

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SİSPLATİN NEFROTOKSİSİTESİ OLUŞTURULAN RATLARDA
SİRTUİN EKSPRESYONU ÜZERİNE KURKUMİNİN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN
Danışmanı

Dr. Sıddık UĞUR
Tıpta Uzmanlık

**ELAZIĞ
2013**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Ayhan Doğukan _____

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN olmak üzere diğer saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Emir DÖNDER, Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKER, Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU, Prof. Dr. Ahmet IŞIK, Prof. Dr. Yusuf ÖZKAN, Prof. Dr. Mehmet YALNIZ, Doç. Dr. Bilge AYGEN, Doç. Dr. S. Serdar KOCA, Doç. Dr. Handan ÇİPİL, Yrd. Doç. Dr. Ulvi DEMİREL, Yrd. Doç. Dr. Mustafa CANHOROZ'a, teşekkür ederim.

Tezimin tüm aşamalarında değerli bilgilerini aktaran, her konuda destek olarak, yol gösteren tez danışmanı Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN'na, Veterinerlik Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları öğretim üyesi Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e, tezimin istatistiklerinin yapılması ve sonuçların yorumlanma safhasında emeği geçen Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet TUZCU'ya, histopatolojik inceleme safhasındaki yardımlarından dolayı Patoloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İbrahim Hanifi Özercan'a, Biyokimya A.D öğretim üyesi Prof. Dr. Necip İlhan'a teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında desteklerini gördüğüm Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Bilim Dalı Arş. Gör. Dr. Cemal ORHAN'a, Fen Fakültesi Biyoloji A.D. Arş. Gör. Hasan GENÇOĞLU'na teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım dostluklarımı esirgemeyen tüm asistan ve uzman olmuş arkadaşlarıma, iç hastalıkları servislerinde çalışan tüm hemşire, personel ve kliniğimiz çalışanlarına teşekkür ederim.

Tüm hayat boyu olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini biran bile eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Her türlü desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren eşim Ayşe UĞUR'a teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmada sisplatin nefrotoksisitesinde kurkuminin sirtuinler (SIRT) ve Nikotinamid fosforibozil transferaz (NAMPT) ekspresyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada, 28 adet Wistar albino cinsi erkek ratlar (10 haftalık, ağırlık 194-264 gr arasında) kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı;

Kontrol Grubu (n=7): Sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve bazal diyetle beslenen grup. Sisplatin Grubu (n=7): Çalışmanın 3. gününde sisplatin % 0.9 salin (1 ml/100 gr/kg i.p.) içinde (7 mg/kg) uygulanan ratlar. Kurkumin Grubu (n=7): Sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 8 gün süreyle kurkumin (100 mg/kg) verilen ratlar. Kurkumin + Sisplatin Grubu (n=7): Sisplatin uygulanan ve sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 8 gün süreyle kurkumin (100 mg/kg) verilen ratlar.

Çalışma sonunda ratlar dekapitasyonla öldürülerek biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için serum ve böbrek örnekleri alındı. Serum üre, kreatinin, doku MDA, SIRT1, SIRT3, SIRT4 ve NAMPT düzeyleri çalışıldı. Böbrek dokusunda histopatolojik inceleme yapıldı.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sisplatin grubunda serum üre ve kreatinin, doku MDA düzeylerinde anlamlı artış, SIRT1, SIRT3, SIRT4 ve NAMPT düzeylerinde anlamlı oranda düşme tespit edildi. Sisplatin+kurkumin grubunda sisplatin grubuyla karşılaştırıldığında serum üre ve kreatinin, doku MDA düzeyleri anlamlı derecede düşük; SIRT1, SIRT3, SIRT4 ve NAMPT düzeyleri anlamlı oranda yüksek tespit edildi. Histopatolojik incelemede sisplatin+kurkumin verilen grupta vokuolizasyon, tübüler nekroz, tübüler atrofi ve inflamasyonun daha az olduğu görüldü.

Sonuç olarak kurkuminin lipid peroksidasyonunu azalttığı, sirtüin ve NAMPT düzeylerini artırdığı görüldü. Kurkumin sisplatin nefrotoksisitesine karşı koruyucu etki göstermesinde sirtüin ve NAMPT ekspresyonunu artırmasının önemli rol oynadığı kanaatindeyiz

Anahtar kelimeler: Sisplatin nefrotoksisitesi, kurkumin, sirtüin, NAMPT.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CURCUMIN ON EXPRESSION OF SIRTUINS IN CISPLATIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

In this study we aimed to determine the effects of curcumin on renal expression of sirtuins (SIRT) and Nicotinamide phosphoribosyl transferase NAMPT in cisplatin induced nephrotoxicity.

We used 28 wistar albino male rat (8 wk-old, between 200-215 g) in this study. We separated the rats into 4 groups (n:7 for each group) as; Control group (n:7): Standard diet and saline administration intraperitoneal with equal volume of cisplatin (1ml/kg/day). Cisplatin group (n:7): cisplatin administered in 0.9% saline solution on the third day of study. Curcumin group (n:7): curcumin administration 2 days before and continued 8 days after saline administration. Cisplatin + curcumin group (n:7): cisplatin+ isotonic saline solution with equal volume and curcumin administration 2 days before and continued 8 days after cisplatin administration.

At the end of study, rats were decapitated and serum and renal tissues were obtained for biochemical and histopathological analysis. Serum urea, creatinine and tissue MDA, SIRT1, SIRT3, SIRT4, NAMPT levels were evaluated. Renal tissues were also histologically evaluated.

Serum urea, creatinin and tissue MDA levels increased and; SIRT1-3-4 and NAMPT levels decreased in cisplatin group in comparison with control group. In cisplatin + curcumin group; serum urea, creatinin and tissue MDA levels were significantly lower; SIRT1-3-4 and NAMPT levels were significantly higher in comparison with cisplatin group. Histopathologic findings such as vacuolisation, tubular necrosis, tubular atrophy and inflammation were relatively low in cisplatin + curcumin group.

In conclusion, we determined that curcumin reduces lipid peroxidation; increases sirtuin and NAMPT levels. According to the results of our study, protective effects of curcumin on cisplatin induced nephrotoxicity depends on the increasing expression of sirtuins and NAMPT.

Key words: Cisplatin induced nephrotoxicity, curcumin, sirtuin, NAMPT.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Sisplatin	2
1.1.1. Sisplatin Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizmaları	3
1.1.2. Sisplatin Sitotoksitesinin Moleküler Farmakolojisi	4
1.1.2.1. Sisplatin-DNA Bağlarının Tamiri	4
1.1.2.2. Sisplatin-DNA Bağlarının Transkripsiyonu İnhibe Etmesi	4
1.1.2.3. Sisplatin Bağlarının Apoptozisi Başlatması	4
1.1.3. Sisplatin Nefrotoksitesitesi	5
1.1.3.1. Sisplatin Nefrotoksitesitesinin Oluşum Mekanizması	5
1.1.3.1.1. Hücre İçerisinde Biriktirilmesi	5
1.1.3.1.2. Sisplatinin Böbrek Hücrelerinde Transformasyonu	7
1.1.3.1.3. Böbrek Hücrelerinde Hasara Neden Olan Hücre İçi Olaylar	7
1.1.3.2. Sisplatin Hasarının Patofizyolojik Etkileri	9
1.1.3.3. Sisplatin Nefrotoksitesitesine Bağlı Patolojik Değişiklikler	10
1.2. Reaktif Oksijen Bileşikleri ve Antioksidan Savunma Sistemleri	11
1.2.1. Endojen Antioksidanlar	12
1.2.1.1. Katalaz ve Peroksidaz	12
1.2.1.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)	13
1.2.1.3. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)	13
1.2.2. Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi	14
1.3. Kurkumin	14
1.3.1. Kimyasal Özellikleri	15

1.3.3. Kurkuminin Biyolojik Etkileri	16
1.3.3.1. Antioksidan Etkileri	16
1.3.3.2. Anti İnflamatuar Etkileri	16
1.3.3.2.1. Kurkuminin Siklooksijenaz ve Lipoksijenaz Üzerindeki Etkileri	16
1.3.3.2.2. Kurkuminin İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Üzerindeki Etkisi	17
1.3.3.2.3. Kurkuminin NF-κB Üzerindeki Etkisi	17
1.3.3.2.4. Kurkuminin TNF Üzerindeki Etkileri	18
1.4. Sirtuinler	19
1.4.1. Sirtuin 1	21
1.4.1.1. SIRT1'in DNA Tamirindeki Rolü	21
1.4.1.2. SIRT1 ve Hücre Ölümü	22
1.4.1.3. SIRT1'in Metabolik Regülasyonundaki Rolü	23
1.4.1.4. SIRT1 ve Yaş İlişkili Hastalıklar	24
1.4.2. Sirtuin 3	25
1.4.3. Sirtuin 4	27
1.4.4. NAMPT (PBEF/Visfatin)	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Hayvan Materyali	30
2.2. Laboratuvar Analizi	31
2.2.1. Üre ve Kreatinin Analizi	31
2.2.2. Malondialdehit (MDA) Analizi	31
2.2.3. Western Blot Analizleri	32
2.2.3.1. Özgül antikorlarla tepkime	34
2.2.3.2. Bantların görüntülenmesi	34
2.3. Histopatolojik Değerlendirme	34
2.4. İstatistiksel analizleri	35
3. BULGULAR	36
3.1. Serum Üre Düzeyleri	36
3.2. Serum Kreatinin Düzeyleri	37
3.3. Malondialdehit Düzeyleri	38
3.4. NAMPT Düzeyleri	39

3.5. Sirtuin 1 Düzeyleri	40
3.7. Sirtuin 4 Düzeyleri	42
3.8. Histopatolojik sonuçlar	43
4. TARTIŞMA	45
5. KAYNAKLAR	53
6. ÖZGEÇMİŞ	74

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Sisplatin nefrotoksisitesi uygulanan ratlarda Kurkumin katkısının serum üre ve kreatin; doku malondialdehit, SIRT1, SIRT3, SIRT4, NAMPT düzeyleri üzerine etkisi	36
Tablo 2. Kurkumin uygulamasının rat böbrek dokusundaki morfolojik değişiklikler üzerine etkisi	44

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Cis-Diamminedichloroplatinum	2
Şekil 2.	Tümör hücresinde sispaltin tarafından indüklenen apoptozis ve nekrozise giden hücre ölüm yolları ve bunlar arasındaki ilişki	6
Şekil 3.	Sispaltinin indüklediği ana akut tübüler hücre hasar yolları	7
Şekil 4.	Sirtuin deasetilasyon ve ADP-ribozilasyon reaksiyonları .	21
Şekil 5.	Mitokondriyal enzimlerin SIRT3, 4 ve 5 tarafından mitokondriyal matrikste regülasyonu	26
Şekil 6.	Gruplara ait serum üre düzeyleri.	37
Şekil 7.	Gruplara ait serum kreatinin düzeyleri.	38
Şekil 8.	Gruplara ait doku MDA düzeyleri.	39
Şekil 9.	Gruplara ait doku NAMPT düzeyleri.	40
Şekil 10.	Gruplara ait doku sirtuin 1 düzeyleri.	41
Şekil 11.	Gruplara ait doku Sirtuin 3 düzeyleri.	42
Şekil 12.	Gruplara ait doku sirtuin 4 düzeyleri.	43
Şekil 13.	Hematoxylin and eosin (H&E) ile gruplara göre böbreğin histopatolojik görünümü.	44

KISALTMALAR LİSTESİ

AceCS2	: Asetilkoenzim A sentaz 2
ATP	: Adenozintrifosfat
COX	: Siklooksijenaz
Ctr 1	: Copper transporter 1
CytC	: Sitokrom c
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FOXO	: Forkhead box class O
GDH	: Glutamat dehidrogenazı
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Oranı
GGT	: Gama glutamil transferaz
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HIF 1	: Hypoksia inducible factor-1
IκB	: İnhibitor of κB kolestrol transportunu sağlayan nükleer reseptör
LXR K	: AMP-aktive protein kinaz
LOX	: Lipoksijenaz
MDA	: Malondialdehit
MMR	: Mismatch repair system
NAD⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADPH	: Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NAMPT	: Nikotinamid fosforibozil transferaz
NER	: Nuclotid excision repair
NF-κB	: Nükleer faktör- κB

- NMN** : Nikotinamidi nikotinamid mononükleotide
- Nmnat** : Nikotinamid mononükleotid adenil transferaz
- NO** : Nitrik oksit
- OH** : Hidroksil radikali
- $\cdot\text{O}_2$** : Süperoksit anyon
- OCT2** : Organic cation transporter
- ONOO⁻** : Peroksinitrit
- PARP-1** : Poly (ADP-ribose) polymerase -1
- PGC-1 α** : Peroxisome proliferator –activated receptor gama-coactivator-1 α
- PPAR- γ** : Peroxisome proliferator-activated receptor γ
- ROB** : Reaktif oksijen bileşikleri
- SIRT 1** : Sirtuin 1
- SIRT3** : Sirtuin 3
- SIRT4** : Sirtuin 4
- Sir-2** : Silentmatingtype information regulation-2
- SOD** : Süperoksid Dismutaz
- TGF- β 1** :Tümör growth faktör- β 1
- TNF- α** : Tümör Nekroz Faktör- α

1. GİRİŞ

Sisplatin (*cis-diamminedichloroplatinum II*) baş, boyun, akciğer, testis, over ve meme gibi birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan güçlü bir antineoplastik ilaçtır (1). Antineoplastik ajan olarak güçlü etkinliği yanında sisplatin kullanımının farklı dezavantajları vardır. Bunlar nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, bulantı ve kusmayı içeren yan etkileridir (2). Nefrotoksisite, sisplatinin kullanımına bağlı oluşan bir komplikasyon olup doz kısıtlamasına neden olan bir faktördür. Sisplatin nefrotoksisitesinin oluşum mekanizması komplekstir. Sisplatin renal dokuda oksidatif strese, apoptoza, inflamasyona neden olur ve fibrinojen oluşumunu artırır (3-8). Akut böbrek yetmezliği oluşan hastalarda ön plandaki lezyon proksimal tübüllerde oluşan akut nekrozdur. Nekrozun şiddeti doz, konsantrasyon ve zaman bağımlıdır. İnterstisyel nefrit tespit edilmemiştir (9, 10). Kronik nefrotoksisite oluşan vakalarda fokal akut tübüler nekroz oluşmuştur. Kistik dilate tübüllerde yassı epitel hücreleri, atipik nükleus ve atipik mitotik şekillere sahip hyalen döküntüler gözlenir. Uzun süreli sisplatin tedavisi ve oluşturduğu hasar kistik dilatasyon ve interstisyel fibrozise neden olabilir (11).

Kurkumin ilk olarak 1910 tarihinde kimyasal yapısı karakterize edilen zerdaçal bitkisinden elde edilen düşük molekül ağırlıklı potent bir anti inflamatuvar ve antioksidan polifenoldür (12, 13). Yapılan bir çalışmada kurkuminin oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak sisplatin nefrotoksisitesine bağlı oluşan biyokimyasal ve patolojik bozukluğu düzelttiği gösterilmiştir (13).

Silentmatingtype information regulation-2 (Sir2) adıyla ilk olarak mayalarda tanımlanan sirtuinler geniş bir protein ailesi olup bakterilerden memelilere kadar birçok cinsten ve farklı sayıda bulunmaktadır. Memelilerde yedi farklı gen tarafından kodlanan yedi farklı sirtuin enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı deasetilasyon veya (mono) ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösterir. Sirtuinlerin belirli stres ve toksisiteye yanıtta önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Bakteri ve maya gibi cinslerde üreme ve yaşam süresi üzerinde ve memelilerde yaşlanmaya bağlı hastalıklar üzerinde etkileri olduğu gözlenmiştir (14).

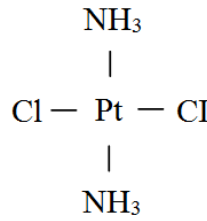
Sitoplazma ve çekirdekte bulunan bir sirtuin olan Sirtuin 1 (SIRT 1) hücrede oluşan genetik bozulmaları tamir etmekte veya oluşacak hasara karşı direnç

oluşturmakta, hücre ölümünde etkili olan yolları regüle etmekte, özellikle *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR- γ) ve *Peroxisome proliferator – activated receptor gama-coactivator-1 α* (PGC-1 α) üzerindeki düzenleyici etkileri ile metabolizmayı etkilemekte ve yaşlanmaya bağlı oluşan hastalıklarda etkileri olmaktadır (15). Sirtuin3 (SIRT3) ve Sirtuin 4 (SIRT4) mitokondride bulunmaktadır. SIRT3 asetilkoenzim-A sentaz 2 (Ace CS2) ve elektron transport zinciri içerisindeki birçok proteini deasetile ederek adenozintrifosfat (ATP) sentezine giden yolları regüle etmekte, SIRT4 glutamattan α -ketoglutarat sentezini gerçekleştiren glutamat dehidrogenazı (GDH) (mono)ADP-ribozil transferaz aktivitesi ile inhibe etmektedir. Özellikle böbrek, beyin, pankreatik islet hücrelerinde stres durumunda SIRT4 aktivitesi azalmaktadır (16). Nikotinamid fosforibozil transferaz (NAMPT) nikotinamidi nikotinamid mononükleotide (NMN) çevirir, NMNde nikotinamid mononükleotid adenil transferaz (Nmnat) ile NAD⁺ 'a çevrilir. NAMPT NAD⁺ sentezinde hız kısıtlayıcı enzimdir (17).

Çalışmamızda kurkuminin sisplatin nefrotoksisitesindeki koruyucu rolü ve sirtuin ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirildi.

1.1. Sisplatin

Sisplatin (*cis-diamminedichloroplatinium*) baş, boyun, akciğer, testis, over ve meme gibi birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan güçlü antineoplastik ilaçtır (1) (Şekil 1).



Şekil 1. Cis-Diamminedichloroplatinum

Sisplatinin antikanser etkinliğinin farkına 1960' lı yıllarda Rossenberg ve çalışma arkadaşlarının elektriksel alanın *Escherichia coli* gelişimi üzerindeki etkisi inceleninceye kadar varılamamıştır (18). Redoks reaksiyonları sonucu platin elektrotları serbestleşmiş ve bakterilerin bölünmesi tamamen engellenmiştir. Bu

platin kompleksleri arasından sisplatin antiproliferatif etkinliği en yüksek form olarak tespit edilmiştir (19).

Antineoplastik ajan olarak gcl etkinliği yanında sisplatin kullanımının farklı dezavantajları vardır. Bunlar nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, bulantı ve kusmayı içeren yan etkileridir. Bu yan etkiler ilacın hastalar için etkin olabileceği dozda kullanımını engellemektedir (2).

Sisplatine karşı dirence neden olan farklı moleküler mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmalar ilacın hücre içinde birikiminin engellenmesi, tiyol bileşikleri ile inaktive edilmesi, platin deoksiribonükleik asit (platin-DNA) bağlarının onarılması, sisplatin bağlarına tolerans ve hücre ölümüne neden olan yollarda aksama meydana gelmesi şeklinindedir. Bir tümörde bu mekanizmalardan biri, ikisi veya tümü hücre tipine bağlı meydana gelebilir (20).

1.1.1. Sisplatin Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizmaları

Sisplatinin hücre içinde sadece %10 kadarı genomik DNA'ya bağlanmaktadır. Geri kalan %75-85'i proteinlere ve diğer hücre sel yapılara bağlanmaktadır (21). Genel olarak kabul edilen sisplatinin antitümör etkinliğini esas olarak genomik DNA 'ya bağlanarak gösterdiğidir (22). Sisplatinin genomik DNA'ya bağlanmasıyla transkripsiyon ve DNA replikasyonu engellenmekte ve sonuçta kanser hücrelerinin ölümü ile sonuçlanan bir süreç oluşmaktadır.

Sisplatinin reaktivitesi bulunduğu ortamdaki klor konsantrasyonundan etkilenmektedir. Kandaki ve ekstraselüler ortamdaki klor konsantrasyonu yaklaşık 100 mM'dur ve sisplatin bu ortamlarda göreceli daha az aktiftir. Hücre içinde bu oran düşmekte ve sisplatinin reaktivitesi artmaktadır. Bu ortamda klor iyonları sisplatinden ayrılmakta ve yerine su molekülleri bağlanmaktadır. Klordan daha kolay ayrılabilen su moleküllerin yerine nükleofilik gruplar bağlanmaktadır (23). Bu nükleofilik gruplar DNA ve RNA 'daki prin bazlarında olduğu gibi birçok proteinin yan zincirlerinde mevcuttur.

Sisplatin DNA'ya tek bağla, bir ucuna protein bağlı diğer ucuyla DNA'ya bağlanarak veya aynı DNA sarmalına çift bağla, karşılıklı zincirlerine çift bağla bağlanma şeklinde bağlanır (24). Bağlanma en çok 1, 2-d (GpG) ve d (ApG) aynı sarmalın komşu prin bazlarına bağlanma şeklinde olmaktadır. Komşu prin bazları

arasındaki bağlantı çift heliksin bükülmesine neden olmaktadır. Bu hipotez *high mobility protein* (HMG) keşfinden sonra ortaya konmuştur. Bu proteinler özellikle sisplatin-DNA bağlarının oluşturduğu bu bükülmüş bölgelere bağlanarak etki etmektedirler (25).

1.1.2. Sisplatin Sitotoksitesinin Moleküler Farmakolojisi

1.1.2.1. Sisplatin-DNA Bağlarının Tamiri

İnsan hücrelerinde sisplatin bağları genelde NER (*nuclotid excision repair*) yoluyla tamir edilir (26). Sisplatin bağlarının bu sistem yoluyla tamirinin hücre içinde çok düşük bir etkinlikte diğer yandan hücre dışında çok iyi gerçekleştiği görülmüştür. Bu şekilde tamir mekanizmasının etkisiz olması sisplatinin antikanser ilaç etkinliği için önemlidir. HMG proteinlerinin sisplatin bağlanma bölgelerine bağlanması tamir mekanizmasını engellemektedir (27).

Mismatch repair system (MMR) proteinleri ATP bağımlı postreplikatif bir tamir sistemidir (28). MMR proteinleri sisplatinin indüklediği hasarı tanır; fakat hücrenin yaşamını uzatmak yerine bu sistemin sisplatin aracılı sitotoksitesiyi artırdığı gösterilmiştir (29).

1.1.2.2. Sisplatin-DNA Bağlarının Transkripsiyonu İnhibe Etmesi

Uzun süreli çalışmalarda DNA'da hasar oluşturan ajanların kullanımı ile beraber RNA sentezinin azaldığı gösterilmiştir. Özellikle 1,2-d (GpG) bağlı sisplatine bağlı hasarda RNA polimeraz II transkripsiyonunun stoplandığı görülmüştür (30). *TATA-Binding protein* (TBP)'nin sisplatinin 1,2-d (GpG) bağlarına TATA-box'a göre 200 kat daha güçlü bağlandığı ve transkripsiyonu desteklemediği gösterilmiştir.

HMG proteinlerden RNA polimeraz transkripsiyon faktörü *upstream binding factor* (UBF) 1,2-d (GpG) bölgesine bağlanmaktadır. Bu transkripsiyon faktörünün rDNA'daki promotor bölgeye sisplatin varlığında bağlanması aksamakta ve RNA polimeraz I'in transkripsiyonu başlatma etkisi engellenmektedir (31).

1.1.2.3. Sisplatin Bağlarının Apoptozisi Başlatması

Sisplatin ile klinik olarak başarılı sonuçlar alınması onun p53 ve p73 olarak bilinen proteinler üzerinden apoptozisi başlatmasıdır. Bu proteinlerin sisplatinin

DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunu durdurma ve apoptozisi indüklemeye özellikleri vardır. Sisplatin biri p53 diğeri p73 üzerinden olmak üzere iki paralel yol üzerinden ölüme yol açan etkiye sahiptir (32). Sisplatinin DNA hasarına yanıt olarak hücre siklusunun durmasına neden olan bir aracı olan c-abl kinaz aktive olmaktadır (33). C-abl p73'ün proapoptotik etkisini artırmaktadır (34). Böylece DNA hasarına bağlı olarak oluşan sinyaller c-abl üzerinden p73'e doğru aktarılmaktadır.

Bcl-2 protein ailesinin ekspresyonu, streskinaz kaskadının aktivasyonu ve telomer kaybı sisplatine bağlı ölüme neden olan olası diğer düzenleyicilerdir (34-36).

1.1.2.4. Sisplatine Bağlı Hücre Ölüm Yolları

Apoptozis ve nekroz hücre ölümüne neden olan iki ayrı yoldur. 1980'lerde nekroz antikanser ajanların DNA'da oluşturduğu hasara bağlı olarak *poly (ADP-ribose) polymerase -1 (PARP-1)* aktivitesinin artması sonucu oluşan bir ölüm şekli olarak kabul edilmiştir. PARP-1 aktivitesi glikolitik koenzim olan NAD^{+} 'ı parçalanmasına neden olmakta ve poly (ADP-ribose) parçalarının oluşmasına neden olmaktadır NAD^{+} 'ın azalması ATP üretiminin azalmasına sebep olmakta ve sonuçta nekrotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (37). 1990'ların sonunda hücrelerde hasara neden olan etkenlerin ATP seviyesini etkilediği ve ATP seviyesinin hücre ölüm şekilleri olan apoptozis ve nekrozu belirlediği görülmüş olup bu iki ölüm şekli arasında bağlantı olduğu ortaya konmuştur (38-40) (Şekil 2) (41).

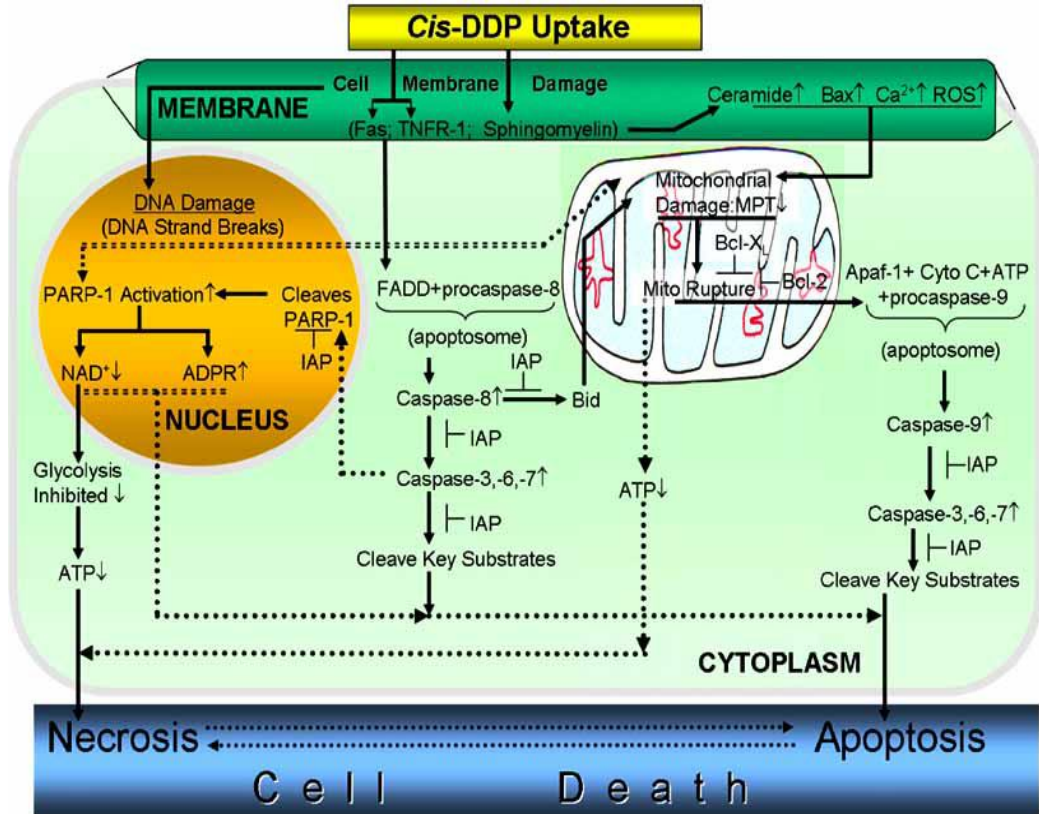
1.1.3. Sisplatin Nefrotoksitesisi

1.1.3.1. Sisplatin Nefrotoksitesinin Oluşum Mekanizması

1.1.3.1.1. Hücre İçerisinde Biriktirilmesi

Böbrek sisplatinini diğer organlara göre daha iyi biriktirir ve sisplatinin esas atılım yeri böbrektir. Sisplatinin proksimal tübüllerdeki konsantrasyonu seruma göre 5 kat daha fazladır (42). Sisplatin çoğunlukla glomerüler filtrasyon ve çok az bir miktarda sekresyonla atılmaktadır. Sisplatin hem proksimal hem de distal tübüllerde birikmektedir (43, 44). Proksimal tübülün S3 segmenti en yüksek konsantrasyonda sisplatin biriktirmekte, onu proksimal tübülün S1 segmenti takip etmektedir (44). Taşıyıcı aracılı taşınmanın yanında sisplatin direkt pasif difüzyonla da taşınmaktadır (45). Bu taşınma mekanizmaları hücre membranlarında değişik vücut bölgelerinde farklı etkinlikte çalışmaktadır. Böbrek hücrelerinde taşıyıcı aracılı taşınma ana

taşıma şeklidir (44). Bu taşınmada etkili olduğu bilinen iki taşıyıcı vardır: *copper transporter 1* (Ctr 1) ve *organic cation transporter* (OCT2). Ctr1 bakır taşınmasında görevlidir. Ctr1'in aynı zamanda sisplatinin hücrelere taşınmasını sağladığı tespit edilmiştir (46). Bu protein böbreklerde yoğun bir şekilde ve özellikle proksimal tubullerin bazolateralinde sentezlenmektedir (47). OCT2 sisplatin taşınmasında görevli diğer bir taşıyıcıdır (48).



Sisplatin tarafından indüklenen biyokimyasal hücre ölüm yolları apoptozis ve nekrozis arasında tümör hücrenin metabolik durumuna göre karşılıklı ilişkiler gösterilmiştir (noktalı oklar). Sisplatin tarafından oluşturulan DNA bağ kırıkları PARP-1'i aktive ederek bu enzimin NAD'ı poly (ADP-riboz) ve nikotinamide ayırmasına neden olur. Bunun sonucunda NAD ve onunla birlikte ATP azalır. Eğer tümör hücrendeki ATP miktarı düşükse hücre nekrozise bağlı olarak ölür. Hücredeki enerji miktarı yaşamın sürdürmesi için yeterliyse kaspaz 3-6-7 kompleksi PARP-1'i parçalar. Nekrozis bloke olur ve hücreler apoptozis yoluyla ölür. Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*), Bid (bir proapoptotik protein tipi), FAAD (*Fas-associated death domain*), Fas (hücre membran yüzey reseptörü), TNRF-1 (*tümör nekroz faktör reseptörü-1*) IAP (*inhibitor of apoptosis*), PARP-1 (*poly (ADP-ribose) polymerase-1*), ROS (*reactive oxygen species*), cyto C (*cytochrome C*), Mito (mitochondriyal) MPT (*mitochondrial permeability transition*))

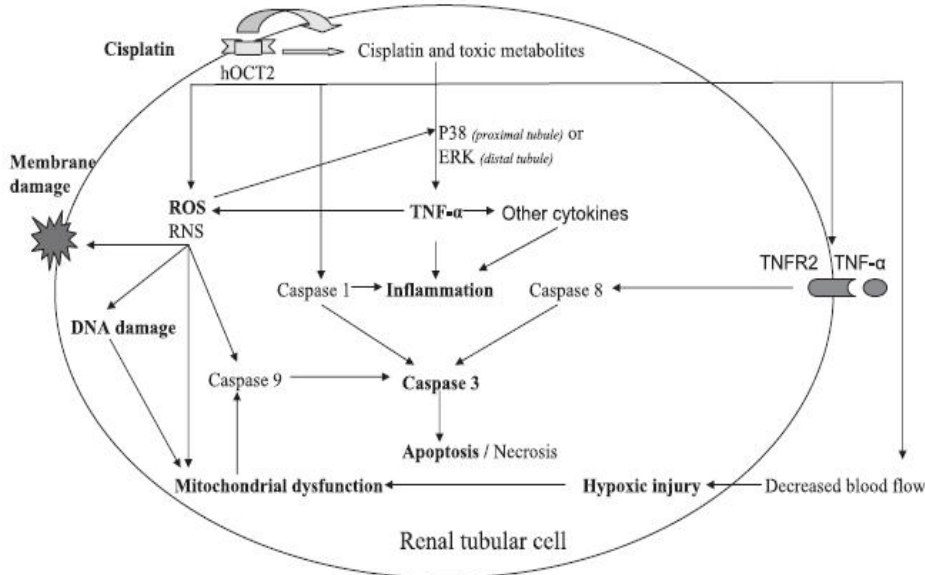
Şekil 2. Tümör hücrende sisplatin tarafından indüklenen apoptozis ve nekrozise giden hücre ölüm yolları ve bunlar arasındaki ilişki (41).

1.1.3.1.2. Sisplatinin Böbrek Hücrelerinde Transformasyonu

Sisplatinin hücre içerisinde hasar oluşturması için nefrotoksik bir ajana dönüşmesi gereklidir (49). *Gama glutamil transferaz* (GGT) hücre dışındaki glutasyonu (GSH) glutamik asit ve sisteinilglisin olarak ayırır. Sisteinilglisin ise diaminopeptidaz tarafından sistein ve glisin olarak ayrılır. Bu aminoasitlerin bir kısmı hücre içerisine alınır ve GSH sentezlenir. Sisplatin molekülü *glutasyon-S-transferaz* (GST) enzimi aracılığıyla GSH ile birleşmektedir. GSH-sisplatin konjugatları GGT tarafından hücre dışında metabolize olur. Hücre içine alınan sisplatin-sistein beta liyazlar aracılığı ile reaktif tiyollere dönüştürülür (50). GGT böbrekte nefrotoksisiteye neden olurken tümör hücrelerinde sisplatine karşı dirence neden olur (51).

1.1.3.1.3. Böbrek Hücrelerinde Hasara Neden Olan Hücre İçi Olaylar

Sisplatin nefrotoksisitesinin oluşum mekanizması komplekstir. Oksidatif stres, apoptosis, inflamasyon ve fibrinojen oluşumudur. Yüksek miktarda sisplatin proksimal tubullerde nekroz, düşük konsantrasyonda sisplatin kaspas 9 yolu üzerinden apoptosise neden olur (52). Sisplatin nefrotoksisitesinde akut tubuler hücre hasarı yapan mekanizmalar Şekil 3’de özetlenmiştir.



Şekil 3. Sisplatinin indüklediği ana akut tübüler hücre hasar yolları (53). (ERK (*ekstraselüler regulated kinase*), hOCT2 (*human organic cation transporter 2*), ROS (reaktif oksijen bileşikleri), TNF- α (tümör nekroz faktör- α), TNFR2 (tümör nekroz faktör reseptörü 2).

Sisplatine bağı akut böbrek hasarı oluşumunda oksidatif stres direkt etki etmektedir. Reaktif oksijen bileşikleri (ROB) lipid, protein ve DNA gibi hücre içi bileşenleri etkilemekte ve onların yapısını bozmaktadır. Reaktif oksijen bileşikleri hücre içinde ksantin-ksantin oksidaz sistemi, NADPH oksidaz ve mitokondri yoluyla üretilmektedir. Sisplatin varlığında belirtilen tüm yollarda böbrek hasarına neden olan ROB üretilmektedir (54). Sisplatin glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz aktivitesini indükleyerek serbest radikal oluşumunu artırmakta ve antioksidan üretimini azaltmaktadır (3). Hücre içi kalsiyum miktarını artırarak NADPH oksidaz aktivitesini artırmakta, mitokondri hasarı yaparak ROB'nun üretimini stimüle etmektedir (54). Süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) sisplatin ile tedavi edilenlerin vakaların böbreklerinde artmaktadır (55-57). Bu serbest radikaller lipid komponentlerini peroksidasyonla hasara uğratmakta ve proteinleri denatüre ederek enzimatik fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Serbest radikaller aynı zamanda mitokondri disfonksiyonuna neden olmaktadır (3). Antioksidanlar sisplatin tarafından inhibe edilmekte ve böbrekteki süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve CAT anlamlı olarak azalmaktadır (58, 59) Reaktif nitrojen bileşikleri de sisplatinin indüklediği nefrotoksisitede çalışılmıştır. Böbreğin içerdiği ONOO⁻ ve nitrik oksit (NO) sisplatin ile tedavi edilen ratlarda artmıştır (60).

Hipoksi ve mitokondrial hasar sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisitede etkilidir. Sisplatinin indüklediği nefrotoksisite en fazla proksimal tubulün S3 segmentinde olmaktadır. Böbreğin bu kısmı iskemik ve toksik hasara daha duyarlıdır (61). *Hypoksia inducible factor-1* (HIF 1) hipoksinin S3 segmentinde aktive ettiği bir transkripsiyon faktörü olup hipoksiye cevap olarak anjiyogenez, eritropoezve glikolitik adaptasyonu sağlamaktadır. Dominant HIF-1 negatif hayvanlar sisplatine bağı apoptozise giden hücre hasarına daha duyarlı hale gelmektedirler. Bu mitokondriyal sitokrom c (CytC) salınımı, mitokondriyal potansiyelin düşmesi ve kaspaz 9 aktivitesinin artması ile gerçekleşmektedir (62).

Apoptozis normal ve patolojik süreçlerde tanımlanan önemli bir hücre ölüm şeklidir. Kaspaz 1, kaspaz 8 ve kaspaz 9 kaspaz 3'ü aktivite eden öncü kaspazlardır. Bu süreç hücre dışı yüzey reseptörleri ve hücre içi mitokondriyal yollar üzerinden ilerlemektedir. DNA fragmanları ve oksidatif stresler mitokondriyal yolu aktive

etmekte bu yol kaspaz 9 aktivitesi ile sonuçlanmaktadır (4). TNF- α 'nın hücre yüzey reseptörüyle bağlanması kaspaz 8'i aktive etmektedir (5). Kaspaz 1 kaspaz 3'ü sisplatine bağlı böbrek hasarında direkt aktive etmektedir. Kaspaz 1 ayrıca interlökin-1 β (IL-1 β) seviyesini artırıp sisplatinin indüklediği inflamasyona katılmaktadır. Sisplatine bağlı apoptozis ve akut tubuler nekroz kaspaz 1 eksik farelerde azalmaktadır (6).

Sisplatinin indüklediği ve böbrek hasarına neden olan bir seri inflamatuvar değişiklik vardır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar sisplatinin indüklediği renal hasar oluşumunda inflamasyonun önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Sisplatin zaman bağımlı bir etki ile inhibitor of κ B (I κ B) yıkımını artırmakta ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) bağlanma aktivitesini artırmaktadır. Bu olaylar renal TNF- α aktivitesini artırmaktadır. TNF- α renal hasar oluşumunda merkezi bir role sahiptir. Apoptozisi indüklemekte, reaktif oksijen moleküllerinin oluşumuna neden olmakta, kemokin ve sitokinler arasındaki yolları koordineli bir şekilde aktive etmektedir (7).

Sisplatin etkilenen tübüllerin etrafında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile beraber fibrozisi de indüklemektedir. Bir rat çalışmasında 2 mg/kg dozunda sisplatin haftada bir olacak şekilde 7 hafta uygulanmış ve birinci haftadan itibaren kortikomedüler bileşkede fibrotik lezyonlar gelişmiş ve beşinci haftada maksimum dereceye ulaşmıştır. Hasar sisplatinin kesilmesinden sonra 19 haftalık bir süreçte fibrotik dokunun azalması ve yerini rejenere tübüllerin alması ile sonuçlanmıştır (8). Makrofajlar TGF- β 1 ve TNF- α üretimini artırarak renal interstisyel fibrozu oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır.

1.1.3.2. Sisplatin Hasarının Patofizyolojik Etkileri

Sisplatin infüzyonundan sonra 3 saat içinde renal kan akımı azalabilmekte ve glomerüler filtrasyon oranı (GFR) kan akımının azalmasından sonra düşmektedir (11). Sisplatin alan hastaların çoğu stabil bir renal fonksiyona sahiptir. Renovasküler akım ve GFR'deki azalma sodyum klorürün makula densaya dağılması ile oluşan tubuloglomerüler geri beslenme sonucu oluşan renal vasküler direnci yansıtır (11). %25 hastada tedaviden sonraki 1-2 hafta sonra geri dönüşümlü azotemi oluşmaktadır (63). Daha az bir kısmında ise renal fonksiyonlarda progresif bir

düşme olmaktadır. Geri dönüşümsüz böbrek yetmezliği yüksek doz ve çok sayıda uygulamayı takiben gelişir (64).

Sisplatin nefrotoksisitesine bağlı proksimal tübül disfonksiyonu kendini renal hemodinamik değişikliklerle göstermeye başlar. Sisplatin uygulanmasını takiben 48-72 saat sonra proksimal ve distal tubullerin reabsorbsiyonu bozulur ve damar direnci artar (63). Akut toksisite mitokondrial fonksiyonu azaltır, ATPaz aktivitesini düşürür, hücre katyon içeriğini değiştirir ve solüsyon transportunu etkiler (11, 63). Aquaporin 1 ve 2, Na-K-ATPaz, Na, K, 2Cl kotransport ile tip III Na, H Exchange kanalları sisplatin nefrotoksisitesinde azalır. Sisplatin tedavisiyle tübüler reabsorbsiyon bozulur ve üriner konsantre etme yeteneği azalır (63, 65). Na ve su transportundaki değişiklikler idrar transport kanallarının azalmasına bağlı olarak üre ve kreatinin yükselmeden önce oluşur (63, 66). Proksimal tübüllerden Na reabsorbsiyonu distal tübüllerden ise Na ve su reabsorbsiyonu azalır. Bu durum su ve Na kaybına neden olur (66). Poliüri sisplatin uygulanmasını takiben iki farklı fazda oluşur. İlk faz sisplatin uygulanmasını takiben ilk 24-48 saatler arasında GFR artışı olmadan idrar osmolalitesinde düşüklük ile seyrederek. Bu faz muhtemelen prostaglandin aracılı olup vazopresin ve aspirin ile önlenir. Erken faz poliüri geri döndürülebilir. İkinci faz ise 72 ve 96 saat arasında ve GFR'de azalma ile seyrederek. Medüler üre siklus defekti ile ilişkili olup medüler tonisitede azalma ve proksimal tübül, henlenin ince çıkan kolundaki NaCl transport kanallarında bozulma ile beraberdir. Bu faz her iki ilaca da yanıt vermez (9). Çoğu hastada sodyum, potasyum, magnezyum ve kalsiyum kaybı olur (63, 67, 68).

1.1.3.3.Sisplatin Nefrotoksisitesine Bağlı Patolojik Değişiklikler

Sisplatin nefrotoksisitesi ön planda tübülointerstisyel lezyonlara neden olmaktadır. Hayvan modellerinde sisplatin proksimal tübüllerde özellikle S3 segmentte hasar oluşturmaktadır. Distal nefronlarda mitokondrial şişme ve nükleer solukluk oluşur. Glomerüllerde belli bir morfolojik değişiklik olmaz (9, 11, 69). İnsanlarda sisplatine bağlı nefrotoksisite sonucu oluşan patolojik sonuçlar ile ilgili sadece birkaç çalışma yapılmıştır (9-11, 69). Hasar ya distal tübül ile toplayıcı kanal veya proksimal tübül ile distal tübülde olmuştur (9, 11). Bölgelerin etkilenmesi muhtemelen dozlardaki değişiklik veya biopsi alınma zamanlarından

etkilenmektedir. Biopsiler 3. ile 60. günler arasında alındığında doz uygulanmasını takiben proksimal tübüllerdeki ve distal tübüllerin *parsec convoluta* ile *pars rektasındaki* epitel hücrelerinde segmental dejenerasyon, nekrozis, ve deskuamasyon oluşmaktadır (10). Akut böbrek yetmezliği oluşan hastalarda ön plandaki lezyon *proksimal convoluta* tübüllerde oluşan akut nekrozdur. Nekrozun şiddeti doz, konsantrasyon ve zaman bağımlıdır. İnterstisyel nefrit tespit edilmemiştir (9, 69). Kronik nefrotoksisite oluşan hastalar fokal akut tübüler nekroza sahiptir. Kistik dilate tübüllerde yassı epitel hücreleri atipik nükleus ve atipik mitotik şekillere sahip olup hyalen döküntüler gözlenir (11). Uzun süreli sisplatin tedavisi ve oluşturduğu hasar kistik dilatasyon ve interstisyel fibroze neden olabilir (11).

1.2. Reaktif Oksijen Bileşikleri ve Antioksidan Savunma Sistemleri

Oksijen insan yaşamı için çok gerekli olmasına karşın, normal metabolizma sırasında üretilen bazı reaktif oksijen türleri vücuda yoğun bir zarar verme potansiyeline sahiptir (70). Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu reaktif oksijen türleri normal oksijen molekülüyle karşılaştırıldığında, kimyasal reaktivitesi daha yüksek olan oksijen formlarıdır (71). Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır. Bu zararın yaşlanmayı teşvik ettiği ve ayrıca kalp-damar hastalıkları, çeşitli kanser türleri, katarakt, bağışıklık sisteminde zayıflama, sinir sistemi dejeneratif hastalıkları gibi birçok hastalığa sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır (70).

İnsan vücudunda farklı reaktif oksijen bileşikleri üretilmektedir. O_2^- moleküler oksijene özellikle elektron transport sisteminde bir elektron katılmasıyla üretilir. Ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz gibi enzimler O_2^- 'yi endojen olarak üretebilir (72). H_2O_2 spontan olarak O_2^{2-} 'ye bir elektron katılmasıyla veya mikrozom ve peroksizomlarda mevcut bazı enzimler tarafından üretilir (73). H_2O_2 fenton reaksiyonu olarak adlandırılan metaller (Fe^{+2} , Cu^+) tarafından katalize edilen ve OH^- oluşumunu sağlayan yol için bir öncüdür. H_2O_2 aynı zamanda miyeloperoksidaz (MPO) tarafından katalizlenen ve

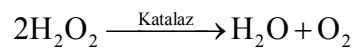
hipoklorik asit (HOCl) oluşumunu sağlayan yolda da öncüdür (74). Reaktif oksijen bileşiklerinin hücrelerde oluşturduğu hasarı tespit etmek amacıyla kullanılan farklı oksidatif stres markırları bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi de lipid peroksidasyonunu tespit etmek için kullanılan malondialdehit (MDA)'dır (75).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (70). Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" adı verilir (76). Antioksidanlar mekanizmalarına göre, birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar; mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Birincil antioksidan kategorisinde yer alan süperoksid dismutaz (SOD), GSHPx ve CAT gibi enzim sistemleri serbest radikalleri yok etme yeteneğindedir. Bu enzimler genel olarak serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidler gibi hücrenel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmak suretiyle bir hücrenel bölgeden diğerine geçişini de önleyebilmektedirler (70). İkincil antioksidanlar ise; oksijen radikalini yakalayan ve radikal zincir reaksiyonlarını kıran C vitamini, E vitamini, ürik asit, bilirubin ve polifenoller gibi bileşiklerdir (77).

1.2.1. Endojen Antioksidanlar

1.2.1.1. Katalaz ve Peroksidaz

Bir metalloenzim olarak bilinen katalaz enzimi redoks reaksiyonunu teşvik eden en etkili protein katalistlerinden birisidir (78). SOD enzimi faaliyeti sonucunda meydana gelen toksik H_2O_2 , "katalaz" enzimi etkisiyle su ve oksijene dönüştürülmektedir (79).

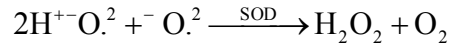


Hidrojen peroksit, biyolojik önemi olan moleküllerin çoğu ile spesifik olarak reaksiyona girmemekle birlikte OH radikali gibi daha reaktif oksidanların

oluşumunda bir ön madde olarak rol oynamaktadır. Peroksidazlar da CAT enzimiyle aynı özelliklere sahiptir (78).

1.2.1.2. Süperoksit Dismutaz Enzimi (SOD)

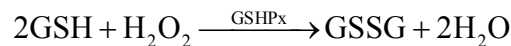
Bu enzim, $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 ve oksijene dönüşümünü katalize ederek bu radikallerin etkisini azaltmaktadır. Bu olayda SOD enziminin aktif bölgesini oluşturan Zn önemli bir mineraldir.



Bu reaksiyon, $\cdot\text{O}_2^-$ nin pH =11 ve altında oldukça stabil olmasına rağmen, enzim katalizi olmasa bile normal fizyolojik pH değerlerinde oldukça hızlı yürümektedir. Bununla birlikte, gerçekte tüm aerobik organizmaların SOD içerdiği belirlenmiştir. SOD enzimi reaksiyon hızını artırmak için yeterince güçlü bir katalisttir. $\cdot\text{O}_2^-$ de, H_2O_2 gibi bir oksidan olarak çoğu organik bileşikle direkt olarak reaktif değildir. Ancak; muhtemelen daha reaktif ve yüksek toksisiteye sahip oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır.

1.2.1.3. Glutasyon ve Glutasyon Peroksidaz (GSHPx)

Tiyol grupları, enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla ve serbest radikalleri yakalamak suretiyle görev yapan hücresel antioksidanlardır. Tiyol grubu taşıyan bir tripeptid olan glutasyon, serbest radikallerin yıkıcı etkilerini önleyen veya azaltan transferazlar, peroksidazlar gibi birçok enzimin substratı olarak görev yapmaktadır. Suda çözünebilen bir tiyol olan ve birçok hücrede çok yüksek konsantrasyonlarda bulunan glutasyon, biyolojik membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. Bu koruma, enzimatik olarak gerçekleşmektedir (80). Aktivitesi için Se mineraline ihtiyaç duyan GSHPx enzimi, glutasyonun indirgenmiş formunu (GSH), oksitlenmiş hale (GSSG) dönüştürmektedir.



Glutasyon aynı zamanda hücre içinde tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$ radikalleri gibi birçok zararlı oksidanla enzim katalizi olmaksızın da reaksiyona girmektedir (78).

1.2.2. Beslenmenin Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Etkisi

Vücudun antioksidan dengesi diyetten büyük ölçüde etkilenmektedir. Besin yetersizlikleri nedeniyle vücudun savunma mekanizmaları tahrip olduğu zaman patolojik koşullar oluşabilmektedir. Reaktif oksijen türlerindeki artış ve savunma sistemlerindeki bir yetersizlik vücuttaki antioksidan dengesinin bozulmasına ve “oksidatif stres” koşullarının oluşmasına neden olmaktadır. Antioksidan savunma sisteminin etkinliği; E vitamini, C vitamini ve karotenoidler gibi antioksidan vitaminleri ve esansiyel iz mineralleri içeren gıdaların yeterince alınmasına bağlıdır (79). Bu vitaminler birlikte etkin bir şekilde çalışarak hastalık ve hasarlara neden olan zararlı reaktif oksijen türlerinin etkisini yok etmektedir.

E vitamini (tokoferoller), yağda çözünebilen başlıca antioksidanlardan olup tüm hücre membranlarında bulunmakta ve çoklu doymamış yağ asitlerini oksidasyona karşı korumaktadır (70). E vitamininin yüksek dozlarda diyete ilavesinin LDL düzeylerini önemli ölçüde artırdığı ve oksidatif strese karşı oldukça koruyucu olduğu bildirilmektedir (81). Askorbik asit de vücudun ekstraselüler sıvılarında bulunan ve suda çözünebilen önemli bir antioksidandır. Vücutta sentezlenemediği için gıdalarla dışarıdan alınması gerekmektedir. Askorbik asidin indirgen bir ajan olmasının yanı sıra vitaminini rejenere etme özelliğine de sahiptir (70). Karotenoidler ise; antioksidan aktivitelerini serbest radikal reaksiyonlarına katılarak zararlı hidrojen peroksitlerin oluşum hızını azaltmak suretiyle gösterirler (80). Önemli diyet karotenoidlerinden β - karoten; sarı, turuncu sebze ve meyvelerde, yeşil sebzelerde, likopen; domateste ve lutein; brokoli ve lifli yeşil sebzelerde bulunmaktadır (70).

Özellikle bitkisel gıdalarda bulunan fenolik bileşikler de indirgen ajan, hidrojen verici, tekli oksijen yakalayıcı ve metal şelatör olmaları nedeniyle önemli antioksidanlar arasında sayılmaktadır (81). Selenyum, bakır, manganez ve çinko gibi mineraller de koruyucu enzimlerin yapıları ve katalitik aktiviteleri için gereklidir (70).

1.3. Kurkumin

Zerdeçal (*Curcuma longa*) asırlardan beri halk arasında bir baharat olarak kullanılmaktadır ve onun iyileştirici özellikleri Hindistan ve Çin tıp sisteminde

kanıtlanmıştır. Birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (82). *Curcuma* cinsi turmerin (suda çözülebilen bir peptid), yağlar (örneğin turmeronlar, atlantonlar, ve zingiberene), ve ve kurkuminin de dahil olduğu kurkuminoidleri (1, 7-bis- (4 hidroksi-3metoksifenol)-1,6 heptadin-3,5-dion) içermektedir. Kurkuminoidler *curcuma* cinsinden elde edilen fenolik bileşiklerdir. Kurkumin ilk olarak 1910 tarihinde kimyasal yapısı karakterize edilen zerdaçal bitkisinin %2-8'ini ihtiva eden düşük molekül ağırlıklı bir polifenoldür (83).

1.3.1. Kimyasal Özellikleri

Kurkumin bir bis- α , β -doymamış diketondur. Kurkumin kendisinin enol tautomeri ile denge halindedir. Bis-keto formu asit ve nötral sulu solüsyonlarda ve hücre membranlarında baskındır (84). Kurkumin pH 3-7'de özel bir H-atom vericisidir. Tersine pH'ın 8'in üstünde olduğu durum enolat formu baskındır ve elektron vericisi olarak görev alır. Bu ikinci mekanizma fenolik antioksidanların tipik temizleme mekanizmasıdır (85).

1.3.2. Farmakolojik Özellikleri

Kurkuminin absorpsiyon, metabolizma ve dağılımı ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bir çalışmada 1gr/kg dozdan ratlara diyet olarak kurkumin verilmiş ve bunun %75'i dışkı ile atılmış ve ihmal edilebilir miktarı da idrarda tespit edilmiştir (86). ³H ile işaretlenmiş kurkumin oral olarak verilmiş ve bunun büyük miktarının dışkı ile atıldığı ve bunun da sadece 1/3'ünün değişmeden atıldığı tespit edilmiştir (87). Kemirgenlerde intraperitoneal ve intravenöz kurkumin uygulaması sonrası yüksek miktarda kurkumin, tetrahidrokurkumin ile heksahidrokurkumin metabolitleri safrada tespit edilmiştir (88, 89). İntravenöz uygulamadan sonra dozun %50'si safra ile atılmıştır. Bu bilgi bize kurkuminin barsaklardan emildiğini ve enterohepatik resirkülasyona uğradığını göstereren bir kanıttır (89). Farelere intraperitoneal kurkumin 0.1 gr/kg'dan verilmiş, önce dihidro ve tetrahidrokurkumine biyotransforme olmuş sonra bu bileşikler monoglukronid formlara konjuge olmuştur (90).

Ratlara oral kurkumin verildikten sonra HPLC ile yapılan ölçümde plazmada düşük miktarda kurkumin, yüksek miktarda kurkumin glukuronid ve kurkumin sülfat, düşük miktarda heksahidrokurkumin, heksahidrokurkuminol ve

heksahidrokurkumin glukronid tespit edilmiştir (91). Bir çalışmada yüksek doz kurkumin (diyetle %2, kilo başına yaklaşık 1, 2 gr kurkumin) 14 gün boyunca verilmiş ve plazmada nanomolar düzeyde karaciğer ile kolon mukozasındaki dokularda konsantre olarak 0.1 ile 1.8 nmol/gr aralığına kadar dağılım gösteren kurkumin tespit edilmiştir.

Sonuç olarak kurkumin kemiricilerde düşük oral yararlanıma sahip olup muhtemelen intestinal dokuda metabolize olmakta ve absorbe olan kurkumin de ilk geçiş etkisine maruz kalıp safra ile atılmaktadır.

1.3.3. Kurkuminin Biyolojik Etkileri

1.3.3.1. Antioksidan Etkileri

Kurkuminin $\cdot O_2$, $(\cdot OH)$ ve nitrojen dioksi (NO_2) radikallerini temizleyen güçlü antioksidan olduğu gösterilmiştir (92). Değişik hayvan çalışmalarında lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir (93). Kurkumin böbrek hücrelerini oksidatif strese karşı lipid peroksidasyonu, lipid degradasyonu ve sitolizi önleyici etkisi ile koruduğu gösterilmiştir (94). Kalpte iskemiye bağlı biyokimyasal değişiklikleri bir kedi modelinde azaltmıştır (95). Vasküler endotelial hücrelerde heme oksijenazın artmasına bağlı oluşan oksidan hasar kurkuminin antioksidan etkisiyle tedavi edilmiştir (96). Kurkuminin kalp hücrelerini miyokardial iskemiye indükleyen isoprenaline karşı koruduğu ve bu etkisini antioksidan özelliği nedeniyle başardığı bulunmuştur (97-99). Diyetle kurkumin eklenmesinin nörodejeneratif hastalıklarda örneğin alzheimer hastalığında faydalı olduğu ileri sürülmüştür (100). Fokal serebral iskemi oluşturulan bir rat modelinde kurkumin anlamlı nöroprotektif etki göstermiştir. Bu etkisini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, endojen antioksidan defans enzimlerini artırarak ve $ONOO^-$ oluşumunu azaltarak yapmıştır (101).

1.3.3.2. Anti İnflamatuar Etkileri

1.3.3.2.1. Kurkuminin Siklooksijenaz ve Lipoksijenaz Üzerindeki Etkileri

Prostaglandin ve diğer eikosanoidlerin kanser oluşumundaki rolleri yaklaşık iki dekattır bilinmektedir. Prostaglandin hem tümör oluşan insanlarda hem de hayvan modellerinde tümör hücre proliferasyonu ve metastasını etkilemektedir (102). Siklooksijenazın (COX) iki izoformu vardır; COX1 ve COX2. Bu enzimlerden

COX2 normalde sadece beyin ve spinal kord dokularında mevcut olup değişik dokularda ovulasyon ve gebelik hormonları, sitokinler, büyüme hormonları, onkojenler ve tümör oluşumunu tetikleyen maddeler tarafından oluşumu indüklemektedir (103). COX2'nin kolon, rektum, meme, boyun, baş, akciğer, pankreas, mide ve prostat kanserlerinde aşırı ekspresyonu meydana gelmektedir (104).

Kawamori ve ark. (105) yaptığı bir çalışmada diyetle alınan kurkuminin kolon mukozası ve tümörde fosfolipaz aktivitesini anlamlı olarak inhibe ettiğini, COX ve lipoksijenaz (LOX) aktivitelerini değiştirdiğini göstermiştir. Enzimin katalitik aktivitesini inhibe eden selektif COX-2 inhibitörlerinin aksine COX-2 transkripsiyonel seviyede COX-2 ekspresyonunu azaltmaktadır (106). Diyetle alınan kurkumin ayrıca LOX aktivitesini ve LOX metabolitlerinin oluşumunu kolonik mukoza ve tümörde inhibe etmektedir. LOX metabolitleri tümör adhezyonu ve metastasında rol almaktadırlar (107).

1.3.3.2.2. Kurkuminin İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Üzerindeki Etkisi

Nitrik oksit tümoregenesis ve neoplastik transformasyon oluşumuna katılan bir ajandır (108). NO tümör progresyonunu ayrıca anjiogenezi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'yi stimüle ederek göstermektedir (109). NO O_2^- ile tepkimeye girmekte ve son derece güçlü olan ONOO $^-$ oluşmaktadır (110). ONOO $^-$ farklı DNA modifikasyonlarına ve farklı hücre hasarlarına neden olmaktadır. Bu durum genotoksisite ve farklı düzeylerde karsinogeneze neden olmaktadır. NO ve ONOO $^-$ 'ye bağlı gelişen DNA hasarı p53 ve poly (ADP-ribose) polimerase (PARP) aktivasyonuna neden olmaktadır (111). P53 ve PARP aktivasyonu apoptotik hücre ölümü ile ilişkilidir. İNOS'un COX-2 regülasyonunda katkısı olduğu gösterilmiştir (112). Kurkuminin NO sentezini, iNOS protein ve mRNA ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

1.3.3.2.3. Kurkuminin NF- κ B Üzerindeki Etkisi

Nükleer faktör- κ B ökaryotik hücrelerde birçok yerde bulunan ve hücre sel büyümede, inflamatuvar cevaplarda, hücre adhezyonunda etkili genlerin regülasyonunda etkili bir transkripsiyon faktörüdür (113). Normalde I κ B ile bağlı

inaktif sitoplazmik kompleks olarak bulunmaktadır. Hücreler mitojenler, inflamatuvar sitokinler, ultraviyole radyasyon, iyonize radyasyon, viral proteinler, bakteriyel lipopolisakkaritler ve reaktif oksijen bileşiklerine maruz kaldıklarında IκB NF-κB'den ayrılır. NF-κB hücre çekirdeğine hareket etmekte ve birçok genin transkripsiyonunu etkilemektedir. İnflamasyondaki katkısı yanında NF-κB hücre proliferasyonu, onkogenез ve hücre transformasyonunda önemlidir (114).

Deneysel çalışmalar kurkuminin NF-κB aktivitesini değişik kanser serilerinde azalttığını göstermektedir (115). Oksidatif stres NF-κB'nin DNA 'ya bağlanma aktivitesini artırmaktadır. Kurkumin bir antioksidan olarak etkisini bu yolla gösteriyor olabilir. Kurkuminin IκB kinazı (IKK) inhibe ettiği gösterilmiştir. Kurkumin NF-κB aktivitesini ve potansiyelize olmuş TNF'nin indüklediği apoptozisi inhibe etmektedir. Kurkuminin ayrıca güçlü antioksidan ve antikanser etkilerini aktivatör protein (AP1) ve NF-κB'nin aktivitesi için gerekli genlerin ekspresyonunu sağlayarak göstermektedir (116).

1.3.3.2.4. Kurkuminin TNF Üzerindeki Etkileri

Tümör nekroz faktörün tümörün oluşum, gelişim ve metastazına aracılık ettiği gösterilmiştir (117). TNF'nin proinflamatuvar etkileri onun NF-κB'yi aktive etmesine bağlıdır. TNF'ye maruz kalan tüm hücreler NF-κB'yi aktive etmekte ve bu da inflamatuvar genlerin ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır. Bunlar COX-2, LOX2, hücre adhezyon molekülleri, inflamatuvar kemokin ve sitokinler ve iNOS'tur. TNF birçok tümör hücresinde tespit edilen bir büyüme faktörüdür (118).

Kurkumin TNF sentezi üzerine etkili önemli bir inhibitördür (119). Mantle hücreli lenfomalarda NF-κB aktivitesinin esas sebebi otokrin eksprese edilen TNF'dir. Kurkumin TNF mRNA ekspresyonunu inhibe etmekte ve bunun inhibisyonu ile TNF protein sentezi olmamakta sonucunda NF-KB ve hücre proliferasyonu inhibe olmaktadır (119).

Nefrotoksisite sisplatinin kullanımına bağlı oluşan bir komplikasyon olup sisplatin tedavisinde doz kısıtlamasına neden olan bir faktördür. Yakın zamanda elde edilen kanıtlar inflamasyon ve oksidatif stresin sisplatinin indüklediği akut böbrek yetmezliği patogenezine katkı sağladığı yönündedir. Kurkumin potent bir anti inflamatuvar ve antioksidan ajandır. Yapılan bir çalışmada: Kurkuminin anlamlı

derecede ve doz bağımlı olarak sislpatin nefrotoksisitesi sonrası serum üre ve kreatinin değerlerinin yükselmesini önlediği, düşen üre ve kreatinin klirensini düzelttiği, serum nitrit seviyesinin sislpatin uygulanması sonrası anlamlı olarak yükseldiği ve kurkuminin anlamlı derecede ve doz bağımlı olarak yüksek olan bu serum nitrit seviyesini düzelttiği, lipid peroksidasyonunun sislpatin uygulanması sonrası anlamlı olarak yükseldiği ve kurkuminin anlamlı derecede ve doz bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı, sislpatinin GSH, SOD ve CAT enzim aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı ve kurkuminin anlamlı olarak bu enzimleri yükselttiği, serum TNF reseptör seviyelerinin kontrol gruplarına göre sislpatin uygulanan ratlarda anlamlı olarak arttığı ve kurkuminin TNF reseptör seviyelerini anlamlı derecede azalttığı, sislpatin uygulanması sonrası kontrol grupları ile karşılaştırmada renal kesitlerde korteks ve dış medulada belirgin histolojik değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Renal kesitlerde şiddetli tubuler nekroz, tubuler atrofi, interstisyel nefrit ve hyalin silendirler gösterilmiştir. Kurkumin uygulanması sonrası morfolojik durumun belirgin korunduğu görülmüştür (13).

1.4. Sirtuinler

Sirtuinler geniş bir protein ailesi olup bakterilerden memelilere kadar birçok cinste ve farklı sayıda bulunmaktadır. Memelilerde yedi farklı gen tarafından kodlanan 1'den 7'ye kadar numaralandırılan 7 farklı sirtuin enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler deasetilasyon veya (mono) ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösterir. Bütün sirtuin enzimleri oksidize NAD⁺ bağımlıdır. Sirtuinler diğer genleri kontrol eden düzenleyici genlerdir. Sirtuinler diğer genler tarafından veya dış etkenler tarafından etkilenebilir. Onlara bilhassa yüklenen önemli rol belli stres ve toksisite durumlarında verdikleri cevaptır. Bakteri ve maya gibi cinslerde üreme ve yaşam süresi üzerinde ve memelilerde yaşlanmaya bağlı hastalıklar üzerinde etkileri olduğu gözlenmiştir (14).

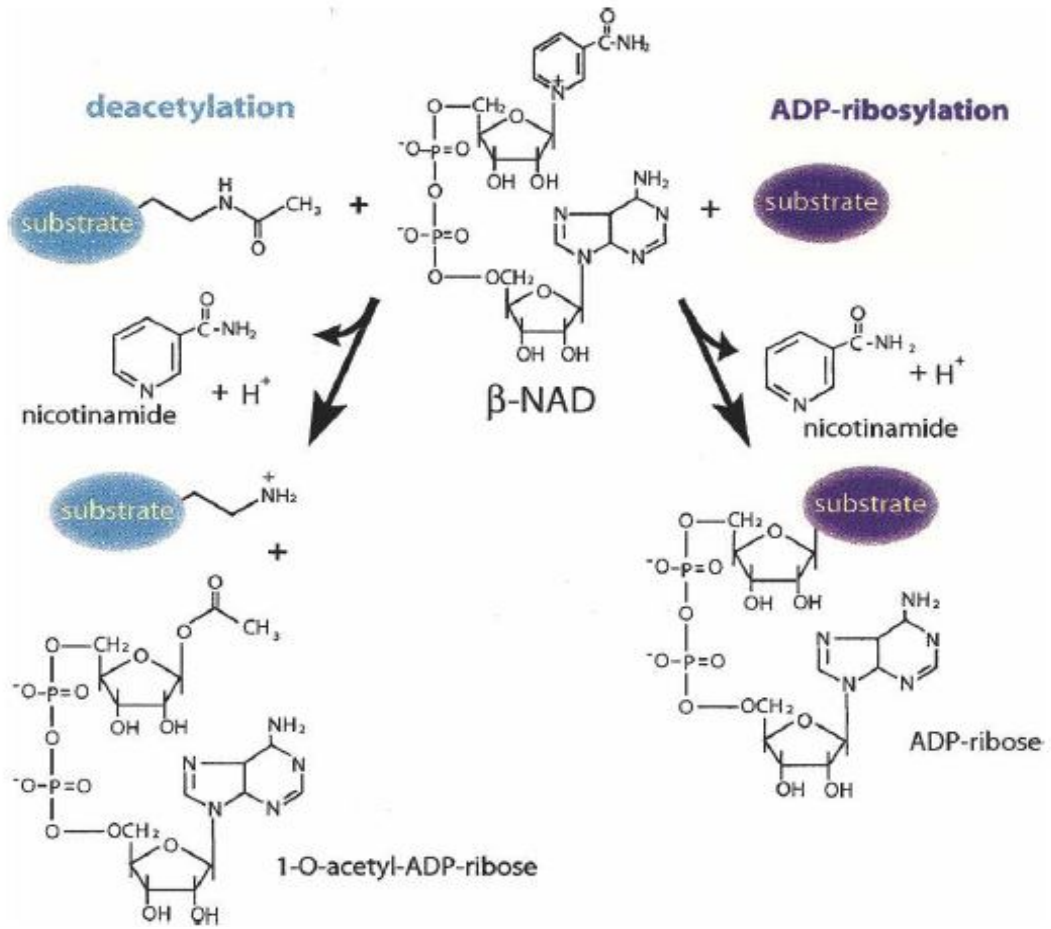
Sirtuin sistem ilk *Saccharomyces cerevisiae* yosununda tespit edilmiştir. Sir2 olarak adlandırılmıştır. Sir2 taşıyan organizmalarda bu protein yaşam süresinin uzatılması dahil farklı metabolik yollarda görev alır. Memelilerde bu genin homoloğu olan SIRT1 tanımlanmıştır. SIRT1 geni SIRT1 enzimini üretmektedir.

Daha sonra memelilerde nükleus, sitoplazma ve mitokondride yedi farklı sirtuin tanımlanmıştır.

Sirtuin 1, 2, 6 ve 7 nükleusta, SIRT1 ve SIRT2 ayrıca sitoplazmada, SIRT 3, 4, 5 ise mitokondride tespit edilmiştir (120). Hücrede farklı yerlerde lokalize olmaları yanında sirtuinler farklı dokularda farklı miktarlarda ekspres olurlar (120).

Sirtuinler klas III histon deasetilaz (lizin deasetilaz olarak da adlandırılır) olarak tanımlanır. Bu enzim ailesi oksidize nikotinamid adenin deasetilaz (NAD^+) bağımlı olup değişik proteinlerdeki lizin kalıntılarını deasetile eder. Sirtuin aracılı histon deasetilaz reaksiyonları asetile lizinler için spesifiktir.

Histondaki asetillizin kalıntıları üzerindeki asetil grupları koparılarak NAD^+ 'ın ADP-riboz parçasına taşınır. Bu reaksiyon sonunda deasetile protein, nikotinamid ve 1-O-asetil-ADP-riboz oluşur (Şekil 4). Daha sonra sirtuinlerin histon dışı deasetilasyon reaksiyonlarına katıldığı tespit edilmiştir. Bu histon dışı deasetilasyon reaksiyonlarda asetil grupları asetillizin-modifiye proteinlerden koparılarak NAD^+ 'a aktarılmakta ve nikotinamid ve 2'-O-asetil-ADP-riboz oluşmaktadır (120, 121). İleri araştırmalar sonucunda bu enzimin bazı tiplerinin mono-ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahip oldukları görülmüştür. Sirtuin aracılı monoribozil transferaz reaksiyonlarında ADP-riboz grupları NAD^+ 'dan alıcı proteinlere ADP-ribozilasyon olarak adlandırılan posttranskripsiyonel modifikasyonla transfer edilir. Bu reaksiyon sonunda mono-ADP-ribozile proteinler üretilir ve deasetilasyon reaksiyonlarına benzer şekilde nikotinamid oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 4) (121, 122) .



Şekil 4. Sirtuin deasetilasyon ve ADP-ribozilasyon reaksiyonları (123).

1.4.1. Sirtuin 1

1.4.1.1. SIRT1'in DNA Tamirindeki Rolü

Sirtuinlerin genomik bütünlüğü sağlamadaki rolleri yakın zamanda model organizmalarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Maya Sir2'nin ribozomal DNA rekombinasyonunu inhibe etmesinin yanında DNA kırıklarının olduğu bölgelerde relokalizasyonu sağladığı görülmüştür (124). Memeli SIRT1'in genomik stabiliteyi etkilediği görülmüştür. SIRT1 DNA hasarının tamirinde görev yapan Werner helikaz ve NBS1 dahil olmak üzere değişik faktörleri deasetile eder (125). Sirt1 embriyolarda artan kromozal aberasyonlar ve DNA tamirindeki yetersizlik SIRT1'in genomik bütünlükteki rolünü doğrulamıştır (126). Oksidatif stres sonrası SIRT1'in oluşan DNA kırıklarını düzelttiği gözlenmiştir. Bununla birlikte benzer düzeltici etki genomik instabilite de önemlidir. Bu yanıt daha önce *baskılanmış* genlerin deprese olması ile birlikte (127). Gözlemler maya Sir2 ve SIRT1'in *epigenetic*

baskılanmayı, kromatin modifikasyonunu düzenlediği göstermiştir. Bunu modifiye edici enzimleri örneğin metiltransferaz SUV39H1 gibi enzimleri regüle ederek yapar (128).

1.4.1.2. SIRT1 ve Hücre Ölümü

Memeli sirtuinleri hücrenin strese karşı direncinde ve hücre ölümü için oluşturulan eşik modülasyonunda önemli role sahiptir. Strese karşı bu direnç kısmen *Forkhead box class O* (FOXO) gibi bir transkripsiyon faktörü ile etkileşime girilmesiyle olmaktadır. Bu memeli transkripsiyon faktörleri hem enerji durumunu hem de stres direncini regüle etmektedir. Bu iki özelliği de sonuçta yaşam süresini etkilemektedir. SIRT 1 FOXO3a'ya bağlanabilmekte ve deasetile edebilmektedir. Bu da selektif olarak FOXO'nun etkileştiği stres direnç genlerinin etkisini artırmaktadır (129). Bir çalışmada SIRT 1'in strese karşı hücreyi *ısı şok* koruduğu rapor edilmiştir (130). SIRT 1 ve p53 arasındaki etkileşim ile dışarıdan gelen strese karşı hücre için ölüm eşik modüle edilmektedir (131). Aslında FOXO proteinleri ve p53 stres durumlarında direkt birbirleri ile etkileşmektedirler (129). P53 SIRT 1 proteinlerinin ekspresyonunu p53 bağımlı mikroRNA vasıtası dahil olmak üzere farklı şekillerde regüle etmektedir (132). P53 dışında SIRT 1 Ku70, E2F1 ve TGF- β sinyal yolağı gibi hücre ölümü ilişkili diğer hedefleri de regüle etmektedir (133). SIRT 1 NF- κ B kompleksinin komponentlerini deasetile ederek apoptozise neden olmaktadır (134).

Sirtuinler ve yaşlanma arasında kurulan bu ilişki bu proteinlerin hücre yaşlanması ve kök hücre fonksiyonları arasındaki aracı rolü üzerinde araştırmacıların ilgisinin yoğunlaşmasına neden olmuştur. SIRT 1 ekspresyonunu fare embriyonik fibroblast hücrelerinde zorunlu onkojen ekspresyonunu antagonize ederek yaşlanmayı geciktirmiştir (135). Sirtuinlerin yaşlanmayı engelleyici bu memnun edici etkileri yanında *Sirt1*^{-/-} fare embriyonik fibroblastlarda yapılan bir çalışmada zıt sonuçlar elde edilmiştir (136). Sirtuinlerin farklılaşma üzerindeki etkisine bakarsak: Sirtuinlerin adipogenezi

Peroxisome proliferator-activated receptor γ 'yı modüle ederek inhibe ettiği ve kas ile nöral farklılaşmayı etkilediği gösterilmiştir (137, 138). Yakın zamanda fare embriyonik kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada SIRT1'in reaktif oksijen bileşiklerinin hemostazında ve farklılaşmadaki rolünü göstermiştir (139).

1.4.1.3. SIRT1'in Metabolik Regülasyonundaki Rolü

Memelilerde kan glikoz konsantrasyonu farklı fizyolojik durumlarda dar bir aralıkta tutulmaya çalışılır. Açlık durumunda serum glikozunun belirtilen düzeyi hepatik glikoneogenez ile sağlanmaktadır. Sürdürülen çalışmalar sirtuinlerin bu fizyolojik adaptasyonda rol aldığını göstermektedir. PGC-1 α SIRT1 bağımlı deasetilasyon için bir hedef gözükmektedir (140). Bu koaktivatör karaciğerde glukoneogenezin düzenlenmesi ile yağ asidi oksidasyonunda esas rolü oynamaktadır. PGC-1 α bu iki yol üzerindeki modüle edici rolü için sirtuinlere gereksinim duymaktadır (141). Kısa süreli (<6 saat) ve uzun süreli (>18 saat) açlık durumlarında protein asetilasyonu ve sirtuin deasetilasyonunun karaciğerin oluşturduğu yanıtın düzenlenmesindeki farklı rolleri incelenmiştir (142).

Hepatik glikoneogenez üzerindeki etkileri yanında sirtuinler kan glikozunu pankreatik insülin salınımını düzenleyerek de modüle etmektedirler. Fare β hücrelerine aktarılan SIRT1 aşırı eksprese genin glikozun stimüle ettiği insülin sekresyonunu artırdığı ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında glikoz toleransını ilerlettiği, buna karşın *Sirt1* -/- farelerde glikozun stimüle ettiği insülin sekresyonu bozulmuştur (143, 144).

Sirtuinlerin glikoz hemostazının düzenlenmesinden ziyade metabolizma üzerinde daha geniş bir rolü vardır. Daha önce belirtildiği gibi SIRT 1 PPAR- γ ve PGC-1 α üzerindeki düzenleyici etkileri ile yağ mobilizasyonu ve oksidasyonu üzerinde önemli rol oynar (137, 145). PGC- α aktivitesi üzerindeki düzenleyici etkileri sirtuinlerin yeni mitokondri sentezi üzerinde rolleri olduğunu düşündürmektedir. PGC- α mitokondri biyogenezinde anahtar role sahiptir. Bu gözlemler yakın zamanda SIRT 1 ile otofaji arasındaki bağlantılar ile birleştirilmiştir (146). Sirtuinler PGC- α üzerinden hücrelerdeki mitokondri sentez ve yıkımı arasında bir denge kurmaktadır.

Sirtuinlerin metabolik düzenleme üzerindeki etkileri üzerine olan çalışmalar karaciğer, pankreas gibi anahtar organlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Gönüllü olarak kalori kısıtlaması yapılan kişiler üzerinde yapılan çalışmalar SIRT 1'in kas ve mononükleer hücrelerde de arttığını göstermiştir (147, 148). SIRT 1 ile sirkadiyen ritm arasındaki ilişki sirtuinlerin metabolik düzenlemede ne kadar etkili olduğunu gösteren ilgi çekici bir etkidir (149).

1.4.1.4. SIRT1 ve Yaş İlişkili Hastalıklar

Sirtuinler ile glikoz hemostazı ve insülin sekresyonu arasında ilişkiyi gösteren bilgiler bu proteinlerin insülin direnci ve diyabet oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmada transgenik aşırı eksprese olan SIRT1 geni ile yapılan ve yağlı diyet alan hayvanlarda glikoz toleransını artırdığı gösterilmiştir (150, 151). Bu iki çalışmada SIRT1 miktarında ılımlı artışın bazal enerji hemostazı üzerinde farklı etkileri olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu fonksiyonel çalışmaların yanında SIRT1'in genetik ve farmakolojik olarak inhibisyonu insülin direncini indüklediği görülmüştür (152). Bu bilgi bize sirtuinin aktivitesindeki manipulasyonlarla metabolik bozuklukların önlenmesinde kullanabileceğini göstermektedir. Benzer şekilde insanlarda SIRT 1'deki farklı genetik varyasyonlarla enerji tüketimi ve obezite arasında ilişki tespit edilmiştir (153). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda sirtuin aktivatörü resveratrolün diyete bağlı obezite ve glikoz intoleransına karşı koruyucu etkisi olduğu görülmektedir (154). Resveratrol aynı zamanda AMPK (AMP-aktif protein kinaz)'yı aktive etmektedir. AMPK sirtuin aktivitesi ile yakından ilişkilidir (155).

Sirtuinler ile metabolik hastalıklar arasındaki ilişki yoğun biçimde çalışılmıştır. Benzer ilişki sirtuinler ile yaş ilişkili hastalıklar arasında da bulunmuştur. SIRT1'in p53'ü aktive edebilme yeteneği sirtuinleri tumörögenizde potansiyel etkenler içerisine sokmaktadır. Bu bağlamda yapılan tartışmalarda SIRT1'in kanser riskini hem artırabileceği hem de azaltabileceği yönündedir (156).

Sirtuinler vasküler biyolojide de etkin rol alıyor ve yaş bağımlı aterosklerozisi regüle ediyor gözükmektedir. Lipid ve kolesterol metabolizmasını regüle ederek, tersine kolesterol transportunu sağlayan nükleer reseptör LXR aktivitesini modüle ederek yapabilmektedir (157). Endotel hücrelerinde oluşan sirtuin delesyonunda iskemik sonuca yanıt olarak anjiogenik yanıtın bozulduğu gösterilmiştir (158). SIRT1 ayrıca vasküler tonusunun ayarlanmasında anahtar rol oynayan endotelial nitrik oksit sentazı (eNOS) deasetile etmekte ve enzim aktivitesini regüle etmektedir (159).

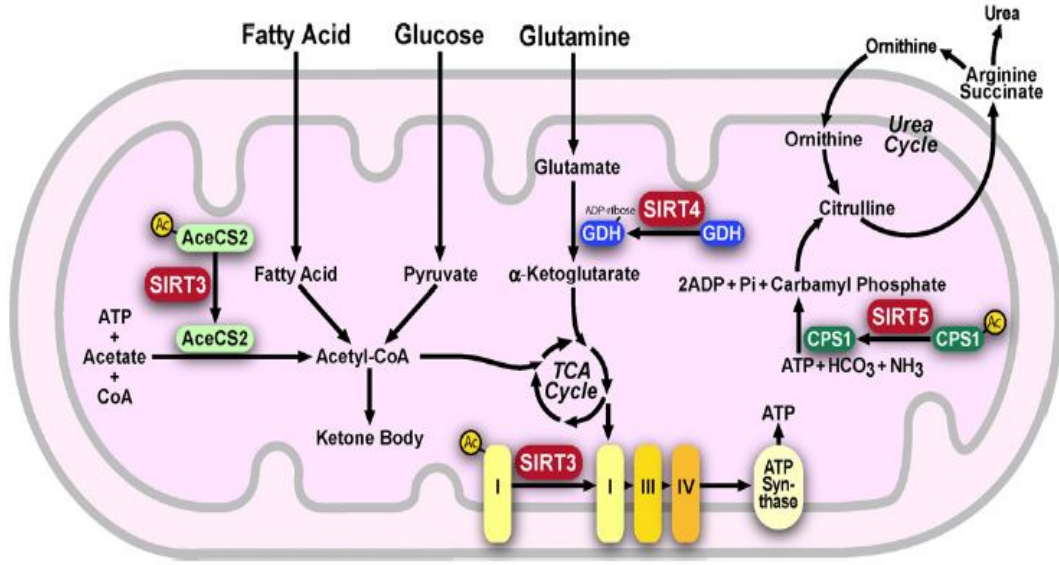
Sirtuinlerin nörolojik hastalıklardaki rolleri yakın zamanda ortaya çıkarılmıştır. İlk raporlar SIRT1'i nöron dejenerasyonu için iyi bir model olarak sunmuş bununla birlikte takip eden çalışmalarda bu modellerde gözlenen nörolojik

patolojilerin sirtuinden bağımsız yollarla olabileceğini düşündürmüştür (160, 161). SIRT1 genelde oksidatif strese karşı koruyucu olarak bilinmektedir. Hem invitro hem de invivo çalışmalardan elde edilen kanıtlar bunun beyin için bu şekilde olmadığı yönündedir (162). Bu gözlemlere rağmen farelerde oluşturulan Alzheimer hastalığında beyin spesifik SIRT1 aşırı ekspresyonunda SIRT1'in nörodejenerasyonu azalttığı görünmektedir (163) .

1.4.2. Sirtuin 3

Sirtuin 3 mitokondri mariksinde çözünür halde bulunan bir proteindir. SIRT3'ün ilk tanımlanan substratı mitokondriyal protein olan asetilkoenzim A sentaz 2 (AceCS2) 'dir (16). SIRT3 AceCS2'yi deasetile ederek aktive etmektedir (164) (Şekil 5). AceCS2 kalpte ile kasta bol miktarda bulunmaktadır ve açlık ile ketogenez sürecinde enzimin ekspresyonu artmaktadır (165). Açlık durumunda yağ asitlerinin oksidasyonu ile asetat ve keton cisimlerinin olduğu karaciğerde AceCS2 enzimi bulunmaz. Yakın zamanda açlık durumunda asetatın karaciğerden serbestleşerek kana karıştığı ve dokularda AceCS2 enzimi tarafından asetilKoA'ya çevrilerek tüketildiğine dair çalışmalar yayınlanmıştır (166). İlginç olarak SIRT3 ATP sentezini mitokondrial elektron transport kompleks I'in asetillenme derecesini etkileyerek regüle etmektedir (167).

Sirtuin 3 elektron transport zincirinin kompleks I' i ile etkileşmekte ve bu kompleks içerisinde NDUFA9 dahil invivo ve invitro olarak çok sayıda proteini deasetile etmektedir (167) (Şekil 5). Bu bilgi SIRT3 ve kompleks I arasındaki ilişkinin hem fonksiyonel hem de fiziksel olduğunu desteklemekte ve SIRT3 *knockout* farelerde gözlenen ATP düzeyindeki azalmayı açıklamaktadır. Bununla birlikte SIRT3 tarafından regüle edilen diğer metabolik yolların da ATP'de düşmeye neden olan bu duruma katkısı olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.



Şekil 5. Mitokondriyal enzimlerin SIRT3, 4 ve 5 tarafından mitokondriyal matrikste regülasyonu (16).

Sirtuin 3 'ün antioksidan proteinlerin aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda SOD2 aktivitesinin farklı lizin bölgelerinin asetilasyonu ile düzenlendiği gösterilmiştir (168). SOD2'nin lizin kalıntılarının SIRT3 ile deasetilasyonu SOD aktivitesini artırmış, Hücrel ROB bileşiklerinin azaltmıştır (168). Antioksidan sistemlerden olan glutasyon sistemde glutasyon redüktaz NADPH kullanarak GSSG'den GSH üretmektedir. Mitokondriyal NADPH primer olarak NADP⁺ -bağımlı dehidrogenazlar tarafından rejenere edilmektedir. Bu dehidrogenazlardan izositrat dehidrogenaz bu işlemde esas rolü üstlenmektedir. Bu enzimler işlem asetile olmaktadır. Her üç enzimden sadece izositrat dehidrogenazın SIRT3'ün hedefi olduğu tespit edilmiştir (169). Tiyoredoksin sistem mitokondriyal H₂O₂ 'yi temizleyen bir antioksidan sistemdir. Bu sistemin üyelerinden olan tiyoredoksin redüktaz 2'nin SIRT3 ile etkileştiği ve SIRT3'ün bu enzimi regüle ettiği görülmüştür. Antioksidan sistemin önemli üyelerinden biri de CytC' dir. SIRT3'ün PGC- α 'nın indüklediği CytC ekspresyonu için gereklidir (170).

Farklı transkripsiyon faktörleri hücrel strese yanıt olarak mitokondriyal ve antioksidan gen ekspresyonuna neden olurlar. SIRT3 stres durumunda FOXO3a gen ekspresyonuna neden olur. FOXO3a oksidatif strese karşı koruyucu ve ROB'ların detoksifikasyonuna neden olur. Bu etkisini antioksidan enzimlerden SOD2, CAT ve

peroksiredoksi 3'in transkripsiyonel upregülasyonunu artırarak yapar. (171, 172).Yapılan bir çalışmada antiokidan genlerin PGC-1 α tarafında indüksiyonu için SIRT3 ekspresyonunun gerektiği rapor edilmiştir (173).

In vitro ve *in vivo* yapılan çalışmalarda ATP sentezindeki azalmanın hücrenin apoptozis ve nekroz ile ölümünde belirleyici olduğu gösterilmiştir (174). Bu SIRT3'ün stres ve hasara yanıt olarak hücre ölümüne katkısı olma olasılığını artırmaktadır. SIRT3 ve SIRT4 DNA alkilizasyon reaksiyonu yaparak hücre ölümüne neden olan metil metan sülfonata karşı NAD⁺'ın biyosentezini gerçekleştiren NAMPT'ye gereksinin duyarlar (175). NAMPT ekspresyonu stres ve besin kısıtlanması durumlarında artar (175). SIRT3 ayrıca HeLa hücrelerini veya kardiyomiyositleri yine bir DNA alkileyici ajan olan N-metil-N'-nitro-N-nitrozogonidin tarafından indüklenen hücre ölümüne karşı korur (176). Bu gözlemlerin tersine SIRT3 bazı kanser hücrelerinde proapoptotik fonksiyon göstermektedir (177).

Farelerin beyaz ve kahverengi yağ dokularında kalori kısıtlanması durumunda SIRT3 ekspresyonu artmaktadır (178). Bu bize SIRT3'ün kalori kısıtlanmasına yanıt olarak bazı metabolik değişikliklere aracılık ettiğini göstermektedir. SIRT3'ün uzun yaşam süresi ile ilgili bu yoldaki etkisini gelecekte yapılacak deneyler ile anlaşılacaktır.

1.4.3. Sirtuin 4

Sirtuin 4 mitokondri matriksinde bulunmaktadır ve mitokondriye girişinden sonra ilk 28 aminoasidi ayrılmaktadır (179). Sirtuin ekspresyonu göreceli olarak kalp, böbrek, beyinde daha yüksektir (180). SIRT3'ün mitokondrial proteinlerin deasetilasyonundaki rollerine karşılık SIRT4'ün NAD⁺ bağımlı deasetilasyon aktivitesi invitro tespit edilmemiştir (180). Bununla birlikte SIRT4 yoksun farelerde mitokondrial protein asetilasyon seviyesinde anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir (181). Diğer mitokondrial sirtuinlerin aksine SIRT4 ADP-ribozun NAD⁺ 'dan hedef proteinlere transferini katalize etmektedir (180).

Çalışmalar insanlarda ve farelerde SIRT4'ü besinin regüle ettiği insülin salınımı ile ilişkilendirmiştir (179, 180). SIRT4 -/- fareler ile vahşi tip serbestçe beslenmesine izin verilen fareler ve gece aç bırakılmış fareler karşılaştırıldığında

SIRT4 -/- farelerin kan insülin seviyelerinin anlamlı derece yüksek olduğu tespit edilmiştir (180). SIRT4 invitro ve invivo olarak pankreatik β hücrelerinde hem glikoz hem de aminoasitlerin stimüle ettiği insülin salınımını olumsuz yönde regüle etmektedir (180). SIRT4 aracılı insülin sekresyonunun inhibisyonu GDH bağımlıdır ve SIRT4'ün GDH ile birlikte inkübasyonu ADP- ribozilasyonuna neden olur ve GDH enzim aktivitesi inhibe olur (180) (şekil 5). GDH bir mitokondrial matriks proteini olup karaciğer, böbrek, beyin ve pankreatik adacık hücrelerinde glutamatı α -ketoglutarat ve amonyağa dönüştürür (182). Bu reaksiyon sonucunda pankreatik adacık hücrelerinde ATP üretilmekte bu da insülin salınımını sağlamaktadır (182).

Aminoasitlerin stimüle ettiği insülin sekresyonu ve GDH aktivitesi insülin adacık hücrelerinde ve kalorisi kısıtlanmış fare karaciğerlerinde artırılmaktadır (180, 183).GDH'in mono-ADP-ribozilasyonu kalori kısıtlanmasının olduğu durumda azalmaktadır. Bu bize SIRT4 aktivitesinin kalori kısıtlanmasında azaldığını düşündürmektedir (180). Bununla birlikte karaciğer NAD^+ aktivitesi kalori kısıtlanmasında artırılmaktadır (184). SIRT4'ün kalori kısıtlı durumlarda regülasyonu farklı dokularda değişik olmaktadır. Açlık durumlarında GDH aktivitesinin ve aminoasitlerin indüklediği insülin sekresyonunun pankreas adacık hücrelerinde neden artırıldığı açıklık kazanmamıştır.

İnsülin degrading enzim (IDE) ve adenine nucleotide translocator (ANT2) SIRT4 ile karşılıklı etkileşmektedir. IDE bir metaloproteinaz olup insülinin hücre içidegradasyonu için gereklidir. IDE tip 2 diabetes mellitus ve Alzheimer hastalıklarının patogenezinde etkili olmaktadır (185). ANT2 sitoplazma ile mitokondri arasındaki ADP transferinin katalize etmektedir ve tip 2 diabetes mellitus ile ilişkilidir (186). İlginç olarak endojen olarak SIRT3 de SIRT4 ile etkileşime girmektedir. Bu ilişkinin fizyolojik bağlantıları açık değildir.

1.4.4. NAMPT (PBEF/Visfatin)

Memelilerde NAD^+ sentezi nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT) ve nikotinamid/nikotinic asit mononükleotid adeniltransferaz (Nmnat) enzimlerinin gerçekleştirdiği iki aşamalı bir yolla gerçekleşir. NAMPT nikotinamidi mononükleotide (NMN), NMN'de Nmnat ile NAD^+ 'a çevrilir. NAD^+ sentezinde hız kısıtlayıcı enzim NAMPT'dir (17). NAMPT sitokin benzeri protein farzedilerek

subklinik inflamasyondaki rolünde dolayı *pre-B colony enhancing factor (PBEF)* olarak tanımlanmıştır (187). Daha sonra bu protein insülin benzeri etkinliği olduğuna inanılarak visceral yağdan türeyen bir adipositokin visfatin şeklinde adlandırılmıştır (188). Bununla birlikte bu yaygın tartışmalı sonuçlara neden olduğundan yayından kaldırılmıştır (189). NAMPT direkt insülin reseptörüne bağlanmıyor olabilir. NAMPT insülin sekresyonunu β hücreleri üzerinden düzenler ve uzun yaşam süresi üzerinde etkili olan bir faktör olarak fonksiyon görür (175, 190).

Nikotinamid fosforibozil transferazın intraselüler (iNAMPT) ve ekstraselüler (eNAMPT) şeklinde iki formu vardır. İntraselüler NAMPT' nin NAD^+ biyosentezi için zorunlu ve hız kısıtlayıcı bir enzim olduğu kanıtlanmış olmakla birlikte eNAMPT'nin fonksiyonları hala tartışma konusudur (191).

Ekstraselüler NAMPT'nin nikotinamidi kanda ekstraselüler NMN'ye çevirerek β hücre fonksiyonlarını düzenleyen sistemik bir sinyal molekülü gibi fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (192). Yakın zaman önce eNAMPT'nin proinflamatuvar sinyali aktive ettiği ve iNOS sentezini indüksiyonuna bir ERK1/2, NF- κ B bağımlı bir mekanizma katıldığı gösterilmiştir (193).

Nikotinamid Adenin Dinükleotid hücredeki redoks reaksiyonlarına katılan klasik bir koenzimdir ve hücredeki birçok biyolojik reaksiyonda etkinliği vardır. SIRT1'in NAD^+ bağımlı deasetilasyonundaki düzenleyici rolü ilgi çekicidir (194). Kromatin ilişkili proteinleri modifiye edici etkisi nedeniyle SIRT1 ortamda besin varlığında metabolizmanın epigenetik regülasyonunda önemli rol alır. NAMPT ve SIRT1 üçüncü bir enzim olan AMPK ile birlikte hücresel sinyallerin algılandığı bir kontrol mekanizması oluştururlar ve besin varlığında reaksiyon gösterirler (195). NAMPT aracılı NAD^+ biyosentezi hücresel yaşlanma, yaşlılık, obezite, diyabet, kanser ve inflamasyon dahil birçok süreçte rol alır (196, 197). İlginç olarak NAMPT ekspresyonu sirkadian salınım gösterir. İlgili genler ve SIRT1 NAMPT ekspresyonunu sirkadiyen bir negatif geri bildirim döngüsü ile etkiler ve böylece SIRT1 kendi kofaktörü olan NAD^+ sentezini kontrol eder (198).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra, standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde (FÜDAM) yapıldı. FÜDAM'dan temin edilen ve ağırlıkları 195-264 g arasında değişen erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı (n=28, 10 haftalık). Ratlar 22±1 °C sıcaklık ve 12 saat ışık/karanlık siklusunun sağlandığı ortamda etik kurallara uygun olarak muhafaza edildi. Hayvanların beslenmesinde, standart pellet yemi ve çeşme suyu kullanıldı.

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

1. Kontrol Grubu (n=7): Sisplatin uygulanmayan, 3. gün i.p. olarak sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve bazal diyetle beslenen grup.

2. Sisplatin Grubu (n=7): Çalışmanın 3. gününde sisplatin (Sisplatin; Sigma Chemical Co, USA), % 0.9 salin (1 ml/100 gr/kg i.p.) içinde (7 mg/kg) uygulanan ratlar.

3. Kurkumin Grubu (n=7): Sisplatin uygulanmayan, 3. gün i.p. olarak sisplatinle eşit hacimde izotonik salin solusyonu (1 ml/kg/gün) uygulanan ve sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 8 gün süreyle kurkumin (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA) (100 mg/kg) verilen ratlar.

4. Kurkumin + Sisplatin Grubu (n=7): Sisplatin uygulanan ve sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 8 gün süreyle kurkumin (100 mg/kg) verilen ratlar.

Kurkumin gavaj yolu ile 100 mg/kg dozda fizyolojik salinde sulandırılarak (%0.9), kaynak sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve uygulamadan sonra 8 gün toplam 10 gün süreyle günde 1 kez olacak şekilde uygulandı. Sisplatin uygulamasından 8 gün sonra ratlar hayvanlar anestezi altında dekapite edilerek histopatolojik ve western blot analizleri için doku örnekleri alınmış ve western

analizleri yapılmaya kadar -80°C ' de saklanmıştır. 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.

2.2. Laboratuvar Analizi

2.2.1. Üre ve Kreatinin Analizi

Kan örnekleri 300 g'de 10 dk süreyle santrifüje edildi ve serumları ayrıldı. Serum üre nitrojeni ve kreatinini biyokimyasal analizör ile (Olympus AU-660, Japonya) ölçüldü.

2.2.2. Malondialdehit (MDA) Analizi

Serum örneklerinin MDA düzeyleri Karatepe'nin bildirdiği metotlara göre belirlendi (199).

- Serum örneklerinden, 1.5 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine 400 μl alındı. Örneklerin üzerine 300 μl 0.5 M HClO_4 eklenerek vorteksle karıştırıldıktan sonra santrifüj edildi.
- Süpernatant dikkatlice viallere alınarak serumların ekstraksiyon işlemi tamamlandı.
- Kalibrasyon grafiği oluşturulmak ve hesaplamalarda kullanılmak üzere MDA (1, 1, 3, 3-tetraethoksi-propan, Sigma-Aldrich, Almanya) standardı hazırlandı.
- MDA standardı için tetraethoksi-propandan 10 μl hacimde alınarak 10 ml'lik kapaklı bir cam tüpe alındı.
- Hacim 0.1 M hidroklorik asit (HCl, %37, Merck, Almanya) ile 10 ml hacme tamamlandı.
- Benmaride (Mommert, Almanya) 100°C 'de 5 dk kapak kapalı şekilde muamele edildikten sonra soğutuldu ve ultra saf su ile 100 ml hacme tamamlandı.
- Analizler ultraviyole (UV) dedektör (SPD-20A), pompa (LC-20AD), otosampler (SIL-20A) ve kolon fırını (CTO-10ASVP) ünitelerine sahip olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid chromatography, HPLC) cihazında (Shimadzu, Japonya) LC Solution (LabSolution LCsolution Release 1.21) paket programı kullanılarak yapıldı.

2.2.3. Western Blot Analizleri

Western blot işlemi Tuzcu'ya göre yapıldı (200). Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin, nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla gösterilmesidir. Bu amaçla hedef dokumuz olan rat böbrek dokusu için western blotlama yapıldı. Her doku, gruplar arası miktarlar eşit olacak şekilde örneklendirilerek; buz içerisinde, doku miktarının altı katı homojenizasyon tamponu kullanılarak, cam homojenizatörler ile homojenize edildi.

Blotlama yapılmadan önce çalışılan örneklerdeki proteinler elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. Proteinlerin elektroforezleri SDS-PAGE'de gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bunlar; jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır. Nitroselüloz membrana transfer sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kağıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir. Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Ancak çalışılan antikor; molekül ağırlığı bilinen bir antikor olup uygun bir markörle ağırlık sırası belirlendiğinde poliklonal antikor kullanımı daha avantajlı bir seçim olmaktadır. Western blotta monoklonal antikorların kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki

epitopların ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır. Özgül antikorlarda raportör madde olarak genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler kullanılmaktadır. Enzim olarak alkalin fosfataz ve peroksidaz enzimleri tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır. Beyin dokusu homojenatlarının Western blot analizi Baydaş ve Tuzcu tarafından uygulanan metoda göre yapıldı (201).

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 90 dakika boyunca 250 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin nitroselüloz membran yüzeyine transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)), çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl , 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda %1'lik taze sığır serum albumini (BSA) ile 37°C'de 60 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

2.2.3.1. Özgül antikorlarla tepkime

Primer antikor olarak anti-SIRT1, anti-SIRT3, anti-SIRT4 ve anti-PBEF antikorları kullanıldı. Primer antikorlar %0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar anti-SIRT1, anti-SIRT3, anti-SIRT4 ve anti-PBEF antikorları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar %0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37°C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı.

2.2.3.2 Bantların görüntülenmesi

Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB'la reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB'la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.3. 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 (202). 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.

2.4. İstatistiksel analizleri

Veriler SPSS 18.0 paket programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası farklılığı ortaya koymak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) post hoc tukey testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

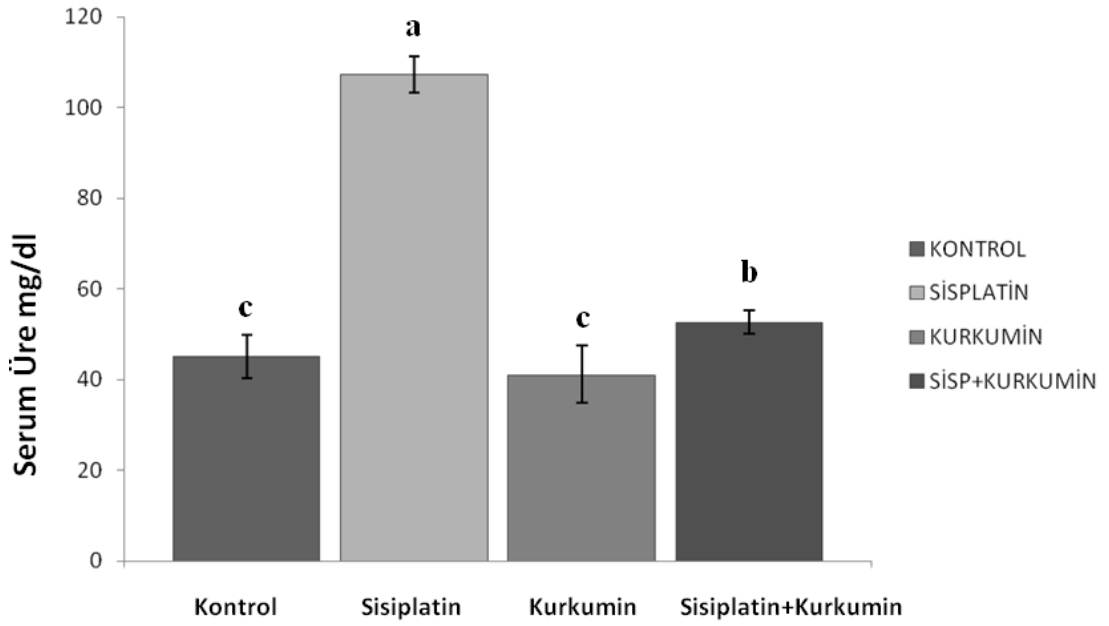
3.1. Serum Üre Düzeyleri

Gruplardaki üre düzeyleri Tablo 1’da gösterilmiştir. Sisplatin verilen gruptaki üre değerleri kontrol grubundaki üre değerlerine göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p<0.001$). Kurkumin+sisplatin grubunda üre düzeyleri sisplatin grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.01$). Kontrol grubu ile kurkumin grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). Sisplatin+kurkumin grubunda üre değerleri sisplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 6).

Tablo 1. Sisplatin nefrotoksitesi uygulanan ratlarda Kurkumin katkısının serum üre ve kreatinin; doku malondialdehit, SIRT1, SIRT3, SIRT4, NAMPT düzeyleri üzerine etkisi.

Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Sisplatin	Kurkumin	Sisplatin+ Kurkumin
Üre (mg/dl)	45,014±4,77 ^c	397,14±103,78 ^a	41,14±6,28 ^c	261±52,72 ^b
Kreatinin (mg/dl)	0,23±0,08 ^c	4,10±1,63 ^a	0,24±0,02 ^c	2,57±0,72 ^b
MDA (µmol/L)	0,35±0,08 ^c	2,24±0,40 ^a	0,29±0,04 ^c	1,40±0,30 ^b
SIRT1 (% Kontrol)	100±0,68 ^b	65,17±2,41 ^d	108,56±1,75 ^a	88,89±1,38 ^c
SIRT3 (% Kontrol)	100±2,60 ^a	69,37±3,59 ^c	106,14±1,04 ^a	80,86±3,82 ^b
SIRT4 (% Kontrol)	100±3,64 ^a	69,51±4,20 ^c	106,71±2,07 ^a	82,130±2,448 ^b
NAMPT (% Kontrol)	100±1,81 ^a	71,27±0,39 ^c	95,98±3,89 ^a	91,39±3,45 ^b

a-d: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p<0.05$).

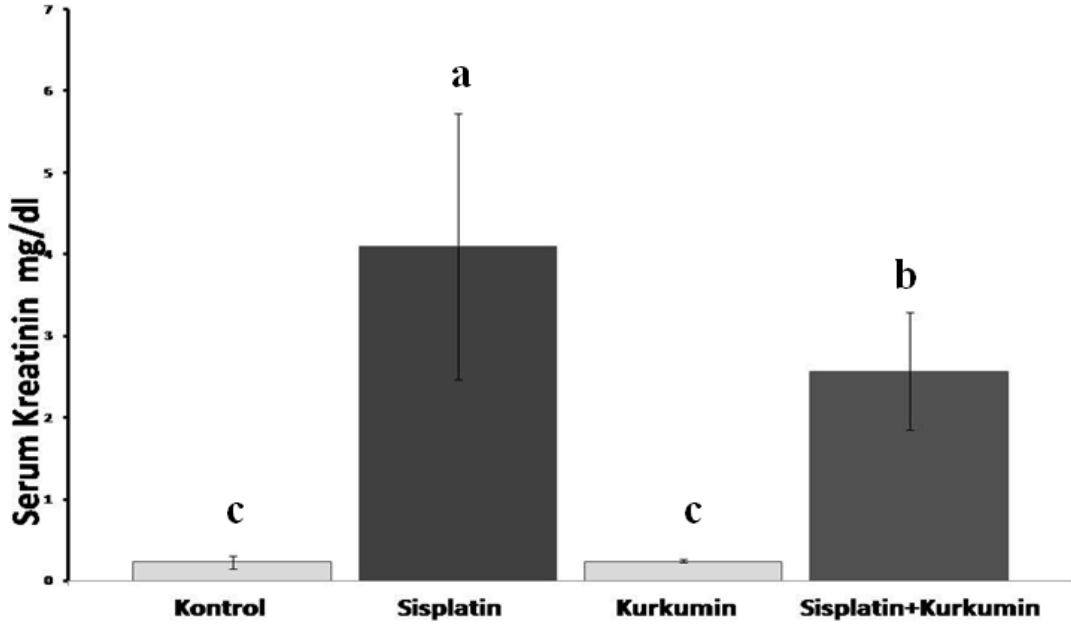


a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 6. Gruplara ait serum üre düzeyleri.

3.2. Serum Kreatinin Düzeyleri

Gruplardaki kreatinin düzeylerinin ortalaması Tablo 1’de gösterilmiştir. Sisiplatin verilen gruptaki kreatinin değerlerinin, kontrol grubundaki kreatinin değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p < 0.001$). Kurkumin+sisiplatin grubunda kreatinin düzeyleri sisiplatin grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile kurkumin grubu arasında yapılan karşılaştırmada kreatinin düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). Sisiplatin+kurkumin grubunda kreatinin değerleri sisiplatin grubuna göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 7).

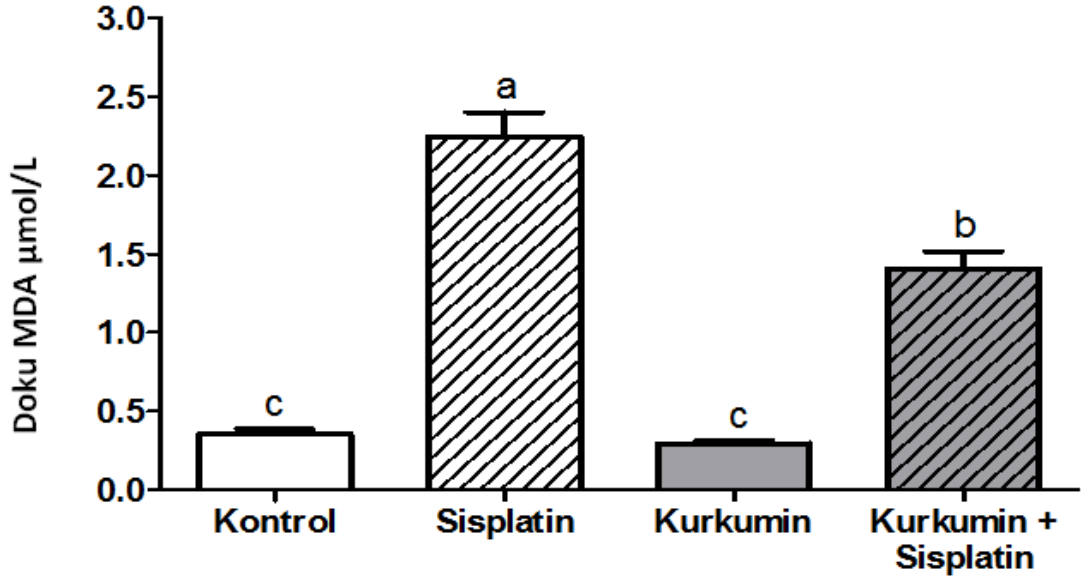


a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 7. Gruplara ait serum kreatinin düzeyleri.

3.3. Malondialdehit Düzeyleri

Gruplardaki MDA düzeylerinin ortalaması Tablo 1’de gösterilmiştir. Sisplatin verilen gruptaki MDA değerlerinin, kontrol grubundaki MDA değerlerine göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı ($p < 0.001$). Kurkumin+sisplatin grubunda MDA düzeyleri sisplatin grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile kurkumin grubu arasında yapılan karşılaştırmada MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). Sisplatin+kurkumin grubunda MDA değerleri sisplatin grubuna göre düşük olmakla birlikte kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 8).

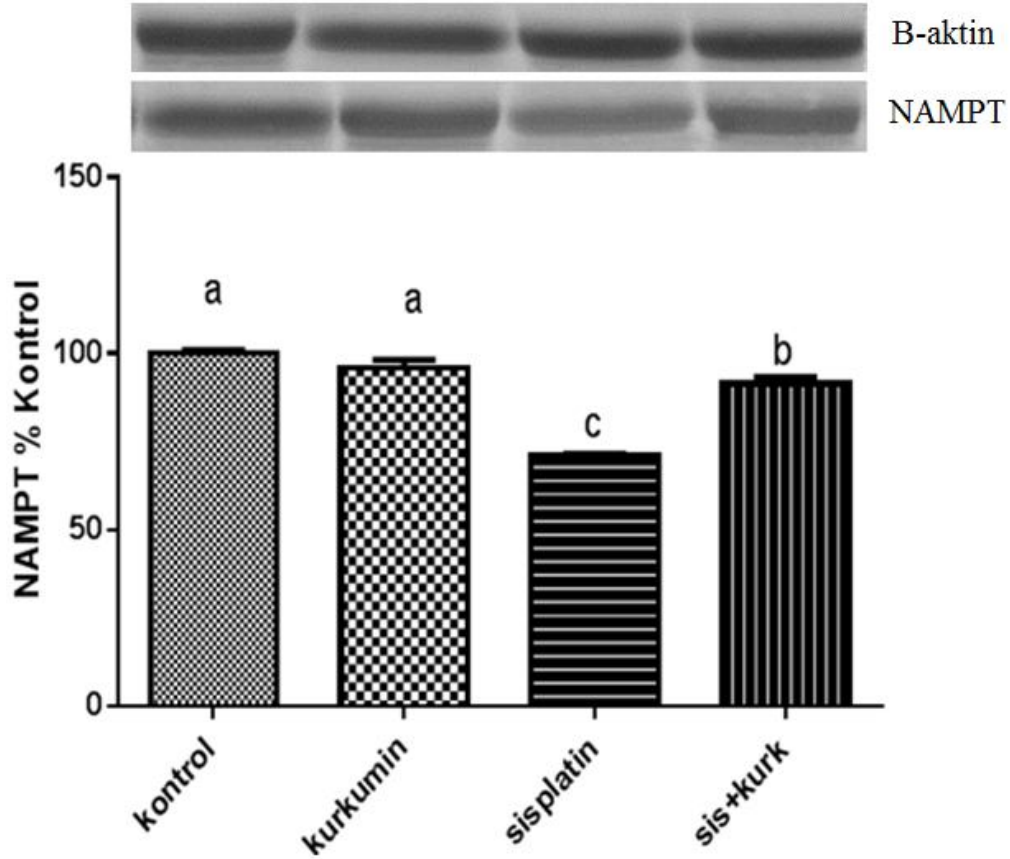


a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 8. Gruplara ait doku MDA düzeyleri.

3.4. NAMPT Düzeyleri

Gruplardaki NAMPT düzeyleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kurkumin verilen grup arasında NAMPT miktarı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0, 05$). Sisplatin verilen grupta NAMPT düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi ($p < 0,001$). Sisplatin verilen grupla karşılaştırıldığında sisplatin+kurkumin grubunda NAMPT düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0, 001$). Sisplatin+kurkumin verilen grupta NAMPT düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktür ($p < 0, 05$) (Şekil 9).

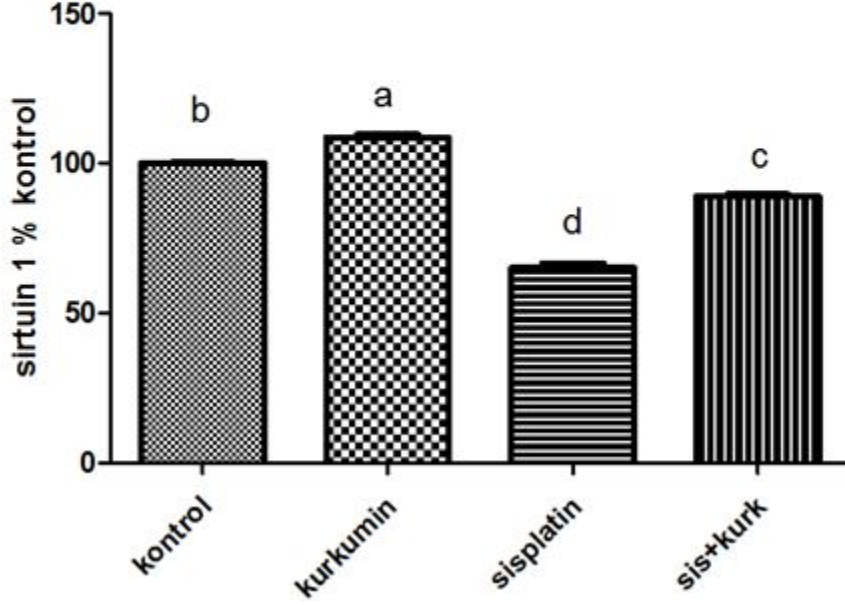
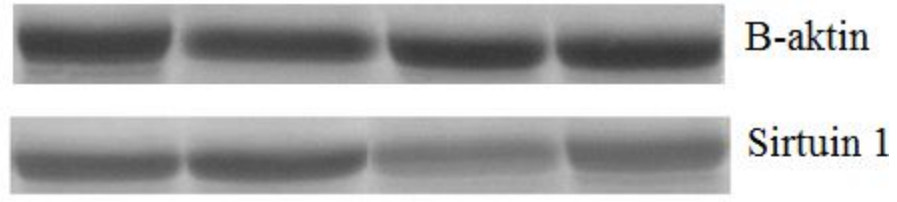


a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 9. Gruplara ait doku NAMPT düzeyleri.

3.5. Sirtuin 1 Düzeyleri

Gruplardaki SIRT1 düzeyleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Kontrol grubuna göre kurkumin verilen grupta SIRT1 miktarı anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir ($p < 0, 01$). Sisplatin verilen grupta SIRT1 miktarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşük bulundu ($p < 0, 001$). Sisplatin verilen grupla karşılaştırıldığında sisplatin+kurkumin verilen grupta SIRT1 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0, 001$). Buna karşın sisplatin+kurkumin verilen grupta SIRT1 düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktür ($p < 0, 001$) (Şekil 10).

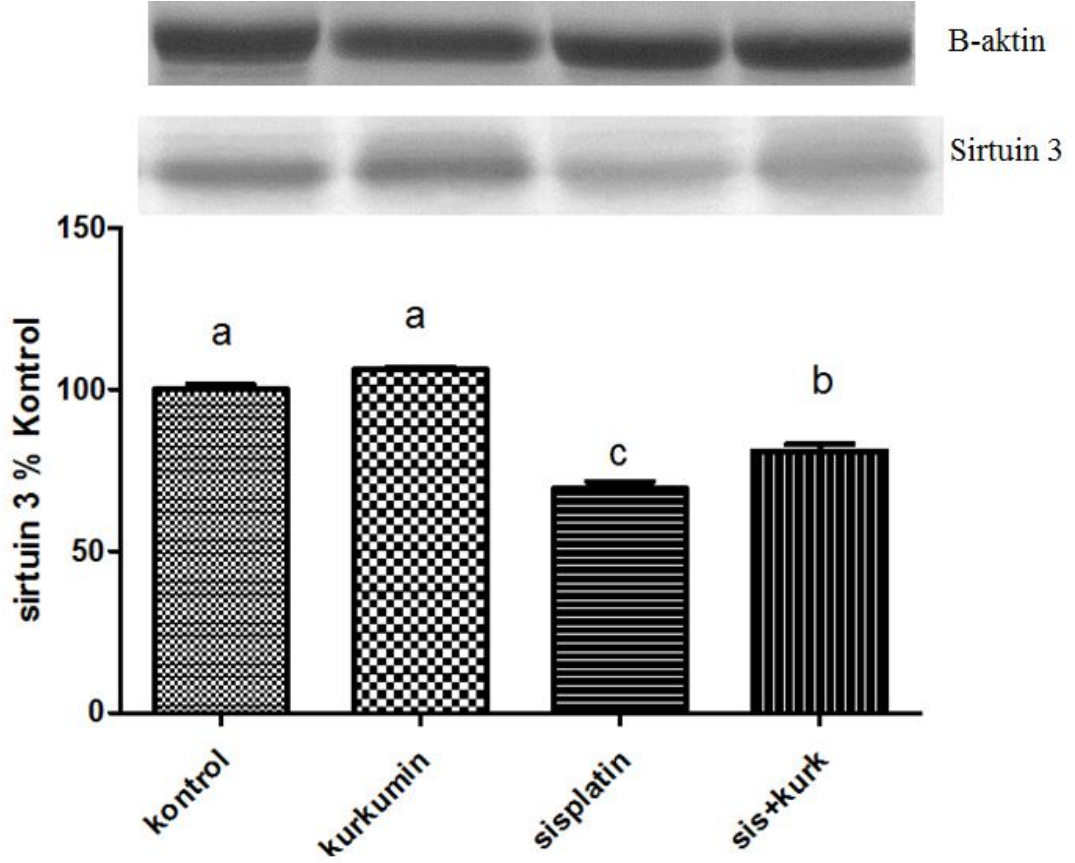


a-d: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 10. Gruplara ait doku sirtuin 1 düzeyleri.

3.6. Sirtuin 3 Düzeyleri

Gruplardaki SIRT3 düzeyleri Tablo 1’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kurkumin verilen grup arasında SIRT3 miktarı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Sisplatin verilen grupta SIRT3 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi ($p < 0,001$). Sisplatin verilen grupla karşılaştırıldığında sisplatin+kurkumin grubunda SIRT3 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,01$). Sisplatin+kurkumin verilen grupta SIRT3 düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktür ($p < 0,001$) (Şekil 11).

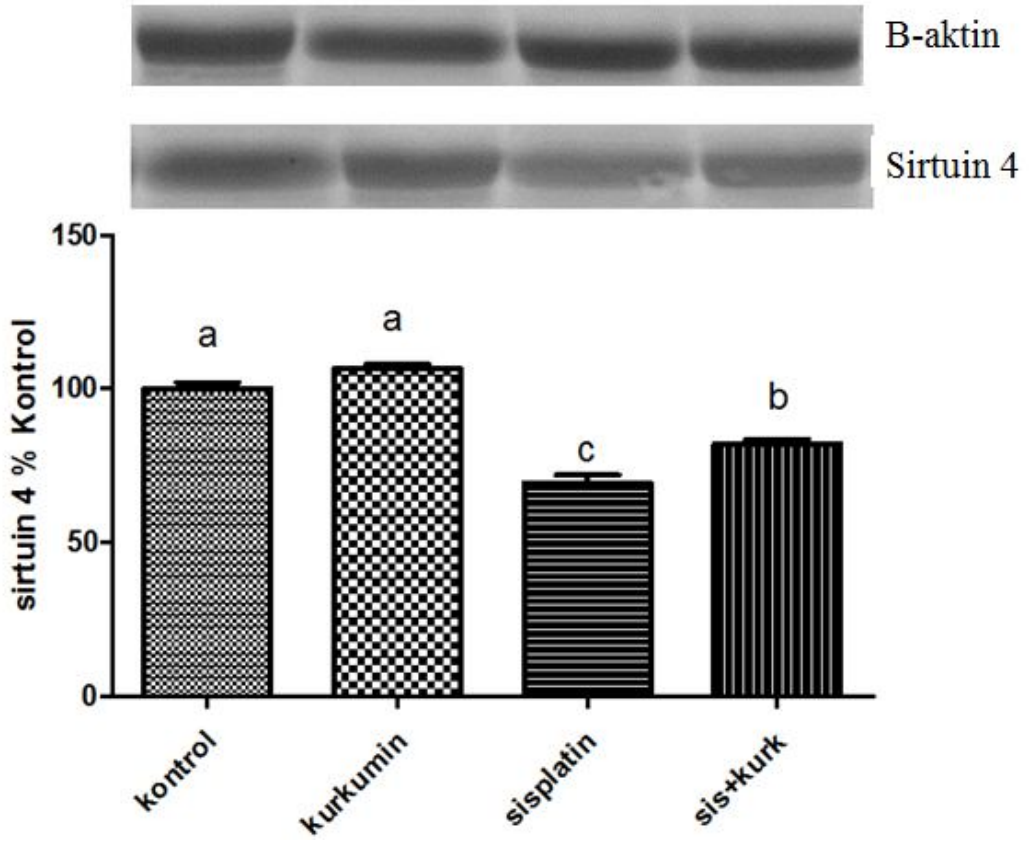


a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 11. Gruplara ait doku Sirtuin 3 düzeyleri.

3.7. Sirtuin 4 Düzeyleri

Gruplardaki SIRT4 düzeyleri Tablo 1’da gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kurkumin verilen grup arasında SIRT4 miktarı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$). Sisplatin verilen grupta SIRT4 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi ($p < 0,001$). Sisplatin verilen grupla karşılaştırıldığında sisplatin+kurkumin grubunda SIRT4 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,01$). Sisplatin+kurkumin verilen grupta SIRT4 düzeyi kontrol grubuna göre daha düşüktür ($p < 0, 01$) (Şekil 12).



a-c: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$).

Şekil 12. Gruplara ait doku sirtuin 4 düzeyleri.

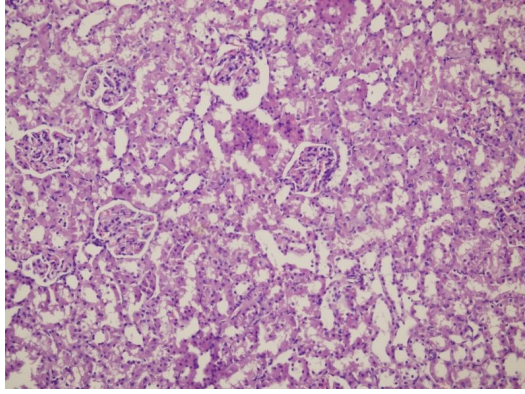
3.8. Histopatolojik sonuçlar

Kontrol ve kurkumin grubundaki ratlardan alınan böbreklerde kurkumin grubunda hafif interstisyel ödem gözlemlendi. Buna karşılık, sisplatin verilen grupta korteks ve dış medullada hafif derecede vakuolizasyon ve interstisyel ödem ve orta derecede inflamasyon, tübüler nekroz ve tübüler atrofi gözlemlendi. Kurkumin+sisplatin grubunda ise tübüler atrofinin ve vakuolizasyonun tamamen düzeldiği, hafif derecede interstisyel ödem, inflamasyon ve tübüler nekroz olduğu görüldü (Şekil 13).

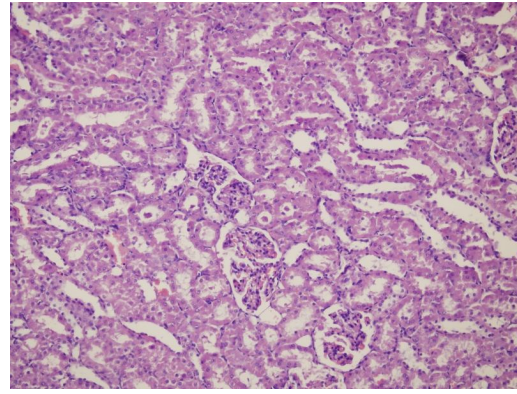
Tablo 2. Kurkumin uygulamasının rat böbrek dokusundaki morfolojik değişiklikler üzerine etkisi

Morfolojik Değişiklikler	Gruplar			
	Kontrol	Kurkumin	Sisplatin	Sisplatin+ Kurkumin
Vakuolizasyon	-	-	+	-
İnterstisyel ödem	+	+/-	+	+
Tübüler nekroz	-	-	++	+
Tübüler atrofi	-	-	++	-
İnterstisyel inflamasyon	-	-	++	+

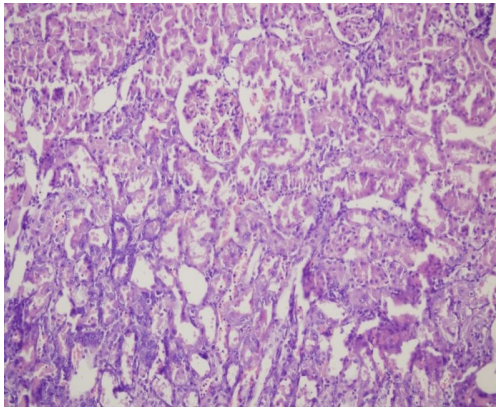
- : Yok, + : hafif, ++ : orta, +++ : şiddetli.



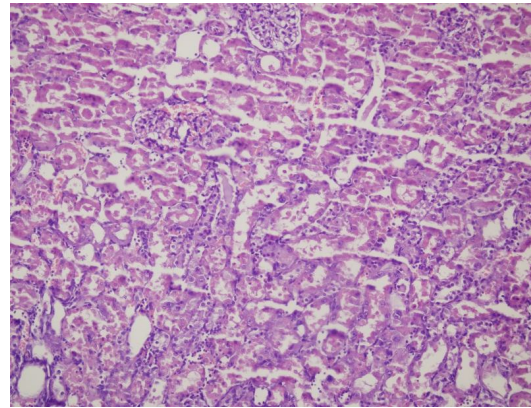
a



b



c



d

Kontrol (a), Kurkumin (b), sisplatin (c) ve sisplatin+ kurkumin (d).

Şekil 13. Hematoxylin and eosin (H&E) ile gruplara göre böbreğin histopatolojik görünümü.

4. TARTIŞMA

Malign hastalıklar günümüzde sıklığı giderek artan ve hastaların hem yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen hem de yaşam süresini kısaltan hastalıklardır. Kemoterapötik ajanlar yaşam kalitesi ve sağkalım üzerinde olumlu etkileri olan ilaçlardır.

Sisplatin (*cis-diamminedichloroplatinum II*) baş, boyun, akciğer, testis, over ve meme gibi birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan güçlü antineoplastik ilaçtır (1). Antineoplastik ajan olarak güçlü etkinliği yanında sisplatin kullanımının farklı dezavantajları vardır. Bunlar nefrotoksisite, nörotoksisite, ototoksisite, bulantı ve kusmayı içeren yan etkileridir (2). Bu yan etkiler ilacın daha etkili bir dozda kullanımını kısıtlamaktadır.

Nefrotoksisite, sisplatinin kullanımının önemli bir komplikasyonu olup sisplatin dozunun kısıtlamasına neden olan bir faktördür. Sisplatin nefrotoksisitesinin oluşum mekanizması oldukça komplekstir. Sisplatin renal dokuda oksidatif strese, apoptoza, inflamasyona neden olur ve fibrinojen oluşumunu artırır (3-8). Yüksek miktarda sisplatin proksimal tübüllerde nekroza neden olur.

Sisplatine bağlı akut böbrek hasarı oluşumunda oksidatif stres direkt etki etmektedir. ROS lipid, protein ve DNA gibi hücre içi bileşenleri etkilemekte ve onların yapısını bozmaktadır. Reaktif oksijen bileşikleri hücre içinde ksantin-ksantin oksidaz sistemi, NADPH oksidaz ve mitokondri yoluyla üretilmektedir. Sisplatin varlığında belirtilen tüm yollarda böbrek hasarına neden olan ROS üretilmektedir (54). Sisplatin glikoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz aktivitesini indükleyerek serbest radikal oluşumunu artırmakta ve antioksidan üretimini azaltmaktadır (3). Hücre içi kalsiyum miktarını artırarak NADPH oksidaz aktivitesini artırmakta, mitokondri hasarı yaparak ROS'nin üretimini stimüle etmektedir (54). $\cdot O_2$, H_2O_2 ve $(\cdot OH)$ radikalleri sisplatin ile tedavi edilenlerin vakaların böbreklerinde artmaktadır (55-57). Bu serbest radikaller lipid bileşenlerini peroksidasyonla hasara uğratmakta ve proteinleri denatüre ederek enzimatik fonksiyonlarını inhibe etmektedir. Serbest radikaller aynı zamanda mitokondri disfonksiyonuna neden olmaktadır (3). Antioksidanlar sisplatin tarafından inhibe edilmekte ve böbrekteki SOD, GSH-Px ve CAT anlamlı olarak azalmaktadır (58, 59) Reaktif nitrojen

bileşikleri de sisplatinin indüklediği nefrotoksisitede çalışılmıştır. Böbreğin içerdiği ONOO⁻ ve NO sisplatin ile tedavi edilen ratlarda artmıştır (60).

Hipoksi ve mitokondrial hasar sisplatinin oluşturduğu nefrotoksisitede etkilidir. Sisplatinin indüklediği nefrotoksisite en fazla proksimal tubulün S3 segmentinde olmaktadır. Böbreğin bu kısmı iskemik ve toksik hasara daha duyarlıdır (61). HIF-1 hipoksinin S3 segmentinde aktive ettiği bir transkripsiyon faktörü olup hipoksiye cevap olarak anjiyogenez, eritropoez ve glikolitik adaptasyonu sağlamaktadır. Dominant HIF-1 negatif hayvanlar sisplatine bağlı apoptozise giden hücre hasarına daha duyarlı hale gelmektedirler. Bu mitokondriyal CytC salınımı, mitokondriyal potansiyelin düşmesi ve kaspaz 9 aktivitesinin artması ile gerçekleşmektedir (62).

Apoptozis normal ve patolojik süreçlerde tanımlanan önemli bir hücre ölüm şeklidir. Kaspaz 1, kaspaz 8 ve kaspaz 9 kaspaz 3'ü aktive eden öncü kaspazlardır. Bu süreç hücre dışı yüzey reseptörleri ve hücre içi mitokondriyal yollar üzerinden ilerlemektedir. DNA fragmanları ve oksidatif stresler mitokondriyal yolu aktive etmekte bu yol kaspaz 9 aktivitesi ile sonuçlanmaktadır (4). TNF- α 'nın hücre yüzey reseptörüyle bağlanması kaspaz 8'i aktive etmektedir (5). Kaspaz 1 kaspaz 3'ü sisplatine bağlı böbrek hasarında direkt aktive etmektedir. Kaspaz 1 ayrıca interlökin 1 β (IL-1 β) seviyesini artırıp sisplatinin indüklediği inflamasyona katılmaktadır. Sisplatine bağlı apoptozis ve akut tubuler nekroz kaspaz 1 eksik farelerde azalmaktadır (6).

Sisplatinin indüklediği ve böbrek hasarına neden olan bir seri inflamatuvar değişiklik vardır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar sisplatinin indüklediği renal hasar oluşumunda inflamasyonun önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Sisplatin zaman bağımlı bir etki ile inhibitor of κ B (I κ B) yıkımını artırmakta ve NF- κ B bağlanma aktivitesini artırmaktadır. Bu olaylar renal TNF- α aktivitesini artırmaktadır. TNF- α renal hasar oluşumunda merkezi bir role sahiptir. Apoptozisi indüklemekte, reaktif oksijen moleküllerinin oluşumuna neden olmakta, kemokin ve sitokinler arasındaki yolları koordineli bir şekilde aktive etmektedir (7).

Sisplatin etkilenen tübüllerin etrafında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile beraber fibrozisi de indüklemektedir. Bir rat çalışmasında 2 mg/kg dozunda sisplatin 7 hafta uygulanmış ve birinci haftadan itibaren kortikomedüler bileşkede fibrotik

lezyonlar gelişmiş ve 5. haftada en üst düzeye ulaşmıştır. Hasar sisplatinin kesilmesinden sonra 19 haftalık bir süreçte fibrotik dokunun azalması ve yerini rejenerere tübüllerin alması ile sonuçlanmıştır (8). Makrofajlar TGF- β 1 ve TNF- α üretimini artırarak renal interstisyel fibrozis oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır.

Oksidatif stresi azaltmak ve antioksidan sentezini artırmak için farklı antioksidanlar bu amaçla kullanılmaktadır. Kurkumin bu amaçla kullanılan bir polifenoldür. Direkt antioksidan etki ile inflamasyonu azaltarak oksidan stresi azaltıcı etkisi bulunmaktadır.

Kurkuminin $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ radikalleri ve NO_2 radikallerini temizleyen güçlü antioksidan olduğu gösterilmiştir (92). Değişik hayvan çalışmalarında lipid peroksidasyonunu inhibe etmiştir (93). Kurkumin böbrek hücrelerini oksidatif strese karşı lipid peroksidasyonu, lipid degradasyonu ve sitolizi önleyici etkisi ile koruduğu gösterilmiştir (94). Kalpte iskemiye bağlı biyokimyasal değişiklikleri bir kedi modelinde azaltmıştır (95). Vasküler endotelial hücrelerde heme oksijenazın artmasına bağlı oluşan oksidan hasar kurkuminin antioksidan etkisiyle tedavi edilmiştir (96). Kurkuminin kalp hücrelerini miyokardial iskemiye indükleyen isoprenaline karşı koruduğu ve bu etkisini antioksidan özelliği nedeniyle başardığı bulunmuştur (97-99). Diyete kurkumin eklenmesinin nörodejeneratif hastalıklarda örneğin Alzheimer hastalığında faydalı olduğu ileri sürülmüştür (100). Fokal serebral iskemi oluşturulan bir rat modelinde kurkumin anlamlı nöroprotektif etki göstermiştir. Bu etkisini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, endojen antioksidan defans enzimlerini artırarak ve ONOO^- oluşumunu azaltarak yapmıştır (101). Yapılan başka bir çalışmada serum nitrit seviyesinin sisplatin uygulanması sonrası anlamlı olarak yükseldiği ve kurkuminin anlamlı derecede ve doz bağımlı olarak yüksek olan bu serum nitrit seviyesini düzelttiği, lipid peroksidasyonunun sisplatin uygulanması sonrası anlamlı olarak yükseldiği ve kurkuminin anlamlı derecede ve doz bağımlı olarak lipid peroksidasyonunu azalttığı, sisplatinin GSH, süperoksit dismutaz (SOD) ve CAT enzim aktivitelerini anlamlı olarak azalttığı ve kurkuminin anlamlı olarak bu enzimleri yükselttiği, serum TNF reseptör seviyelerinin kontrol gruplarına göre sisplatin uygulanan ratlarda anlamlı olarak arttığı ve kurkuminin TNF reseptör seviyelerini anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (13).

Reaktif oksijen bileşiklerinin hücrelerde oluşturduğu hasarı tespit etmek amacıyla kullanılan farklı oksidatif stres belirteçleri bulunmaktadır. Lipid peroksidasyonunu tespit etmek için kullanılan MDA bunlardan biridir (75). Antioksidanların oksidatif strese maruz kalan dokularda MDA düzeyindeki artışı engellediğini veya azalttığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Se ve E vitamininin, sisplatin uygulanan sıçanlarda, GSH düzeylerinin korunmasında, GSH-Px sentezinin artmasında, MDA düzeylerindeki artışın önlenmesinde ve dolayısıyla nefrotoksisitenin azaltılmasında etkin oldukları gösterilmiştir (203). Doğukan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sisplatin ile tedavi edilen ratlarda renal MDA düzeylerinin oldukça yüksek olduğu, sisplatin ile beraber likopen uygulanmasıyla MDA'daki yükselmeyi engellendiği tespit edilmiştir (204). *L*-Karnitin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rol oynayabilen bir bileşiktir. Sisplatin uygulamasından önce ve sonra *L*-karnitin uygulanmasının, oksidatif stres parametrelerindeki (MDA, NO düzeyleri gibi) yükselmesini önleyici etkisinin olduğu gösterilmiştir (205). Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada sisplatin uygulanan gruptaki serum MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi. Buna karşılık sisplatin ile birlikte verilen epigallocateşin galat serum MDA düzeylerinde düşmeye neden oldu (206). Bizim çalışmamızda da bu sonuçlara uygun olarak sisplatin uygulanan gruptaki serum MDA değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (Tablo 1). Buna karşılık sisplatine kurkumin eklenmesi serum MDA düzeylerinde düşmeye neden oldu. Bu sonuçlar kurkumin kullanımının serumda antioksidan savunma sistemini düzelttiğini göstermektedir. Bu veriler daha önce bahsettiğimiz çeşitli antioksidanların kullanıldığı birçok çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir.

Sisplatin infüzyonundan sonra 3 saat içinde renal kan akımı azalabilmekte ve GFR kan akımının azalmasından sonra düşmektedir (11). %25 hastada tedaviden sonraki 1-2 hafta sonra geri dönüşümlü azotemi oluşmaktadır (63). Daha az bir kısmında ise renal fonksiyonlarda progresif bir düşme olmaktadır. Geri dönüşümsüz böbrek yetmezliği yüksek doz ve çok sayıda uygulamayı takiben gelişir (64). Böbrek yetmezliği rutin hidrasyon ve mannitol kullanımına rağmen olmaktadır. Bir çalışmada ratlara i.p. 7mg/kg sisplatin uygulanmış, uygulamadan 2 gün ve

uygulamadan 10 gün sonra epigallokateşin galat 100mg/kg uygulanmıştır. Sisplatin uygulanan grupta üre ve kreatinin değerlerinin kontrol ve epigallokateşin galat verilen gruba göre istatistiksel olarak artmış olduğu görüldü. Epigallokateşin galatın sisplatin ile birlikte verildiği grupta ise üre ve kreatinin artışının bloke edildiği görüldü (206). Mansour ve arkadaşları 7.5 mg/kg sisplatin ile oluşturdukları nefrotoksisite grubunda serum üre ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubuna göre sırasıyla 2.5 ile 3.3 kat arttığını bildirmişlerdir. Sisplatin öncesi 5 gün ve sonrasında 5 gün amiguanidinle tedavi edilen grupta serum üre ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubundan yüksek olmakla beraber, sisplatin grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (205). Çalışmamızda kullandığımız antioksidan kurkumin ve literatürdeki diğer çalışmalarda nefroprotektif etkisi olan bir çok ajanın, lipid peroksidasyonunu azaltmasıyla birlikte üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı düşüş sağladığı gösterilmiştir. Biyokimyasal olarak elde ettiğimiz bu olumlu sonuçlar histopatolojik bulgularla da desteklenmiştir. Sisplatin ile meydana gelen vakulizasyon, interstisyel ödem, interstisyel inflamasyon, tübüler nekroz ve tübüler atrofi gibi bulguların kurkumin uygulanması ile önemli ölçüde önlendiği görüldü.

Sirtuinler geniş bir protein ailesi olup bakterilerden memelilere kadar birçok cinste ve farklı sayıda bulunmaktadır. Memelilerde yedi farklı gen tarafından kodlanan 1'den 7'ye kadar numaralandırılan 7 farklı sirtuin enzimi tanımlanmıştır. Bu enzimler deasetilasyon veya (mono) ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösterir. Bütün sirtuin enzimleri oksidize NAD⁺ bağımlıdır.

Memelilerde NAD⁺ sentezi nikotinamid fosforiboziltransferaz (NAMPT) ve nikotinamid/nikotinic asit mononükleotid adeniltransferaz (Nmnat) enzimlerinin gerçekleştirdiği iki aşamalı bir yolla gerçekleşir. NAMPT nikotinamidi mononükleotide (NMN), NMN'de Nmnat ile NAD⁺ 'a çevrilir. NAD⁺ sentezinde hız kısıtlayıcı enzim NAMPT'dir (17). İnvitro ve invivo yapılan çalışmalarda ATP sentezindeki azalmanın hücrenin apoptozis ve nekroz ile ölümünde belirleyici olduğu gösterilmiştir (174). AMPK hücredeki ATP miktarındaki azalmayı algılayarak enerji dengesini sürdüren primer düzenleyicilerden biridir (207). AMP/ATP oranının arttığı stres durumlarında (zehirlenme, serbest radikal oluşumu, ısı-şok, hipoksi ve beslenme yetersizliği) AMPK aktive olur. AMPK'nın belli derecede aktivasyonu faydalıyken aşırı aktivasyonu yıkıcı etkilere neden olmaktadır (208, 209).

Resveratrol ve quercetin'in NAMPT ve AMPK'nın ekspresyonunu artırarak indirekt olarak SIRT1 aktivitesini artırır (210-213). AMPK ayrıca NAMPT ekspresyonunu artırarak hücre içi NAD⁺ seviyesini artırır (155). HEK293 hücrelerinde SIRT1'in aşırı ekspresyonuyla LKB1 aracılığıyla AMPK aktivitesini artırmıştır (214). Çalışmamızda NAMPT miktarı sisplatin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, sisplatin ile birlikte kurkumin uygulanan grupta sadece sisplatin uygulanan gruba göre yüksek bulundu. Bu bize aşırı stres durumunda bütün sirtuinlerin aktivasyonunda rol alan NAMPT'nin ya direkt etkilenecek veya AMPK gibi stres durumunu algıladığı ve NAMPT sentezini etkilediği düşünülen proteinlerin miktarındaki değişmeden etkilenecek düşüğünü, stres durumunda eklenen antioksidanın NAMPT sentezini artırdığını göstermektedir.

Sirtuin 1 FOXO3a üzerinden antioksidan gen ekspresyonu artırmakta; p53 üzerinden antiapoptotik etkiler göstermekte; PGC-1 α ve PPAR- γ 'ı etkileyerek enerji üretimini artırmakta, apoptoz ve nekroza giden hücre ölümünü engellemekte; PGC-1 α üzerinden mitogenezi artırmakta; NF- κ B'yi etkileyerek antiinflamatuvar etkiler göstermektedir (130, 131, 136, 137, 145, 215). Resveratrol besini kısıtlanmış hayvanlarda lipid peroksidasyonunu azaltmış ve SIRT1 ekspresyonunu artırmıştır. (216). Quercetin ile yapılan çalışmada SIRT1 sentezini artırdıkları gösterilmiştir (217). Oksidatif stres SIRT1 mRNA seviyesini microRNA'larla inhibe eder. Yamakuchi ve arkadaşları miR-34'ün SIRT1'İN 3'UTR' sine bağlanarak SIRT1 ekspresyonunu inhibe ettiklerini göstermişlerdir (132). İnflamasyonla giden kronik oksidatif stres durumlarında SIRT1'in aktivitesinde ve ekspresyonunda azalma görülmüştür (218). Yaptığımız çalışmada sisplatin verilen grupta kontrol grubuna göre SIRT1 miktarı anlamlı düzeyde düşük bulundu. Sisplatin nefrotoksitesi oluşturulan gruba göre sisplatin ile birlikte kurkumin verilen grupta SIRT1 miktarı anlamlı miktarda yüksek tespit edildi (Tablo 2). Kontrol grubuna göre kurkumin verilen grupta SIRT1 düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Bu bize antioksidanın maruz kalınan stres miktarı arttıkça SIRT1 miktarını daha fazla arttırdığını düşündürmektedir.

SIRT3 stres durumlarında AceCS2' yi deasetile ederek aktive etmekte ve böylece asetatin bir enerji kaynağı olarak kullanılmasını sağlamakta; ATP sentezini mitokondrial elektron transport kompleks I'in asetillenme derecesini etkileyerek

regüle etmekte; antioksidan sistemlerin aktivitesini artırmakta; antioksidan enzimlerin miktarını artıran gen aktivitesini artırmaktadır (164, 167-173).

Zebrafish resveratrol uygulanması sonrası karaciğerlerinde semikantitatif RT-PCR ile yapılan ölçümde resveratrolün PGC1 α ve SIRT1 mRNA seviyelerinde değişiklik oluşturmadığı fakat SIRT3, SIRT4, and NAMPT gen ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (219). Orsolya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada SIRT3 'ün miktarca fazla ekprese olduğu iskelet kası gibi metabolik olarak aktif dokularda değişik koşullarda dinamik olarak regüle olduğu bulunmuştur. Aşırı yağlı beslenmede SIRT3 protein miktarı azalmış, uzun ve kısa süreli açlık ile egzersizde ise SIRT3 miktarı artmıştır. Yine aynı çalışmada SIRT3 miktarındaki azalma durumlarında AMPK fosforilasyonu anlamlı olarak inhibe olmuştur. Bu da PGC-1 α transkripsiyonel ekspresyonunu kas dokusunda azaltmıştır (220). Jinrong Fu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada huntinton hastalığı olan modelden alınan hücrelere viniferin uygulanmış, SIRT3 miktarında artma ve AMPK aktivitesinde artma tespit edilmiştir (221). Çalışmamızda sisplatin uygulanan grupta SIRT3 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, sisplatinle birlikte kurkumin verilen grupta SIRT3 düzeyi sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Aminoasitlerin stimüle ettiği insülin sekresyonu ve GDH aktivitesi insülin adacık hücrelerinde ve kalorisi kısıtlanmış fare karaciğerlerinde artırılmaktadır (180, 183). GDH'in mono-ADP-ribozilasyonu kalori kısıtlanmasının olduğu durumda azalmaktadır. Bu bize SIRT4 aktivitesinin kalori kısıtlanmasında azaldığını düşündürmektedir (180). Bununla birlikte karaciğer NAD⁺ aktivitesi kalori kısıtlanmasında artırılmaktadır (184). SIRT4'ün kalori kısıtlı durumlarda regülasyonu farklı dokularda değişik olmaktadır. Açlık durumlarında GDH aktivitesinin ve aminoasitlerin indüklediği insülin sekresyonunun pankreas adacık hücrelerinde neden artırıldığı açıklık kazanmamıştır. Kalori kısıtlı durumlar gibi oksidatif stres durumuna hem pankreasın, hem glikoneogenezin meydana geldiği organ karaciğerin hem de aktif enerji kullanan dokuların yanıtını inceleyen ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır. Çalışmamızda sisplatin uygulanan grupta böbrekte SIRT4 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, sisplatinle birlikte kurkumin verilen grupta SIRT4 düzeyi sisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu

Sonuç olarak, sisplatin ile birlikte kurkumin verilen grupta NAMPT, SIRT1, SIRT3 ve SIRT4 miktarları sisplatin uygulanan gruba göre yüksek bulundu. Sisplatinle birlikte kurkumin verilen grupta sisplatin verilen gruba göre biyokimyasal ve histopatolojik bozulma daha az oldu. Biyokimyasal ve histopatolojik bulgulardaki düzelmeler, sirtuinler üzerine olan etkiler ile birlikte değerlendirildiğinde kurkuminin antioksidan ve antienflamatuvar yolla sisplatin nefrotoksitesinde koruyucu role sahip olduğu görülmektedir. Kurkuminin bu koruyucu rolünde sirtuinlerin miktarında ve aktivesindeki artışın etkili olduğu ileri sürülebilir.

5. KAYNAKLAR

1. Rosenberg B. Fundamental studies with cisplatin. *Cancer* 1985; 55: 2303-16.
2. Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 2000; 59: 9-17, 37-38.
3. Yilmaz HR, Iraz M, Sogut S, Ozyurt H, Yildirim Z, Akyol O, Gergerlioglu S. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 2004; 50: 287-90.
4. Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2001; 60: 1726-36.
5. Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 2003; 63: 72-82.
6. Faubel S, Ljubanovic D, Reznikov L, Somerset H, Dinarello CA, Edelstein CL. Caspase-1-deficient mice are protected against cisplatin-induced apoptosis and acute tubular necrosis. *Kidney Int* 2004; 66: 2202-13.
7. Ramesh, G. Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002; 110: 835-42.
8. Yamate J. Participation of different macrophage populations and myofibroblastic cells in chronically developed renal interstitial fibrosis after cisplatin-induced renal injury in rats. *Vet Pathol* 2002; 39: 322-33.
9. Meyer KB, Madias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab* 1994;20: 201-13.
10. Tanaka H, Ishikawa E, Teshima S, Shimizu E. Histopathological study of human cisplatin nephropathy. *Toxicol Pathol* 1986; 14: 247-57.
11. Cornelison TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin. *Gynecol Oncol* 1993; 50: 147-158.

12. Tayyem RF, Heath DD, Al-Delaimy WK, Rock CL. Curcumin content of turmeric and curry powders. *Nutr Cancer* 2006; 55: 126-31.
13. Kuhad A, Pilkhwai S, Sharma S, Tirkey N, Chopra K. Effect of curcumin on inflammation and oxidative stress in cisplatin-induced experimental nephrotoxicity. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 10150-10155.
14. Kelly G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: Part 1. *Altern Med Rev* 2010; 15: 245-63.
15. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009; 460: 587-591.
16. Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1645-1651.
17. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23:164-170.
18. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205: 698-699.
19. Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222: 385-386.
20. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 2000; 59: 1-8.
21. Akaboshi M. Binding characteristics of (-)-(R)-2-aminomethylpyrrolidine (1, 1-cyclobutanedicarboxylato)-2-platinum (II) to DNA, RNA and protein molecules in HeLa cells and its lethal effect: comparison with cis- and trans-diamminedichloroplatinums (II). *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:106-11.
22. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59: 657-663.
23. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999; 99: 2467-98.

24. Yang DZ. Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA. *Prog Biophys Mol Biol* 1997; 66: 88-111.
25. Pil PM, Lippard SJ. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* 1992; 256: 234-237.
26. Zamble DB, Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 1995; 20: 435-439.
27. Zamble DB. Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 1996; 35:10004-100013.
28. Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 2001; 61:7369-7374.
29. Sedletska Y, Fourrier L, Malinge JM. Modulation of MutS ATP-dependent functional activities by DNA containing a cisplatin compound lesion (base damage and mismatch). *J Mol Biol* 2007; 369: 27-40.
30. Corda Y. Transcription by eucaryotic and procaryotic RNA polymerases of DNA modified at a d (GG) or a d (AG) site by the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochemistry* 1991; 30: 222-230.
31. Treiber DK. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5672-566.
32. Gong JG. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399: 806-809.
33. Kharbanda S. Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 1995; 376: 785-788.
34. Strasser A. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* 1994; 79: 329-339.
35. Zanke BW, Boudreau K, Rubie E, Winnett E, Tibbles LA, Zon L, et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr Biol* 1990; 6: 606-613.

36. Ishibashi T, Lippard SJ. Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4219-4223.
37. Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* 2003; 103:645-662.
38. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 1997; 57:1835-1840.
39. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185: 1481-1486.
40. Zhou R, Vander Heiden MG, Rudin CM. Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism. *Cancer Res* 2002; 62: 3515-3520.
41. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Pérez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 3-18.
42. Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2478-2480.
43. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol*, 2003; 23: 460-464.
44. Kroning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 43-49.
45. Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993; 67:1171-1176.
46. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:14298-14302.

47. La N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 505-511.
48. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005; 167:1477-1484.
49. Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lopus MG, Hanigan MH. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1-10.
50. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003; 1: 47-61.
51. Hanigan MH, Gallagher BC, Townsend DM, Gabarra V. Gamma-glutamyl transpeptidase accelerates tumor growth and increases the resistance of tumors to cisplatin in vivo. *Carcinogenesis* 1999; 20: 553-9.
52. Lieberthal W, Triaca V, and Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; 270: 700-708.
53. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 2007; 334: 115-124.
54. Kawai Y, Nakao T, Kunimura N, Kohda Y, Gemba M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to Cisplatin-related renal cell injury. *J Pharmacol Sci* 2006; 100: 65-72.
55. Davis CA, Nick HS, Agarwal A. Manganese superoxide dismutase attenuates Cisplatin-induced renal injury: importance of superoxide. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2683-2689.
56. Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 2004; 23: 29-34.

57. Shino Y, Itoh Y, Kubota T, Yano T, Sendo T, Oishi R. Role of poly (ADP-ribose) polymerase in cisplatin-induced injury in LLC-PK1 cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 966-977.
58. Badary OA, Abdel-Maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2005; 76: 2125-2135.
59. Durak I, Ozbek H, Karaayvaz M, Oztürk HS. Cisplatin induces acute renal failure by impairing antioxidant system in guinea pigs: effects of antioxidant supplementation on the cisplatin nephrotoxicity. *Drug Chem Toxicol* 2002; 25: 1-8.
60. Chirino YI, Hernandez-Pando R, Pedraza-Chaverri J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol* 2004; 4: 20.
61. Winston JA, Safirstein R. Reduced renal blood flow in early cisplatin-induced acute renal failure in the rat. *Am J Physiol* 1985; 249: 490-496.
62. Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Inagi R, Miyata T, Ingelfinger JR, et al. Hypoxia-inducible factor modulates tubular cell survival in cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: 1123-1133.
63. Daugaard G, Abildgaard U. Cisplatin nephrotoxicity. A review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989; 25:1-9.
64. Kollmannsberger C, Kuzcyk M, Mayer F, Hartmann JT, Kanz L, Bokemeyer C. Late toxicity following curative treatment of testicular cancer. *Semin Surg Oncol* 1999; 17: 275-281.
65. Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Nielsen S, Frøkiaer J, Ostergaard LF, Magnesium depletion enhances cisplatin-induced nephrotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 56: 535-5442.
66. Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. *Drug Saf* 200; 24: 19-38.
67. Goren MP. Cisplatin nephrotoxicity affects magnesium and calcium metabolism. *Med Pediatr Oncol* 2003; 41:186-189.

68. Lajer H, Daugaard G. Cisplatin and hypomagnesemia. *Cancer Treat Rev* 1999; 25: 47-58.
69. Vickers AE, Rose K, Fisher R, Saulnier M, Sahota P, Bentley P. Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Toxicol Pathol* 2004; 32: 577-90.
70. Diplock A. *Healthy Lifestyles Nutrition and Physical Activity: antioxidant nutrients*. Belgium: ILSI Europe concise monograph series, 1998.
71. Nawar WW, Fennema OR. Lipids. Fennema OR (ed). *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1996: 225-319.
72. Evans P, Halliwell B. Free radicals and hearing. Cause, consequence, and criteria. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 884: 19-40.
73. Schrader M, Fahimi HD. Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 383-393.
74. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 2006; 141: 312-322.
75. Zhou H, Kato A, Miyaji T, Yasuda H, Fujigaki Y, Yamamoto T, et al. Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 616-623.
76. Elliot JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech* 1999; 53: 46-48.
77. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3122-3128.
78. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 27: 969-978.
79. Duthie GG, Wahle KW, James WP. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr Res Rev* 1989; 2: 51-62.

80. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 194-200.
81. Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res* 1995; 22: 375-383.
82. Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991; 57: 1-7.
83. Milobedzka J. Structure. *Chem Ber* 1910; 43: 2163.
84. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15: 1867-1876.
85. Jovanovic SV. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 9677-9680.
86. Wahlstrom B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol* 1978; 43: 86-92.
87. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin-studies with (3H) curcumin. *Toxicology* 1981; 22: 337-344.
88. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione) in the rat. *Xenobiotica* 1978; 8: 761-768.
89. Ravindranath V, Chandrasekhara N. In vitro studies on the intestinal absorption of curcumin in rats. *Toxicology* 1981; 20: 251-257.
90. Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 486-494.
91. Ireson C, Orr S, Jones DJ, Verschoyle R, Lim CK, Luo JL, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in human and rat hepatocytes and in the rat in vivo, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E2 production. *Cancer Res* 2001; 61: 1058-1064.

92. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 1994; 137: 1-8.
93. Reddy AC, Lokesh BR. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Mol Cell Biochem* 1992; 111: 117-124.
94. Cohly HH, Taylor A, Angel MF, Salahudeen AK. Effect of turmeric, turmerin and curcumin on H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 49-54.
95. Dikshit M, Rastogi L, Shukla R, Srimal RC. Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. *Indian J Med Res* 1995; 101: 31-35.
96. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1303-1312.
97. Nirmala C, Puvanakrishnan R. Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 1996; 159: 85-93.
98. Nirmala C, Puvanakrishnan R. Effect of curcumin on certain lysosomal hydrolases in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 47-51.
99. Manikandan P, Sumitra M, Aishwarya S, Manohar BM, Lokanadam B, Puvanakrishnan R. Curcumin modulates free radical quenching in myocardial ischaemia in rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1967-1980.
100. Calabrese V, Butterfield DA, Stella AM. Nutritional antioxidants and the heme oxygenase pathway of stress tolerance: novel targets for neuroprotection in Alzheimer's disease. *Ital J Biochem* 2003; 52: 177-181.
101. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci* 2004; 74: 969-985.

102. Qiao L, Kozoni V, Tsioulis GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1258: 215-223.
103. Subbaramaiah K, Telang N, Ramonetti JT, Araki R, DeVito B, Weksler BB, Dannenberg AJ. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1996; 56: 4424-4429.
104. Fang HY, Lin TS, Lin JP, Wu YC, Chow KC, Wang LS. Cyclooxygenase-2 in human non-small cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 171-7.
105. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-412.
106. Zhang F, Altorki NK, Mestre JR, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis* 1999; 20: 445-451.
107. Hong J, Bose M, Ju J, Ryu JH, Chen X, Sang S, et al. Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A (2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1671-1679.
108. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutat Res* 2001; 480-481: 243-268.
109. Chin K, Kurashima Y, Ogura T, Tajiri H, Yoshida S, Esumi H. Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 1997; 15: 437-442.
110. Blough NV. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Indian J Exp Biol* 1995; 24: 3502-3505.
111. Szabo C, Ohshima H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1997; 1: 373-385.

112. Landino LM, Crews BC, Timmons MD, Morrow JD, Marnett LJ. Peroxynitrite, the coupling product of nitric oxide and superoxide, activates prostaglandin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15069-15074.
113. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999; 45: 7-17.
114. Luque I, Gelinas C. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 1997; 8: 103-111.
115. Singh S, Aggarwal BB. Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) (corrected). *J Biol Chem* 1995; 270: 24995-5000.
116. Sarkar FH, Li Y. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutat Res* 2004; 555: 53-64.
117. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 745-756.
118. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM. et al. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 943-945.
119. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2005; 70: 700-713.
120. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4623-4635.
121. Sauve AA. Sirtuin chemical mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1804: 1591-603.
122. Ziegler M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* 2000; 267: 1550-1564.

123. Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006; 20: 2913-2921.
124. Denu JM. Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD (+)-dependent deacetylases. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 41-48.
125. Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, Lane WS, Seto E. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 2007; 27: 149-162.
126. Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 2008; 14: 312-323.
127. Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 2008; 135: 907-18.
128. Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 2007; 450: 440-444.
129. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 2004; 303: 2011-2015.
130. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM Jr, Sistonen L, Morimoto RI, et al. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009; 323:1063-1066.
131. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 2001; 107: 137-148.
132. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:13421-13426.
133. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 2007; 404: 1-13.

134. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004; 23: 2369-23680.
135. Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 2002; 21:2383-2396.
136. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 2009; 136: 62-74.
137. Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 303-309.
138. Prozorovski T, Schulze-Topphoff U, Glumm R, Baumgart J, Schröter F, Ninnemann O, et al. Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 385-394.
139. Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 241-251.
140. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1{alpha}. *J Biol Chem* 2005; 280: 16456-16460.
141. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005; 434: 113-118.
142. Liu Y, Dentin R, Chen D, Hedrick S, Ravnskjaer K, Schenk S, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange. *Nature* 2008; 456: 269-73.
143. Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Méneur C, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2005; 2: 105-117.

144. Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006; 4: 31.
145. Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 2008; 582: 46-53.
146. Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, et al. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008; 105: 3374-3379.
147. Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martínez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 672-678.
148. Civitarese AE, Carling S, Heilbronn LK, Hulver MH, Ukropcova B, Deutsch WA, et al. Calorie restriction increases muscle mitochondrial biogenesis in healthy humans. *PLoS Med* 2007; 4: 76.
149. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 2008; 134: 317-328.
150. Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutiérrez-Juárez R, Rossetti L, et al. SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 2008; 8: 333-341.
151. Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 9793-9798.
152. Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 2007; 6: 307-319.
153. Weyrich P, Machicao F, Reinhardt J, Machann J, Schick F, Tschritter O, et al. SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention--the TULIP Study. *BMC Med Genet* 2008; 9: 100.

154. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 2006; 127: 1109-22.
155. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458: 1056-1060.
156. Deng CX. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci* 2009; 5: 147-152.
157. Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, Guarente L. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 2007; 28: 91-106.
158. Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev* 2007; 21: 2644-2658.
159. Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, et al. SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14855-14860.
160. Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 2004; 305: 1010-1013.
161. Fainzilber M, Twiss JL. Tracking in the Wlds-the hunting of the SIRT and the luring of the Draper. *Neuron* 2006; 50: 819-821.
162. Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab* 2008; 8: 38-48.
163. Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J* 2007; 26: 3169-3179.
164. Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:10230-10235.

165. Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT. Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J Biol Chem* 2001; 276: 11420-11426.
166. Sakakibara I, Fujino T, Ishii M, Tanaka T, Shimosawa T, Miura S, et al. Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. *Cell Metab* 2009; 9: 191-202.
167. Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 14447-14452.
168. Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell* 2010; 40: 893-904.
169. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell* 2010; 143: 802-812.
170. Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, et al. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 2010; 327: 1000-1004.
171. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M, et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci* 2008; 4: 291-299.
172. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2758-2771.
173. Kong X, Wang R, Xue Y, Liu X, Zhang H, Chen Y, et al. Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS One* 2010; 5: 11707.
174. Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death Differ* 1997; 4: 429-434.

175. Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* 2007; 130: 1095-1107.
176. Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 6384-6401.
177. Allison SJ, Milner J. SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle* 2007; 6: 2669-2677.
178. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280: 13560-13567.
179. Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, et al. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 2007; 282: 33583-33592.
180. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 2006; 126: 941-954.
181. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8807-8814.
182. Stanley CA. Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism. *Mol Genet Metab* 2004; 81: 45-51.
183. Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. Caloric restriction increases gluconeogenic and transaminase enzyme activities in mouse liver. *Exp Gerontol* 2003; 38: 267-278.
184. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell* 2009; 137: 560-570.
185. Hersh LB. The insulysin (insulin degrading enzyme) enigma. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2432-2434.

186. Lu H, Yang Y, Allister EM, Wijesekara N, Wheeler MB. The identification of potential factors associated with the development of type 2 diabetes: a quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1434-1451.
187. Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor (PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 804-816.
188. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307: 426-430.
189. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, et al. Retraction. *Science* 2007; 318: 565.
190. Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 2007; 6: 363-375.
191. Li Y, Zhang Y, Dorweiler B, Cui D, Wang T, Woo CW, et al. Extracellular Nampt promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem* 2008; 283: 34833-34843.
192. Tanaka T, Nabeshima Y. Nampt/PBEF/Visfatin: a new player in beta cell physiology and in metabolic diseases? *Cell Metab* 2007; 6: 341-343.
193. Romacho T. Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *Diabetologia* 2009; 52: 2455-2463.
194. Revollo JR, Grimm AA, Imai S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 50754-50763.
195. Fulco M. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell* 2008; 14: 661-673.
196. Poirier P. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific

- Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 2006; 113: 898-918.
197. Garten A. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 130-138.
198. Nakahata Y. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 2009; 324: 654-657.
199. Karatepe M. Simultaneous Determination of Ascorbic Acid and Free Malondialdehyde in Human Serum by HPLC– UV Lcgc North America, 2004; 22: 362-365.
200. Tuzcu M. Deneysel olarak oluşturulan diyabetik ratlarda hipokampus ve beyin korteksinden n-cam protein ekspresyonu ve buna melatonin ve vitamin E'nin etkisi. Elazığ: Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004.
201. Baydas G, Tuzcu M. Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp Neurol* 2005; 194: 175-181.
202. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histology- A Text and Atlas (ki sp k)*, Baltimore: Williams and Wilkings, 1989.
203. Naziroglu M, Karaoglu A, Aksoy AO. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. *Toxicology* 2004; 195: 221-230.
204. Dogukan A, Tuzcu M, Agca CA, Gencoglu H, Sahin N, Onderci M, et al. 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* 2010; 63: 427-434.
205. Sayed-Ahmed MM. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Chemotherapy* 2004; 50: 162-170.
206. Timurkan M. Sisplatin Nefrotoksisitesi Oluşturulan Ratlarda Epigallokateşin Gallatın Etkisinin Araştırılması. Elazığ: Tıpta Uzmanlık Projesi, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, 2010.

207. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 18-24.
208. Marino G. Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2196-2211.
209. Cao C. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H₂O₂-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *J Biol Chem* 2008; 283: 28897-28908.
210. Suchankova G. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 378: 836-841.
211. Mukherjee S. Expression of the longevity proteins by both red and white wines and their cardioprotective components, resveratrol, tyrosol, and hydroxytyrosol. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 573-8.
212. Hou X, Xu S, Maitland-Toolan KA, Sato K, Jiang B, Ido Y, et al. SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2008; 283: 20015-20026.
213. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 2010; 59: 554-563.
214. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 2008; 283: 27628-27635.
215. Canto C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 98-105.
216. Franco JG, de Moura EG, Koury JC, Trotta PA, Cordeiro A, Souza LL, et al. Resveratrol reduces lipid peroxidation and increases sirtuin 1 expression in adult animals programmed by neonatal protein restriction. *J Endocrinol* 2010; 207: 319-28.
217. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. et al. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296: 1071-1077.

218. Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 861-870.
219. Schirmer H, Pereira TC, Rico EP, Rosemberg DB, Bonan CD, Bogo MR, Souto AA. Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1alpha and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 3281-3289.
220. Palacios OM, Carmona JJ, Michan S, Chen KY, Manabe Y, Ward JL, et al. Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1alpha in skeletal muscle. *Aging (Albany NY)* 2009; 1: 771-783.
221. Fu J, Jin J, Cichewicz RH, Hageman SA, Ellis TK, Xiang L, et al. Trans-(-)-epsilon-Viniferin increases mitochondrial Sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK) and protects cells in models of Huntington Disease. *J Biol Chem* 2012; 287: 24460-24472.

6. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Bingöl'de doğdum. İlköğretim 5. sınıfa kadar Bingöl'de okuduktan sonra ilköğretimin kalan kısmını, ortaöğretimi ve liseyi Elazığ'da tamamladım. 1999 yılında yükseköğrenime başladığım İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden 2006 yılında mezun oldum. Haziran 2009 tarihinde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Bölümünden istifa ederek Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Kliniğinde başladığım ihtisasa devam etmekteyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.