



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2021; 35 (3): 178 - 186
http://www.fusabil.org

Zeynep TUZCU ^{1, a}
Ökkeş YILMAZ ^{1, b}

¹ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-5331-4893

^b ORCID: 0000-0002-8276-4498

Sisplatin Uygulanan Ratlarda Oluşturulan Nefrotoksisitede Melatoninin NAMPT/SIRT-1 Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi *

Nefrotoksisite, geniş kullanım alanına sahip antineoplastik bir ilaç olan sisplatinin en yaygın yan etkisidir. Bu nedenle bir doz sisplatin alındıktan sonra renal fonksiyonlarında gerileme meydana gelen hastalarda sisplatin kullanımı %25-35 oranında kısıtlanmaktadır. Sisplatinden kaynaklanan nefrotoksisite böbrekte artış gösteren oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu çalışmada sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede bir antioksidan olarak melatoninin, sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeyde nasıl etki gösterdiğini araştırdık. Bu çalışma, tek doz intraperitoneal (i.p.) sisplatin uygulamasıyla oluşturulan bir rat nefrotoksisite modelinde melatonin uygulamasının böbreklerde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Melatonin verilen hayvanlarda serum üre ve kreatinin değerleri, renal bozulmanın sisplatin enjekte edilen gruba oranla belirgin biçimde azaldığını ortaya koymuştur. Böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂α seviyeleri sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Melatonin tedavisi alan ratlarda, SIRT-1 protein ekspresyon seviyesi belirgin biçimde artış yönünde düzenlenirken NAMPT, COX-2, TGF-β1 ve TNF-α proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ise azalmıştır. Histopatolojik bulgular; melatoninle ön tedavinin, sisplatin kaynaklı tübüler nekroz başta olmak üzere sisplatin tarafından oluşturulan çoğu değişimi de önlediğini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, sisplatin ile oluşturulmuş böbrek hasarında melatoninin NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağını düzenleyerek COX-2, TGF-β1 ve TNF-α inhibisyonu yoluyla yangıyı azaltarak bir iyileşme sağlayabildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, nefrotoksisite, melatonin, NAMPT, SIRT-1

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

Nephrotoxicity is the most relevant side effect of widely used antineoplastic drug cisplatin. Therefore use of cisplatin is limited with about 25–35% of patients experiencing a significant reduction in renal function after a single dose of cisplatin. Cisplatin-induced nephrotoxicity is related to an increase in oxidative stress in the kidney. In the present study, we investigated biochemically, histopathologically and at the molecular level how the melatonin display antioxidant effect against cisplatin-induced nephrotoxicity. The present study demonstrates that the administration of melatonin exerts a renal protective effect in a rat model of nephrotoxicity provoked by a single intraperitoneal (i.p.) injection of cisplatin. In the animals that receive melatonin, the levels of serum urea and creatinine indicating reduced renal injury were significantly lower as compared to the cisplatin injected group. The renal tissue MDA and 8-iso-PGF₂α levels showed a significant increase in cisplatin-treated rats compared the control rats. SIRT-1 protein expression levels were significantly up-regulated while NAMPT, COX-2, TGF-β1 and TNF-α protein expression level were down-regulated in rats treated with melatonin. Histopathological findings showed that melatonin pretreatment decreased the cisplatin-induced tubular necrosis and most of the changes produced by cisplatin. Taken together, results of this study indicate that melatonin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity by modulating NAMPT/SIRT-1 signaling, and reducing the inflammation by inhibiting COX-2, TGF-β1 and TNF-α.

Key Words: Cisplatin, nephrotoxicity, melatonin, NAMPT, SIRT-1

Geliş Tarihi : 25.09.2021
Kabul Tarihi : 02.11.2021

Giriş

Sisplatin çeşitli kanser türlerinin tedavisi için yaygın olarak kullanılan platin bazlı bir antineoplastik ilaçtır (1, 2). Ancak çoklu organ toksisitesi ve özellikle böbrek üzerindeki sitotoksik etkisi nedeniyle kullanımı sınırlıdır (3, 4). Son çalışmalar sisplatinin, DNA mutasyonlarını, hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indüklediğini göstermiştir (5). Sisplatin, böbrek dokularında diğer organlardan çok daha fazla birikir. Proksimal tübüler hücrelerdeki konsantrasyonu, kandakinin yaklaşık beş katıdır (6, 7). Ayrıca, sisplatin kaynaklı nefrotoksisitede sıklıkla böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin arttığı bildirilmiştir (8, 9). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak anlaşılacakla birlikte; hipoksi, serbest radikaller, inflamasyon ve apoptoz gibi çeşitli mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir. Sisplatin uygulamasıyla oluşan serbest oksijen radikalleri oksidatif stresin şiddetiyle paralel doğrultuda artış gösterir. Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikallerin aşırı üretimi ve oksidatif strese bağlı lipid

Yazışma Adresi Correspondence

Zeynep TUZCU
Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ – TÜRKİYE

ztuzcu@firat.edu.tr

* Bu araştırma FÜBAP Koordinasyon Birimi tarafından (FÜBAP/ FF.11.21) desteklenmiştir.

peroksidasyonunun ortaya çıkması, sisplatin kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir (10, 11). Sisplatin nefrotoksisitesini ve diğer yan etkileri azaltmak için deneysel ve klinik çalışmalarda çeşitli ilaçlar kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda (8, 12-17) sisplatinin daha çok aşırı serbest radikal üretimiyle oksidatif renal hasar yaptığına dair kanıtlar ileri sürülmüştür. Bu nedenle çeşitli antioksidan maddelerin deney hayvanlarında sisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede önleyici rolleri çalışılmıştır.

Melatonin pineal bez, immün sistem hücreleri, beyin, solunum epiteli, kemik iliği, bağırsak, ovaryum, erbezleri ve benzer diğer dokular tarafından salgılan bir hormondur (18, 19). Melatonin vücuda her yoldan uygulanabilen, hızla absorbe olabilen ve ileri derecede lipofilik özelliği nedeniyle tüm dokulara kolayca yayılabilen, direkt olarak serbest radikalleri giderici güçlü bir antioksidandır (20-22). Serbest radikaller, hücre zarında bulunan membran fosfolipidleri ile lipid peroksidasyonu denilen bir reaksiyona girerek malondialdehit (MDA) adı verilen bir ürünün oluşmasına neden olmaktadır. Oksidatif stres olarakta bilinen bu reaksiyon sonucu, hücre membranının stabilitesi bozulmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir (8, 13, 23). Lipid peroksidasyonu sonucu non-enzimatik olarak araşidonik asitten üretilen 8-iso-prostaglandin F₂α (8-iso-PGF₂α) son yıllarda oksidatif hasarın güvenilir bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Serbest radikal hasarlı hayvan modellerinde 8-iso-PGF₂α miktarının yüksek seviyelerde olduğu rapor edilmiştir (9, 24). Nicotin Amide Phosphoribosyl Transferase (NAMPT) B lenfosit öncülleri için bir büyüme faktörü olarak tanımlanır (25). Böbrekteki mesanjial hücrelerin aynı zamanda NAMPT salınımında yüksek yeteneğe sahip olduğu bildirilmiştir. NAMPT; nefropatide önemli bir parakrin rolü ve böbrek iltihabı varlığında seviyesi anlamlı derecede yüksek olan bir enzimdir (26-28). Sirtuin-1 (SIRT1) hücrel düzenlemede görev alan proteinlerin deasetilasyonundan sorumlu bir enzimdir. Yapılan araştırmalarda SIRT-1'in ekspresyonunun artması ile sisplatinle bağlı hücre hasarını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. SIRT-1, glomerüler mesanjial hücrelerde TGF-β1 kaynaklı apoptozisi inhibe ederek böbrekte glomerüler hastalıkların önlenmesi için yeni bir strateji sağlayabilir (29-30). Siklooksijenaz-2 (cox-2) genellikle kanser, yangı ve iltihabi reaksiyonlarda fazla oranda sentezlenen bir enzimdir. Siklooksijenaz-2 sentezi dokularda, hormonlar, büyüme faktörleri, endotoksinler ve sitokinler tarafından indüklenmektedir. Bu uyarıcı faktörler, hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlandığında, bazı protein kinazlar aktive olmakta buna bağlı olarak da Nuclear Factor kappa B (NF-κβ) aktifleşerek çekirdekte cox-2 gen promotör bölgesinden cox-2 enzim sentezini teşvik etmektedir (24, 31). Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) proteini hücrel büyüme, çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve bağışıklık sisteminin kontrolü gibi birçok hücrel ve moleküler işlevde aktif rol almaktadır. Birçok hücre TGF-β1 proteinini sentezlemekte ve hemen hepsinde bu proteine spesifik reseptörler bulunmaktadır (32, 33). Tümör nekroz faktör-alfa (TNF-α) makrofajlar tarafından üretilen çok fonksiyonlu bir sitokindir. Hücre çoğalması

ve değişimi, apoptoz, lipid metabolizması, pıhtılaşma gibi geniş bir biyolojik spektrumda görev alırlar. Akut inflamasyon ve obezitede TNF-α ekspresyonu artar (34).

Böbreklerde sisplatin kaynaklı oksidatif stres, antioksidanların kullanıldığı tedavilerle kısmen önlenmiştir (4, 9, 11-14). Melatonin'in sisplatin toksisitesine karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (1, 11). Bununla birlikte, melatoninin sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada; antikanserojen ilaç olarak klinikte sıklıkla kullanılan ksenobiyotik özellikli sisplatinin ratlarda oluşturduğu nefrotoksisitede NAMPT/SIRT-1 sinyal yolağındaki mekanizmalar üzerine antioksidan özellikli melatoninin etkinliği araştırıldı. Bu amaçla; serum üre ve kreatinin, böbrek dokusu MDA ve 8-iso-PGF₂α düzeyleri ölçüldü. Böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF-β1 ve TNF-α düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edildi. Histolojik değişiklikler değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'ndan (FÜHADEK), onay alındıktan sonra (Tarih: 20.01.2011, Toplantı: 2011/1, Karar No: 21), çalışma standart deneysel hayvan çalışmaları etik kurallarına uygun olarak yapıldı.

Hayvanlar ve Deneme Düzeni: Çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen ve ağırlıkları 210±5 g arasında değişen erkek Wistar albino cinsi ratlar kullanıldı (n=40, 8 haftalık). Deney hayvanlarının buldukları nisbi nem %55 ±5, ortam sıcaklığı 22±2 °C ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde takip edildi. Hayvanlara yem ve su *ad libitum* olarak verildi.

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

Ratlar rastgele aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

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

Melatonin, her bir rata 4 mg/kg/gün dozunda karanlık periyoda geçmeden hemen önce i.p. enjeksiyonla sisplatin uygulamasından 2 gün önce ve

uygulamadan sonra 10 gün toplam 12 gün süreyle günde 1 kez olacak şekilde verildi. Sisplatin uygulamasından 10 gün sonra ratlar anestezi altında dekapite edilerek analizler için doku örnekleri alındı ve analizler yapıncaya kadar -80 °C'de saklandı. Böbrekler histolojik inceleme için hemen %20 nötr tamponlu formalin solüsyonunda sabitlendi. Serum üre-azotu ve kreatinin ölçümleri için kan alındı.

Laboratuvar Analizleri: Kan örnekleri 3000 g'de 10 dk süreyle santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Serum üre nitrojeni ve kreatinini biyokimyasal analizör ile (Olympus AU-660, Japonya) ölçüldü. Doku MDA seviyeleri, yüksek basınçlı sıvı kromatografisiyle (HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japonya) analiz edildi (35). 8-iso-PGF2α düzeyleri enzyeme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemine göre çalışan ticari kitlerle (Cayman Chemical, MI, USA) ELISA cihazında (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Vermont) ölçüldü.

Böbrek dokusu 1:10 (w/v)'luk soğuk hipotonik tampon [10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, ve 0.1 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF)] içinde homojenize edildi. Doku homojenatlarına %10'luk Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisinden 80 µL ilave edildi ve karışım 14.000 g'de 2 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatantlar yeni tüplere alındı. Pellet, 40 µL %10'luk NP-40 ilaveli soğuk hipotonik tamponun 500 µL'si ile bir kez yıkandı. Daha sonra 200 µL tampon [50 mM HEPES (pH 7.8), 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, %20 gliserol] içerisinde yeniden süspanse edildi ve 14.800 g'de 5 dakika boyunca santrifüj işlemi yapıldı. Elde edilen süpernatant yeni tüplere alındı. Protein konsantrasyonu Lowry prosedürüne uygun şekilde protein ölçüm kiti kullanılarak (Sigma, St. Luis, MO, ABD) ölçüldü. Sodyum dodecyl sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) içinde eşit miktarlarda (50 µg) protein, elektroforez için kullanıldı (36). Arkasından nitrosellülöz membranlara (Schleicher and Schuell Inc, Keene, NH, USA) aktarıldı. Nitrosellülöz membranlar PBS içinde 5 dakika süreyle 2 kez yıkandı ve %1'lik siğir serum albümini içerisinde primer antikor uygulamasından önce 1 saat bekletildi. Primer antikor [NAMPT, SIRTUIN-1, COX-2, TGF-β1, TNF-α (Abcam, Cambridge, İngiltere)] %0.05 Tween-20 içeren aynı tampon içinde 1:1000 oranında dilüe edildi. Nitrosellülöz membran gece boyunca 4°C'de primer antikorları ile inkübe edildi. Biotlar yıkandı ve sekonder antikor [horseradish peroksidaz-conjugated goat anti mouse IgG (Abcam, Cambridge, İngiltere)] ile inkübe edildi. Spesifik bağlanma, diaminobenzidin ve H₂O₂ substratları kullanılarak tespit edildi. Protein yükleme β-aktin antikoruna (A5316; Sigma) karşı monoklonal bir mouse antikorunu kullanılarak kontrol edildi. Protein düzeyleri bir görüntü analiz sistemi (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) ile dansitometrik olarak analiz edildi.

Her bir rattan alınan sol böbrek histolojik inceleme için hemen %20'lik nötr tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edildi. Daha sonra yavaş yavaş dehidrate edilip parafine gömüldü. Parafin bloklar standart işlemlere uygun olarak 5 µM'lik kesitler halinde kesilerek

hematoksilin-eosin boyası ile boyandı. Her bir böbrek lamı için minimum 10 alan incelendi. Vaküoler dejenerasyon, tübüler atrofi ve dilatasyon, tübüler nekroz, interstisyel ödem ve inflamasyon semikantitatif olarak değerlendirildi. Değişimin şiddetini belirlemede kullanılan derecelendirme sistemi: (-): yok, (+): hafif derece hasar, (++) : orta derece hasar, (+++): şiddetli hasar olarak belirlendi.

Verilerin değerlendirilmesinde SAS (2002) istatistik paket programı kullanıldı (37). Veriler varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Değişkenler ortalamaya±standart hata olarak gösterildi. Grup içi farklılığı ortaya koymak amacıyla Fisher LSD post hoc testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık P<0.05 olarak kabul edildi.

Bulgular

Serum üre ve kreatinin düzeyleri Şekil 1A ve B'de gösterilmiştir. Melatonin uygulanan grupta üre ve kreatinin düzeylerinde kontrol gruplarına göre önemli bir değişim görülmemiştir (P>0.05). Kontrol grubuna göre, sisplatin uygulanmış grupta, üre ve kreatinin düzeylerinde önemli ölçüde artış tespit edilmiştir (P<0.001). Sisplatin grubuna göre, melatonin+sisplatin grubunda ise üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı bir azalış tespit edilmiştir (P<0.001).

Böbrek dokusu MDA ve 8-iso-PGF2α düzeyleri Şekil 2A ve B'de gösterilmiştir. Melatonin uygulanan grupta MDA ve 8-iso-PGF2α düzeylerinde kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir (P>0.05). Kontrol grubuna göre, sisplatin uygulanmış grupta, MDA ve 8-iso-PGF2α düzeylerinde önemli ölçüde artış tespit edilmiştir (P<0.001). Sisplatin grubuna göre, melatonin+sisplatin grubunda ise MDA ve 8-iso-PGF2α düzeylerinde anlamlı bir azalış tespit edilmiştir (P<0.001).

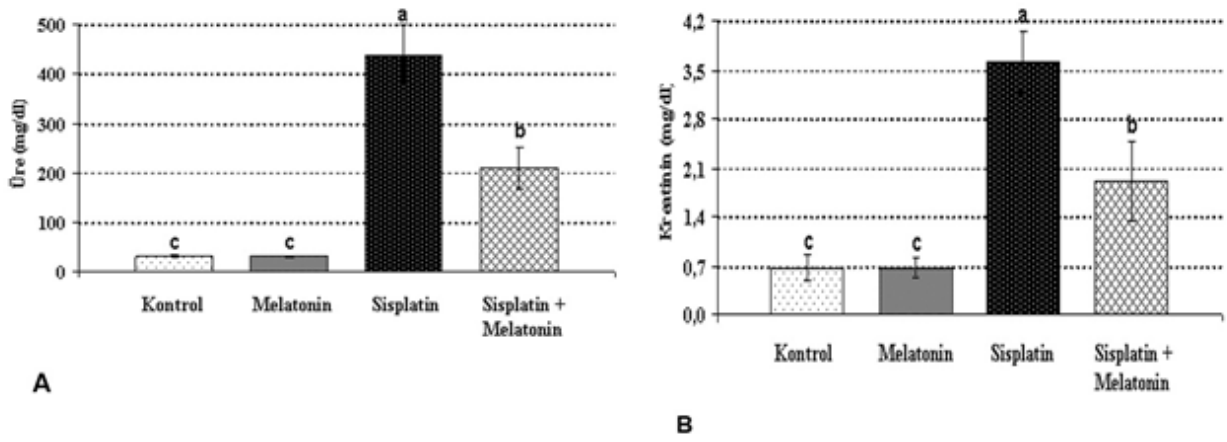
Böbrek dokusu NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF-β1 ve TNF-α düzeyleri Şekil 3A, B, C, D ve E'de gösterilmiştir. Melatonin uygulanan grupta NAMPT, SIRT-1, COX-2, TGF-β1 ve TNF-α düzeylerinde kontrol gruplarına göre önemli bir değişim görülmemiştir (P>0.05). Kontrol grubuna göre, sisplatin uygulanmış grupta, SIRT-1 (P<0.05) düzeyinde bir düşüş, NAMPT (P<0.05), COX-2 (P<0.05), TGF-β1 (P<0.05) ve TNF-α (P<0.05) düzeylerinde ise belirgin bir ölçüde artış tespit edilmiştir. Sisplatin grubuna göre, melatonin+sisplatin grubunda, NAMPT (P<0.05), COX-2 (P<0.05), TGF-β1 (P<0.05) ve TNF-α (P<0.05) düzeylerinde anlamlı bir azalış, SIRT-1 düzeyinde ise artış tespit edilmiştir (P<0.05).

Kontrol ve melatonin grubundaki ratlardan alınan böbreklerde herhangi bir patoloji gözlenmedi. Buna karşılık, sisplatin verilen grupta korteks ve dış medullada orta şiddete vakuolizasyon, hafif şiddette interstisyel ödem ve inflamasyon, şiddetli derecede tübüler nekroz gözlemlendi. Melatonin+sisplatin grubunda ise sisplatinin indüklediği histopatolojik değişikliklerin şiddetinin azaldığı görüldü (Tablo 1, Şekil 4A, B, C ve D).

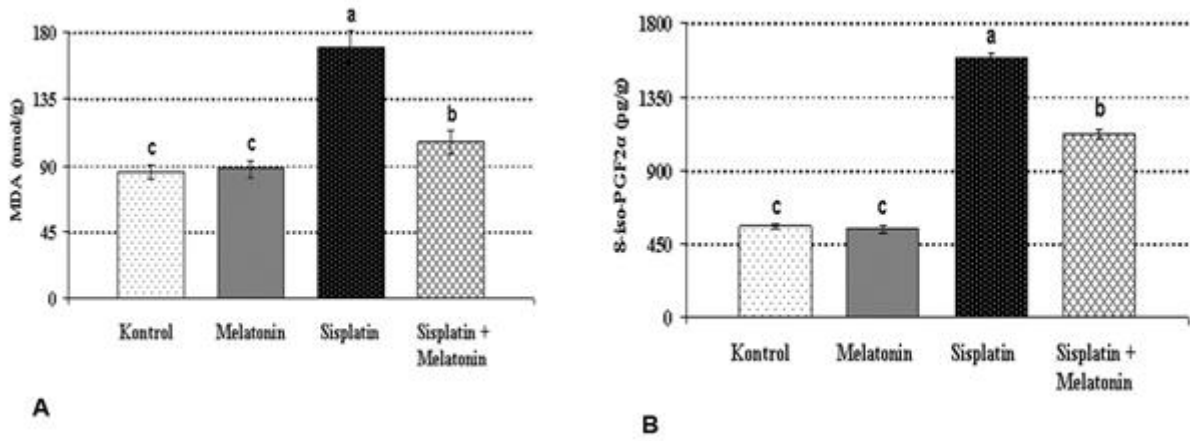
Tablo 1. Melatonin uygulamasının rat böbrek dokusunda morfolojik değişiklikler üzerine etkisi

Morfolojik Değerlendirme	Kontrol	Melatonin	Sisplatin	Melatonin +Sisplatin
Tübüler Rejenerasyon	-	-	+	-
Tübüler Dilatasyon	-	-	++	+
Tübüler Vakuolizasyon	+	+	++	+
İnterstitial İnflamasyon	-	-	+	-
Tübüler Nekroz	-	-	+++	+

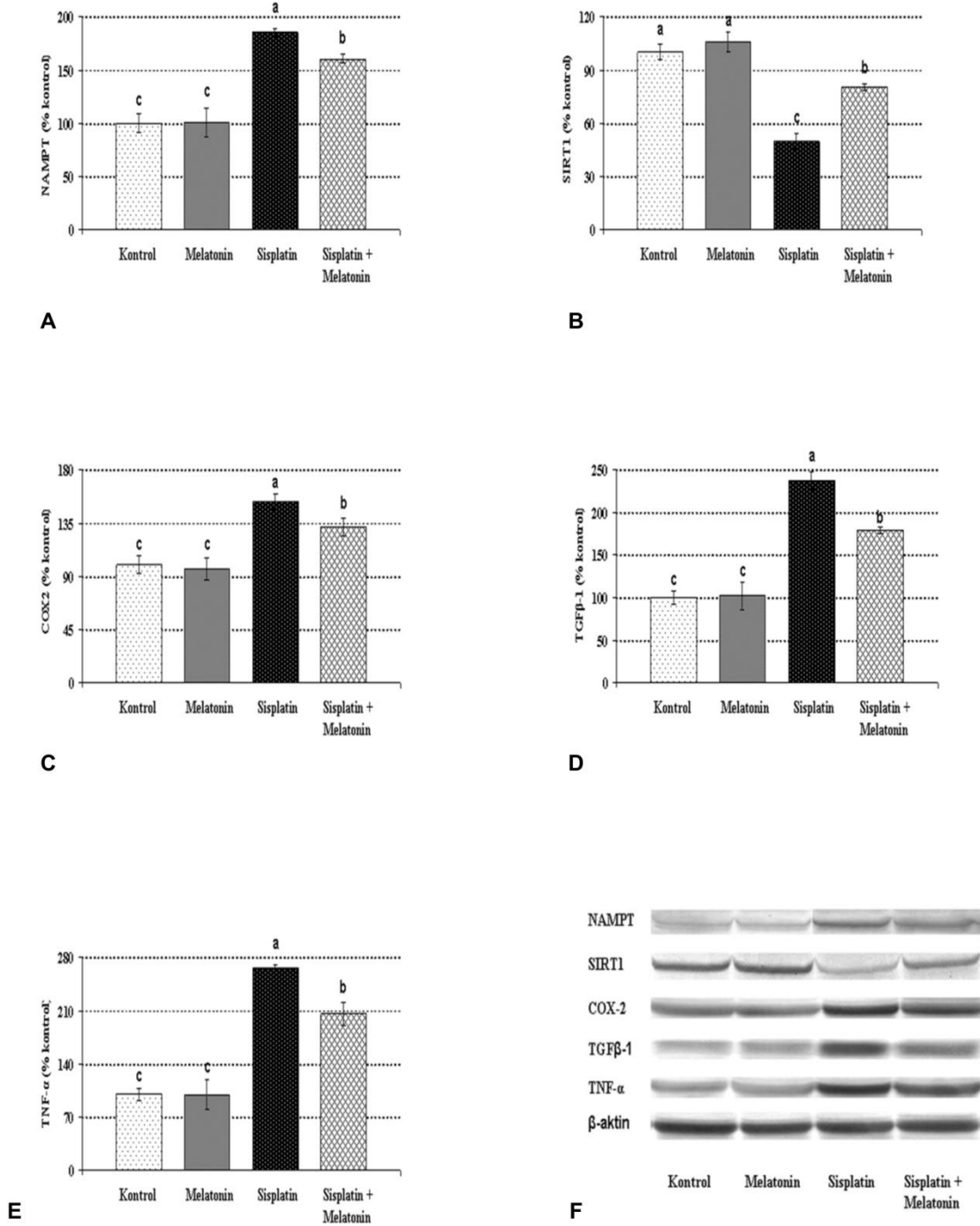
- : Yok, + (Hafif) : < % 25, ++ (Orta) : % 25-50 arası, +++ (Şiddetli) : % 50'den fazla



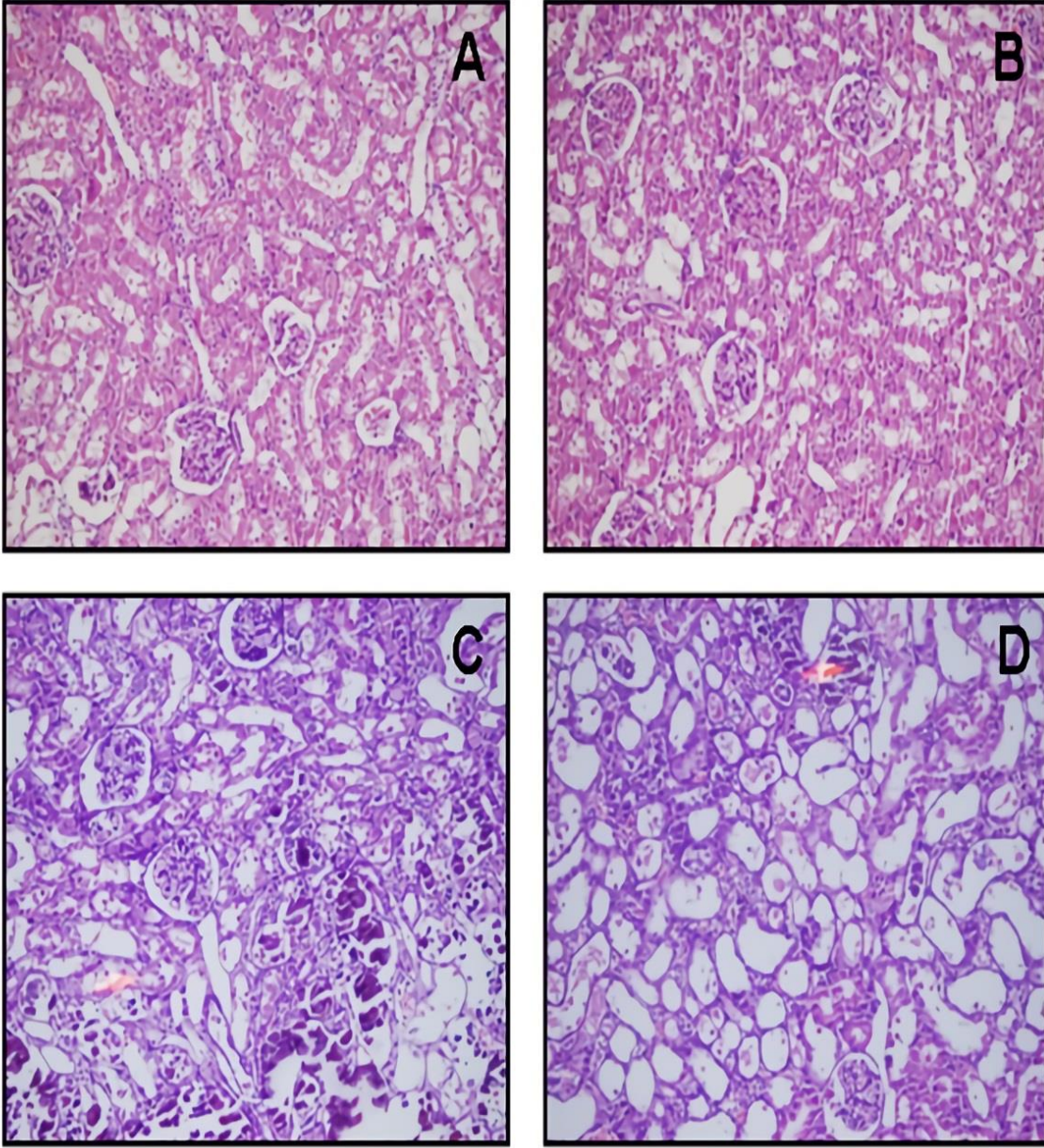
Şekil 1. Serum; üre (A) ve kreatinin (B) düzeyleri, [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (p<0.05)].



Şekil 2. Böbrek dokusu; MDA (A) ve 8-iso-prostaglandin F₂α (B) düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir (p<0.05)].



Şekil 3. Böbrek dokusu; NAMPT (A), SIRT-1 (B), COX-2 (C), TGFβ-1 (D), TNF-α (E) düzeylerindeki değişimler ve Western blot bantları (F) [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.05$)].



Şekil 4. Gruplarda böbrek histopatolojisi: **(A)** Kontrol grubu, normal histoloji; **(B)** Melatonin grubu, normal histoloji; **(C)** Sisplatin grubu, tübüllerde yaygın dejenerasyon, nekroz ve rejeneratif değişiklikler; **(D)** Melatonin+Sisplatin grubu, tübül epitel hücrelerinde hafif derecede hidropik dejenerasyon ve tübüller hasar (H&E, x200).

Tartışma

Bu çalışma, tek doz i.p. sisplatin uygulamasıyla oluşturulan rat nefrotoksisite modelinde melatonin uygulamasının böbrek üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Melatonin verilen hayvanlarda serum üre ve kreatinin seviyeleri, böbrek fonksiyonlarındaki azalmanın sisplatin enjekte edilen

gruba oranla belirgin biçimde düşük olduğunu ortaya koymaktadır. Böbrek dokusunda MDA ve 8-iso-PGF₂α seviyeleri sisplatin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Melatoninle tedavi edilen ratlarda, SIRT-1 protein ekspresyon seviyesi belirgin biçimde artış yönünde düzenlenirken NAMPT, COX-2, TGF-β1 ve TNF-α proteinlerinin ekspresyon

seviyeleri ise azalmıştır. Histopatolojik bulgular, melatoninle ön tedavinin, sisplatinle oluşturulan tübüler nekrozu ve sisplatinin neden olduğu çoğu patolojik değişimi indirgediğini ortaya koymuştur.

Sisplatin ROS üretimini artırır, antioksidan enzim düzeylerini azaltır, TNF- α seviyesini artırır (8, 11, 13), toksisitesini tetiklemek suretiyle apoptozisi uyarır (15). Böbrekteki mesanjial hücrelerin NAMPT salınımında yüksek yeteneğe sahip olduğu bildirilmiştir (26). NAMPT nefropati patogeneğinde önemli rolü olan bir enzimdir (28). NAMPT hücrede Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)'ın dönüşümünde ve regülatör enzimlerin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir (38). Sisplatin tarafından oluşturulan serbest oksijen radikallerinin NF- κ B'yi aktive ettiği bildirilmektedir (1, 11). SIRT-1'in kanser hücrelerinin apoptozise yönlendirilmesinde ve oksidatif strese direncin artırılmasında görev aldığı rapor edilmiştir (39). NF- κ B, SIRT-1'in önemli substratlarından biridir ve inflamatuvar hücre hasarında merkezi bir rol oynamaktadır. Sisplatin kaynaklı böbrek hasarında NF- κ B'nin aktifleşmesi suretiyle ROS türlerinin yangıdaki rolü de araştırılmıştır (40). Yapılan bir araştırmada SIRT1'in ekspresyonunun artması ile sisplatinle bağlı hücre hasarını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (41). SIRT-1 aynı zamanda antioksidan enzim aktivasyonunu sağlayarak reaktif oksijen türlerinin hücre detoks yeteneğini artırır (42). Yapılan bir araştırmada (43); diyabetik ratlarda SIRT1'in, anti-inflamatuvar etkileri ve otofaji düzenlenmesi yoluyla diyabetik nefropatiyi düzelttiğini ortaya konulmuştur.

Sisplatin nefrotoksisitesinde çeşitli mekanizmalar suçlanmakla beraber son dönemlerde patofizyolojide daha çok oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Oksidatif hasar, organizmanın antioksidan kapasitesinin üzerinde ROS (süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleri) üretimi veya antioksidan mekanizmaların yetersizliğinde oluşur. Sisplatin nefrotoksisitesinde oksidatif hasarın rolü çeşitli yayınlarda bildirilmektedir (8, 9, 11, 14). Kemoterapötik ajanlar tümoral hücrelere spesifik olmamakla birlikte yüksek bölünme hızına sahip hücrelerde daha fazla etkili olmaktadır. Bu özellikleri ile kontrolsüz bir şekilde bölünmeye uğrayan tümoral hücrelere etki ederken aynı zamanda fizyolojik olarak yüksek bölünme hızlarına sahip normal hücrelere de etki etmektedirler. Böbrek hücreleri yüksek bölünme hızına sahip olmamasına rağmen yüksek kan akım hızı ve hacmi nedeni ile kemoteropatik ajana daha fazla maruz kalması ve tübül hücrelerindeki transport mekanizmaları aracılığı ile kemoteropatik ajanın birikmesi sonucu böbrek hücreleri de etkilenmektedir. Sisplatin nefrotoksisitesinde suçlanan çeşitli mekanizmaların sonucu gelişen lipid peroksidasyonu tübül hücrelerinde çeşitli yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açmakta ve bütün bu değişiklikler nedeniyle böbrek fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Sisplatin nefrotoksisitesini azaltmaya

yönelik olarak çeşitli antioksidanlar deneysel çalışmalarda kullanılmış ve kısmen koruyucu etkilerinin olduğu yayınlarda belirtilmiştir (1, 4, 8, 9, 13, 14, 24). Oksidatif stres ve yangı, sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin kapsadığı iki çok önemli faktördür (40).

Melatonin ve metabolitlerinin, antioksidan sistemi serbest radikalleri süpürmeye zorladığı gösterilmiştir (19, 22). Melatonin; antioksidan enzimlerin ve glutatyonun sentezini stimüle eder, başka antioksidanların aktivitelerini artırır ve diğer antioksidatif enzimleri oksidatif hasardan korur (20, 21). Wang ve arkadaşları (44), melatoninin; kardiyo pulmoner by pass sonucu oluşan renal hasarın önlenmesinde muhtemelen antioksidan fonksiyonu ve HO-1 sentezini artırması sonucunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Melatonin; iyi tolere edilebilen, başka tedavilerle düşük etkileşim potansiyeline sahip ve bazı vakalarda serbest radikal süpürücü özellikleri nedeniyle sentetik ilaçların yan etkilerini azaltabilen bir indoldür (19). Melatonin bir antioksidan olarak değişik hayvan gruplarında ve farklı nefrotoksik modellerde çalışılmıştır (1, 11, 45, 46).

Son on yılda, akut ve kronik doku tahribatı ve oksidatif stresin çeşitli modellerinde, melatoninin koruyucu etkisindeki ana mekanizmanın; dolaylı (transkripsiyonel) etkiler aracılığıyla olduğu gösterilmiştir. Akut renal hasar oluşturulan bir rat modelinde melatoninin, oksidatif stres markörlerini, antioksidan ve detoksifikasyon enzimi HO-1'in ekspresyonunu geliştirerek (44) veya NOS'un indüklenebilir formu yanında p38 MAPK ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmek suretiyle arttırdığı belirlenmiştir (47).

Melatoninin ratlardaki karaciğer koruyucu etkileri, dimetilnitrozaminle akut zehirlenme oluşturularak (48) belirlenmiş ve bu durum melatoninin sekonder bir antioksidan ve detoksifikasyon ajanı rolünü desteklemektedir (49). Bu mekanizma, stres yanıtıyla aktive olan NF- κ B bağımlı genlerin negatif modülasyonlarıyla ilişkili görünmektedir. NAMPT, NF- κ B aktivatörüdür. Dolayısıyla sisplatin grubunda visfatin düzeylerinin yükselmesi NF- κ B'yi aktive ederek serbest oksijen radikallerinin yangıyı artırmasına neden olmuştur. SIRT-1, NF- κ B'yi substrat olarak kullanır. Dolayısıyla sisplatin grubunda sırt-1 düzeylerindeki azalma NF- κ B'nin artışına neden olmaktadır. Böylece muhtemel bir yangı artışı söz konusu olmaktadır. Melatonin uygulamasıyla birlikte visfatin düzeylerinde meydana gelen düşüş ve sırt-1 düzeylerindeki artış NF- κ B aktivasyonunu inhibe etmektedir. Böylece renal hasar oluşturulan bu modelde nefrotoksisiteye karşı melatonin kaynaklı bir koruma sağlanması muhtemeldir.

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

Kaynaklar

- Kilic U, Kilic E, Tuzcu Z, et al. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutr Metab (Lond)* 2013; 10: 7.
- Szturz P, Cristina V, Herrera Gomez RG, et al. Low-dose vs. high-dose cisplatin: Lessons learned from 59 chemoradiotherapy trials in head and neck cancer. *Front Oncol* 2019; 9: 86.
- Duan Z, Cai G, Li J, et al. Cisplatin-induced renal toxicity in elderly people. *Ther Adv Med Oncol* 2020; 12: 1758835920923430.
- Sahin K, Sahin N, Kucuk O. Lycopene and chemotherapy toxicity. *Nutr Cancer* 2010; 62: 988-995.
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev* 1999; 99: 2467-2498.
- Gunbakan E, Yalcin E, Cikler Dulger E, et al. Short-term diet restriction but not alternate day fasting prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Biomedicines* 2020; 8: 23.
- Oh GS, Kim HJ, Shen A, et al. Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. *Electrolyte Blood Press* 2014; 12: 55-65.
- Tuzcu M, Sahin N, Dogukan A, et al. Protective role of zinc picolinate on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Ren Nutr* 2010; 20: 398-407.
- Ulu R, Dogukan A, Tuzcu M, et al. Regulation of renal organic anion and cation transporters by thymoquinone in cisplatin induced kidney injury. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 1675-1679.
- Hamroun A, Lenain R, Bigna JJ, et al. Prevention of cisplatin-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Drugs* 2019; 79: 1567-1582.
- Badreldin HA, Aly A, Yousuf AS, et al. Effect of concomitant treatment of curcumin and melatonin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother* 2020; 131: 110761.
- Nagwani S, Tripathi YB. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity by PTY: A herbal preparation. *Food Chem Toxicol* 2010; 48: 2253-2258.
- Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci* 2010; 87: 240-5.
- Sahin K, Tuzcu M, Sahin N, et al. Nrf2/HO-1 signaling pathway may be the prime target for chemoprevention of cisplatin-induced nephrotoxicity by lycopene. *Food Chem Toxicol* 2010; 48:2670-2674.
- Townsend DM, Deng M, Zhang L. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:1-10.
- Huang SJ, Huang J, Yan YB, et al. The renoprotective effect of curcumin against cisplatin-induced acute kidney injury in mice: involvement of miR-181a/PTEN axis. *Ren Fail* 2020; 42(1):350-357.
- Hassanzadeh S, Read MI, Bland AR, et al. Curcumin: An inflammasome silencer. *Pharmacol Res* 2020; 159: 104921.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
- Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: A newly-discovered genre for melatonin. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2009; 44: 175-200.
- Samanta S. Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. *Arch Physiol Biochem* 2020; 1: 22.
- Angelo GD, Chimenz R, Reiter RJ, et al. Use of melatonin in oxidative stress related neonatal diseases. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9: E477.
- Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: The resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J Pineal Res* 2009; 47: 109-126.
- Tuzcu Z, Orhan C, Sahin N, et al. Cinnamon Polyphenol Extract Inhibits Hyperlipidemia and Inflammation by Modulation of Transcription Factors in High-Fat Diet-Fed Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 1583098.
- Sahin K, Orhan C, Tuzcu M, et al. Comparative in vivo evaluations of curcumin and its analog difluorinated curcumin against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biol Trace Elem Res* 2014; 157: 156-163.
- Samal B, Sun Y, Stearns G, et al. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1431-1437.
- Garten A, Petzold S, Körner A, et al. Nampt: Linking nad biology, metabolism and cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20:130-138.
- Song HK, Lee MH, Kim BK, et al. Visfatin: a new player in mesangial cell physiology and diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 1485-1494.
- Kang YS, Song HK, Lee MH, et al. Plasma concentration of visfatin is a new surrogate marker of systemic inflammation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 89: 141-149.
- Gencoglu H, Tuzcu M, Hayirli A, et al. Protective effects of resveratrol against streptozotocin-induced diabetes in rats by modulation of visfatin/sirtuin-1 pathway and glucose transporters. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66: 314-20.
- Akar F, Uludağ O, Aydın A, et al. High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(6):2135-41.
- Kilic U, Sahin K, Tuzcu M, et al. Enhancement of Cisplatin sensitivity in human cervical cancer: epigallocatechin-3-gallate. *Front Nutr* 2015; 26: 28.
- Li C, Cai F, Yang Y, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside ameliorates diabetic nephropathy in rats: Involvement of SIRT1 and TGF-β1 pathway. *European Journal of Pharmacology* 2010; 649: 382-389.
- Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol* 2009; 85: 29-33.
- Yousef MI, Hussien HM. Cisplatin-induced renal toxicity via tumor necrosis factor-α, interleukin 6, tumor suppressor P53, DNA damage, xanthine oxidase, histological changes, oxidative stress and nitric oxide in rats: protective effect of ginseng. *Food Chem Toxicol* 2015; 78: 17-25.

35. Karatepe M., Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV. LC-GC North America 2004; 22: 362-365.
36. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
37. SAS User's guide: Statistics. Cary, North Carolina, USA: SAS institute, Inc., 2002.
38. Yang H, Lavu S, Sinclair DA. Mini Review: Nampt/PBEF/Visfatin: A regulator of mammalian health and longevity? Exp Gerontol 2006; 41: 718-726.
39. Kalle AM, Mallika A, Badiger J, et al. Inhibition of SIRT1 by a small molecule induces apoptosis in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2010; 401: 13-19.
40. Lee S, Moon SO, Kim W, et al. Protective role of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylic acid in cisplatin-induced renal injury. Nephrol Dial Transplant 2006; 21:2085-2095.
41. Jung YJ, Lee JE, Lee AS, et al. SIRT1 overexpression decreases cisplatin-induced acetylation of NF-kB p65 subunit and cytotoxicity in renal proximal tubule cells. Biochem Biophys Res Commun 2012; 419: 206-210.
42. Ogura Y, Kitada M, Koya D. Sirtuins and renal oxidative stress. Antioxidants (Basel) 2021; 10: 1198.
43. Tomino Y, Cooper ME, Kurtz TW, Shimizu Y. Experimental models of type-2 diabetic nephropathy. Exp Diabetes Res 2012; 2012: 218917.
44. Wang Z, Zhang J, Liu H, et al. Melatonin a potent regulator of hemeoxygenase-1, reduces cardiopulmonary bypass-induced renal damage in rats. J Pineal Res 2009; 46: 248-254.
45. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. J Pineal Res 2001; 30: 129-138.
46. Nava M, Romero F, Quiroz Parra G, et al. Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercury chloride in rats. Am J Physiol Renal Physiol 2000; 279: 910-918.
47. Ozbek E, Ilbey YO, Ozbek M, et al. Melatonin attenuates unilateral ureteral obstruction- induced renal injury by reducing oxidative stress, iNOS, MAPK, and NF-kB expression. J Endourol 2009; 23: 1165-1173.
48. Jung KH, Hong SW, Zheng HM, et al. Melatonin downregulates nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB during prevention of oxidative liver injury in a dimethylnitrosamine model. J Pineal Res 2009; 47: 173-183.
49. Luchetti F, Canonico B, Betti M, et al. Melatonin signaling and cell protection function. FASEB J 2010; 24: 3603.