

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLARAK DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
SİSPLATİN'İN NEDEN OLDUĞU NEFROTOKSİTEYE KARŞI
CURCUMİN'İN KORUYUCU ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERPİL BAYRAKDAR

ELAZIĞ – 2013

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN
Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Kadir SERVİ
Danışman



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Kadir SERVİ
Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN
Prof. Dr. Saadettin TANYILDIZI
Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU
Doç. Dr. Ömer KIZIL



TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında yüksek lisansım süresince beni yönlendiren, bilgi ve birikimlerinden istifade ettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Kadir SERVİ'ye, tez çalışmalarım sırasında değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN ve diğer öğretim üyelerine; yine birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım asistan arkadaşlarım, Gülden GÖÇÜK, Dr. Burcu GÜL BAYKALIR ve Ozan TEKELİ'ye teşekkür ederim. Bu vesile ile eğitimim sırasında bana koşulsuz desteklerini eksik etmeyip hoşgörü ve sabır gösteren değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. ÖZET.....	1
2.ABSTRACT	2
3. GİRİŞ.....	3
3.1. Sisplatin	3
3.1.1. Sisplatin ve kimyasal yapısı	3
3.1.2.Sisplatin Nefrotoksisitesinin Patogenezi.....	5
3.1.3.Sisplatin Nefrotoksisitesinin Moleküler Patogenezi.....	5
3.2. Diyabet	7
3.2.1. Diyabet ve Sınıflandırılması.....	7
3.2.2.Diyabet ve Oksidatif Stres	8
3.3.Curcumin	9
3.3.1. Curcumin ve Antioksidan Özelliği.....	9
4. MATERİYAL ve METOT	11
4.1. Materyal.....	11
4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	11
4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	12
4.1.3. Deney Hayvanları.....	12

4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	15
4.1.4.1. Homojenatların Hazırlanması	16
4.2. Metot.....	16
4.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeylerinin Ölçümü.....	16
4.2.2. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeylerinin Ölçümü.....	18
4.2.3. Böbrek Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü	20
4.2.4. Protein Ölçümü	21
4.2.5. İstatistiksel Analiz	22
5. BULGULAR	23
5.1. Canlı Ağırlık ve Kan Şeker Düzeyleri.....	23
5.2. Biyokimyasal Parametreler	24
5.2.1. Plazma Üre ve Kreatinin Düzeyleri	24
5.2.2. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri.....	25
5.2.3. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri.....	26
5.2.4. Böbrek Dokusu CAT Aktiviteleri	27
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	29
7. KAYNAKLAR.....	33
8. ÖZGEÇMİŞ.....	37

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin bileşimi.....	13
Tablo 2. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları ve kan şeker düzeyleri.	24
Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarına ait üre ve kreatinin düzeyleri (mg/dl).	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı.....	4
Şekil 2. Malondialdehit (MDA) kalibrasyon eğrisi	17
Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi.....	20
Şekil 4. Gruplara ait böbrek dokusu MDA düzeyleri	26
Şekil 5. Gruplara ait böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri.....	27
Şekil 6. Gruplara ait böbrek dokusu CAT düzeyleri.....	28

KISALTMALAR LİSTESİ

MDA	: Malondialdehit
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
CAT	: Katalaz
STZ	: Streptozotosin
CİS	: Sisplatin
NADPH	: Nikotin adenin difosfat
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklorasetik asit
DTNB	: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
LDL	: Düşük yoğunluklu kolesterol

1. ÖZET

Diyabet ve kanser günümüzde yaygın görülen ve birçok problemi beraberinde getiren önemli hastalıklardır. Kanser tedavisinde kullanılan sisplatin'in en önemli yan etkisi böbreklerde oluşturduğu nefrotoksisitedir. Bu çalışmada, deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda sisplatinin meydana getirdiği nefrotoksisiteye karşı curcumin'in muhtemel koruyucu özellikleri araştırılmıştır. Çalışmada ratlar 5 gruba bölünmüş ve ilk grup kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Diğer gruplarda streptozotosin ile deneysel diyabet modeli oluşturulmuş ve ikinci grup diyabet oluşturulan grup, üçüncü grup diyabet+sisplatin grubu, dördüncü grup diyabet+curcumin grubu, beşinci grup ise diyabet+sisplatin+curcumin grubu olarak belirlenmiştir. Araştırmaya alınan ratlardan kan ve böbrek dokuları alınarak plazmada üre ve kreatinin düzeyleri otoanalizör cihazı yardımı ile böbrek dokusunda oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit (MDA) katalaz (CAT) ve indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri ise spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Plazma üre/ kreatinin ve böbrek dokusu MDA düzeylerinin diyabet ve sisplatin uygulamalarına bağlı olarak artışlar gösterdiği, buna karşın böbrek dokusunda katalaz ve GSH düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. Curcumin uygulamalarının oluşan bu nefrotoksisite bulgularını kısmen iyileştirdiği ve hem diyabet hem de sisplatin tarafından oluşturulan böbrek hasarlarının curcumin uygulamalarıyla hafifletilebileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Sisplatin, Nefrotoksisite, Curcumin, Rat

2.ABSTRACT

the protective effects of curcumin against cisplatin induced nephrotoxicity in experimental diabetic rats

Diabetes mellitus and cancer are important diseases affecting people all over the world. Renal injury in diabetes mellitus and nephrotoxicity due to the treatment of cancer by cisplatin are significant adverse effects. This study was undertaken to evaluate the protective effect of curcumin against nephrotoxicity in streptozotocin-induced diabetic rats. Rats were divided into five groups; while the first group was selected as control, the other groups were allocated as experimental models of diabetes by the administration of streptozotocin, Group 2 consisted of diabetes only, Group 3 diabetes plus cisplatin, Group 4 diabetes plus curcumin, and Group 5 included diabetes, cisplatin and curcumin, simultaneously. Following the applications, rats were decapitated and their blood and kidney tissues were removed, plasma urea and kreatinin levels were measured by autoanalyzer. The kidney tissue malondialdehyde, reduced glutathione levels and catalase activities were determined by spectrophotometry. It was determined that the application of diabetes and cisplatin increased plasma urea/ creatinine and MDA levels, whereas it decreased catalase and GSH levels in kidney tissue. This study showed that applications of curcumin may ameliorate induced nephrotoxicity findings partially; and kidney damage induced by both diabetes and cisplatin, moderately.

Key Words: Diabetes, Cisplatin, Nephrotoxicity, Curcumin, Rat.

3. GİRİŞ

3.1. Sisplatin

3.1.1. Sisplatin ve kimyasal yapısı

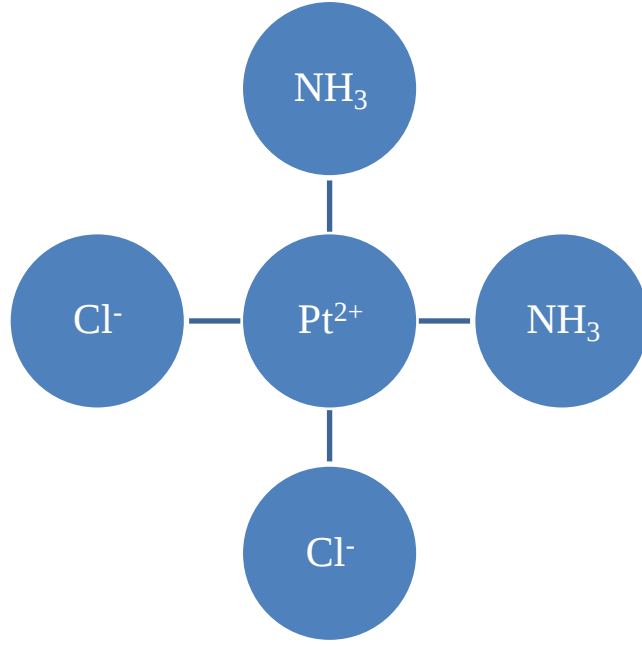
Moleküler yapısında bir platin etrafında klor ile amonyum atomlarının çevrildiği ve *cis* formunda bir ajan olan sisplatin suda çözünebilen organik bir bileşiktir (Şekil 1) (1).

Sisplatin ovaryum, akciğer, baş-boyun ve testis gibi organlardaki kanser tedavisinde kullanılır. Ancak, böbrek üzerine olumsuz etkileri nedeniyle klinik kullanımında doz sınırlayıcı faktörleri olan kemoterapötik bir ilaçtır (2, 3).

Damar içi veya periton içi yolla uygulandıktan sonra yaklaşık %90 serum proteinlerine bağlanan sisplatin birçok dokuya dağılabilen ve böbrekler yoluyla değişmeden atılabilen kemoterapötik bir ajandır. Böbreklerde özellikle proksimal tubül hücrelerine girişinin enerjiye bağımlı bir salgılama şeklinde olduğu bilinmektedir. Radyasyon ve diğer kemoterapötik ajanlar sisplatin sitotoksitesinde sinerjik etkiler göstermekte ve en önemli doz sınırlayıcı problemleri ise yan etkilere ilave olarak tümör dokusunda sisplatine karşı oluşan direnç problemleri olmaktadır (1). Sisplatin etkisinde azalmaya neden olan direnç ile ilgili 4 olayın katkıda bulunduğu bildirilmiştir.

Bunlar;

1. İlacın hücresel birikiminin azalması,
2. Glutasyon veya glutasyon-S-transferaz aktivitesinin artması,
3. Hücrede metallothionein düzeylerinin artması,
4. DNA onarımlarının artması olarak sıralanabilmektedir (4, 5).



Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı.

Canlı vücudunda hücre içerisinde sisplatin daha çok sitozol, mitokondrium, çekirdek ve mikrozomlarda bulunur. Eğer girilen hücrede klor düzeyi düşük ise sisplatindeki 2 adet klor, ilacın suda çözünabilen, toksisitesi daha fazla olan şekline dönüşür (5).

Sisplatin'in antikanser etkisinin mekanizması tam olarak açıklanamamakla beraber, tümörlü hücrelerde DNA'nın sentezini ve replike olmasını durdurduğu belirtilmiştir. Ayrıca sisplatin'in kanserli hücrelerde DNA hasarlarını indükleyerek bu hücrelerin ölmesine neden olduğu bildirilmektedir. Ancak, sisplatinin seçiciliğinin olmaması canlı hücrelerinde de yan etkiler gösterir. Bu yan etkilerden en önemlisi sisplatin tedavisi gören hastaların yaklaşık üçte birinde görülen nefrotoksisitedir (6).

3.1.2.Sisplatin Nefrotoksisitesinin Patogenezi

Vücuda alınan sisplatin böbrek dokusunda diğer dokulara göre 5 kat daha fazla bulunur. Aktif taşıma ya da taşıt proteinlerine bağlanarak böbreklerin proksimal tubüllerinde biriken sisplatin sitotoksik etkisini ancak hücre içerisine girerse gösterir. *In vivo* canlı modellerinde sisplatinin proksimal tubül hücrelerinin S3 segmentinde hasarlar oluşturarak meydana getirdiği hücre ölümleri en önemli histopatolojik bulgu olmaktadır. Papiller ve glomerüler hasar azdır ve uzun süreli tedavilerde böbreklerde kist ve intertisyel bölgede fibröz oluşumu görülebilir (6-8).

3.1.3.Sisplatin Nefrotoksisitesinin Moleküler Patogenezi

Sisplatin tarafından oluşturulan nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, oksidatif stres sisplatin nefrotoksisitesinin ana mekanizmalarından biridir. Özellikle trion, süperoksit dismutaz benzeri maddeler ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) süpürücülerinin sisplatin tedavisine karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla meydana gelen patolojik olayların Serbest oksijen radikalleri (ROS) tarafından olduğu bildirilmektedir. Hücre içine giren sisplatin reaktif forma dönüşür ve burada antioksidanlarla reaksiyona girebilir. Eğer hücre içinde aşırı reaktif ürünlerin oluşması söz konusu olursa antioksidanlar baskılanır ve ortamda ROS birikimi artar. Oluşan bu ROS'lar tarafından oksidatif hasarlar meydana getirildiği ileri sürülmektedir (6, 9).

Sisplatin tedavisinde böbreklerde bazı genlerin yeniden düzenlendiği, örneğin metallothionein 1 geninin upregilasyonu olurken; katalaz, süperoksit

dismutaz ve gama glutamil transferaz genlerinin ise downregulasyonun olduğu bildirilmiştir. Bu gen değişmeleri sisplatinin meydana getirdiği nefrotoksisitesinin temelini oluşturmaktadır. Sisplatin uygulamasına bağlı olarak hücresel glutasyon düzeylerinin azaldığı sisplatinle birlikte glutasyon uygulamasının sisplatine bağlı yan etkileri azalttığı bildirilmektedir (6, 10, 11).

Aşırı oksidatif stres sisplatin tarafından neden olunan hücre hasarlarının bir sonucu olarak başta tubüler nekroz ve apoptozis yoluyla hücre ölümlerine neden olabilmektedirler. Uygulanan cisplatin miktarlarına göre bazı hücrelerde hücre ölümleri bazı hücrelerde ise hücre nekrozu olmaktadır. Yüksek dozda verilen sisplatin daha çok hücre ölümlerine neden olmaktadır (12-14). Buna karşın bazı araştırıcılar (15) sisplatinin oluşturduğu ROS ile hücre ölümleri arasında direk bir ilişki olmasına karşın nekroz oluşturmasıyla ilgili bir ilişkinin olmadığı ileri sürölmüştür.

Bazı araştırıcılar (2) nefrotoksisitesinden süperoksit ve nitrit oksit reaksiyonundan oluşan peroksinitritin sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Süperoksit oluşumu özellikle mitokondriyal solunum, ksantin oksidaz, lipoksijenaz, eşleşmemiş nitrikoksit sentaz ve NADPH oksidaz gibi birçok enzim aktivitesinde rol oynamaktadır. Diyabete bağlı böbrek hasarlarında glomerüler ve distal tubüllerde NADPH miktarının arttığı ve bu artışta oksidatif stresle ilgili olduğu bildirilmektedir (16).

Sisplatin en fazla proksimal tuböl hücrelerine girmekte başlıca hasarlarını da burada göstermektedir. Sonuçta bu bölgelerde sisplatin nefrotoksisitesinin belirtisi olan nekroz ve apoptozisi ile yeni hücrelerinin o bölgeye infiltre olduğu gösterilmiştir. Oluşan toksisitenin DNA hasarı, Caspaz aktivasyonu,

mitokondriyel fonksiyon bozukluğu, reaktif oksijen oluşumu, nitrojen türlerinin artışı, poli-polimeraz aşırı üretimi ve yangı olaylarının olaya dahil edilmesiyle karmaşık bir şekilde oluştuğu bildirilmektedir (3).

3.2. Diyabet

3.2.1. Diyabet ve Sınıflandırılması

Diabetes mellitus dünyadaki insanlarda yaklaşık %5 oranında görülen, farklı tipleri olan kompleks metabolik bir hastalıktır. Diyabetler farklı tiplere bölünmektedir. Tip 1 diyabet pankreas beta hücrelerinin otoimmün hasarları sonucu genellikle hızlı gelişen ve oluşumunda insülin alımına gerek duyulan ve toplam diyabet olgularının yaklaşık %5-10'unu kapsamaktadır. Tip 2 diyabet ise vakaların % 90-95'ni kapsar. Tip 2 diyabet insülin direnci veya insülin noksanlığı ile ilgili olup çoğunlukla aşırı kilolu insanlarda görülür. Bu durumda genellikle yavaş gelişim gösterir ve kan glikoz düzeyi orta derecede yükselir. Tip 2 diyabetle oluşan insülin direnci insülin salınımının artırılmasıyla karşılanır. Bu durum beta hücrelerinde bitkinlik ve yıkımlanmalara neden olabilmektedir. Bu tip diyabet vakalarında glikoz ile uyarılmış insülin salgılanması bozulmakta ancak sülfonilüre ve aminoasitlere karşı bu salgılanma daha az etkilenmektedir. Tip 2 diyabetli hastalarda pankreasta insülin salınımı, glikoz taşıyıcıları ve glikokinaz aktivitelerini azaltmıştır. Bu canlıların pankreas adacıklarında apoptozis olgularının sağlıklı bireylere göre arttığı bildirilmektedir (17-20).

Diyabet modelleri oluşturmada en çok kullanılan madde streptozotosin (STZ)' dir. Nitrozoüre analogu olan STZ pankreas hücrelerindeki sitotoksik etkisiyle diyabet oluşturur. STZ etkisini pankreasın beta hücrelerinde hasar

oluşturarak yapar. Seçici bir etki gösteren STZ insülin salgılayan hücrelere glikozun yarısının geçmesine izin verir. STZ uygulaması beta hücrelerinde DNA alkilasyonu gibi hasarları oluşturduğu ortaya konulmuştur. Ancak beta hücrelerinin çekirdeğindeki polimeraz enzimleri ise DNA onarımı yapmaktadır (17, 21-23).

Hem tip 1 diyabette hemde tip 2 diyabette böbrek hasarları ve yetmezliği hastaların yaklaşık %30'unda sorun oluşturmaktadır. Bu durumların mekanizması açık değildir. Ancak zaman içerisinde (5-10 yıl) protein atılımında artış, hipertansiyon ve glomerüler filtrasyonda azalma gibi belirtiler görülmektedir. Bu hastalardan alınan biyopsi örneklerinde böbrek dokusunda glomerüler skleroz veya nodüler interkapillar glomerüler skleroz tipik bulgular olarak görülmekle birlikte intertisyel doku ve tubül hücreleri gibi yapıların etkilenmesinin nefropati oluşumuna katkılarının olduğu bildirilmiştir (24, 25).

3.2.2.Diyabet ve Oksidatif Stres

Tip 2 diyabetin komplikasyon ve patofizyolojik mekanizmaları kandaki kronik aşırı glikoz düzeyleri ile bağlantılı olup artan kan glikoz düzeyleri metabolik yolları etkilemek suretiyle serbest radikal ve oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır.

Ancak geç ortaya çıkan diyabetik komplikasyonlar sadece oksidatif stres ve radikal oluşumu ya da antioksidan aktivitede azalmaya bağlı değildir. Tip 2 diyabet serbest radikal oluşumunun artmasında enzimatik olmayan glikolizasyondaki artış, glikoz otooksidasyonu, enerji metabolizmasındaki değişikliklere bağlı metabolik stres yangı medyatörlerinin düzeyindeki artış ve

antioksidan savunma sisteminde de değişiklere yol açar (26). Kan glikoz düzeyindeki yükselme süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi mitokondriyal DNA hasarlarına neden olan ROS düzeylerinde artışa neden olur. Özellikle guanin oksidasyon ürünlerinden 8-hidroksi guanin oksidatif DNA hasarının en önemli göstergesidir ve Tip 2 diyabetli hastalarda bu maddenin düzeyinin arttığı gösterilmektedir (26, 27).

3.3.Curcumin

Curcumin (diferuloylmethane) başta Doğu Hindistan olmak üzere birçok yerde yetişen *Curcuma longa* bitkisinden elde edilen ve turmerik (zerdeçal) türlerinin ana bileşimidir. Curcumin curcumoidlerin en önemlisi olup turmeriğin yaklaşık %2-5'ini karşılamaktadır. Turmeriğin sarı renginden sorumlu olan Curcumin aynı zamanda tedavi edici etkisi bakımından en önemli etken maddesidir. Gıdalarda tatlandırıcı, renklendirici olarak kullanılmakla birlikte antioksidan, antiseptik, analjezik, antimalaryal, yangı önleyici amaçla da geniş ölçüde kullanılmaktadır. Günümüzde Curcumin diyetlere destekleyici ürün olarak farmakolojik amaçlar için de kullanılmaktadır (28, 29).

3.3.1. Curcumin ve Antioksidan Özelliği

Lipofilik bir madde olan curcumin suda çözünmez ancak dimetilsülfoksit, aseton, etanol gibi organik çözücülerde hızlıca çözünebilmektedir. Curcuminoidlerin antioksidan özelliği kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. Curcuminoidler kimyasal olarak yapısında bulunan 2 metoksillenmiş fenol ile 2 adet doymamış karbonil gruplarına bağlanır. Curcumin doymamış yağ asidi olan

linoleat vasıtasıyla lipit peroksidasyonu önlediği bildirilmiştir. Aynı şekilde curcumin'in serbest radikal (süperoksit, hidrojen peroksit ve nitrit radikalleri gibi) süpürücü bir özellik gösterdiği ratlarda makrofaj hücrelerinde bildirmişlerdir (28, 29, 30, 31, 32, 33).

Curcumin'in yangı, hücresel proliferasyon ve hücre yaşamasında görevli genlerin düzenlenmesi yoluyla başta nekroz faktör olmak üzere bazı komponentleri etkileyerek antiinflamatuvar özellik gösterdiği bildirilmiştir. Özellikle Hindistan'da diğer ülkelere göre daha az görülen kolon kanseri vakalarından yola çıkılarak yapılan çalışmalarda curcumin'in kanser oluşumu ve ilerlemelerini ciddi düzeylerde azalttığı ortaya konulmuştur (28, 29, 34).

Oksidatif stres, miyokardiyel iskemi, serebral iskemi-reperfüzyon hasarları, şok, nöronal hasarlar, kanser gibi birçok hastalığın patogenezisinde çok önemli rol oynar. Curcumin vitamin C ve vitamin E'ile karşılaştırıldığında çok güçlü antioksidan etki gösterir (35). Birçok araştırma (35, 36) böbrek hücrelerinde oksidatif hücre hasarlarına karşı curcumin'in koruyucu özellik gösterdiğini ve bunu da lipid yıkımlanması, lipit peroksidasyonu ve sitolizis'i inhibe etmesi yoluyla yaptığını ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak STZ ile model diyabet oluşturulmuş ve bu diyabetli hayvanlara kemoterpötik ajan olan sisplatin uygulamaları yapılarak hem diyabet hem de sisplatin kaynaklı nefrotoksisite oluşturulmaya çalışılmıştır. Oluşan bu nefropatiye karşı curcuminin antioksidan maddesinin antioksidan maddesinin koruyucu veya tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. MATERİYAL ve METOT

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Alet ve/veya cihazlar	Markası
Spektrofotometre	Techcomp UV 7500
Spektrofotometre küveti (normal ve kuvarz)	
Soğutmalı santrifüj	Hettich Universal 320R
İnkübatör	Nüve FN ₅₀₀
Homojenizatör	B.BRAUN 853022
pH metre	WTW pH 340i
Vorteks	Velp Scientifica 10.0176
Su banyosu	Nüve NB9
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik 2553 D
Hassas terazi (0,001 g - 150 g)	Denver instrument Apx-153
Bidistile su cihazı	GFL 2104
Manyetik karıştırıcı	Colara Magnetomix
Glikoz ölçüm cihazı	Smart Chek
Balon joje (5, 10, 25, 50 ml)	Isolab
Cam tüp (16x100 mm)	Isolab
Beher (25, 50, 100 ml)	Isolab
Mikro pipet (10-100,100-1000 µl)	Thermo Labsystems

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Araştırmada kullanılan Curcumin %95 ABCR Co[®]; Cisplatin EBEWE Pharma; Streptozotosin ise Merck (Darmstadt, Germany) firmasından temin edildi. Analizlerde kullanılan diğerk sarf malzemeleri ise analitik düzeyde olup Sigma firmasından satın alındı.

4.1.3. Deney Hayvanları

Araştırmada kullanılan deney hayvanları Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden (FÜDAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 168-187 g olan 6-8 haftalık 50 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. FÜDAM'da gerçekleştirilen çalışmalarda ratlar standart şartlarda (sabit ve ısı havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) her bir kafeste en fazla 5 hayvan olacak şekilde barındırıldı. Ratlara su ve yem *ad libitum* olarak verildi. Ratların beslenmesinde Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen 8 mm'lik rat pellet yemleri kullanıldı. Kullanılan yemin bileşimi Tablo 2'de gösterilmiştir.

Deney hayvanlarının seşimi ve yapılan uygulamalar sırasında Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (Toplantı tarihi 29.12.2011; Karar No:139) onayı alınarak; çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı. Deney süresi 14 gün olarak belirlendi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ratlara verilen yemin bileşimi

Yem Bileşimi	Oran %
Su (en çok)	12
Ham protein (en az)	24
Ham selüloz (en çok)	7
Ham kül (en çok)	8
HCL’ de çözünmeyen kül (en çok)	2
NaCl(en çok)	1
Mineral Karması *	1.25
Vitamin Karması **	1.25
Metabolik enerji	2650 kcal/kg

* Mineral Karması: Kalsiyum (% 1.0 -2.8), Fosfor (% 0.9), Sodyum (% 0.5-0.7), Mangan (10 mg/kg), Çinko (4 mg/kg).

** Vitamin Karması: Vitamin A (300 iü/kg), Vitamin D₃ (1000 iü/kg), Vitamin E (60 mg/kg), Vitamin B2 (4 mg/kg).

Ratların deneylere başlamadan önce ve bitiminden sonra canlı ağırlık tartımları yapılarak canlı ağırlık ortalamaları değerlendirildi. Ayrıca çalışma periyodu boyunca ölen hayvanların ölüm günleri de kaydedildi.

Deney Grupları

Her grupta 10 hayvan olacak şekilde ratlar 5 gruba ayrıldı;

- 1. Grup (Kontrol):** Kontrol grubu hayvanlara ilk gün sitrat tamponu (STZ çözücüsü) periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden

itibaren) kan şeker düzeyleri belirlendi. Daha sonra her bir hayvana 0,5 ml mısır yağı gavaj yoluyla uygulandı.

2. Grup (Diyabet): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 200 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi.

3. Grup (Diyabet + Sisplatin): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 200 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 5 mg/kg dozda sisplatin periton içi yolla tek doz uygulandı.

4. Grup (Diyabet + Curcumin): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri 200 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 20 mg/kg dozda curcumin mısır yağında çözdürülerek gastrik gavaj ile 10 gün süresince uygulandı.

5. Grup (Diyabet + Sisplatin+ Curcumin): Deneysel diyabet oluşturmak amacıyla bu gruptaki hayvanlara ilk gün sitrat tamponu içerisinde 60 mg/kg dozunda STZ periton içi yolla uygulandı ve 72 saat sonra (3ncü günden itibaren) açlık kan şeker düzeyleri belirlendi. Kan şeker düzeyleri

200 mg/dl ve üzerinde olan hayvanların tümü diyabetli olarak kabul edildi ve aynı hayvanlara 20 mg/kg curcumin gavaj ile 5 mg/kg dozda sisplatin periton içi yolla uygulandı.

Araştırmada deneysel diyabet modeli STZ ile gerçekleştirildi. Öncelikle 20 mM sodyum sitrat tamponu (pH 4,5) içerisinde taze olarak hazırlanmış STZ çözeltisi (soğuk ortamda saklanmak koşuluyla) 60 mg/kg (37) dozunda uygulandı. 72 saat sonra kuyruk venasında bir damla kan alınarak açlık kan şekeri ölçümü yapıldı ve 200 mg/dl ve üzerinde olan ratların diyabetli olarak kabul edildi ve çalışmaya alındı. Diyabetli oldukları kabul edilen hayvanlara yem ve su serbestçe verildi.

Curcumin %0,5'lik çözeltisi şeklinde 20 mg/kg dozunda (38); sisplatin ise 5 mg/kg dozunda (39, 40) tarafından belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

4.1.4. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Son ilaç uygulamasından 24 saat sonra ratlar hafif bir eter anestezisine alınarak dekapite edildi. Plazma üre ve kreatinin düzeylerinin belirlenmesi için yeterli kan örnekleri alındı ve plazmaları çıkartıldı. Daha sonra laparotomi yapılarak her iki böbrek dokuları alındı. Alınan böbreklerden biri histopatolojik değerlendirmeler için diğeri ise biyokimyasal analizler için (MDA ve GSH düzeyleri ile CAT aktivitesi) eksi 20°C'de muhafaza edildi.

4.1.4.1. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılıp cam tüplere konuldu. Üzerlerine 1/10 (g/v) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15' lik potasyum klorür (KCl) ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dk hızda 3 dk homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlarda böbrek doku MDA tayinleri yapıldı.

Geri kalan homojenat +4 °C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda ise redükte GSH, CAT aktivitesi ile protein ölçümleri yapıldı.

4.2. Metot

4.2.1. Böbrek Dokusu MDA Düzeylerinin Ölçümü

Böbrek dokusu MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark (41) tarafından önerilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Aerobik şartlar altında ve pH 3,5'te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkübasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

Ayırıcılar

1. Tiyobarbitürik asit (TBA)ayracı: 0,25 N HCl içerisinde %0,65 TBA çözdürüldü.

2. Trikloroasetik asit (TCA) ayracı: 0,25 N HCl içerisinde %10 TCA çözdürüldü.

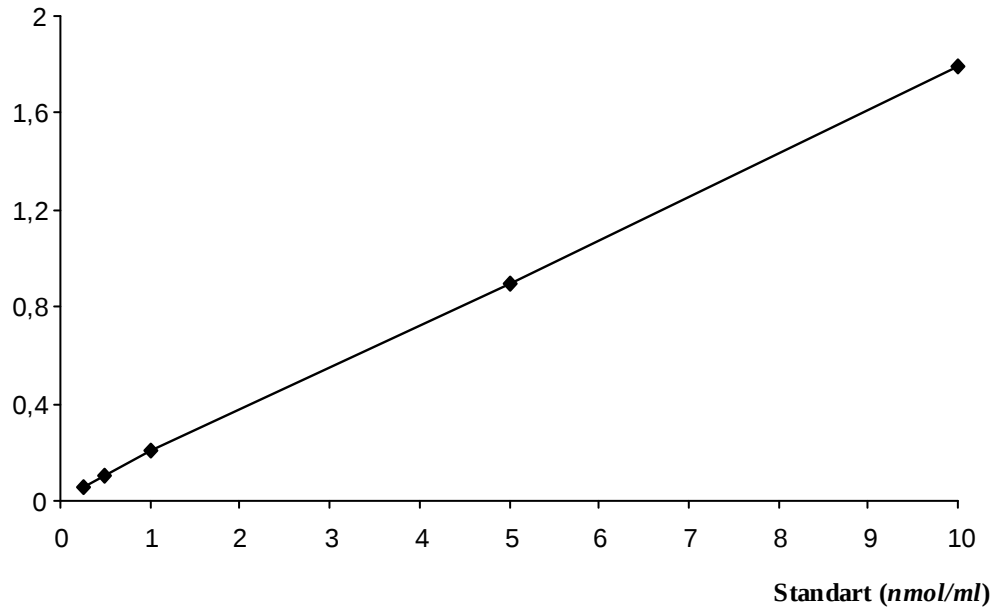
3. Standart (1.1.3.3 tetraetoksipropan): %50 Etanol içerisinde hazırlandı.

Stok standarttan konsantrasyonu 20 nmol/ml olan günlük stok hazırlandı.

Bu standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 0.25, 0,5, 1, 5, 10 nmol/ml konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma standartlarından 0,5 ml TCA ve TBA ayraçlarından 1'er ml alınarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı (Şekil 2).

Tüpler karıştırıldıktan sonra 95 C°'de 30 dk kaynar su banyosunda tutuldu ve soğutuldu. 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilip üst kısımları pipetlendi. 532 nm'de köre karşı okunup standartlardan eğri çizimi yapıldı. Daha sonra çalışılan tüm örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi. Ölçülen böbrek dokusu MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak ifade edildi.

Absorbans (532 nm)



Şekil 2. Malondialdehit (MDA) kalibrasyon eğrisi

Yöntem

Örnekler için ayıraçlar tüplere standart eğri oluşturulurken uygulanan şekilde (0,5 ml homojenat, 1 ml TBA, 1 ml TCA) hazırlandı ve aynı uygulamalara tabi tutuldu. Spektrofotometrede 532 nm'de absorbanslar belirlendi ve kalibrasyon eğrisi yardımıyla MDA düzeyleri nmol/ml homojenat olarak hesaplandı.

Hesaplama

532 nm'de okunan örnek absorbansları (OD) standart değerleri kullanılarak aşağıdaki formül yardımıyla değerlendirildi:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = (\text{Örnek abrosbansı} / \text{Std. Absorbansı}) \times \text{Std. Konsantrasyonu}$$

4.2.2. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeylerinin Ölçümü

Böbrek dokularındaki redükte GSH düzeyleri Ellman (42) tarafından önerilen ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi.

Prensip: 5,5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), sülfüdril bileşikler tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturulur. Daha sonra bu sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH düzeyleri saptanır.

Ayır  lar

1.Tris EDTA Tamponu (0,2 mol/ml, pH: 8,9)

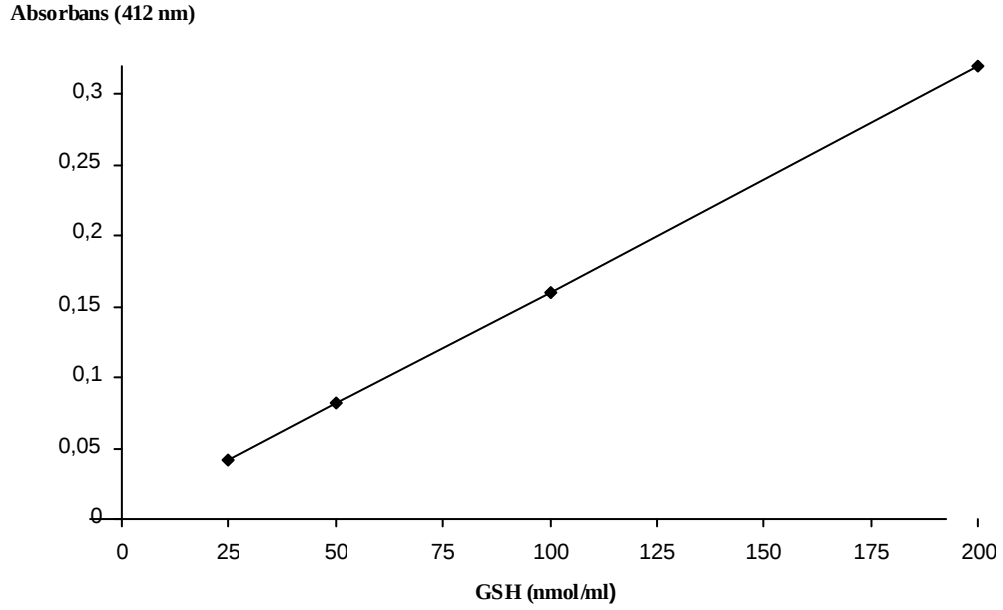
2.TCA Ayır   (% 10'luk)

3.DTNB (5-5'-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) (0,01 mol/L)

Konsantrasyonu 1000 nmol/ml olan stok standart hazırlandı. Bu stok standarttan belli oranlarda dilüsyonlar yapılarak 25, 50, 100, 200 nmol konsantrasyonlarda çalışma standartları hazırlandı. Çalışma çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi şekil 2 'de gösterilmiştir.

Yöntem

Homojenat +4   C'de 45 dakika süreyle 3500 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. 0,5 ml süpernatant ile 0,5 ml TCA ile    kt  r  ld   ve tekrar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstteki kısımdan 0,5 ml alınıp 2 ml Tris EDTA tamponu ilave edildi. Daha sonra 0,1 ml DTNB ilave edilerek karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 412 nm'deki absorbansları k  re karşı okunarak belirlendi. Elde edilen değerler   mol/g protein olarak sunuldu.



Şekil 3. Redükte GSH kalibrasyon eğrisi

4.2.3.Böbrek Dokusu CAT Aktivitesi Ölçümü

CAT enzim aktivitesi Aebi (43) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. CAT katalitik aktivitesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştürmektedir.

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. Deney ortamına ilave edilecek H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanması, UV spektrumunda bir absorbans azalması olarak takip edildi. Absorbanstaki azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ayırıcılar

1. Fosfat Tamponu (pH: 7; 50 mM)
2. H_2O_2 çözeltisi (% 30)

Yöntem

Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna karşı sıfırlanır. Fosfat tamponuna % 30'luk H₂O₂ ilave edilerek absorbans 0,50 oluncaya kadar azar azar ilave edilir.

Numune ilavesi ile 240 nm dalga boyundaki absorbans azalması her 30 saniyede bir 2 dakika boyunca kaydedildi. Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının değerleri esas alındı.

Hesaplama

$$k/dk = k \times dk^{-1} = (2.31 \times \log \text{Okunan Değer 1} / \text{Okunan Değer 2}) / 60 \text{ sn}$$

4.2.4. Protein Ölçümü

Protein miktarı tayini ise yine bu süpernatantlarda Lowry ve ark (44) tarafından tarif edilen yönteme göre tayin edildi.

Prensip: Alkali bakır ayıracındaki Cu⁺⁺ peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin-Fenol ayıracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 650 nm'de okunur.

Ayıraçlar

1. Alkali Bakır ayıracı
2. Fenol ayıracı
3. Bovine serum albumin (150 µ/ml)

Yöntem

1/100 oranında sulandırılan doku örneğinden ve alkali bakır ayırıcından 1'er ml alınarak karıştırılır, oda ısısında 10 dk bekletilir. 4 ml fenol ayıracı ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 55 C'de 5 dk bekletilir. İnkübasyon sonucunda hemen soğutularak absorbensları 650 nm'de köre karşı okunur.

4.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler "SPSS for Windows 11,5" paket programı kullanılarak değerlendirildi. Normallik testleri yapıldı ve veriler nonparametrik test varsayımlarına uyduğu için grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi ve ardından gruplar arası karşılaştırmalar için Tukey HSD testlerine tabi tutuldu. Canlı ağırlıklardaki değişimler ise nonparametrik testlerden Wilcoxon testine tabi tutuldu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Canlı Ağırlık ve Kan Şeker Düzeyleri

Araştırmaya alınan ratlara ait başlangıç ve bitiş canlı ağırlıkları Tablo 2’te gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan ratların başlangıç ağırlıkları homojen olarak oluşturulmuş ve ortalama 168-187 g aralığında olan hayvanlar kullanılmıştır. Kontrol grubu hayvanlarda deneyin başlangıcı ile bitiş arasında ölçülen ağırlıklar arasında istatistikî olarak bir artış ($p<0,001$) olmasına karşılık, diyabet oluşturulmuş tüm hayvan gruplarında azalmalar görülmektedir.

Çalışma süresince kontrol grubunda 2; diyabet grubunda 4; diyabet+sisplatin grubunda 1; diyabet+sisplatin+curcumin grubunda ise 3 hayvan ölmüşlerdir. Geri kalan hayvanlar çalışmanın bitimine kadar sağlıklı bir şekilde yaşamalarını sürdürmüş ve dekapite edilmişlerdir. Tüm gruplarda laparotomi yapılarak açılan hayvanların iç organlarında herhangi bir makroskopik patolojik duruma rastlanılmamıştır.

Araştırmada diyabet oluşturmak amacıyla STZ uygulaması yapılan hayvanların (toplam 40 rat’ ta uygulandı) hemen tümü diyabetli olarak belirlenmiş sadece 1 hayvandaki açlık kan şekeri 200 mg/kg düzeyinin altında çıkmış, bu hayvana da 30 mg/kg Ek doz uygulaması yapılarak diyabet sayılacak seviyelere getirilmiştir.

Tablo 2. Araştırmaya alınan ratların canlı ağırlıkları ve kan şeker düzeyleri.

Gruplar	Deney başlangıç ağırlığı (g)	Deney sonu ağırlığı (g)	Kan şeker düzeyleri (mg/dl)
Kontrol	185.6±5.6 ^a	197.2±7.1 ^a	70.0±2.64 ^c
Diya	180.3±5.4 ^a	162.1±4.8 ^b	485±6.74 ^a
Diya + Sis	168.7±5.9 ^a	156.2±5.3 ^b	375±25.1 ^b
Diya + Cur	170.5±3.7 ^a	164.5±4.5 ^b	376±8.76 ^b
Diya + Sis + Cur	168±3.07 ^a	158.6±5.8 ^b	322±11.2 ^b
P değeri	0.081	0.000	0.000

^{a,b} ; Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arası fark önemlidir (p<0.05)

5.2. Biyokimyasal Parametreler

5.2.1. Plazma Üre ve Kreatinin Düzeyleri

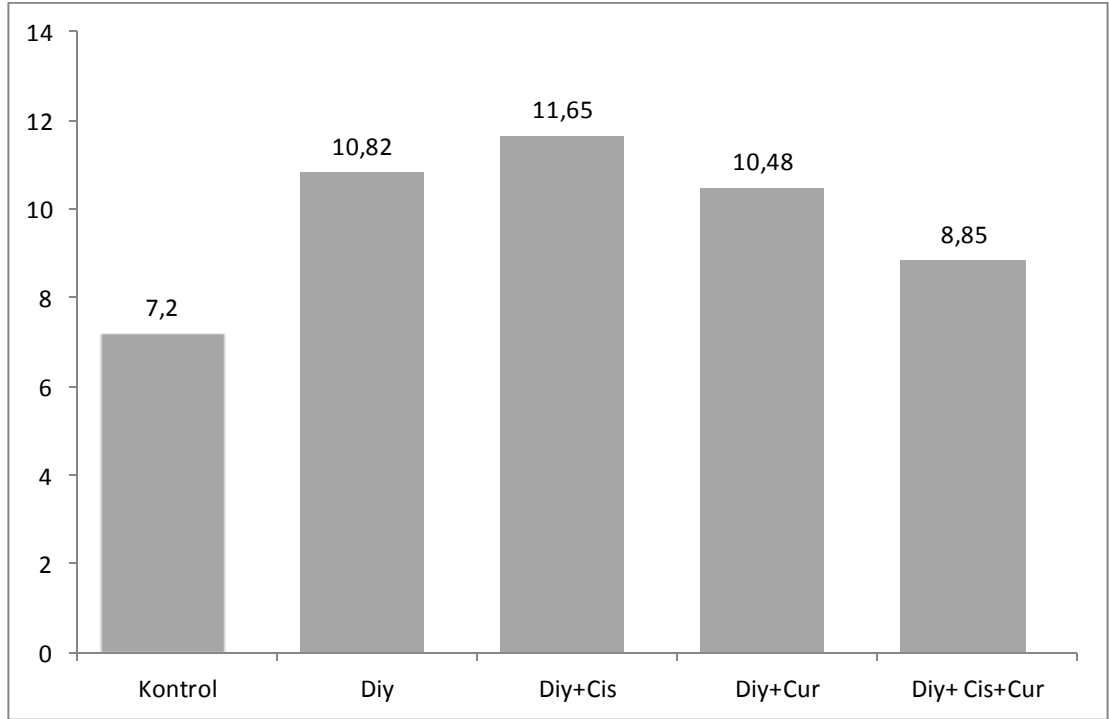
Plazma üre ve kreatinin düzeyleri Tablo 4 da gösterilmiştir. Diyabet oluşturulan grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında plazma üre değerlerinin anlamlı bir şekilde ($p<0.05$); kreatinin değerlerinin ise hafif bir şekilde yüksek olduğu görülmektedir. Diyabet+sisplatin grubunda üre ve kreatinin değerlerinin tek başına diyabet grubuna göre daha yüksek olduğu; diyabet+sisplatin+curcumin grubunda ise üre ve kreatinin düzeylerinin diyabet+sisplatin grubuna göre daha düşük seviyelerde olduğu görülmektedir. Hem diyabet hem de diyabet+sisplatin gruplarıyla karşılaştırıldığında eşzamanlı curcumin uygulamalarının plazma üre ve kreatinin düzeylerinde olumlu bir iyileşmeye neden olmadığı görülmektedir.

Tablo 3. Kontrol ve deneme gruplarına ait üre ve kreatinin düzeyleri (mg/dl).

Gruplar	Üre	Kreatinin
Kontrol	32,6±2,76 ^a	0,75±0.02
Diya	78,0±2,76 ^b	0,88±0.06
Diya + Sis	85,5±5,90 ^b	0,92±0.03
Diya + Cur	77,4±3.29 ^b	0.84±0.04
Diya + Sis + Cur	86,3±3.06 ^b	0.85±0.06
P değeri	0.358	0.182

5.2.2. Böbrek Dokusu MDA Düzeyleri

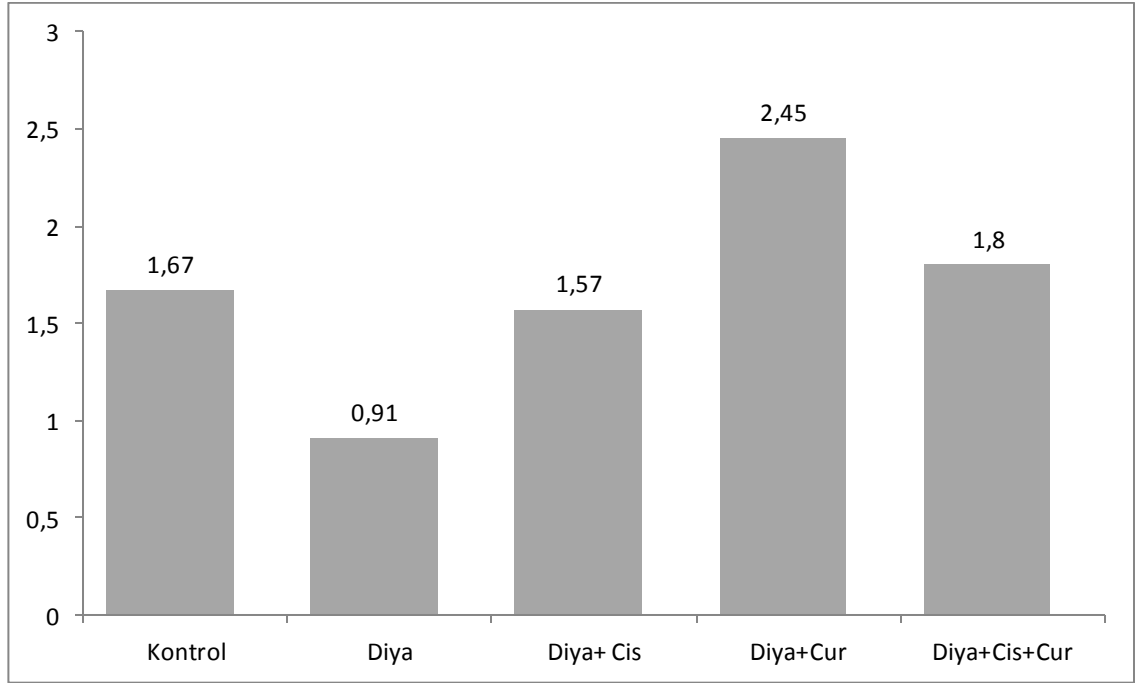
Böbrek dokusu MDA düzeyleri Şekil 4'te sunulmuştur. Kontrol grubu MDA düzeylerinin 7,2±0,38 nmol/ml homojenat olarak belirlendiği buna karşılık tek başına diyabet oluşturulan grupta ise 10,82±0,34 nmol/ml düzeylerinde olduğu, diyabetli gruba sisplatin uygulandığında ise hafif bir artışla 11,65±0,57 nmol/ml düzeylerine çıktığı görülmektedir. Ancak, diyabet+sisplatin+curcumin uygulaması yapılan grupta ise MDA düzeylerinin 8,85±0,25 nmol/ml düzeyleriyle anlamlı bir şekilde iyileşme gösterdiği görülmektedir (p<0,001).



Şekil 4. Gruplara ait böbrek dokusu MDA düzeyleri

5.2.3. Böbrek Dokusu Redükte GSH Düzeyleri

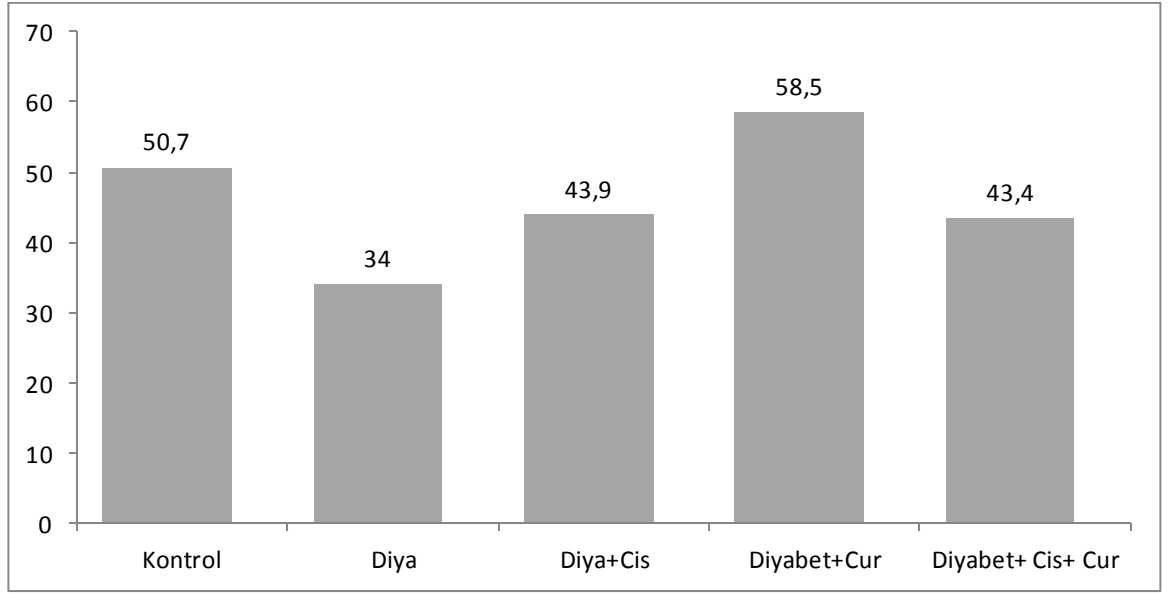
Böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri Şekil 5’te sunulmuştur. Çalışmaya alınan hayvanlardan kontrol grubu ratlarda GSH düzeylerinin $1,67 \pm 0,20$ nmol/g protein olduğu, buna karşılık diyabet grubunda ise $0,91 \pm 0,16$ nmol/g protein düzeylerine indiği belirlenmiştir. Diyabetli gruba sisplatin uygulamasıyla $1,57 \pm 0,21$ nmol/g düzeylerine düşen GSH düzeyleri yine diyabetli gruba Curcumin uygulamasıyla $2,45 \pm 0,12$ nmol/g değerlerine yükselmiştir. Çalışmada diyabet oluşturulmuş gruba hem sisplatin hem de Curcumin uygulaması yapılan hayvanların GSH düzeylerinin ise $1,80 \pm 0,137$ nmol/g düzeylerinde olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5. Gruplara ait böbrek dokusu redükte GSH düzeyleri

5.2.4. Böbrek Dokusu CAT Aktiviteleri

Araştırmaya alınan hayvanların böbrek dokusu CAT aktivitelerine ait sonuçlar Şekil 5’da sunulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tek başına diyabet oluşturulan grup arasında bir azalma (sırasıyla $50,7 \pm 7,25$ ve $34,0 \pm 5,62$ ku/g protein) olduğu ($p < 0,05$) belirlenmiştir. Aynı şekilde diyabetli gruba sisp latin uygulamasının katalaz aktivitesinde diyabetli gruba göre artışlar gösterdiği; diyabet+curcumin grubunda ise bu artışın daha da yüksek olduğu görülmektedir. Buna karşın diyabetli gruba sisp latin+curcumin uygulamalarının diyabet+sisplatin grubuna yakın seviyelerde tuttuğu görülmektedir ($p > 0,05$).



Şekil 6. Gruplara ait böbrek dokusu CAT düzeyleri

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şeker hastalığı görülme sıklığı bakımından dünyada yaygın hastalıklardan biridir ve beraberinde birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Bu hastalıklarla ortaya çıkan bozukluklarla ilgili araştırmalar yapılmakta ve özellikle bitkisel kaynaklı ürünlerin kullanıldığı çok sayıda alternatif tedaviler denenmektedir. Bu çalışmada diyabete ek olarak sisplatinin meydana getirdiği nefrotoksisteye karşı Curcuma Longa bitkisinden elde edilen bir polifenol olan curcuminin etkileri araştırılmaktadır.

Deneysel diyabet oluşumu hayvanlarda çok sayıda araştırmacı tarafından başarı ile yapılmaktadır (13, 22, 23, 45, 46). Bu araştırmada ratlara tek doz şeklinde 60 mg/kg STZ uygulanmış ve STZ'nin pankreas beta hücrelerinde yaptığı sitotoksiste sonucu hayvanların hemen tamamında kan glikoz düzeyleri 72 saat sonra 350 mg/dl düzeyinin üzerinde bulunmuştur. Oluşan bu kan glikoz düzeyi diyabet değeri olarak kabul edilen 200 mg/dl üzerinde olduğundan bu hayvanlar diyabetli olarak kabul edilmiştir. Bu durum deneysel hayvan modellerinde diyabet oluşturan yukarıdaki araştırmacıların görüşleri ile paralellik göstermektedir.

Araştırmada kullanılan hayvanlar canlı ağırlıkları bakımından tartılarak homojen gruplar oluşturulmuştur. Tablo 2'de görüldüğü gibi kontrol grubu hayvanlarda 13 günlük deney süresince canlı ağırlıklarda başlangıç ağırlıklarına göre %8 gibi bir artış olduğu ancak diyabet oluşturulan guruplardaki hayvanların canlı ağırlıklarında bir artış olmadığı belirlenmiştir. Hatta sadece diyabet oluşturulan grup ile karşılaştırıldığında diyabet+sisplatin, diyabet + Curcumin ve

diyabet + sisplatin + Curcumin gruplarında da canlı ağırlık kazanımlarının olmadığı belirlenmiştir. Çalışmada hayvanların canlı ağırlık kazancı sonuçlarının azalması yukarıdaki araştırmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir (39, 40). Nefrotoksisitenin en önemli göstergeleri plazma üre ve kreatinin düzeyindeki artışlar olur ve bu durum gerek diyabet gerekse sisplatin uygulamalarında meydana gelmektedir (47, 48, 49). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında diyabetli grubun plazma üre ve kreatinin düzeylerindeki artışlar glomerüler süzülme ve özellikle proksimal tübüllerdeki hasarlara bağlı olarak artmıştır. Diyabet ve sisplatin uygulamalarına bağlı olan nefrotoksisitenin nedenini glomerüler damar membranlarının kalınlığı, mesangial matriks oluşumundaki artışın oluşturduğu nodüler ve yaygın glomeruloskleroz ve interstisyel fibröz gibi patolojik bulgulara bağlanmaktadır. Bu patolojik oluşumların asıl nedeni böbreklerde artan reaktif oksijenler ile azalan antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (50). Yapılan bu çalışmada da diyabetli hayvanlardaki plazma üre ve kreatinin düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu, curcumin uygulamasının bu artışlar kısmen de olsa önlendiği ortaya konulmaktadır (Tablo 3).

Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve uzaklaştırılması arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişir. Artan oksidatif stres diyabete bağlı komplikasyonların patogenezisinde en önemli unsurlardan biridir. Diyabetli canlılarda özellikle katalaz ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde artan hidrojen peroksite tepki olarak önemli azalmaların olduğu ve bunun da aşırı glikozun otooksidasyonu ve proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonuna bağlı olduğu ileri sürülmektedir (22, 23, 51). Bu antioksidan enzimlerdeki aktivite

azalmalarının bir başka nedeni ise diyabet şartlarında protein sentezindeki azalmadan dolayı olabilir (52). Diyabet oluşturulan grupta azalan katalaz aktivitelerinin curcumin ile kısmen yükseltildiği şekil 5 de görülmektedir. Artan ROS ve buna bağlı enzim aktivitelerindeki düşüşler çeşitli antioksidan maddeler ile iyileştirilmeye çalışıldığı ve oldukça başarılı sonuçların alındığı çalışmalar mevcuttur (53, 54). Yukarıdaki araştırmaların da belirttiği üzere çok güçlü bir antioksidan madde olan curcuminin serbest radikal oluşumunu azaltarak ve antioksidan enzim aktivitelerini yükselterek diyabet ve sisplatine bağlı nefrotoksistenin kısmen iyileştirilmesini sağladığı ve diğer araştırmaların görüşleriyle paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan birçok araştırmada (55, 56, 57) diyabet olgularında indirgenmiş GSH düzeylerinin azaldığı ortaya konmuştur. Dokularda artan serbest oksijen düzeyleri ile yapılan mücadele GSH düzeylerinde azalmalara yol açar. Yapılan bu araştırmada diyabet oluşturulan hayvan gruplarındaki böbrek dokusundaki GSH düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığı, curcumin uygulanan grupta ise kontrol grubunun üzerine çıktığı belirlenmiştir. Diyabet + Sisplatin grubunun GSH düzeyi diyabet grubuyla karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu ve bu durumun sisplatinin oluşturduğu oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmalarının olaya karışması sonucu olabileceği düşünülmektedir. Curcumin uygulamasında ise verilen curcuminin serbest radikallerle mücadelesi indirgenmiş GSH'ın tüketiminde azalmasına ve bu durumda doku düzeylerinin normal değerlerde kalmasına neden olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabet ve sisplatin uygulanan gruplarda lipid peroksidasyonun artması ve antioksidan sistemlerin azalmasının sonucu olarak MDA düzeylerinin artışı görülmektedir ($p < 0.001$).

Lipit peroksidasyon düzeylerinin artması hücrelerin membranlarında geçirgenlik bozuklukları ile hasarlara neden olmakta ve sonuçta birçok patolojik olayın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (55, 57). Bu çalışmada deney gruplarındaki MDA düzeylerindeki artışlar, GSH düzeyi ve katalaz gibi enzim aktivitesindeki azalmalar curcumin uygulaması ile kısmen iyileştirilmiştir. Bazı araştırmacılar (45, 58,59) curcuminin TBARS ürünlerinin oluşumunu azalttığı, lipit peroksidasyonu ve antioksidan savunma sistemlerinde düzenleyici rol aldığını, serbest radikal oluşumunu azalttığını ve serbest radikal oluşumunu azalttığını ve serbest radikal süpürücüsü olarak görev aldığını bildirmişlerdir. Çalışmada diyabet ve sisplatin grupları tarafından böbrek dokusunda MDA düzeyleri reaktif oksijenlerin hücrel hasarlarına bağlı olarak kontrol grubuna göre yüksektir ve curcumin verilen gruplardaki MDA azalmaları yukarıdaki araştırmacıların görüşleriyle paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak STZ ile tip 2 diyabet oluşturulan ratlarda ilave olarak verilen sisplatinin böbrek hasarlarını daha da artırdığı, curcuminin ise lipit peroksidasyonun göstergelerinden en önemlisi olan MDA düzeylerini azalttığı, GSH ve katalaz aktivitelerini artırarak bozulan antioksidan savunma sistemlerini güçlendirdiği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Ali BH, Al Moundhri MS. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds. *Food Chem Toxicol* 2006; 44: 1173-1183.
2. Chirino YI, Gonzalez DJS, Martinez CMM, et al. Protective effects of apocynin cisplatin induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 2008; 245: 18-23.
3. Pan H, Mukhopadhyay P, Rajesh M, et al. Cannabidiol attenuates cisplatin induced nephrotoxicity by decreasing oxidative/nitrosative stress, inflammation, and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 328: 708-714.
4. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin. *Br J Cancer* 1993; 67: 1171-1176.
5. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transpl* 1997; 12: 2478-2480.
6. Uehara T, Yamate J, Torii M, Maruyama T. Comparative nephrotoxicity of cisplatin and nedaplatin mechanisms and histopathological characteristics. *J Toxicol Pathol* 2011; 24: 87 -94.
7. Safirstein R, Winston J, Goldstein M, et al. Cisplatin nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis.* 1986; 8(5): 356-67.
8. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(1): 1-10.
9. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; 73: 994-1007.
10. Guerrero BCE, Calderon OM, Tapia E, et al. Sulforaphane protects against cisplatin induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 2010; 192: 278-285.
11. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, et al. Role of apoptosis in cisplatin –induced toxicity in the renal epithelial cell line LLCK-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 195-201.
12. Bouliskas T and Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep* 2003; 10: 1663-1682.
13. Wei Q, Don G, Franklin J and Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 2007; 72: 53-62.
14. Park MS, De Leon M, Deverajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC –PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 858-865.
15. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cell apoptosis. *Am J Physiol* 1996; 270: 700-708.

16. Tajo A, Asaba K, Onazata ML. Suppressing renal NADPH oxidase to treat diabetic nephropathy. *Expert Opin Ther Target*. 2007; 11: 1011-1018.
17. Tomasz S. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine* 2012; 237: 481-490.
18. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care* 2006; 29: 43-8.
19. Anello M, Lupi R, Spampinato D, et al. Functional and morphological alterations of pancreatic beta cells from type diabetic patients. *Diabetologia* 2005; 48: 282-9.
20. Lencioni C, Lupi R, Del Prato S. Beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2008; 8: 179-84.
21. Sato Y, Feng GG, Huang L, et al. Enhanced expression of naofen in kidney of streptozotocin-induced diabetic rats: possible correlation to apoptosis of tubular epithelial cells. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14(3): 205-12.
22. Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Nishanth K, Kuo CH, Reddy KS. Protective effect of dietary ginger on antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues. *Food Chemistry* 2011; 124: 1436-1442.
23. Shanmugam KR, Mallikarjuna K, Kesireddy N, Sathyavelu Reddy K. Neuroprotective effect of ginger on anti-oxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(4): 893-7.
24. Ziyadeh FN, Goldfarb S. The renal tubulointerstitium in diabetes mellitus. *Kidney Int* 1991; 39(3): 464-75.
25. Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1983; 25(6): 496-501.
26. Lazalde-Ramos BP, Zamora-Perez AL, Sosa-Macías M. Guerrero-Velázquez C, Zúñiga-González GM. DNA and oxidative damages decrease after ingestion of folic acid in patients with type 2 diabetes. *Arch Med Res* 2012;7.
27. Singh PP, Farzana M, Ajanta R et al., Reactive oxygen species, reactive nitrogen species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian J Clin Biochem* 2009; 24: 324-342.
28. Wilken R, Veena, MS; Wang, Marilene B. Curcumin: A Review of Anti-Cancer Properties and Therapeutic Activity in Head, Neck, Squamous Cell Carcinoma. *Molecular Cancer* 2011; 10: 12.
29. Jayaprakasha GK, Rao LJM, Sakariah K: K, Chemistry and Biological Activities. *Trends in Food Science* 2005; 16: 533-548
30. Masuda T, Maekawa T, Hidaka K, et al. Chemical Studies on antioxidant mechanisms of curcumin analysis of oxidative coupling products from curcumin and linoleate. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 2539-2547.

31. Joe B, Vijaykumar M, Lokesh BR, Biological properties of curcumin cellular and molecular mechanisms of action. *Crit Rev Food Sci Nut.* 2004; 44: 97-111.
32. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 2007; 595: 1-75.
33. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of curcuma longa. *Planta Med* 1991;57: 1-7.
34. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cell by curcumin via modulation of nuclear factor- κ B signaling. *Int J Cancer* 2004; 111: 679-692.
35. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin. *Life Sciences* 2006; 78: 2081-2087.
36. Cohly HHP, Taylor A, Angel MF. Effect of Turmeric Turmerin and curcumin on H_2O_2 -induced renal epithelial (LLC-PK₁) cell injury. *Free Radical Biology and Medicine.* 1998; 24: 49-54.
37. Pushparaj P, Tan CH, Tan BKH, Averrhoa Bilimbi Leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2000; 72:69-76.
38. El-Demerdash FM, Yousef MI, Radwan FME. Ameliorating effect of curcumin on sodium arsenite-induced oxidative damage and lipid peroxidation in different rat organs. *Food and Chemical Toxicology.* 2009; 47:249-254.
39. Atessahin A, Türk G, Karahan I et al. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertility and Sterility* 2006; 85, Suppl 1; 1216-22.
40. Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology* 2005; 212: 116-123.
41. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
42. Ellman G, Tissue sulfhydryl groups, *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-77.
43. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
44. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin phenol reagent, *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
45. Pari L, Umamaheswari J. Antihyperglycaemic activity of *Musa sapientum* flowers effect of lipid peroxidation in alloxan diabetic rat. *Phytother Res* 2000; 14:136-138.
46. Van de Maele I, Rogier N, Daminet S. Retrospective study of owners' perception on home monitoring of blood glucose in diabetic dogs and cats. *Can Vet J* 2005; 46:718-723.
47. Koder R, Shikata K, Kataoka HU, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011; 54(4): 965-78.
48. Francescato HDC, Costa RS, Camargo SMR et al. Effect of dietary oral selenium on cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 77-82.

49. Antunes LMG, Darin JDC, Bianchi MLP. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 145–50.
50. Lin CC, Liu Y, Ho CT, Huang MT. Inhibitory effects of 1,3-bis-(2-substituted-phenyl)-propane-1,3-dione, β -diketone structural analogues of curcumin, on chemical-induced tumor promotion and inflammation in Mouse skin. *Food Funct.*, 2011; 2:78
51. Preet A, Gupta BL, Yadava PK, Baquer NZ. Efficacy of lower doses of vanadium in restoring altered glucose metabolism and antioxidant status in diabetic rat lenses. *J Biosci* 2005; 30(2): 221-30.
52. Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vaziri ND. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26(1): 43-53.
53. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 358(1-2): 60-7.
54. Young HY, Luo YL, Cheng HY, et al., Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J Ethnopharmacol* 2005; 4; 96(1-2): 207-10.
55. Tirkey N, Kaur G, Vij G, Chopra K. Curcumin, a diferuloylmethane, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rat kidneys. *BMC Pharmacology*.2005; 5;15
56. Meister A, Anderson ME, Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 1983; 52: 711-760.
57. Tachi Y, Okuda Y, Bannai C, Shinohara M, et al. Hyperglycemia in diabetic rats reduces the glutathione content in the aortic tissues. *Life Sciences* 2001; 69: 1039-1047.
58. Asayama K, Miyao A, Dobashi K et al. Concentration of lipid peroxide in serum lipoproteins of insulin-dependent diabetic children. *Acta Paediatr Jpn* 1991; 33(3): 369-74.
59. Kalpona C, Menon VP, Protective effect of curcumin on circulatory lipid peroxidation and antioxidant status during nicotine-induced toxicity 2004;14: 339-343.

8. ÖZGEÇMİŞ

1979 Şanlıurfa doğumluyum. İlk, orta ve lise eğitimimi 1996 yılında tamamladım. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi kazandım. 2007 yılında Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığında Veteriner Hekim olarak göreve başladım. Halen Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsünde Veteriner Hekim olarak çalışmaktayım. Evli ve iki çocuk annesiyim.