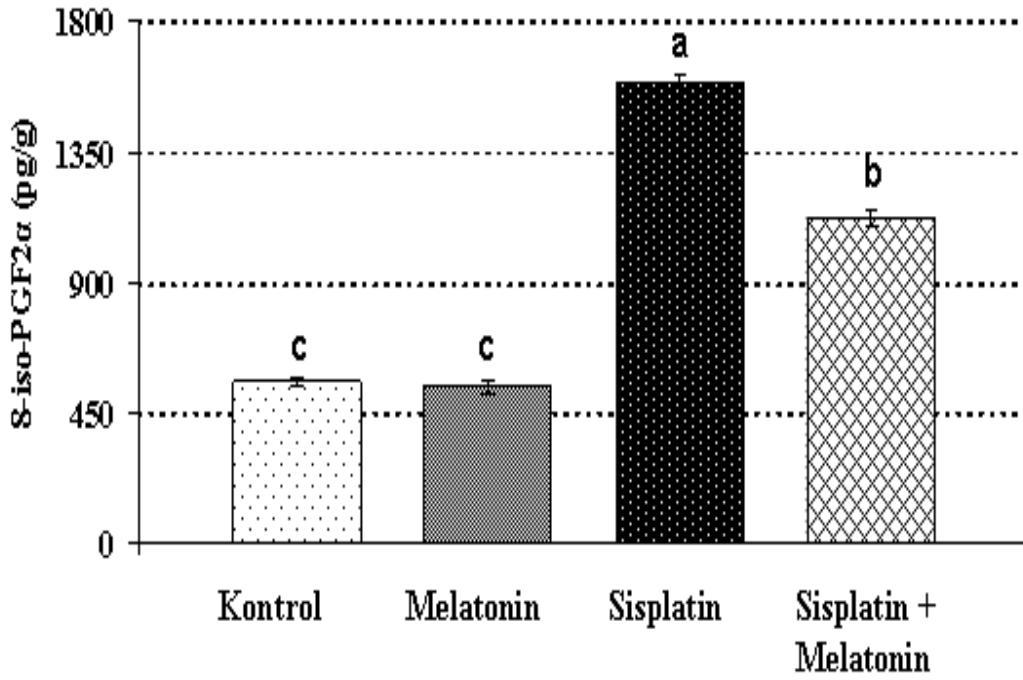
Böbrek dokusu MDA düzeyleri incelendiğinde şekil 3’de görüldüğü gibi gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Gruplar içi farklılığa bakıldığında ise sisplatin grubunun (170.0 ± 10.5 nmol/g), kontrol grubuna (85.6 ± 4.5 nmol/g) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu (105.4 ± 8.2 nmol/g) MDA düzeyleri önemli bir düşüş göstermiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile melatonin grubu (87.5 ± 5.6 nmol/g) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Melatonin+sisplatin grubunda MDA değerleri sisplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol ve melatonin grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 3. Böbrek dokusu MDA düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.4. 8-iso-prostaglandin F_{2α} Düzeyleri

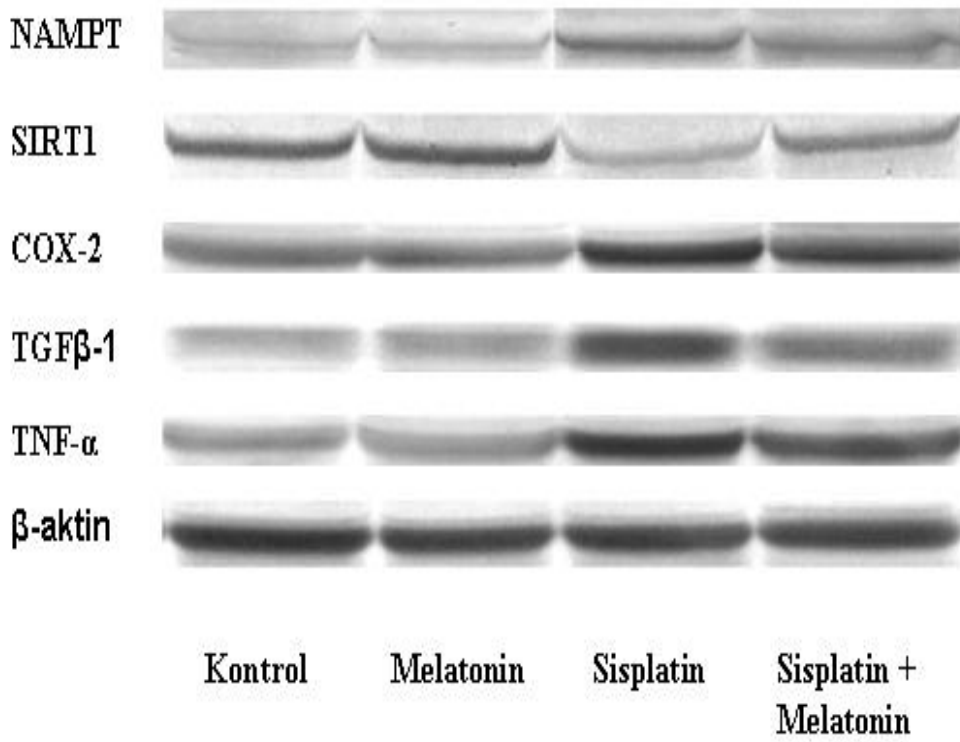
Böbrek dokusu 8-iso-prostaglandin F_{2α} düzeyleri incelendiğinde şekil 4’de görüldüğü gibi gruplar arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Gruplar içi farklılığa bakıldığında ise sisplatin grubunun (1582 ± 35 pg/g), kontrol grubuna (558 ± 14 pg/g) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p<0.001$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu (1125 ± 26 pg/g) 8-iso-prostaglandin F_{2α} düzeyleri önemli bir düşüş göstermiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile melatonin grubu (543 ± 22 pg/g) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Melatonin+sisplatin grubunda 8-iso-prostaglandin F_{2α} değerleri sisplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol ve melatonin grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4. Böbrek dokusu 8-iso-prostaglandin F_{2α} düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.5. Western Blot Analizleri

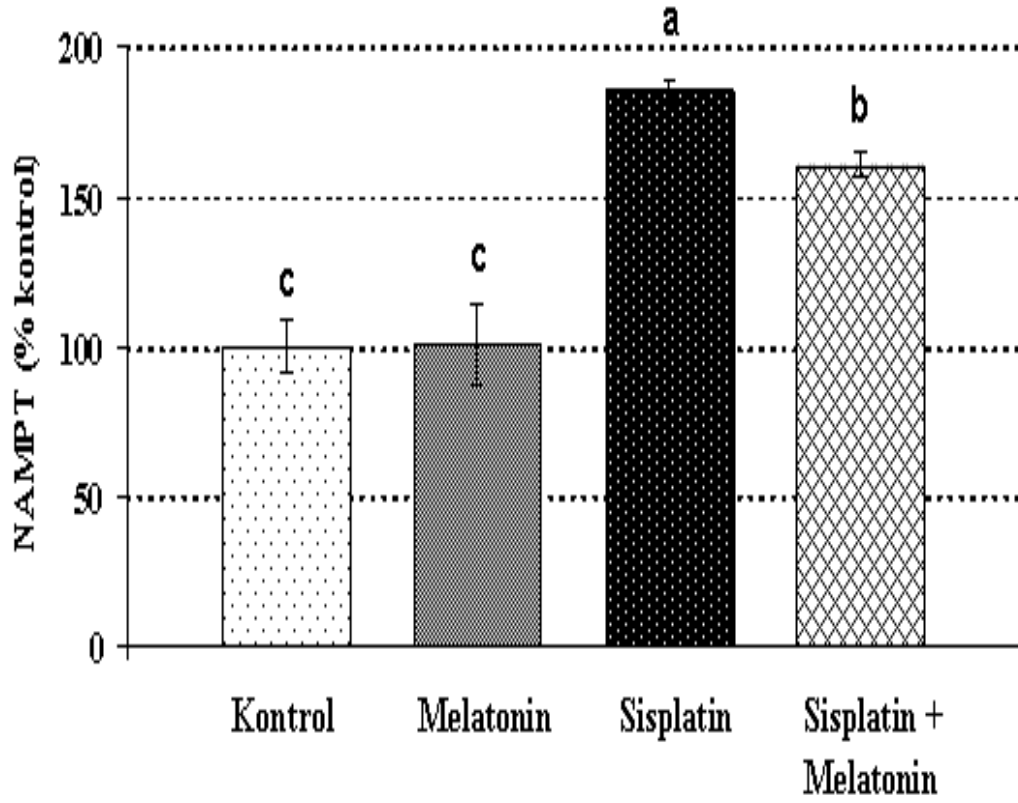
Bu çalışmada; böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre ratların böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α düzeylerini ifade eden Western blot bantları şekil 5’de gösterilmiştir. Ayrıca nitrösellülöz membranlarda görüntülenen bu bantların rölatif yoğunlukları hesaplanarak mukayeseli barlar oluşturulmuştur.



Şekil 5. Böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α düzeylerini ifade eden Western blot bantları

3.5.1. NAMPT Düzeyleri

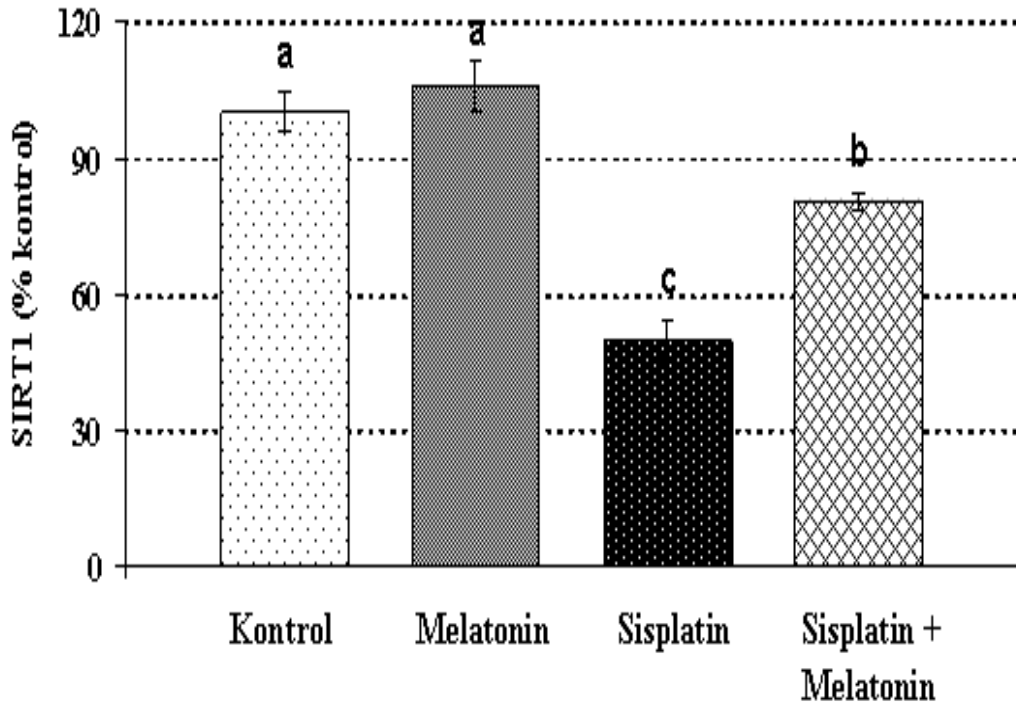
Böbrek NAMPT düzeyleri şekil 6'da gösterilmiştir. NAMPT düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sisplatin grubu NAMPT düzeyi, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.05$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu NAMPT düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile melatonin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 6. Böbrek dokusu NAMPT düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.5.2. SIRT-1 Düzeyleri

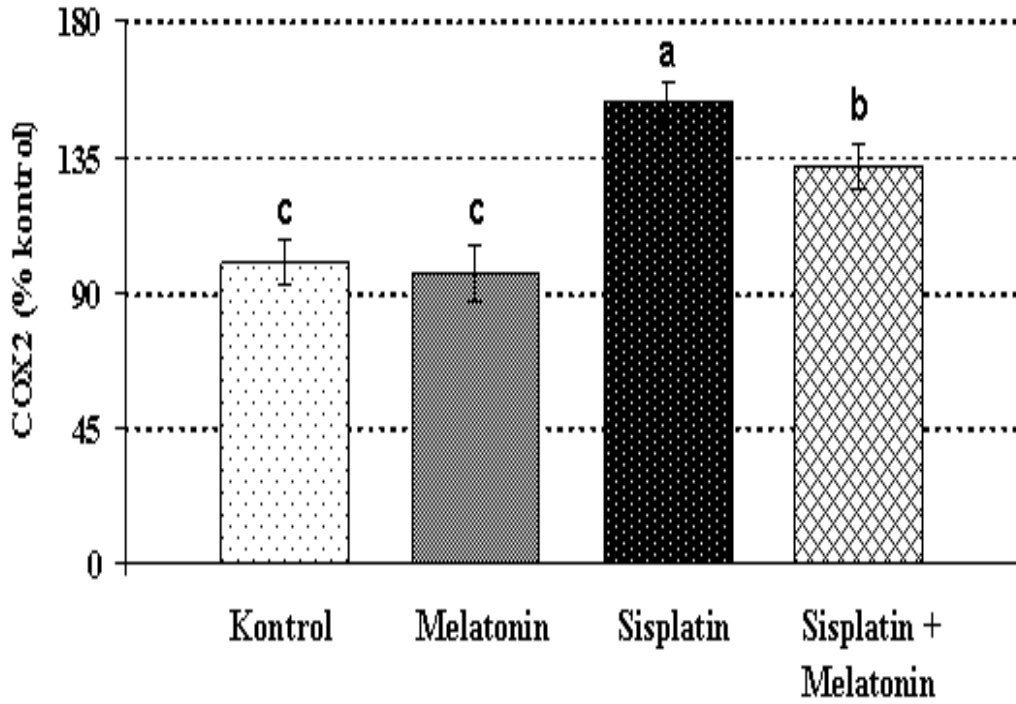
Böbrek SIRT-1 düzeyleri şekil 7’de gösterilmiştir. SIRT-1 düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sisplatin grubu SIRT-1 düzeyi, kontrol grubuna göre azalmıştır ($p<0.05$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu SIRT-1 düzeyinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile melatonin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 7. Böbrek dokusu SIRT-1 düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.5.3. COX-2 Düzeyleri

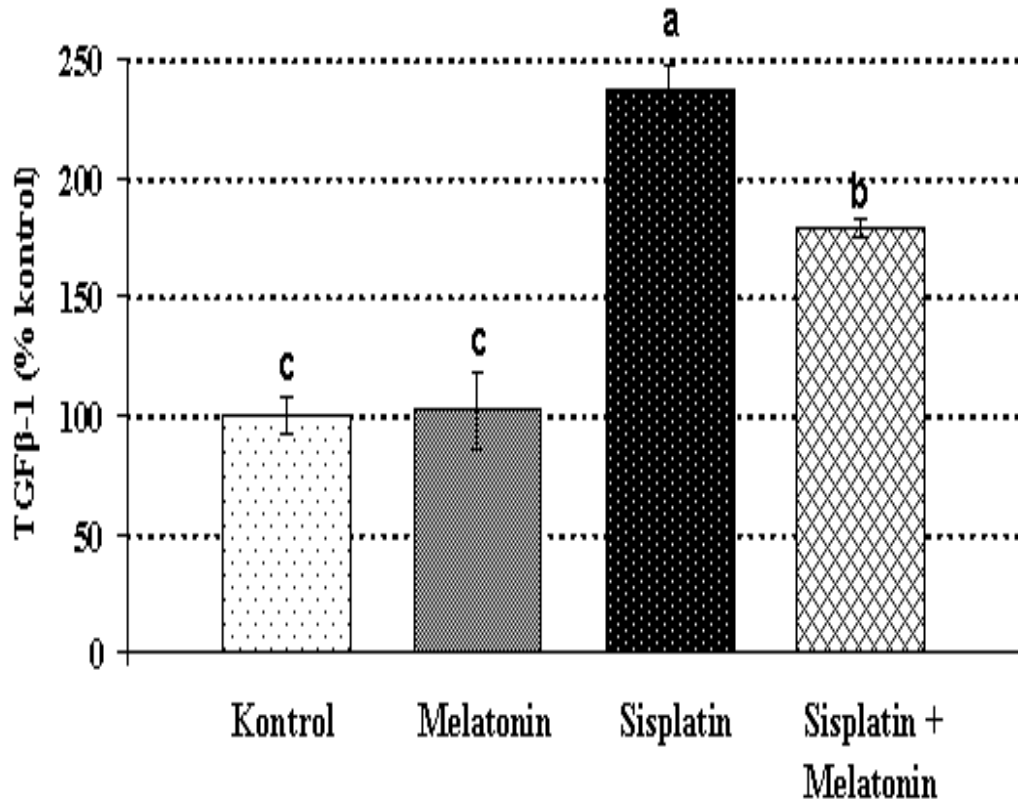
Böbrek COX-2 düzeyleri şekil 8’de gösterilmiştir. COX-2 düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sisplatin grubu COX-2 düzeyi, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.05$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu COX-2 düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile melatonin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 8. Böbrek dokusu COX-2 düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.5.4. TGF- β 1 Düzeyleri

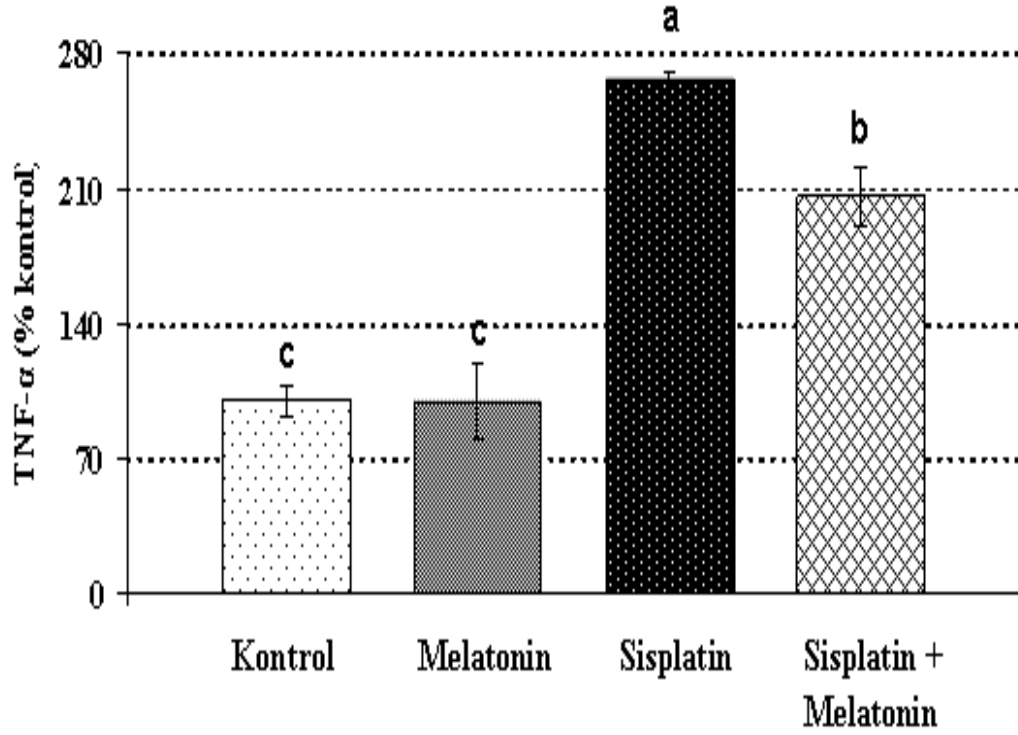
Böbrek TGF- β 1 düzeyleri şekil 9’da gösterilmiştir. TGF- β 1 düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sisplatin grubu TGF- β 1 düzeyi, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.05$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu TGF- β 1 düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile melatonin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).



Şekil 9. Böbrek dokusu TGF- β 1 düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.5.5. TNF- α Düzeyleri

Böbrek TNF- α düzeyleri şekil 10’da gösterilmiştir. TNF- α düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($p<0.001$). Sisplatin grubu TNF- α düzeyi, kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.05$). Sisplatin grubu ile karşılaştırıldığında melatonin+sisplatin grubu TNF- α düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile melatonin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$).



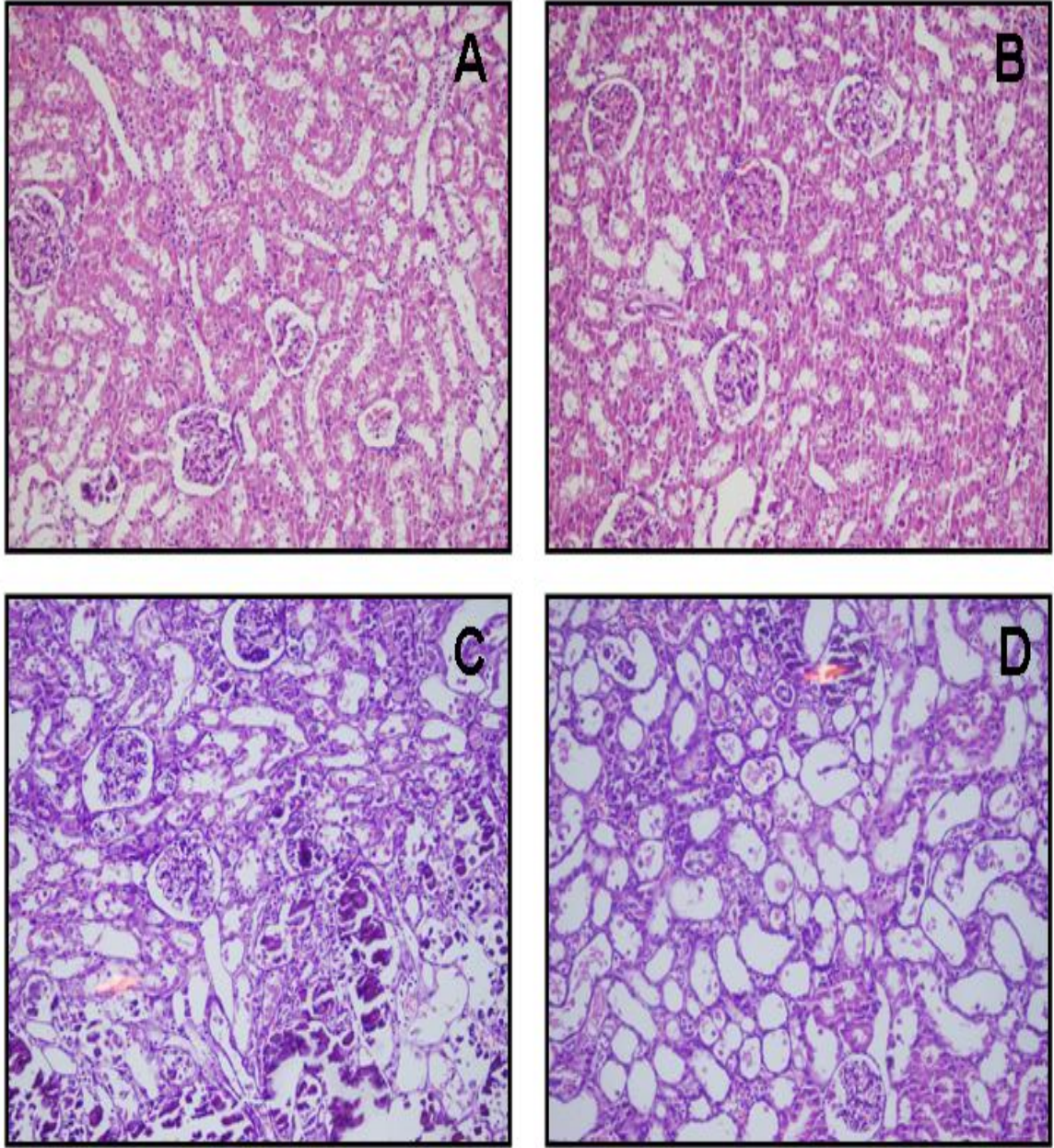
Şekil 10. Böbrek dokusu TNF- α düzeyleri [a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$)]

3.6. Histopatolojik Bulgular

Kontrol ve melatonin grubundaki ratlardan alınan böbreklerde herhangi bir patoloji gözlenmedi. Buna karşılık, sisplatin verilen grupta korteks ve dış medullada orta şiddette vakuolizasyon, hafif şiddette interstisyel ödem ve inflamasyon, şiddetli derecede tübüler nekroz gözlemlendi. Melatonin+sisplatin grubunda ise sisplatinin indüklediği histopatolojik değişikliklerin şiddetinin azaldığı görüldü (Tablo 1, Şekil 11)

Tablo 1. Melatonin uygulamasının rat böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler üzerine etkisi (n=10)

Gruplar				
Morfolojik Değerlendirme	Kontrol	Melatonin	Sisplatin	Melatonin +sisplatin
Tübüler Rejenerasyon	-	-	+	-
Tübüler Dilatasyon	-	-	++	+
Tübüler Vakuolizasyon	+	+	++	+
İnterstisyel İnflamasyon	-	-	+	-
Tübüler Nekroz	-	-	+++	+
- : Yok, + (Hafif) : < % 25, ++ (Orta) : % 25-50 arası, +++ (Şiddetli) : % 50'den fazla				



Şekil 11. Gruplarda böbreğin histopatolojik görünümü [A:Kontrol grubu, normal histoloji; B:Melatonin grubu, normal histoloji; C:Sisplatin grubu, tübülüslerde yaygın dejenerasyon, nekroz ve rejeneratif değişiklikler; D: Melatonin+Sisplatin grubu, tübülüs epitel hücrelerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ve tübüller hasar (H&E, x200)]

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma, tek doz intraperitoneal (i.p.) sisplatin uygulamasıyla oluşturulan rat nefrotoksisite modelinde melatonin uygulamasının böbrek koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Melatonin verilen hayvanlarda serum üre ve kreatinin seviyeleri, böbrek fonksiyonlarındaki azalmanın sisplatin enjekte edilen gruba oranla belirgin biçimde düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂ α seviyeleri sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Melatoninle tedavi edilen ratlarda, SIRT-1 protein ekspresyon seviyesi belirgin biçimde artış yönünde düzenlenirken NAMPT, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ise azalmıştır. Histopatolojik bulgular, melatoninle ön tedavinin, sisplatinle oluşturulan tübüler nekrozu ve sisplatinin neden olduğu çoğu patolojik değişimi indirgediğini ortaya koymuştur.

Sisplatin ROS üretimini artırır, antioksidan enzim düzeylerini azaltır, TNF- α seviyesini geliştirir (Ramesh ve Reeves, 2002), toksisitesini tetiklemek suretiyle apoptozisi uyarır (Tsuruya vd., 2003). Böbrekteki mesanjiyal hücrelerin NAMPT salınımında yüksek yeteneğe sahip olduğu bildirilmiştir (Song vd., 2008). NAMPT nefropati patogeneğinde önemli rolü olan bir enzimdir (Kang vd., 2010). NAMPT hücrede NAD'ın dönüşümünde ve regülatör enzimlerin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (Yang vd., 2006). Sisplatin tarafından oluşturulan serbest oksijen radikallerinin NF- κ β 'yi aktive ettiği bildirilmektedir (Lee vd., 2006). SIRT-1'in kanser hücrelerinin apoptozise yönlendirilmesinde ve oksidatif strese direncin artırılmasında görev aldığı rapor edilmiştir (Kalle vd., 2010). NF- κ β , SIRT-1'in önemli substratlarından biridir ve inflamatuvar hücre hasarında merkezi bir rol oynamaktadır. Sisplatin kaynaklı böbrek hasarında NF- κ β 'nin aktifleşmesi suretiyle ROS türlerinin yangıdaki rolü de araştırılmıştır (Lee vd., 2006). Yapılan araştırmalarda SIRT1'in ekspresyonunun artması ile sisplatine bağlı hücre hasarını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Jung vd., 2012). SIRT-1 aynı zamanda antioksidan enzim aktivasyonunu sağlayarak reaktif oksijen türlerinin hücresel detoks yeteneğini artırır (Li vd., 2010). Yapılan bir araştırmada; diyabetik ratlarda SIRT1'in, anti-inflamatuvar etkileri ve otofaji düzenlenmesi yoluyla diyabetik nefropatiyi düzelttiğini ortaya konulmuştur (Tomino vd., 2012).

Sisplatin nefrotoksisitesinde çeşitli mekanizmalar suçlanmakla beraber son dönemlerde patofizyolojide daha çok oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Oksidatif

hasar, organizmanın antioksidan kapasitesinin üzerinde ROS (süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleri) üretimi veya antioksidan mekanizmaların yetersizliğinde oluşur. Sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın rolü çeşitli yayınlarda bildirilmektedir (Dogukan vd., 2011; Sahin vd., 2010a; Sahin vd., 2010b; Schrier, 2002; Tuzcu vd., 2010; Ulu vd., 2012). Kemoterapötik ajanlar tümoral hücrelere spesifik olmamakla birlikte yüksek bölünme hızına sahip hücrelerde daha fazla etkili olmaktadır. Bu özellikleri ile kontrolsüz bir şekilde bölünmeye uğrayan tümoral hücrelere etki ederken aynı zamanda fizyolojik olarak yüksek bölünme hızlarına sahip normal hücrelere de etki etmektedirler. Böbrek hücreleri yüksek bölünme hızına sahip olmamasına rağmen yüksek kan akım hızı ve hacmi nedeni ile kemoteropatik ajana daha fazla maruz kalması ve tübül hücrelerindeki transport mekanizmaları aracılığı ile kemoteropatik ajanın birikmesi sonucu böbrek hücreleri de etkilenmektedir. Sisplatin nefrotoksisitesinde suçlanan çeşitli mekanizmaların sonucu gelişen lipid peroksidasyonu tübül hücrelerinde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmakta ve bütün bu değişiklikler nedeniyle böbrek fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesini azaltmaya yönelik olarak çinko pikolinat, likopen, timokinon, yeşil çay, pravastatin, sistein, Ginko alkaloidleri, C vitamini, asetilsalisilik asit, ebselen, curcumin, taurine, mizoprostol, bixin, lipoik asit, SOD, selenyum, flavonidler, erdosteine, kafeik asit fenetil ester ve E vitamini gibi çeşitli antioksidanlar deneysel çalışmalarda kullanılmış ve kısmen koruyucu etkilerinin olduğu yayınlarda belirtilmiştir (Anand ve Bashey 1993; Dogukan vd., 2011; el Daly, 1998; Fujieda vd., 2011; Matsushima vd., 1998; Sahin vd., 2010a; Sahin vd., 2010b; Tuzcu vd., 2010; Ulu vd., 2012; Yildirim vd., 2003). Oksidatif stres ve yangı sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin kapsadığı iki çok önemli faktördür (Lee vd., 2006).

Melatonin (N-asetil 5-metoksitriptamin) ve metabolitlerinin, antioksidan sistemi serbest radikalleri süpürmeye zorladığı gösterilmiştir (Hardeland vd., 2007; Tan vd., 2007). Melatonin; antioksidan enzimlerin (Reiter vd., 2000) ve glutatyonun (Urata vd., 1999) sentezini sitümile eder, başka antioksidanların aktivitelerini artırır (Gitto vd., 2001) ve diğer antioksidatif enzimleri oksidatif hasardan korur (Mayo vd., 2003). Wang ve arkadaşları (2009), melatoninin; kardiyo pulmoner by pass sonucu oluşan renal hasarın önlenmesinde muhtemelen antioksidan fonksiyonu ve HO-1 sentezini artırması sonucunda etkili olduğunu göstermişlerdir (Wang vd., 2009). Melatonin; iyi tolere edilebilen, başka tedavilerle düşük etkileşim potansiyeline sahip ve bazı vakalarda serbest radikal süpürücü özellikleri nedeniyle sentetik ilaçların yan etkilerini azaltabilen bir indoldür (Reiter vd.,

2002). Önceki çalışmalarda melatoninin küçük moleküler boyutuna ve yüksek oranda lipofilik oluşuna bağlı olarak kan-beyin bariyerinden rahatlıkla geçebildiği ve insanlarda minimum yan etkiye neden olduğu (Cheung vd., 2006; Reiter vd., 2007; Reiter vd., 2009), farelerde beyin hasarını (Kilic vd.,2004; Kilic vd., 2005; Zou vd., 2006) ve rat modellerinde iskemik felci indirgediği gösterilmiştir.

Melatonin bir antioksidan olarak değişik hayvan gruplarında, yaşa bağlı nörodejenerasyonda (Ortiz vd., 2008), fokal serebral iskemide (Kilic vd., 2012; Kilic vd., 2004, Kilic vd., 2005), travmatik beyin hasarında (Beni vd., 2004), ventriküler hipertrofide (Paulis vd., 2009), antraksilin ve gentamisin gibi antibiyotik kaynaklı nefrotoksisitede (Sener vd., 2002) ve farklı nefrotoksik modellerde çalışılmıştır (Hara vd., 2001; Nava vd., 2000).

Son on yılda, akut ve kronik doku tahribatı ve oksidatif stresin çeşitli modellerinde, melatoninin koruyucu etkisindeki ana mekanizmanın; dolaylı (transkripsiyonel) etkiler aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Venoroso ve arkadaşları; ratlarda akut egzersiz sonucu yangısal ve prooksidan yolların NF- κ B'ye bağlı kontrolü ile ilişkili olarak kalpte oluşan tahribatta, melatonin kaynaklı koruma oluştuğunu bildirmişlerdir (Luchetti vd., 2010; Veneroso vd., 2009). Akut renal hasar oluşturulan bir rat modelinde melatoninin, oksidatif stres markörlerini, antioksidan ve detoksifikasyon enzimi HO-1'in ekspresyonunu geliştirerek (Wang vd., 2009) veya NOS'un indüklenebilir formu yanında p38 MAPK ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmek suretiyle arttırdığı belirlenmiştir (Ozbek vd., 2009).

Melatoninin ratlardaki karaciğer koruyucu etkileri, dimetilnitrozaminle akut zehirlenme oluşturularak (Jung vd., 2009) belirlenmiş ve bu durum melatoninin sekonder bir antioksidan ve detoksifikasyon ajanı rolünü desteklemektedir (Luchetti vd., 2010). Bu mekanizma, stres yanıtıyla aktive olan NF- κ B bağımlı genlerin negatif modülasyonlarıyla ilişkili görünmektedir. Visfatin NF- κ B aktivatörüdür. Dolayısıyla sispaltin grubunda visfatin düzeylerinin yükselmesi NF- κ B'yi aktive ederek serbest oksijen radikallerinin yangıyı artırmasına neden olmuştur. Sirt-1, NF- κ B'yi substrat olarak kullanır. Dolayısıyla sispaltin grubunda sirt-1 düzeylerindeki azalma NF- κ B'nin artışına neden olmaktadır. Böylece muhtemel bir yangı artışı söz konusu olmaktadır. Melatonin uygulamasıyla birlikte visfatin düzeylerinde meydana gelen düşüş ve sirt-1 düzeylerindeki artış NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmektedir. Böylece renal hasar oluşturulan bu modelde nefrotoksisiteye karşı melatonin kaynaklı bir koruma sağlanması muhtemeldir.

Sonuç olarak, sisplatin ile oluşturulmuş böbrek hasarında melatoninin NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağını düzenleyerek, COX-2, TGF- β 1 ve TNF- α inhibisyonu yoluyla yangıyı azaltarak bir iyileşme sağlayabildiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Anand, A.J., Bashey, B.,** 1993. Newer insights into cisplatin nephrotoxicity, *Ann Pharmacother*, **27**, 1519–1525.
- Arendt, J., Skene, D.J., Middleton, B., Lockley, S.W., Deacon, S.,** 1997. Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work and blindness, *Journal of Biology Rhythms*, **12**, 604-612.
- Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., Sporn, M.B.,** 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets, Identification of a major storage site, purification, and characterization, *J. Biol. Chem*, **258**: **11**, 7155–7160.
- Baek, S.J., Eling, T.E.,** 2006. Changes in Gene Expression Contribute to Cancer Prevention by Cox Inhibitors, *Progress in Lipid Research*, **45**, 1-16.
- Barber, D.A., Harris, S.R.,** 1994. Oxygen free radicals and antioxidants: a review, *American Pharmacology*, **34**, 26-35.
- Barry, M.A., Behnke, C.A., Eastman, A.,** 1990. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins hyperthermia, *Biochem Pharmacol*, **40**, 2353–2362.
- Baur, J.A.,** 2010. Biochemical effects of SIRT1 activators, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 1626–1634.
- Baydas, G., Ercel, E., Canatan, H., Donder, E., Akyol, A.,** 2001. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure, *Cell Biochemistry and Function*, **19**, 37-41.
- Baykal, Y., Kocabalkan, F.,** 2000, Serbest radikaller ve hücre hasarı yapma mekanizmaları, *Sendrom*, 31-38.
- Beni, S.M., Kohen, R., Reiter, R.J., Tan, D.X., Shohami, E.,** 2004. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1, *FASEB J*, **18**, 149-51.
- Bompart, G.J., Orfila, C., Girolami, J.P.,** 1990a. Cisplatin nephrotoxicity in lead-pretreated rats: Enzymatic and morphological studies, *Toxicol Lett*, **50**, 237–247.
- Bompart, G.J., Prevot, D.S., Bascants, J.L.,** 1990b. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin induced toxicity, *Clin Biochem*, **23**, 501–504.

- Boogaard, P.J., Nagelkerke, J.F., Mulder, G.J., 1990.** Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as in vitro models to study nephrotoxicity. *Chem Biol Interact*, **76**, 281–291.
- Cadenas, E., 1989.** Biochemistry of oxygen toxicity, *Annu Rev Biochem*, **58**, 79–110.
- Casper, E.S., Kelsen, D.P., Alcock, N.W., Young, C.W., 1979.** Platinum concentrations in bile and plasma following rapid and 6-hour infusions of cis-diamminedichloroplatinum (II), *Cancer Treat Rep*, **63**, 2023–2025.
- Cavalca, V., Minardi, F., Scurati, S., Guidugli, F., Squellerio, I., Veglia, F., Dainese, L., Guarino, A., Tremoli, E., Caruso, D., 2012.** Simultaneous quantification of 8-iso-prostaglandin-F2 α and 11-dehydrothromboxane B2 in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, **397**, 168–174.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993.** An introduction to free radical biochemistry, *Brit Med Bull*, **49**, 481–493.
- Cheung, R.T., Tipoe, G.L., Tam, S., Kwan, E.S., Zou, L., Chan, P.S., 2006.** Preclinical evaluation of pharmacokinetics and safety of melatonin in propylene glycol for intravenous administration, *J Pineal Res*, **41**, 337–343.
- Cooley, M.E., Davis, L.E., Stefano, M., Abraham, J., 1994.** Cisplatin: A clinical review, Part 1-Current uses of cisplatin and administration guideliness, *Cancer Nurs*, **17**, 283–293.
- Cvitkovic, E., Spaulding, J., Bethune, V., 1977.** Improvement of cis-dichlorodiammineplatinum therapeutic index in an animal model, *Cancer*, **39** 1357–1361.
- Dannenberg, A.J., Altorki, N.K., Boyle, J.O., Dang, C., Howe, L.R., Weksler, B.B., Subbaramaiah, K., 2001.** Cyclo-Oxygenase 2: A Pharmacological Target for The Prevention of Cancer, *The Lancet Oncology*, **2**, 544-551.
- Daugaard, G., Abildgaard, U., 1989.** Cisplatin nephrotoxicity, A review *Cancer Chemother Pharmacol*, **25**, 1–9.
- Davi, G., Ciabattoni, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F., Patrono, C., 1999.** In vivo Formation of 8-Iso-Prostaglandin F2 α and Platelet Activation in Diabetes Mellitus Effects of Improved Metabolic Control and Vitamin E Supplementation, *American Heart Association*, **99**, 224-229.
- Davis, C.A., Nick, H.S., Agarwal, A., 2001.** Manganese superoxide dismutase attenuates cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide, *J. Am. Soc. Nephrol*, **12**, 2683–2690.
- DeConti, R., Toftness, B., Lange, R., Creasey, W., 1973.** Clinical and pharmacological studies with cis-Diamminedichloroplatinum (II), *Cancer Res*, **33**, 1310-1315.

- Den Hartog, H.J., Altona, C., Van der Marel, G.A., Reedijk, J.,**1985. A¹H and ³¹P NMR study of cis-Pt(NH₃)₂ [d(CpGpG)-N7 (2),N7 (3)] The influence of a 5'-terminal cytosine, on the structure of the cis-Pt(NH₃)₂ [d(GpG)-N7,N7] intrastrand cross-link, *Eur J Biochem*, **147**, 371–379.
- Dillioglulil, M.O., Maral Kir, H., Gulkac, M.D., Ozon Kanli, A., Ozdogan, H.K., Acar, O., Dillioglulil, O.,** 2005. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. *Urol Int*, **75**, 340–344.
- Dogukan, A., Tuzcu, M., Agca, C.A., Gencoglu, H., Sahin, N., Onderci, M., Ozercan, I.H., Ilhan, N., Kucuk, O., Sahin, K.,** 2011. A tomato lycopene complex protects the kidney from cisplatin-induced injury via affecting oxidative stress as well as Bax, Bcl-2, and HSPs expression, *Nutr Cancer*, **63**, 427-34.
- Dong, Y., Guo, T., Taurig, M., Mason, C.C., Kobes, S., Perez, J., Knowler, W.C., Bogardus, C., Hanson, R.L., Baier, L.J.,** 2011. SIRT1 is associated with a decrease in acute insulin secretion and a sex specific increase in risk for type 2 diabetes in Pima Indians, *Molecular Genetics and Metabolism*, **104**, 661–665.
- el Daly E.S.,** 1998. Protective effect of cysteine and vitamin E, *Crocus sativus* and *Nigella sativa* extracts on sisplatin-induced toxicity in rats, *J Pharm Belg*, **53**, 87-93.
- Fantuzzi, G.,** 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation, *J Allergy Clin Immunol*, **115**, 911–919.
- Farombi, E.O., Shrotriya, S., Na, H.K., Kim, S.H., Surh, Y.J.,** 2008. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1, *Food Chem Toxicol*, **46**, 1279–1287.
- Faubel, S., Ljubanovic, D., Reznikov, L.,** 2004. Caspase–1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis, *Kidney Int*, **66**, 2202–2213.
- Fernández-Martínez, A.B., Carmena, M.J., Arenas, M.I., Bajo, A.M., Prieto, J.C., Sánchez-Chapado, M.,** 2012. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptors and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer, Analysis of potential prognostic relevance, *Histol Histopathol*, **27**, 1093-1101.
- Fillastre, J.P., Godin, M.,** 1998. Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP. *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*. New York. Oxford University Press, 2645–2657.
- Fouda, N., Abaza, N., El-Hilaly, R., El Said, H.W., El-kabarity, R.H.,** 2011. Evaluation of visfatin in patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with disease activity mand lupus nephritis, *The Egyptian Rheumatologist*, **34**, 9-17.
- Frank, L., Massaro. D.,** 1980. Oxygen toxicity, *Am J Med*, **69**, 117–126.
- Freeman, B.A., Crapo, J.D.,** 1982. Biology of disease, Free radicals and tissue injury, *Lab Invest*, **47**, 412–26.

- Fujieda, M., Morita, T., Naruse, K., Hayashi, Y., Ishihara, M., Yokoyama, T., Toma, T., Ohta, K., Wakiguchi, H., 2011.** Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Hum Exp Toxicol*, **30**, 603-615.
- Fukuhara, A., Matsuda, M., Nishizawa, M., Segawa, K., Tanaka, M., Kishimoto, K., Matsuki, Y., Murakami, M., Ichisaka, T., Murakami, H., Watanebi, E., Takagi, T., Akiyoshi, M., Ohtsubo, T., Kihara, S., Yamashita, S., Makishima, M., Funahashi, T., Yamanaka, S., Hiramatsu, R., Matsuzawa, Y., Shimomura I., 2005.** Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin, *Science*, **307**, 426–430.
- Galea, A.M., Murray, V., 2002.** The interaction of cisplatin and analogues with DNA in reconstituted chromatin, *Biochim Biophys Acta*, **1579**, 142–152.
- Garten, A., Petzold, S., Körner, A., Imai, S., Kiess, W., 2009.** Nampt: Linking nad biology, metabolism and cancer, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, **20**, 130-138.
- Gillum, M.P., Erion, D.M., Shulman, G.I., 2011.** Sirtuin-1 regulation of mammalian Metabolism, *Trends in Molecular Medicine*, **17**, 8–13.
- Gilman, A., 1963.** The initial clinical trial of Nitrogen Mustard. *Amer J Surgery*, **105**, 574.
- Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., Karbownik, M., Manchester, L.C., Cuzzocrea, S., Fulia, F., Barberi, I., 2001.** Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates, *J Pharm Pharmacol*, **53**, 1393–1401.
- Halliwell, B., Arouma O., 1991.** DNA damage by oxygen-derived species, It's mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letter*, **281**, 9-19.
- Hao, C.M., Haase, V.H., 2010.** Sirtuins and Their Relevance to the Kidney, *J Am Soc Nephrol*, **21**, 1620–1627.
- Hara, M., Yoshida, M., Nishijima, H., Yokosuka, M., Iigo, M., Ohtani-Kaneko, R., Shimada, A., Hasegawa, T., Akama, Y., Hirata, K., 2001.** Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *J Pineal Res*, **30**, 129–138.
- Hardeland, R., Backhaus, C., Fadavi, A., 2007.** Reactions of the NO redox forms NO⁺, NO and HNO (protonated NO) with the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine, *J Pineal Res*, **43**, 382–388.
- Hardeland, R., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2009.** Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines, *J Pineal Res*, **47**, 109–126.

- Hasegawa, K., Wakino, S., Yoshioka, K., Tatematsu, S., Hara, Y., Minakuchi, H., Washida, N., Tokuyama, H., Hayashi, K., Itoh H., 2008. Sirt1 protects against oxidative stress induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **372**, 51–56.
- Hotamisligil, G., 2003. Inflammatory pathways and insulin action, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 53–55.
- Hotamisligil, G.S., Murray, D.L., Choy, L.N., Spiegelman, B.M., 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor., *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 4854–4858.
- Ianas, O., Olivescu, R., Badescu, I., 1991. Melatonin involvement in oxidative processes, *Endocrinologie*, **29**, 147–153.
- Ikarashi, Y., Kakihara, Y., Imai, C., 2004. Glomerular dysfunction, independent of tubular dysfunction, induced by antineoplastic chemotherapy in children. *Pediatr Int*, **46**, 570–575.
- Jamieson, E.R., Lippard, S.J., 1999. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts, *Chem Rev*, **99**, 2467–2498.
- Jin, D., Tan, H.J., Lei, T., Gan, L., Chen, X.D., Long, Q.Q., Feng, B., Yang, Z.Q., 2009. Molecular cloning and characterization of porcine sirtuin genes, *Comparative Biochemistry and Physiology*, **Part B 153**, 348–358.
- Jung, Y.J., Lee, J.E., Lee, A.S., Kang, K.P., Lee, S., Park, S.K., Lee, S.Y., Han, M.K., Kim, D.H., Kim, W., 2012. SIRT1 overexpression decreases cisplatin-induced acetylation of NF- κ B p65 subunit and cytotoxicity in renal proximal tubule cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **419**, 206–210.
- Jung, K.H., Hong, S.W., Zheng, H.M., Lee, D.H., Hong, S.S., 2009. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor- κ B during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model, *J. Pineal Res*, **47**, 173–183.
- Kalle, A.M., Mallika, A., Badiger, J., Alinakhi, Talukdar, P., Sachchidanand, 2010. Inhibition of SIRT1 by a small molecule induces apoptosis in breast cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **401**, 13–19.
- Kanfi, Y., Peshti, V., Gozlan, Y.M., Rathaus, M., Gil, R., Cohen, H.Y., 2008. Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability, *FEBS Letters*, **582**, 2417–2423.
- Kang, Y.S., Song, H.K., Lee, M.H., Ko, G.J., Cha, D.R., 2010. Plasma concentration of visfatin is a new surrogate marker of systemic inflammation in type 2 diabetic patients, *Diabetes Research and Clinical Practice*, **89**, 141–149.

- Karatepe, M.**, 2004. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV, *LC-GC North America*, **22**, 362–365.
- Kelman, A.D., Peresie H.J.**, 1979. Mode of DNA binding of cis-platinum (II) antitumor drugs: a base sequence-dependent mechanism is proposed, *Cancer Treat Rep*, **63**, 1445–1452.
- Kilic, E., Kilic, U., Reiter, R.J., Bassetti, C.L., Hermann, D.M.**, 2004. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1, *J Pineal Res*, **37**, 247–251.
- Kilic, U., Yilmaz, B., Ugur, M., Yuksel, A., Reiter, R.J., Hermann, D.M., Kilic, E.**, 2012. Evidence that membrane-bound G protein-coupled melatonin receptors MT1 and MT2 are not involved in the neuroprotective effects of melatonin in focal cerebral ischemia, *J Pineal Res*, **52**, 228–235.
- Kilic, U., Kilic, E., Reiter, R.J., Bassetti, C.L., Hermann, D.M.**, 2005. Signal transduction pathways involved in melatonin-induced neuroprotection after focal cerebral ischemia in mice, *J Pineal Res*, **38**, 67–71.
- Kim, S.W., Lee, J.U., Nah, M.Y.**, 2001. Cisplatin decreases the abundance of aquaporin water channels in rat kidney, *J Am Soc Nephrol*, **12**, 875–882.
- Kintzel, P.E.**, 2001. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management, *Drug Safety*, **24**, 19–38.
- Klein, DC.**, 1993, The mammalian melatonin rhyth-generating system. In: Weterberg L, Ed. Light and Biological Rhythms in Man, Neuroscience, *Oxford, Pergamon Press*, 55-63.
- Kotins, M.S., Patel, P., Menon, S.N., Sane R.T.**, 2004. Renoprotective effect of *Hemidesmus indicus*, a herbal drug used in gentamicin-induced renal toxicity, *Nephrology*, **9**, 142–147.
- Kuhlmann, M.K., Burkhardt, G., Kohler, H.**, 1997. Insight into potential cellular mechanism of cisplatin nephrotoixcty and their clinical application, *Nephrol Dial Transplant*, **12**, 2478–2480.
- Laemmli, UK.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**: 680–685.
- Lee, S., Moon, S.O., Kim, W., Sung, M.J., Kim, D.H., Kang, K.P., Jang, Y.B., Lee, J.E., Jang, K.Y., Lee, S.Y., Park, S.K.**, 2006. Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury, *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 2085–2095.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y.**, 1958. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes, *Journal of the American Chemical Society*, **80**, 2587.

- Li, C., Cai, F., Yang, Y., Zhao, X., Wang, C., Li, J., Jia, Y., Tang, J., Liu, Q.,** 2010. Tetrahydroxystilbene glucoside ameliorates diabetic nephropathy in rats: Involvement of SIRT1 and TGF- β 1 pathway, *European Journal of Pharmacology*, **649**, 382–389.
- Liang, Y., Wei, P., Duke, R.W., Reaven, P.D., Harman, S.M., Cutler, R.G., Heward, C.B.,** 2003. Quantification Of 8-Iso- Prostaglandin F $_{2\alpha}$ And 2,3-Dinor-8- Iso- Prostaglandin F $_{2\alpha}$ In Human Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Free Radical Biology & Medicine*, **34**, 409–418.
- Links, M., Lewis, C.,** 1999. Chemoprotectants: A review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy, *Drugs*, **57**, 293–308.
- Loehrer, P.J., Einhorn, L.H.,** 1984. Drugs five years later, *Cisplatin*, *Ann Int Met*, **100**, 704–713.
- Luchetti, F., Canonico, B., Betti, M., Arcangeletti, M., Pilolli, F., Piroddi, M., Canesi, L., Papa, S., Galli, F.,** 2010. Melatonin signaling and cell protection function, *FASEB J.*, **24**, 3603.
- Luke, D.R., Vadieli, K., Lopez-Berestein, G.,** 1992. Role of vascular congestion in cisplatin-induced acute renal failure in the rat, *Nephrol Dial Transplant*, **7**, 1–7.
- Madias, N.E., Harrinton, J.T.,** 1978. Platinum nephrotoxicity, *Am J Med*, **65**, 307–314.
- Mamali, I., Roupas, N.D., Armeni, A.K., Theodoropoulou, A., Markou, K.B., Georgopoulos, N.A.,** 2012. Measurement of salivary resistin, visfatin and adiponectin levels, *Peptides*, **33**, 120-124.
- Matsushima, H., Yonemura, K., Ohishi, K., Hishida, A.,** 1998. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats, *J Lab Clin Med*, **131**, 518–526.
- Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Burillo, S.L., Reiter, R.J.,** 2003. Oxidative damage to catalase induced by peroxyl radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants, *Free Radic Res*, **37**, 543–553.
- McQueen, C.A., Williams, G.M.,** 1990. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of 4,4'-methylene-dianiline and 4,4'-methylene-bis-2-chloroaniline. *Mutat Res*, **239**, 133–142.
- Metoyer, C.F., Pruitt, K.,** 2008. The role of sirtuin proteins in obesity, *Pathophysiology*, **15**, 103–108.
- Meyer, K.B., Medias, N.E.,** 1994. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab*, **20**, 201–213.
- Nagwani, S., Tripathi, Y.B.,** 2010. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation, *Food Chem Toxicol*, **48**, 2253-2258.

- Nava, M., Romero, F., Quiroz Parra, G., Bonet, L., Rodriguez-Iturbe, B., 2000.** Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercury chloride in rats, *Am J Physiol Renal Physiol*, **279**, 910–918.
- Nogalska, A., D’Agostino, C., Engel, W.K., Davies, K.J.A., Askanas, V., 2010.** Decreased SIRT1 deacetylase activity in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers, *Neurobiology of Aging*, **31**, 1637–1648.
- Ortiz, G.G., Benitez-King, G.A., Rosales-Corral, S.A., Pacheco-Moises, F.P., Velazquez-Brizuela, I.E., 2008.** Cellular and biochemical actions of melatonin which protect against free radicals: role in neurodegenerative disorders, *Curr Neuropharmacol*, **6**, 203–214.
- Osanto, S., Bukman, A., Van Hoek, F., Sterk, P.J., De Laat, J.A., Hermans, J., 1992.** Long-term effects of chemotherapy in patients with testicular cancer, *J Clin Oncol*, **10**, 574–579.
- Ozbek, E., Ilbey, Y.O., Ozbek, M., Simsek, A., Cekmen, M., Somay, A., 2009.** Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction- induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF-kB expression, *J Endourol*, **23**, 1165–1173.
- Packer, L., Landvik, S., 1990.** Vitamin E in biological systems. In: Emerit L Packer and C Auclair (editor). Antioxidants in therapy and preventive medicine. New York: Plenum Press, 93–104.
- Paulis, L., Pechanova, O., Zicha, J., Krajcovicova, K., Barta, A., Pelouch, V., Adamcova, M., Simko, F., 2009.** Melatonin prevents fibrosis but not hypertrophy development in the left ventricle of NG-nitro-l-arginine-methyl ester hypertensive rats, *J Hypertens*, **27**, 11–16.
- Portilla D., Li S., Nagothu K.K., 2006.** Metabolomic study of cisplatin-induced nephrotoxicity, *Kidney Int*, **69**, 2194–2204.
- Rahman, I., Biswas, S.K., Kirkham, P.A., 2006.** Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols, *Biochem Pharmacol*, **72**, 1439–1452.
- Ramesh, G., Reeves, W.B., 2002.** TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity, *J Clin Invest*, **110**, 835–842.
- Rao, N.K., Nammi S., 2006.** Antidiabetic and renoprotective effects of the chloroform extract of *Terminalia chebula* Retz, seeds in streptozotocin-induced diabetic rats, *BMC Complement Altern*, **6**, 17–22.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Leon, J., Kilic, U., Kilic, E., 2005.** When melatonin gets on your nerves: its beneficial actions in experimental models of stroke, *Exp Biol Med (Maywood)*, **230**, 104–117.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C., Gitto, E., 2000.** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress, A review, *J Biomed Sci*, **7**, 444–458.

- Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M.,** 2002. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs, *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1299–1321.
- Reiter, R.J., Paredes, S.D., Manchester, L.C., Tan, D.X.,** 2009. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **44**, 175–200.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Pilar Terron, M., Flores, L.J., Koppisetti, S.,** 2007. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions, *Adv Med Sci*, **52**, 11–28.
- Reiter, R.J.,** 1993. Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered free radicals: a brief review, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **26**, 1141-1155.
- Reiter, R.J.,** 1996. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, **104**, 10-15.
- Reiter, R.J.,** 1998. Melatonin and human reproduction, *Annals of Medicine*, **30**, 103-113.
- Reiter, R.J.,** 1991, Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and its physiological interactions, *Endocrinology Review*, **12**, 151-160.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., Imai, S.,** 2007. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals, *Curr Opin Gastroenterol*, **23**, 164-170.
- Roberts, J.J., Thomson, A.J.,** 1979. The mechanism of action of antitumor platinum compounds, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **22**, 71–133.
- Rosenberg, B., Van Campl, T.J., Mansour, V.,** 1969. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents, *Nature*, **222**, 385–386.
- Ross, M.H., Reith E.J., Romrell, L.J.,** 1989. Histology-A Text and Atlas, *Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland*.
- Sadzuka, Y., Shoji, T., Takino, Y.,** 1992. Effects of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation, *Biochem Pharmacol*, **43**, 1872–1875.
- Sadzuka, Y., Shoji, T., Takino, Y.,** 1994. Role of glutathione S-transferase isoenzymes in cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat, *Toxicol Lett*, **70**, 211–222.
- Safirstein, R., Winston, J., Goldstein, M., Moel, D., Dikman, S., Guttenplan, J.,** 1986. Cisplatin nephrotoxicity, *Am J Kidney Dis*, **8**, 356–367.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Dogukan, A., Timurkan, M., Sahin, N., Aslan, A., Kucuk, O.,** 2010a. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Life Sci*, **87**, 7-8.

- Sahin, K., Tuzcu, M., Sahin, N., Ali, S., Kucuk, O.,** 2010b. Nrf2/HO-1 signaling pathway may be the prime target for chemoprevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by lycopene, *Food Chem Toxicol*, **48**, 2670-2674.
- Samal, B., Sun, Y., Stearns, G., Xie C, Suggs S, McNiece I.,** 1994. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*, **14**, 1431-1437.
- Santos, N.A., Catão, C.S., Martins, N.M., Curti, C., Bianchi, M.L., Santos, A.C.,** 2007. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria, *Arch Toxicol*, **81**, 495–504.
- SAS Institute,** 2002. SAS® User's Guide: Statistics, *SAS Institute Inc*, Cary, NC.
- Schrier, R.W.,** 2002. Cancer therapy and renal injury, *J Clin Invest*, **110**, 743-745.
- Scovell, W.M, Muirhead, N., Kroos, L.R.,** 1987. cis-Diamminedichloroplatinum (II) selectively cross-links high mobility group proteins 1 and 2 to DNA micrococcal nuclease accessible regions of chromatin, *Biochem Biophys Res Commun*, **142**, 826–835.
- Sener, G., Sehirli, A.O., Altunbas, H., Ersoy, Y.,** 2002. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *J Pineal Res*, **32**, 231-236.
- Sethi, J.K., Vidal-Puig, A.,** 2005. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes? *Trends Mol Med*, **11**, 344–347.
- Shimeda, Y., Hirotani, Y., Akimoto, Y., Shindou, K., Ijiri, Y., Nishihori, T., Tanaka, K.,** 2005. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *Biol Pharm Bull*, **28**, 1635–1638.
- Sleijfer, D.T., Meijer, S., Mulder, N.H.,** 1985. Cisplatin: A Review of Clinical Applications and Renal Toxicity, *Pharm Weekbl*, **7**, 237-244.
- Song, H.K., Lee, M.H., Kim, B.K., Park, Y.G., Ko, G.J., Kang, Y.S., Han, J.Y., Han, S.Y., Han, K.H., Kim, H.K., Cha, D.R.,** 2008. Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy, *Am J Physiol Renal Physiol*, **295**, 1485–1494.
- Taguchi, T., Nazneen, A., Abid, M., Razzaque, M.S.,** 2005. Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol*, **148**, 107–121.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Terron, M.P., Flores, L.J., Reiter, R.J.,** 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, **42**, 28–42.
- Taylor, A.W.,** 2009. "Review of the activation of TGF-beta in immunity", *J Leukoc Biol*, **85**, 29–33.

- Tomino, Y., Cooper, M. E., Kurtz, T.W., Shimizu, Y., 2012.** Experimental Models of Type-2 Diabetic Nephropathy, *Experimental Diabetes Research*, doi:10.1155/2012/218917.
- Townsend, D.M., Deng, M., Zhang, L., 2003.** Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells, *J Am Soc Nephrol*, **14**, 1–10.
- Tsikis, D., 2004.** Handling of commercially available enzyme immunoassays for 8-iso-prostaglandin F2A (8-iso- PGF2A, iPF2A-III, 15-F2t-IsoP) in clinical research and science: considerations from the analytical and review point of view), *Clinica Chimica Acta*, **344**, 215–217.
- Tsuruya, K., Ninomiya, T., Tokumoto, M., Hirakawa, M., Masutani, K., Taniguchi, M., Fukuda, K., Kanai, H., Kishihara, K., Hirakata, H., Iida, M., 2003.** Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin induced renal tubular cell death, *Kidney Int*, **63**, 72–82.
- Tuzcu, M., Sahin, N., Dogukan, A., Aslan, A., Gencoglu, H., Ilhan, N., Kucuk, O., Sahin, K., 2010.** Protective role of zinc picolinate on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats, *J Ren Nutr*, **20**, 398–407.
- Uhla, M., Csernoka, A., Aydina, S., Kreienberga, R., Wiesmüllera, L., Gatz, S.A., 2010.** Role of SIRT1 in homologous recombination, *DNA Repair*, **9**, 383–393.
- Ulu, R., Dogukan, A., Tuzcu, M., Gencoglu, H., Ulas, M., Ilhan, N., Muqbil, I., Mohammad, R.M., Kucuk, O., Sahin, K., 2012.** *Food Chem Toxicol*, **50**, 1675–1679.
- Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Lida, T., Cho, S., Honma, K., Kondo, T., 1999.** Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells, *Free Radic Biol Med*, **27**, 838–847.
- Veneroso, C., Tunon, M.J., Gonzalez-Gallego, J., Collado, P.S., 2009.** Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise, *J Pineal Res*, **47**, 184–191.
- Wang, Z., Zhang, J., Liu, H., Huang, H., Wang, C., Shen, Y., Li, D., Jing H., 2009.** Melatonin a potent regulator of heme oxygenase-1, reduces cardiopulmonary bypass-induced renal damage in rats, *J Pineal Res*, **46**, 248–254.
- Weichert-Jacobsen, K.J., Bannowski, A., Küppers, F., Loch, T., Stöckle, M., 1999.** Direct amifostine effect on renal tubule cells in rats. *Cancer Res*, **59**, 3451–3453.
- Weiner, M.W., Jacobs, C., 1982.** Mechanism of cisplatin nephrotoxicity, *Fed Proc*, **42**, 2974–2978.
- Winston, J.A., Safirstein, R., 1985.** Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat, *Am J Physiol*, **249**, 490–496.

- Yang, H., Lavu, S., Sinclair, D.A.**, 2006. Mini Review: Namp t/PBEF/Visfatin: A regulator of mammalian health and longevity?. *Experimental Gerontology*, **41**, 718–726.
- Yi J., Luo J.**, 2010. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 1684–1689.
- Yildirim, Z., Sogut, S., Odaci, E., Iraz, M., Ozyurt, H., Kotuk, M., Akyol, O.**, 2003. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats, *Pharmacol Res*; **47**, 149–156.
- Zhang, A., Wang, H., Qin, X., Pang, S., Yan, B.**, 2012. Genetic analysis of SIRT1 gene promoter in sporadic Parkinson's disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **422**, 693–696.
- Zhang, J.G., Lindup, W.E.**, 1993. Role of mitochondria in cisplatin–induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices, *Biochem Pharmacol*, **45**, 2215–2222.
- Zou, L.Y., Cheung, R.T., Liu, S., Li, G., Huang, L.**, 2006. Melatonin reduces infarction volume in a photothrombotic stroke model in the wildtype but not cyclooxygenase-1-gene knockout mice, *J Pineal Res*, **41**, 150–156.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da tamamladıktan sonra 2002 yılında Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünü kazandım ve 2006 yılında mezun oldum. Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde 2006-2007 yılları arasında yüksek lisansımı tamamladım. 2008 yılında Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında Doktora eğitimime başladım. 2009 yılında Bingöl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi kadrosuna atandım. Halen Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk annesiyim.