



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2-AMİNOETHOXYDİPHENYL BORATE (2-APB)'NİN AMİNOGLİKOZİD NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Özge KENDİRLİNAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Necdet AYTAÇ

ADANA-2020



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2-AMİNOETHOXYDİPHENYL BORATE (2-APB)'NİN AMİNOGLİKOZİD NEFROTOKSİSİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Dr. Özge KENDİRLİNAN

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Necdet AYTAÇ

Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
TTU-2018-10971 No'lu proje ile desteklenmiştir

ADANA-2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde tez konumun seçilmesi, tezimin yürütülmesi ve sonuçların değerlendirilmesi ve sorunların çözümünde bilgi ve deneyimlerini cömertçe aktaran, beni yönlendiren ve her daim yanımda olduğunu hissettiğim hocam, Sayın Prof. Dr. Ufuk Özgü Mete'ye,

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sait Polat'a, Prof. Dr. Özgül Tap'a, Dr. Öğretim Üyesi Leman Sencar'a, Dr. Öğretim Üyesi Yurdun Kuyucu'ya,

Asistanlık sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum başta Dr. Esra Sakallı olmak üzere değerli çalışma arkadaşlarıma ve anabilim dalımız teknisyenleri Nevriz Dural ve Zuhal Özkurt'a personellerimiz Gülsüm Küçük'e ve Ömer Karaoğlu'na,

Benim bu günlere gelmemi sağlayan, her an yanımda olup desteklerini esirgemeyen annem Bedriye Kendirlihan'a, babam Abdullah Kendirlihan'a ve kardeşlerim Ramazan Kendirlihan'a, Reşat Kendirlihan'a ve Özlem Demirkol'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Özge Kendirlihan

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
GRAFİKLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Böbrek Anatomisi	4
2.2. Böbrek Histolojisi	4
2.2.1. Böbrek Nefronları	5
2.2.2. Böbrek Cisimciği (Renal Korpüskül)	5
2.2.3. Mezangium	8
2.2.4. Jukstaglomerüler aparat	9
2.2.5. Tübül Sistemi	11
2.2.5.1. Proksimal Tübül	11
2.2.5.2. Henle Kulpu İnce Segmenti	13
2.2.5.3. Distal Düz Tübül	13
2.2.5.4. Distal Kıvrıntılı Tübül	14
2.2.5.5. Toplayıcı Tübül ve Toplayıcı Duktuslar	15
2.3. Aminoglikozidler	17
2.3.1. Farmakolojik Özellikleri	17
2.3.2. Aminoglikozidler Klinik Kullanımı	19
2.3.3. Yan Etki Profili	20
2.3.3.1. Nefrotoksisite	21
2.3.3.1.1. Glomerüler Etkileri	23
2.3.3.1.2. Vasküler Etkileri	24

2.3.3.1.3. Tübüler Etkileri	25
2.4. Kalsiyum Bağımlı Süreçler	25
2.4.1. Kalsiyum, Endoplazmik Retikulum-Mitokondrion ve Apoptozis	26
2.5. 2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB)	26
2.5.1. Depo Aracılı Kalsiyum Girişi (<i>Store Operated Calcium Entry</i>) (SOCE)..	27
2.5.2. Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları (<i>Transient Receptor Potential Channels</i>) (TRP)	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması	32
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.3. Işık Mikroskopi Yöntemi	33
3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri	34
3.4.1. İmmünohistokimyasal Skorum Yöntemi	35
3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri	35
3.6. Biyokimyasal Analiz	37
3.7. İstatistiksel analiz	37
4. BULGULAR	39
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular	39
4.1.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları	39
4.1.2. Gentamisin Grubu	40
4.1.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu	42
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular	44
4.2.1. IL-6 İmmünohistokimyasal Bulguları	46
4.2.1.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları	46
4.2.1.2. Gentamisin Grubu	47
4.2.1.3. Gentamisin+2 APB Grubu	48
4.2.2. TNF- alfa İmmünohistokimyasal Bulguları	49
4.2.2.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları	49
4.2.2.2. Gentamisin Grubu	50
4.2.2.3. Gentamisin+ 2- APB Grubu	51
4.2.3. Kaspaz 3 İmmünohistokimyasal Bulguları	52
4.2.3.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları	52

4.2.3.2. Gentamisin Grubu.....	53
4.2.3.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu	54
4.2.4. İmmünohistokimyasal Skorelama.....	55
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular	56
4.3.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları	56
4.3.2. Gentamisin Grubu	62
4.3.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu.....	69
4.4. Biyokimyasal Bulgular.....	74
4.4.1. Denek Ağırlık Bulguları (Gram).....	74
4.4.2. Kan Üre Azotu (BUN) (mg/dl)	74
4.4.3. Kreatinin (mg/dl).....	75
4.4.4. SOD (IU/ml), MDA (nmol/ml).....	76
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇLAR	86
KAYNAKLAR	88
EKLER	105
ÖZGEÇMİŞ	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Pedisel yapısı.....7
Şekil 2.	Filtrasyon yarık diyaframı.....7
Şekil 3.	STIM yapısal değişim28
Şekil 4.	Depo aracılı kalsiyum kanalları.....28
Şekil 5.	TRP kanallarının böbrekte dağılımı.29
Şekil 6.	TPRM 2'nin ABY'deki olası rolü.....31
Şekil 7.	Podositteki muhtemel TRPC6 kanal aktivasyon mekanizması.31
Şekil 8.	Kontrol grubu (K) (üst panel), DMSO grubu (D) (orta panel), 2-APB grubuna (A) (alt panel) ait ışık mikroskopik görüntü39
Şekil 9.	Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü.....40
Şekil 10.	Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü.....41
Şekil 11.	Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü.....41
Şekil 12.	Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü.....42
Şekil 13.	Gentamisin+ 2-APB grubu ışık mikroskopik görünümü.....43
Şekil 14.	Gentamisin+ 2-APB grubu ışık mikroskopik görünümü.....43
Şekil 15.	IL-6 immünreaktivitesi.....44
Şekil 16.	TNF- α immünreaktivitesi.....44
Şekil 17.	Kaspaz 3 immünreaktivitesi45
Şekil 18.	Kontrol (a), DMSO (b), 2-APB (c) grubu IL-6 immünreaktivitesi.46
Şekil 19.	Gentamisin grubu IL-6 immünreaktivitesi.47
Şekil 20.	Gentamisin grubu IL-6 immünreaktivitesi47
Şekil 21.	Gentamisin+ 2-APB grubu IL-6 immünreaktivitesi.....48
Şekil 22.	Gentamisin+ 2-APB grubu IL-6 immünreaktivitesi.....48
Şekil 23.	Kontrol (a), DMSO (b) ve 2-APB (c) gruplarında TNF alfa immünreaktivitesi.49
Şekil 24.	Gentamisin grubu TNF- α immünreaktivitesi.50
Şekil 25.	Gentamisin grubu TNF- α immünreaktivitesi.50
Şekil 26.	Gentamisin+ 2-APB grubu TNF- α immünreaktivitesi.51
Şekil 27.	Gentamisin+ 2-APB grubu TNF- α immünreaktivitesi.....51
Şekil 28.	Kontrol (a), DMSO (b), 2-APB (c) grubunda kaspaz 3 immünreaktivitesi.....52
Şekil 29.	Gentamisin grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi.53
Şekil 30.	Gentamisin grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi.53
Şekil 31.	Gentamisin+ 2-APB grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi.....54
Şekil 32.	Gentamisin+ 2-APB grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi.54
Şekil 33.	Kontrol grubu elektron mikroskopik görünümü.58
Şekil 34.	DMSO grubu elektron mikroskopik görünümü.60

Şekil 35.	2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.....	62
Şekil 36.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	63
Şekil 37.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	63
Şekil 38.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	64
Şekil 39.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	65
Şekil 40.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	65
Şekil 41.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	66
Şekil 42.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	66
Şekil 43.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	67
Şekil 44.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	68
Şekil 45.	Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü.....	68
Şekil 46.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	69
Şekil 47.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	70
Şekil 48.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	71
Şekil 49.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	71
Şekil 50.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	72
Şekil 51.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü	73
Şekil 52.	Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü.	73

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik No:

Sayfa No:

Grafik 1. TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 için immünohistokimyasal skorlama	55
Grafik 2. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait ortalama BUN değerleri	75
Grafik 3. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait kreatinin ortalama değerleri	76
Grafik 4. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait SOD ve MDA ortalama değerleri.	77



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Aminoglikozidlerin klinik kullanımları ve özellikleri ¹³⁶	20
Tablo 2. Işık mikroskopik doku takip işlemi	33
Tablo 3. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi	36
Tablo 4. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi	36
Tablo 5. Gömme materyalinin hazırlanışı	36
Tablo 6. $P < 0.014$ için anlamlı farklılık kontrol ve Gentamisin grupları için a, DMSO ve Gentamisin grupları için b, 2-APB ve Gentamisin grupları için c, kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g ile belirtilmiştir.	56
Tablo 7. $P < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.	74
Tablo 8. $p < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.	75
Tablo 9. $P < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.	76
Tablo 10. $p \leq 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AQ-1	: Akuaporin 1
NO	: Nitrik Oksit
GBM	: Glomerüler Bazal Membran
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
IL-1	: İnterlökin 1
CSF-1	: Koloni Stimüle Edici Faktör 1
TGF	: Transforming Büyüme Faktörü
JGA	: Jukstaglomerüler Aparat
V_d	: Vücut Dağılım Hacmi
M_{ik}	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
C_{maks}	: Maksimum Konsantrasyon
EDP	: Enerji Bağımlı Faz
AG	: Aminoglikozid
K_f	: Ultrafiltrasyon Faktörü
GFR	: Glomerüler Fİltrasyon Hızı
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
NFKB	: Nükleer Faktör Kappa B
IP₃R	: İnozitoltrifosfat Reseptörü
SOCE	: Depo Aracılı Kalsiyum Girişi
TRP	: Geçici Reseptör Potansiyel
TRPC	: Geçici Resetör Potansiyel Kanonik Kanalı
TRPM	: Geçici Resetör Potansiyel Melastin Kanalı
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Ca	: Kalsiyum
IL-6	: İnterlökin 6
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör- α
SOD	: Süperoksit Dismutaz
MDA	: Malondialdehit
ng	: Nanogram

µm	: Mikrometre
IU	: İnternasyonel ünit
nmol	: Nanomol
dl	: Desilitre
ml	: Mililitre
HE	: Hematoksilen Eozin
i.m.	: İntramusküler
i.p.	: İnteraperitoneal
Fe	: Demir
GSH	: Glutatyon



ÖZET

2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB)'nin Aminoglikozid Nefrotoksisitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Aminoglikozidler, Gram (-) enfeksiyonların önlenmesinde etkili olan antibiyotikler olarak uzun zamandır bilinmekte ve kullanılmaktadır. Ancak, hızlı ve yüksek antibakteriyel etkinlik, düşük direnç gelişme potansiyeli, Beta laktam antibiyotiklerle sinerjistik etki ve düşük maliyet gibi avantajlarına rağmen, yan etkileri ve özellikle yüksek nefrotoksisite insidansı nedeniyle klinik kullanımları sınırlanmaktadır. Literatürde aminoglikozid nefrotoksisitesinin iyileştirilmesi için birçok farklı ajanın kullanıldığı çalışmalar bulunmasına rağmen 2- APB'nin kullanıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu deneysel çalışmada aminoglikozid nefrotoksisitesindeki mekanizmalardan olan ROS ve kalsiyum bağımlı apoptotik ve inflammatuar süreçler temel alınarak gentamisin nefrotoksisitesi üzerine TRP kanal modülatörü 2-APB'nin koruyucu etkisinin araştırılması ve elde edilen sonuçların ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilerek gösterilmesi amaçlanmaktadır.

Bu amaçla yapılan deneysel çalışmada 40 adet Wistar sıçan 5 gruba ayrıldı:

Grup 1: Kontrol grubu (n=8): Herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2: DMSO grubu (n=8): 10 gün boyunca günde 1 kez %10 DMSO intraperitoneal (i.p.) uygulandı.

Grup 3: 2-APB grubu (n=8): 10 gün boyunca 2 mg/kg i.p. 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) %10 DMSO içinde çözündürülerek uygulandı.

Grup 4: Gentamisin (G) grubu (n=8): 10 gün boyunca 100 mg/kg intramusküler (i.m.) Gentamisin uygulandı.

Grup 5: Gentamisin + 2-APB (GA) grubu (n=8): 10 gün boyunca 100 mg/kg dozunda i.m. Gentamisin ve Gentamisinden 30 dakika önce 2 mg/kg i.p. 2-APB uygulandı.

Sakrifikasyon işlemi sonrası ratlardan, biyokimyasal değerlendirme için kan numuneleri, ışık, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için böbrek doku örnekleri alındı. Gentamisin verilen sıçanların böbrek dokusunda ışık mikroskopik olarak; glomerüler dejenerasyon, tübüler genişleme, hücre vakuolizasyonu, tübül lümenine hücre deskuamasyonu ve hyalin kast birikimi, lökositik infiltrasyon şeklinde; elektron mikroskopik olarak glomerül bazal membranında yer yer kalınlaşma, tübül hücrelerinde mikrovillus yapısında düzensizleşme, apikal sitoplazmada blebleşme, lipid birikimi, miyeloid cisimcik oluşumu, lizozomlarda sayıca artış, mitokondrionda şişme ve krista yapısının bozulması, apoptotik değişimler ve hücreler arası mesafenin genişlemesi şeklinde değişimlerin olduğu görüldü. İmmünohistokimyasal olarak Tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), Interlökin 6 (IL-6) ve kaspaz 3 ekspresyonunun arttığı tespit edildi. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirilmesinde kullanılan kan üre azotu (BUN), kreatinin değerlerinin arttığı, lipid peroksidasyon göstergesi Malondialdehit (MDA)'ın arttığı, antioksidan olan Süperoksit dismutaz (SOD)'ın azaldığı dikkati çekti. Gentamisin+ 2-APB tedavisi ile dejenerasyon varlığını sürdürse de şiddeti ve kapladığı alanın azaldığı, glomerül ve tübül yapılarının genel olarak korunduğu görüldü. 2-APB tedavisi ile gentamisin grubuna göre

TNF- α , IL-6, kaspaz 3 immünoreaktivitesinin ve BUN, kreatinin, MDA değerlerinin belirgin olarak azaldığı, SOD'un arttığı görüldü.

Sonuc olarak, 2-APB'nin; Gentamisinin oluşuracağı böbrek hasarını önlemede, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstererek hasarın önüne gecebileceği kanısına varıldı.

Anahtar sözcükler: 2-APB, Gentamisin, immünohistokimya, nefrotoksisite, ince yapı.



ABSTRACT

Investigation of 2- Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB)'s Effects on Aminoglycoside Nephrotoxicity

Aminoglycosides are antibiotics that are effective on preventing Gram (-) infections and have been known and used for a long time. Despite of their advantages such as rapid and high antibacterial efficacy, low resistance development potential, synergistic effect with beta lactam antibiotics, and their low cost, clinical use of them is limited due to their side effects and especially because of high nephrotoxicity incidence. Although there are studies in the literature which used many different agents to improve aminoglycoside nephrotoxicity, there have been no study using 2- APB. This experimental study aims to investigate the protective effect of TRP channel modulator 2-APB on Gentamicin nephrotoxicity caused by ROS and calcium-induced apoptosis and inflammation which are the mechanisms in aminoglycoside nephrotoxicity. We aimed to evaluate the results by using light and electron microscopic, biochemical and immunohistochemical techniques.

Fourty Wistar rats were divided in 5 groups:

Group 1 : Control group (n=8): They did not receive anything.

Group 2: DMSO group (n=8): %10 DMSO injected intraperitoneally (i.p.) once a day for 10 days .

Group 3: 2- APB group (n=8): 2 mg/kg 2-APB dissolved in %10 DMSO injected intraperitoneally for 10 days.

Group 4: Gentamicin group (n=8): 100 mg/kg Gentamicin injected intramuscularly for 10 days.

Group 5: Gentamicin+ 2-APB group (n=8): 100 mg/kg Gentamicin injected intramuscularly for 10 days. 30 minutes before gentamicin injection, 2 mg/kg 2-APB applied intraperitoneally.

After sacrifice, blood samples collected for biochemical investigation, kidney tissue samples collected for light and electron microscopic and immunohistochemical investigation.

Glomerular degeneration, tubular dilatation, vacuolization, desquamation of tubular cells and hyaline cast formation in luminal space and leukocyte infiltration were seen in kidneys of the rats in Gentamicin group under light microscopic examination. In electron microscopic observation; occasional glomerular basement membrane thickening, disorganization of microvilli of tubular cells, apical cytoplasmic blebbing, lipid accumulation, myeloid body formation, an increase in the amount of lysosome, mitochondrial swelling and disorganization of cristae structure, apoptotic changes and widening of intercellular space were found.

It was observed that Tumour Necrosis Factor alpha (TNF- α), IL-6 (Interleukin 6) and caspase 3 expressions were increased in kidney tissues of gentamicin group. It was remarkable that there was an increasing in BUN and creatinin levels which are used for evaluating kidney functions. Also it was determined that there were an increasing in MDA levels as an indicator of lipid peroxidation and decreasing in levels of SOD which is an antioxidant. Even though

degeneration still continues in Gentamicin+2ABP treatment group, it was observed that the severity and the area it occupied decreased and the glomerular and tubule structures were generally preserved. In Gentamicin+ 2-APB treatment group TNF- α , IL-6, caspase 3 immunoreactivity and BUN, creatinin, MDA levels reduced and SOD levels increased markedly when compared with Gentamicin group.

In conclusion, it has been considered that 2-APB can prevent Gentamicin mediated nephrotoxicity with its anti-oxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects.

Keywords: 2-APB, Gentamicin, immunohistochemistry, nephrotoxicity, ultrastructure.



1. GİRİŞ

Aminoglikozidler gentamisin, tobramisin, amikasin, streptomisin, neomisin, paromomisini içeren bir antibiyotik grubudur¹. Aminoglikozidlerin en sık klinik kullanımı (tek veya kombinasyon tedavide) aerob gram negatiflerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlardır^{2, 3}. Geçmişte aminoglikozidlerin kullanımı yaygınlaştıkça; ototoksisite ve nefrotoksisiteye daha sık rastlanmıştır; daha güvenli, antimikrobiyal ajanlar mevcut olduğunda, aminoglikozidlerin kullanımı belirgin şekilde azalmıştır. Ancak çoklu ilaç direncine sahip bakteri gelişimi klinisyenleri ciddi enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidleri tekrar gözden geçirmeye itmiştir⁴. İstenmeyen toksik etkilerine rağmen aminoglikozidlerin tercih edilme nedenleri arasında; diğer antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların tedavisinde kullanımı, kimyasal stabilitesi, hızlı bakterisidal etki göstermesi, Beta laktam antibiyotiklerle sinerjistik etki göstermesi, az direnç gelişimi ve düşük maliyeti vardır⁵. Gentamisin nefrotoksisiteye en çok neden olan aminoglikozidlerden birisi olmasının aksine, çeşitli klinik durumların tedavisinde ilk veya ikinci seçeneği oluşturur. Aminoglikozidlerin en önemli toksik etkileri ototoksisite, nefrotoksisite ve nöromusküler bloktur. Nefrotoksisite katyonik yük sayısı ve tübül epitel hücresine bağlanma ile ilgilidir: 6 katyonik amino grubuna neomisin en nefrotoksik olanken; gentamisin ve tobramisin 5 katyonik gruba, amikasin 4 amino grubuna, streptomisin ve netilmisin ise 3 amino grubuna sahiptir ve en az nefrotoksik olanlardır⁶. Gentamisin sitotoksitesi ilacın biriktiği alanlarda meydana gelmektedir. Deney hayvanları⁷ ve insanlarda⁸ esas olarak proksimal tübül olmak üzere, distal ve toplayıcı tübülün⁹ etkilendiği gösterilmiştir.

2-Aminoetoksifenil borat (2-APB), İnozitol 1,4,5-trifosfat reseptörünün antagonistidir¹⁰. Ayrıca depo-aracılı Ca^{+2} (SOC) kanalını ve sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz pompası inhibitörüdür¹¹. Ek olarak geçici reseptör potansiyel (TRP) kanallarını da modüle etmektedir.

Gentamisinin hücrelerde birikimi, varlığı proksimal tübülle sınırlı olan megalin ve cubulin tarafından oluşturulan büyük endositotik kompleks olarak adlandırılan taşıyıcılara bağlıdır. Bu kompleks aminoglikozidlerin endositozunu sağlamaktadır¹². İlaçlar endositotik kompartmanlardan sonra lizozom başta olmak üzere, Golgi ve endoplazmik retikulumda birikir^{13, 14}. Gentamisin membran fosfolipidlerine bağlanır,

bunların metabolizma ve turnoverını etkileyerek insan¹⁵ ve deney hayvanlarında^{16, 17} fosfolipidoza neden olur. Endozom içinde aşırı miktarda aminoglikozid biriktiğinde, membran bütünlüğü bozulur ve ilaç sitoplazmaya dağılır^{18, 19}. Sitolitik gentamisin, kaspaz aktivasyonuna neden olarak apoptotik sinyalizasyonu tetikler. Bu sinyalizasyon direkt (Bax aktivasyonunu takiben ER'den IP₃ (inozitol trifosfat) reseptörü aracılı Ca⁺² salınımı sonucu mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu²⁰) olabileceği gibi indirekt (proteazomal yıkımın inhibisyonu ile ubiquitinlenmiş Bax artışı²¹) de olabilmektedir. Ayrıca Gentamisin poliunsatüre lipid varlığında in vitro şartlarda reaktif oksijen radikal oluşumu ile de apoptotik sürece katılabilmektedir²². Ayrıca Gentamisin, endoplazmik retikulumda (ER) protein sentezini inhibe edip translasyonu ve posttranslasyonel modifikasyonu²³ bozduğu için ER stresi meydana gelir. Bunun sonucu olarak da ER'den kalsiyum salınımı²⁴ sonucu kaspaz 12 ve kalpain²⁵ aracılı apoptoz aktive olur. İntraselüler kalsiyum artışının, kalpain aktivasyonuna neden olduğu, kalpainin de kaspaz 3 modülasyonu ile apoptozu tetiklediğini gösterilmiş²⁶, HeLa-S3 hücre hattında 2-APB ile sisplatinin indüklediği Ca⁺² girişinin azaltılarak kalpain aktivasyonunu ve apoptoz indüksiyonunun engellenebileceği öne sürülmüştür²⁷. Hücre siklusu, diferansiasyonu, mitoz, apoptoz, ETozis, hücre mobilitesi, makrofaj aktivitesi, kromatin paketlenmesi ve modifikasyonu, protein katlanması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde rol alan kalsiyum iyon²⁸ konsantrasyonunun düzenlenimi çalışmamızın hedefini oluşturmaktadır. 2-APB, IP3 kanalını bloke ettiği için endoplazmik retikulumdan mitokondriona kalsiyum geçişinin engellenip apoptozun intrinsik yolağının ve kalpain aktivasyonunun önüne geçileceği düşünülmektedir. Yine apoptoz inhibisyonuna 2-APB'nin gentamisin nefrotoksisitesinde artan intraselüler kalsiyumu SOCE inhibisyonu ile azaltarak da katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Gentamisin Reaktif Oksijen Radikal (ROS) oluşumunu tetikleyerek NF-κB transkripsiyon faktörünü stimüle eder. Stimülasyona bağlı NF-κB, NF-κB-IκB kompleksinden ayrılır, nükleusa transloke olur ve böbrek hasarına neden olan hedef genlerin^{29, 30}, IL-6, iNOS, TNF-alfa, COX-2, transkripsiyonel aktivasyonuna neden olur. İntraselüler Ca²⁺ konsantrasyon ([Ca²⁺]_i) artışının NF-κB aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir^{31, 32}. Dolayısıyla çalışmada SOCE aracılı kalsiyum girişinin 2-APB ile inhibisyonu sonucu, NF-κB üzerine etkileri TNF-α ve IL-6 aracılığıyla incelenecektir.

ROS, özellikle de NADPH oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumu TRPC6 aktivasyonuna neden olur. TRPC6 redoks duyarlı bir kanaldır ve Ca^{+2} aracılı modülasyonu podosit dahil çeşitli hücrelerde hasarı tetikler. TRPC6 blokajı yapan 2-APB'nin gentamisin tarafından oluşturulan ROS'a bağlı TRPC6 aktivasyonunu engelleyerek hasarın önüne geçeceği öngörülmektedir. Yine oksidatif stres RAC1 aracılı apoptoza yol açar ve bu olayda TPRM2 rol almaktadır³³. Araştırmacılar böbrekte, 2-APB'nin TPRM2 inhibisyonu ile iskemi reperfüzyon (I/R) sonrası sitoproteksiyon sağladığını göstermiştir^{33, 34}. Benzer mekanizmayla TPRM2 blokajı yapan 2-APB'nin de gentamisine bağlı apoptoza engelleyeceği düşünülmektedir.

Literatürde aminoglikozid nefrotoksisitesinde çok sayıda ajanın³⁵⁻⁴⁸ tedavi edici etkileri rapor edilmiş olmasına rağmen 2-APB'nin etkileri henüz araştırılmamıştır. Bu çalışmada 2-APB'nin, aminoglikozid nefrotoksisitesindeki mekanizmalardan olan ROS ve kalsiyuma bağlı apoptotik ve inflamatuvar süreçler üzerine olan etkilerinin biyokimyasal, immünohistokimyasal, ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle ortaya konulması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Anatomisi

Böbrek; karın arka duvarına yaslanmış olup kolumna vertebralisin iki yanında ve psoas kasının lateralinde yerleşmişlerdir. Logitudinal uzunluğu yaklaşık 3 vertebra boyutunda olup genellikle 12. torakal vertebra ile 3. lomber vertebra aralığında uzanmaktadır. Sağ böbrek, üst komşuluğunda bulunan karaciğer nedeniyle biraz daha aşağı yerleşimlidir. Longitudinal uzunluğu 12-13 cm, eni 6-7 cm ve ön arka genişliği 3 cm'dir. Sol böbrek sağ böbrekten 1 cm kadar daha uzundur ve ortalama ağırlıkları 150 gramdır⁴⁹. Böbrekleri içten dışa doğru; Capsula fibrosa, Capsula adiposa (perirenal yağ tabakası), Fascia renalis (Gerota fasyası, Zuckerland fasyası), Corpus adiposum pararenale sarar⁵⁰.

2.2. Böbrek Histolojisi

Taze, ortadan ikiye ayrılmış böbreğe çıplak gözle bakıldığında 2 farklı bölgeye ayrıldığı gözlenir: korteks dıştaki kırmızı kahverengimsi kısımken, medulla daha açık renkli iç kısımdır. Fikse edilmemiş böbreğin kesit yüzeyinde görülen renk farkı, organdaki kan dağılımını yansıtır. Böbrekten geçen kanın %90-95'i kortekse, %5-10'u ise medullaya dağılır⁵¹. Korteks, kortikal labirentler ve medullar ışıklardan meydana gelir. Kortikal labirent, renal korpüskül ve nefronun kıvrıntılı tübüler kısımlarını içerirken; medullar ışın (Ferrein) medullanın kortekse uzantısıdır ve böbrek lobülünün merkezini oluşturur. 500 civarında olan medullar ışın, proksimal ve distal tübülün pars rektasını ve toplayıcı tübülü içerir⁵².

Medulla; düz tübüller, toplayıcı duktuslar ve idrar konsantrasyonunu düzenleyen zıt yönlü akım değişim sisteminin vasküler parçası olan vasa rectayı içerir. Medulladaki tübüller, düzenleniş ve uzunluğundaki farklılıklar nedeniyle, piramit adı verilen yapılar meydana getirir. İnsan böbreğinde 8-12, en fazla 18 piramit bulunabilir. Her medullar piramit ve bunun taban ve kenarlarındaki ilişkili kortikal doku (her komşu renal sütunun yarısı) böbrek lobunu oluşturur. Böbrekteki lobların sayısı medullar piramitlerin sayısına eşittir. Piramitlerin üzerinde yer alan kortikal doku başlıkları, periferiye uzanıp piramidin lateral kısmının çevresinde renal sütunları (Bertin) oluşturur⁵¹.

2.2.1. Böbrek Nefronları

Nefron böbreğin yapısal ve fonksiyonel birimidir. Her bir böbrek yaklaşık 2 milyon nefron içerir. Nefron, renal korpüskül ve tübül sisteminden oluşur. Renal korpüskülün korteks içindeki yerleşimine göre 3 tip nefron tanımlanmıştır. Subkapsüler (kortikal) nefronun renal korpüskülleri korteksin dış kısmında yer alır. Sadece dış medullaya uzanan kısa henle kulpları bulunmaktadır. Jukstamedullar nefronlar, toplam nefron sayısının sekizde birini oluşturur. Renal korpüskülleri medullar piramidin tabanına yakın bulunur, uzun henle kulpları ve piramidin iç bölgesine uzanan uzun çıkan ince segmentleri vardır. Ara nefronların (midkortikal nefron) korpüskülleri korteksin orta bölgesindedir. Henle kulpları orta uzunluktadır⁵¹.

2.2.2. Böbrek Cisimciği (Renal Korpüskül)

Renal korpüskül; 10-20 kapiller halkasından oluşan kapiller yumağı olan glomerül ve onu çevreleyen renal kapsül ya da Bowman kapsülü adı verilen çift tabakalı epitelyal kapsülden oluşmaktadır, 200µm çapa sahiptir.

Glomerüler kapillerler bir afferent arteriol tarafından beslenirler ve daha sonra böbrek tübüllerini beslemek üzere dallanarak yeni kapiller ağ oluşturan efferent arteriyol tarafından drene edilir. Afferent ve efferent arteriyollerin Bowman kapsülünün pariyetal tabakasından girdikleri ve çıktıkları bölgeye damar kutbu denir. Bu bölgenin karşı tarafı idrar kutbudur ve burada proksimal kıvrıntılı tübül başlar⁵¹. Glomerüler kapiller endoteli, 70-90 nm çapında diyaframsız fenestralara sahiptir, suyun epitelden hızlı geçişine olanak sağlayan çok sayıda akuaporin-1 (AQ-1) su kanallarına sahiptir⁵¹. Endotel hücresi maddelerin transvasküler geçişi için bariyer olmakla kalmaz vazoaaktif maddeleri de sentezler⁵³. Kronik böbrek yetmezliğindeki renal fibrozisin, endotel disfonksiyonu tarafından indüklenen mikrovasküler yatak obstrüksiyonu ve nefron kapiller disfonksiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Bu süreçte Nitrik Oksit (NO), Adipositokin ve Üremi-ilişkili faktör sentezinde azalma endotel disfonksiyonunu indükler⁵⁴.

Glomerüler bazal membran (GBM), 300-370 nm kalınlığındadır ve tip IV kollajen (başlıca kollajen $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ zincirleri), laminin, nidojen, entaktin ve bunlarla beraber agrin ve perlekan gibi proteoglikanların yanında multiadheziv

glikoproteinlerden meydana gelen ağdan oluşmaktadır³. Bu proteinler GBM içinde çeşitli bölgelerde yerleşmiştir:

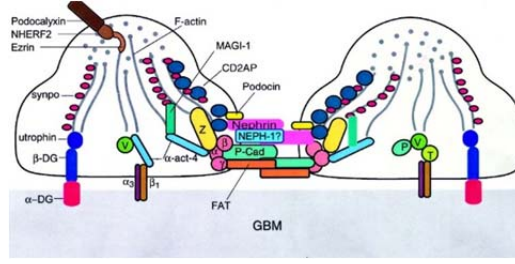
Lamina rara eksterna; podosit çıkıntılarına komşudur. Spesifik olarak heparan sülfat gibi negatif yüklü moleküllerin geçişini engelleyen polianyonlar bakımından zengindir.

Lamina densa, iki bazal laminanın üst üste binme bölgesidir, lamina raralar arasında bulunur. Ağsı yapıda düzenlenmiş Tip IV kollajen içermektedir.

Lamina rara interna, kapiller endoteline komşudur. Moleküler özelliği lamina rara eksternaya benzemektedir.

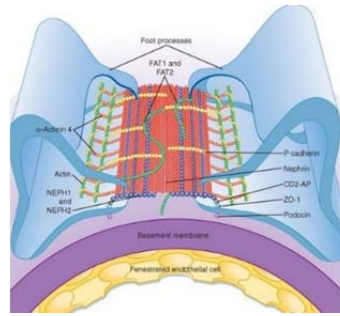
Tip XVIII kollajen, perlekan ve agrin, glomerüler bazal membranda bulunan anyonik yüklerin büyük kısmından sorumludur. Lamina rara interna ve eksternada bulunan laminin ve diğer proteinler endotel hücrelerinin ve podositin GBM'ye tutunmasından sorumludur. GBM çoğunlukla 70.000 dalton ya da 3.6 nm çaptan daha büyük proteinler gibi partiküllerin hareketini kısıtlamaktadır. Lamina raranın polianyonik glikozaminoglikanları güçlü negatif yüke sahiptir, 70.000 daltondan küçük de olsa anyonik partiküllerin ve moleküllerin GBM'den geçişini kısıtlarlar⁵¹.

Bowman kapsülü visseral tabakası, podosit adı verilen özelleşmiş hücreleri içermektedir. Bu hücreler, glomerüler kapillerlerin çevresine uzantılar (pedisel, ayaklı uzantı) uzatır⁵¹. Podosit ayaklı uzantıları, kontraktildir ve aktin, miyozin II, α -aktinin 4, talin, vinkulin içerir⁵⁵. Şekil 1, podosit ayaklı uzantıları hakkındaki mevcut bilgiyi yansıtmaktadır. Ayaklı çıkıntılar; Glomerül bazal membranına $\alpha 3\beta 1$ integrin⁵⁶ ve distroglukan^{57, 58} tarafından tutundurulmuştur.



Şekil 1. Pedisel yapısı: α -act4: α -aktinin-4; $\alpha3\beta1$: $\alpha3\beta1$ integrin; α -DG: α -distroglikan; β -DG, β -distroglikan; Na/H ERF2,: Na/H exchanger regülatuar faktör 2; P,:paksillin; P-cad: P-kaderin; Synpo: sinaptopodin; T, tallin; V, vinkullin⁵⁹.

Filtrasyon yarığı adı verilen ve interdigitasyon yapan ayaklı uzantılar arasında bulunan boşluklar yaklaşık 40 nm genişliğindedir ve filtrasyon yarık diyaframı ile kaplıdır. Transmembran bir protein olan Nefrin, yarık diyaframının anahtar yapısal ve fonksiyonel elemanıdır, yarığın merkezinde etkileşerek (homofilik etkileşim) merkezi yoğunluk oluşturur⁵¹. Filtrasyon yarık diyaframında nefrin, NEPH1 ve NEPH2(mavi), FAT1 ve FAT2 (yeşil) ve P-kaderin ile etkileşir (şekil 2). Nefrin, NEPH1 ve NEPH2'nin intraselüler kısmı, bu proteinleri ZO-1, α - aktinin 4, ve aktinle bağlayan podosin ve CD2-AP ile etkileşir⁶⁰. Filtrasyon yarık diyaframı, boyut selektif filtre görevi görür. Yarık diyaframın tıkanmasını; GBM'deki glikozaminoglikanların negatif yükleri, podosit hücre membranının negatif yükü ve renal korpüsküldeki mezangial hücrelerin fagositik fonksiyonu engeller⁵¹.



Şekil 2. Filtrasyon yarık diyaframı⁶⁰.

Glomerüler filtrasyon bariyeri geleneksel olarak glomerüler kapiller endoteli, glomerüler bazal membran, Bowman kapsülü visseral tabakası olarak tanımlanmışsa da, son zamanlarda fizyolojik olarak önemli iki ek tabaka olan glomerüler kapillerlerin endotelial yüzeyi ve subpodosit alan da filtrasyon aparatının parçalarına dahil edilmektedir⁵¹.

Endotelyal yüzey; glikozaminoglikan yan zincirleri (heparan sülfat ve kondroitin sülfat gibi) ile ilişkili, plazma membranına bağlı ve negatif yüklü proteoglikanlardan (perlekan, sindekan, versikan gibi) meydana gelen glikokaliksi ve periferik membran proteinlerini içerir. Kandan absorbe edilen plazma proteinleri (albumin) glikokaliksin luminal yüzeyini kaplarlar⁵¹. Rostgaard ve ark. endotelyal glikokaliksin 300 nm boyutunda olduğunu, fenestralı ve interfenestral alanları kapladığını SEM ile göstermiştir⁶¹. Glikokaliks, endotel yüzeyini örten negatif yüklü jeldir ve büyük moleküllerin geçişini sınırlandırır ayrıca endotel hücrelerini korur⁶².

Subpodosit alan, bir tarafta ayaksız uzantılar ile birlikte filtrasyon yarık diyaframının, diğer tarafta ise podosit hücre gövdesinin arasında kalan boşluktur⁵¹.

Bowman kapsülünün pariyetal tabakasını tek katlı yassı epitel oluşturmaktadır. Bowman kapsülünün visseral ve pariyetal tabakaları arasındaki alana idrar boşluğu ya da Bowman boşluğu adı verilir⁵¹.

2.2.3. Mezangium

Mezangial hücreler ve onların ekstraselüler matriksi mezangiumu oluşturmaktadır. Mezangium en çok glomerülün vasküler kutbunda ve komşu glomerüller kapillerlerin arasındaki boşlukta belirgindir. Damar kutbu boyunca yer alan bu hücrelere Lacis hücreleri denilmektedir ve bu hücreler Jukstaglomerüler aparat olarak bilinen yapının parçasıdır. Önemli fonksiyonları:

- Fagositoz ve endositoz: GBM'den ve filtrasyon yarık diyaframından kalıntıları ve çökmüş proteinleri uzaklaştırırlar ve böylece glomerüler filtratı yıkıntılardan uzak tutarlar. Aynı zamanda immün kompleksler de dahil olmak üzere çeşitli plazma proteinlerini endositoza tabi tutup işlerler.
- Yapısal destek: Mezangial hücreler, mezangial matriksin komponentlerini üretirler⁵¹.
- Sekresyon: Prostoglandin, tromboksan, lipoksijenaz ürünleri, platelet aktive edici faktör (PAF), NO gibi vazoaaktif ve büyümeyi modifiye edici ajanların; trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), interlökin 1 (IL-1), Koloni stimüle edici faktör (CSF-1), Transforming büyüme faktörü (TGF- β) gibi büyüme

faktörleri ve sitokinlerin üretim yeridir. Ayrıca plazminojen aktivatör ve inhibitörlerinin üretimini sağlar⁶³.

- Anjiotensin II, endotelin, vazopresin, norepinefrin gibi vazokonstrüktörler; atriyopeptin, nitrik oksit, prostoglandin E2, prostoglandin I2 ve dopamin gibi vazodilatörlerin hedef bölgesidir. Buna ek olarak inflamatuvar ajanlar, büyüme faktörleri, sitokinler burada etki gösterirler⁶³.
- İyon kanalı: Non selektif katyon kanalı, reseptör aracılı veya depo aracılı kanal olarak foksiyon gören kanonik geçişli reseptör potansiyel kanalları (TRPC), aktivasyonla kalsiyum girişi ile gerekli intraselüler kalsiyum konsantrasyonunu sağlar. Son çalışmalar bu kanalların diyabette GFR'yi düzenlediğini göstermektedir. Mezangial hücreler, TRPC 1,3,4 ve 6 eksprese eder. TRPC 1 ve 4'ün anjiotensin II'nin kontraktıl aktivitesine aracılık ettiği düşünülmektedir⁶⁴.
- Glomerüler distansiyonun modülasyonu: Mezangial hücreler kontraktıl özelliklere sahiptir. Geçmişte mezangial hücrelerin kontraksiyonunun intraglomerüler kan hacmini ve filtrasyon basıncını yükseltebildiği öne sürülmüştür. Son çalışmalar, glomerüler filtrasyon hızına mezangial katkının minimal olduğunu ve mezangial hücrelerin yükselmiş kan basıncına yanıt olarak gelişen glomerüler distansiyonun düzenlenmesinde fonksiyon görebileceklerini göstermiştir⁵¹.
- Oksidatif stres durumunda, hipertrofi, matriks birikimi apoptoz ve sitokin/büyüme faktörü ekspresyonu gibi çeşitli cevaplar verir⁶⁴.

2.2.4. Jukstaglomerüler aparat

Jukstaglomerüler aparat (JGA), makula densa, jukstaglomerüler hücreleri ve ekstraplomerüler hücreleri içerir⁵¹.

Makula densa hücreleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde distal tübül hücrelerinden daha dar ve daha uzun olmaları ile kolaylıkla ayırt edilir. Bu hücrelerin çekirdekleri kısmen üst üste binmiş görünecek kadar kalabalık görüldüğü için makula densa (yoğun) olarak adlandırılmaktadır⁵¹. Makula densa hücreleri JGA'nın renal kan akımı, glomeruler filtrasyon hızı ve renin salınımını kontrol eden elemanıdır. Ultrastrüktürel çalışmalarda, primer silyum varlığı nedeniyle kemo/ mekanoreseptör olarak düşünülmüşlerdir⁶⁵.

Jukstaglomerüler hücreler, aynı bölgede, komşu afferent arteriolün (ve bazen efferent arteriolün) düz kas hücrelerinin değişikliğe uğraması ile oluşmuştur. Bu hücreler salgı granülleri içerir ve salgı granüllerinin ışık mikroskopunda ortaya konabilmesi için özel boyalara ihtiyaç vardır. Nükleusları tipik uzun düz kas hücresi nükleusunun aksine küre şeklindedir⁵¹.

Glomerüler filtrasyonun belirleyicileri ve düzenlenmesi:

Renal kan akımı yaklaşık olarak kardiyak outputun %20'si kadardır. Glomerüler filtrasyonun otoregülasyonu, afferent ya da efferent arter tonusunu modüle eden üç major faktörle sağlanır. Bunlar; afferent arteriolde otonom vazoreaktif (miyojenik) refleks, tübüloglomerüler feedback ve efferent arteriolün anjiyotensin II aracılı vazokonstriksiyonudur. Miyojenik refleks, kan basıncındaki değişimlere karşı ilk savunmadır. Tübüloglomerüler feedback afferent arteriolün refleks vazokonstriksiyonu veya dilatasyonu ile filtrasyon hızını ve tübüler akımı değiştirir ve makula densa aracılığıyla sağlanır. Yüksek tübüler akım ve filtrasyon hızı makula densaya artmış solüt gelişine neden olur ki bu da glomerüler filtrasyon hızının normale dönmesine yol açacak olan afferent arteriyol vazokonstriksiyonu ile sonuçlanır. Makula densadan solubl sinyalin bir bileşeni, artmış NaCl reabsorbsiyonu sırasında hücrelerden salınan adenozin trifosfattır (ATP). ATP hücre dışı boşlukta ecto-5'-nükleotidaz tarafından afferent arteriolün potent vazokonstriktörü olan adenoziini oluşturmak üzere metabolize olur. Makula densa hücreleri direk de adenozin salabilir. Filtrasyon hızında bir düşme ile birlikte olan koşullar sırasında, makula densaya azalmış solüt gelişi tübüloglomerüler yanıtı zayıflatarak, afferent arteriolün dilatasyonuna ve glomerüler filtrasyonun normal seviyelere dönüşüne olanak sağlar. Filtrasyon hızının otoregülasyonunun altında yatan üçüncü bileşen anjiotensin II ile ilgilidir. Düşük kan akımı durumunda, jukstaglomerüler aparattan renin salınır. Renin proteolitik bir enzimdir, anjiotensinojenin anjiotensin I'e dönüşümünü katalize eder, daha sonra anjiotensin I, anjiotensin converting enzim (ACE) ile anjiotensin II'ye dönüşür. Anjiotensin II efferent arteriyolün vazokonstriksiyonunu uyarır ve bu durum filtrasyonu normal seviyeye getirilmesi ile sonuçlanır⁶⁶. Anjiotensin II, adrenal bezin zona glomerulozasından aldosteron sentezi ve salınımını da uyarır. Aldosteron, toplayıcı duktuslar üzerine etki edip sodyumun ve eşlik eden suyun geri emilimini artırarak kan hacmini ve basıncını yükseltir⁵¹.

2.2.5. Tübül Sistemi

2.2.5.1. Proksimal Tübül

Proksimal kıvrıntılı tübülün kübik hücreleri, emilim ve sıvı transportunda görevli hücrelerle ilişkili yüzey özelleşmelerine sahiptir. Bu hücrelerin özellikleri:

- Fırçamsı kenar: Nispeten uzun, sıkıca paketlenmiş düz mikrovilluslardan oluşmaktadır.
- Bağlantı kompleksi: İnterselüler alanı tübül lümeninden ayıran dar bir sıkı bağlantı ve komşu hücrelerin birbirine adhezyonunu sağlayan zonula adherensten meydana gelir.
- Plika ya da katlantılar: Hücrelerin lateral yüzünde yer alan ve komşu hücrelerin benzer uzantılarıyla interdigitasyon yapan geniş yassı uzantılardır.
- Bazal çizgilenme: Bazal yüzeye dik konumlanan ve bazal uzantılarda yoğunlaşan uzun mitokondrionlardan oluşmaktadır.
- Yoğun bazal uzantı interdigitasyonu: 6 nm'lik mikrofilament demetleri bulunmaktadır. Bu aktin filamentleri sıvının bazolateral ekstraselüler alandan tübülün bazal laminasının diğer tarafına, komşu peritübüler kapillere doğru hareketini düzenlemede rol oynayabilir⁵¹.

Yüksek büyütme ışık mikroskopunda, proksimal tübülün iç içe geçmiş üç segmentten meydana geldiği görülür. Bunlar a) proksimal kıvrıntılı tübülün baş ve orta parçasını içeren S1 segmenti, b) proksimal kıvrıntılı tübülün son kısmı ve proksimal düz tübülün başlangıç kısmını içeren S2 segmenti ve c) proksimal düz tübülün kalan kısımlarını içeren S3 segmentidir^{67, 68}, ancak sadece jukstamedullar nefron proksimal düz tübülünde S3 segmenti bulunur^{69, 67, 68}. Ancak bu üç segment arası sınır çok belirgin değildir. S1 segmenti, daha geniş fırçamsı kenar membranı ve daha çok mikrovillus, endositotik kompartman ve iyi gelişmiş vakuolar- lizozomal sisteme sahiptir böylelikle de transport ve endositoz için daha fazla luminal yüzey oluşmaktadır. Ayrıca yine S1 segmenti S2 ve S3 segmentine kıyasla daha fazla lateral interdigitasyon veya invajinasyon, daha büyük mitokondrion ağı ve iyi gelişmiş Golgi aparatına sahiptir. Bu nedenle S1 segmentinin sodyum, çözünen maddeler, amino asit ve sıvı transportunda

tüm tübüler sistemlerden daha yüksek kapasiteye sahip olması şaşırtıcı değildir. Kıyaslama yapılacak olursa S3 segmenti, diğer segmentlerden daha kısa fırçamsı kenar, daha az bazolateral membran invajinasyonu, daha küçük mitokondrion, daha az belirgin olan endositotik kompartmanlara sahiptir⁷⁰.

Proksimal tübül, filtre olan NaCl ve suyun %60'ının, filtre bikarbonatın %90'ının ve glukoz ve amino asit gibi kritik nutrientlerin çoğunun reabsorbsiyonundan sorumludur. Proksimal tübülden bol miktarda sıvı absorbsiyonu yüksek onkotik basınç ve peritübüler kapillerler içindeki düşük hidrostatik basınç ile sürdürülür. Proksimal tübülden çoğu solütün hücrel transportu, bazolateral Na/K ATPase aktivitesi tarafından sağlanmış Na konsantrasyon farkına bağlıdır. Bu aktif transport mekanizması hücreler arası sodyum gradiyentini düşük tutarak aşırı (steep) bir sodyum gradientini idame ettirir. Solüt reabsorbsiyonu Na- bağımlı transporterlarla sağlanır. Glukoz reabsorbsiyonu proksimal tübülün sonunda neredeyse tamamlanmıştır. Glukozun transportu, apikal Na-glukoz kotransporter ile birlikte bir glukoz taşıyıcı ile bazolateral, kolaylaştırılmış difüzyon aracılığıyla olur. Paraselüler yola ek olarak su reabsorbsiyonu aynı zamanda her iki apikal ve bazolateral membranlarda bulunan yapısal olarak aktif su kanalları (aquaporin-1) ile sağlanan hücrel yol üzerinden de olur.

Proksimal tübül hücreleri karbonik anhidrazilardan bağımsız mekanizma ile bikarbonatı kazandırır. Filtre olmuş bikarbonat lümene Na/H Exchanger tarafından verilen protonlar tarafından ilk olarak titre edilir. Oluşan karbonik asit, fırçamsı kenar karbonik anhidrazı tarafından su ve karbondioksit metabolize olur. Erimiş karbondioksit karbonik asidi oluşturmak üzere hücreye difüze olur. Sonuçta, hücre içi karbonik asit, serbest proton ve bikarbonat anyonuna ayrılır ve bikarbonat hücreden bazolateral Na/ HCO₃ kotransporter ile çıkar.

Proksimal tübül değişik organik asitleri (karboksilat anyonları) ve bazıları (çoğunlukla primer amin katyonları) sekrete etme kapasitesine sahip spesifik taşıyıcılara sahiptir. Bu sistemlerle transport edilen maddeler organik anyonlar ürat, ketoasit anyonları ve glomerülden filtre olmayan çeşitli protein bağlı ilaçlar (penisilin, sefalosporin, salisilat)dır. Proksimal tübülden sekrete edilen organik katyonlar değişik biyogenik amin nörotransmitterler (dopamin, asetilkolin, epinefrin, norepinefrin, histamin) ve kreatinindir. Na bağımlı ve Na bağımsız transport sistemleri üzerinden proksimal tübül, amino asitleri etkin olarak reabsorbe eder⁶⁶.

2.2.5.2. Henle Kulpu İnce Segmenti

Henle ince segmentinin uzunluğu, nefronun kortekste konumuna göre farklılık göstermektedir. Jukstamedullar nefronlar en uzun kollara sahipken, kortikal nefronlar en kısa kollara sahiptir⁵¹. Bununla beraber inen kolda epitelyal morfolojide de belirgin heterojenite vardır. Kısa henle kulpu olan nefronun inen kolunda basit yassı epitel (Tip I hücre) vardır, bu hücrelerin komşu hücrelerle etkileşimi de azdır ve aralarında interdigitasyon bulunmaz, sıkı bağlantı varsa derindir. Belirgin fark olarak, uzun henle kulbu olan nefronda uzun hücreler ve epitelyal yüzey özelleşmesi (apikalde mikrovillus) bulunan epitel (Tip II) bulunur. Hücrelerin sitoplazması mitokondriden zengin, lateral interdigitasyonları ve bazolateral katlantıları ileri derecede gelişmiş, sıkı bağlantıları vardır. Uzun henle kulpu olan nefronların inen kol alt segmentinde, epitel morfolojisi Tip I hücreye benzer (Tip III) . İnen kolda aşağı inildikçe Tip II epitelyal hücrenin boyu kısalır. Tip III hücreye dönüşüm dış medullanın çeşitli seviyelerinde meydana gelir, bazen iç medullaya kadar uzanır⁷¹. Tip IV epitel hücresi, uzun kulplu henlenin dönüş yerinde ve bütün çıkan ince kol boyunca bulunmaktadır. Mikrovillussuz, alçak yassı epitelden oluşur. Hücreler az organelle sahiptir⁵¹.

Fonksiyonel bakış açısıyla, iç medulladaki inen ince kol, yüksek su ve üre geçirgenliğine sahiptir; oysa iç medulladaki çıkan ince kolun suya geçirgenliği az, sodyum klorür geçirgenliği önemli derecede yüksektir⁷². Son moleküler çalışmalar bu farklılığın açıklanmasına katkıda bulunmuştur. Esas su kanalı olan Aquaporin-1'in (AQP-1), inen ince kol hücrelerinin hem luminal hem de bazolateral yüzeyinde olduğu, böylelikle gereken su permabilitesinin sağlandığı bulunmuştur⁷³⁻⁷⁵, oysa çıkan ince kolda su kanalı bulunmamıştır⁷². Üre transporterı UT-A2 aktivitesi su yoksunluğunda artar, inen ince kolda bulunurken, çıkan ince kolda bulunmaz⁷⁶. Aksine klor kanalı olan ClC-K1 çıkan ince kolun bazolateral, muhtemelen de luminal membranında bulunur, inen ince kolda bulunmaz⁷⁷⁻⁷⁹.

2.2.5.3. Distal Düz Tübül

Henle kulpunun çıkan kolunun bir parçasıdır, hem medullar hem kortikal kısımlar içerir. Kortikal kısım medullar ışıklarda yer alır. Çıkan kalın kolu döşeyen epitel hücreleri NaCl geri Emilimini ve üriner konsantrasyon yeteneğini etkileyen, Üromodulin (Tamm- Horsfall) proteini olarak adlandırılan 85 kilo daltonluk bir protein

üretir. Rutin histolojik preparatta distal düz tübülün geniş kübik hücreleri eozin ile açık renk boyanır ve hücrelerin lateral sınırı belirsizdir. Nükleus hücrenin apikal kısmında yerleşmiştir ve bazen, özellikle de düz segmentte hücrenin lümene doğru çıkıntı yapmasına neden olur, bu hücreler yoğun bazolateral katlantılara sahiptirler ve bu bazal katlantılarla ilişkili çok sayıda mitokondrion bulunur⁵¹. Çıkan kalın kolda morfolojik olarak 2 tür hücre bulunmaktadır. Bunlar; belirgin apikal mikrovillusa sahip kaba yüzeyli hücre (R hücresi) ve çokça subapikal veziküle sahip düz yüzeyli hücre (S hücresi)dir^{80, 81}. Hamster çıkan kalın kolunda hücreler fonksiyonel olarak yüksek apikal, düşük bazolateral K geçirgenliği, yüksek bazolateral Cl geçirgenliği olan (LBC hücresi) ve düşük apikal, yüksek bazolateral K geçirgenliği, yüksek bazolateral Cl geçirgenliği (HBC) olan hücreler olmak üzere 2 çeşit hücre izlenir^{81, 82}. Morfolojik ve fonksiyonel subtiplerin kortikal ve medullar çıkan kalın koldaki rölatif frekansı, HBC hücrelerinin S hücrelerine, LBC hücrelerinin R hücrelerine karşılık geldiğini düşündürmektedir⁸¹.

Çıkan kalın kolda apikal membranda Na/K/2Cl kotransporter ile birlikte bir dizi bazolateral Cl kanalları ve Na/K ATPase tarafından sağlanan yüksek seviyeli sekonder aktif tuz transportu vardır. Tübüler sıvı K⁺u bu kotransporter için kısıtlayıcı substrattır (tübüler K konsantrasyonu plazmaya yakındır, yaklaşık 4 mEq/L), fakat apikal potasyum kanalı üzerinden K geri dönüşümü ile idame ettirilir. K dönüşümü aynı zamanda, paraselüler yol üzerinden divalan katyon (Mg ve Ca) reabsorbsiyonunu teşvik eden interstisyuma bağlı olarak lümende pozitif bir elektrostatik şarja katkıda bulunur⁶⁶.

2.2.5.4. Distal Kıvrıntılı Tübül

Fonksiyonel olarak 2 farklı bölüme ayrılır: DCT1 (ilk kısım), DCT2 (son kısım). Bu segmentler aldosterona cevap olarak farklılık gösterir. Aldosteron, volüm azlığı veya hiperkalemiye cevap olarak adrenal bezden salınan steroid hormondur. Kortizol gibi glukokortikoidlere benzer yapısı vardır ve her ikisi de mineralokortikoid reseptörüne eşit afinite ile bağlanırlar⁸³. Mineralokortikoid reseptörleri tüm distal kıvrıntılı tübül boyunca eksprese olmasına rağmen, 11-β hidroksisteroid dehidrogenaz 2 (11-βHSD2) enzimi eksprese ettiği için DCT2, aldosterona daha sensitiftir. 11-βHSD2, kortizolu inaktif metaboliti olan kortizona çevirerek, dolaşan glukokortikoidlerin DCT2'deki mineralokortikoid reseptörüne bağlanmasını engeller⁸⁴. DCT2'deki mineralokortikoid

reseptörüne sadece aldosteron bağlandığı için, DCT2 dolaşan aldosteron değişikliklerine DCT1'den duyarlıdır. 11- β HSD2 bağlayıcı tübül ve kortikal toplayıcı tübül gibi ilerideki nefron segmentlerinde de eksprese edilir. Bu nedenden dolayı DCT2, bağlayıcı tübül ve kortikal toplayıcı tübül, aldosteron duyarlı distal nefron olarak tanımlanır⁸⁵.

Bazal ve lateral membranda çok sayıda interdigitasyon barındırır. Mitokondrion bu membranlarla yakın ilişki içindedir. Hafifçe yassılaştırmış nükleus apikal membrana yakın konumlanmıştır. Apikal yüzeyde kısa mikrovillus bulunmaktadır⁸⁶. Bu bilgiler ışığında distal kıvrımlı tübülün yoğun ATP kullanımı gerektiren işlerde ve bazolateral Na-K-ATPase tarafından aktif transporttan sorumlu olduğunu göstermektedir⁸⁷.

Distal kıvrıntılı tübül, filtre olan NaCl'nin %5'ini reabsorbe eder. Esas NaCl transporte eden yol apikal membranı, elektronötral tiyazid duyarlı Na/Cl kotransporter ile çift olarak bazolateral Na/K-ATPase ve Cl kanallarını kullanır. Apikal Ca selektif kanallar (TRPV5) ve bazolateral Na/Ca değişimi distal kıvrıntılı tübülde kalsiyum geri emilimine aracılık eder. Ca reabsorpsiyonu paratiroid hormon tarafından uyarılır. Apikal NaCl kotransportunun engellenmesi ile hücre içi Na'nın azalması, artmış bazolateral Na/Ca değişimi ve pasif apikal Ca girişi sağlanacaktır⁶⁶.

2.2.5.5. Toplayıcı Tübül ve Toplayıcı Duktuslar

Toplayıcı tübüller, kortikal ve medullar toplayıcı duktuslar gibi tek katlı epitelle döşelidir. Toplayıcı tübüller ve kortikal toplayıcı duktuslar kısmen yassı, kısmen de kübik şekilli yassılaştırmış hücrelere sahiptir. Medullar toplayıcı duktuslar kübik hücrelere sahipken, çap arttıkça prizmatik hücrelere dönüşüm gözlenir. Toplayıcı tübüller ve duktuslar ışık mikroskopunda görülebilen hücre sınırları sayesinde proksimal ve distal tübüllerden kolayca ayırt edilirler⁶⁶.

Toplayıcı tübülde esas hücreler ve interkalar hücreler tuz karabiber görüntüsü oluşturur⁸⁸. Esas ve interkalar hücrelerin oranı tübüller segmentte farklılık gösterir, dış medullar toplayıcı duktusta bu oran 2:1 iken kortikal toplayıcı duktusta 3:1'dir^{89, 90}. İnterkalar hücreler, apikal kısımlarında fazlaca bulunan mitokondriondan dolayı 'mitokondriden zengin hücre' olarak adlandırılmıştır; bu dağılım bazolateral membran yakınında toplanan mitokondrionlara sahip diğer böbrek tübül hücrelerinden farklıdır⁹¹⁻⁹⁴. Bu hücreler çevre segment- spesifik hücrelere kıyasla 'çok sayıda irregüler apikal mikrovillusa' sahiptir⁹³. Bunun da ötesinde interkalar hücreler merkezi silyum

bulundurmaz, en azından kortekste, bu özelliği komşu esas hücrelerden farklılığıdır^{95, 90, 96, 97}. Pediküler morfolojileri kaplumbağa mesanesinde^{98, 99} ve kurbağa derisindeki¹⁰⁰ asit sekrete eden hücreleri anımsatır ve tıpkı bu hücreler gibi interkalar hücreler üriner asit sekresyonu, bikarbonat reabsorbsiyonu ve sekresyonunda rol alır¹⁰¹.

Tip A interkalar hücreler, morfolojik olarak silyum bulundurmaz, çok sayıda apikal mikropilika bulundurur ve apikal kısımda mitokondrionlar yoğun olarak bulunur^{90, 97}. Esas rolleri idrara proton sekresyonudur, pendrin ekspresyon yokluğu ile tanınırlar¹⁰². Tip A interkalar hücreleri asit sekresyonu ve bikarbonat geri emilimine aracılık eder⁶⁶.

Tip B interkalar hücrelerin bazolateral membranında asit geri emilimine olanak sağlayacak proton pompası bulunurken, apikal membranında bikarbonat sekresyonuna aracılık eden anyon değiştiricisi vardır. Asidemi koşulları altında, böbrek tercihen fazla H sekresyonu için tip A interkalar hücreleri kullanır ve daha çok bikarbonat oluşturur. Bu durumun aksi Tip B interkalar hücrelerin baskın olduğu alkemi ile birlikte bikarbonat fazlalığı durumudur. Hensin olarak adlandırılan hücre dışı protein bu adaptasyona aracılık eder⁶⁶.

Esas hücre, açık hücre, tek bir primer silyuma ve nispeten az sayıda kısa mikrovillusa⁵¹, mitokondrial birikimin üstünde uzanan bazal labirent olarak adlandırılan bazal içe katlantıya (infolding) sahiptir. ER ve golgi organeli vardır ancak sayıca çok değildir. Geniş subapikal mikrotübül ve mikrofilamanlar yüksek düzeyde protein trafiğini düzenler. İç medullaya doğru hücrede değişim gözlenir: bazal içe katlantılar ve mitokondrion sayıca azalır ancak büyüklük olarak artar¹⁰³. Bu hücrelerde, toplayıcı duktusların su permeabilitesinden sorumlu olan antidiüretik hormon (ADH) tarafından düzenlenen su kanalları olan akuaporin-2 (AQP-2) bol miktarda bulunmaktadır. Buna ek olarak bu hücrelerin bazolateral membranlarında akuaporinlerden AQP-3 ve AQP-4 bulunmaktadır⁵¹.

Toplayıcı duktuslar dış medulladan iç medullaya geçerken epitel hücreleri giderek daha uzun boylu hale gelirler ve renal papilla bölgesinde prizmatik epitele dönüşür. İnterkalar hücrelerin sayısı giderek azalır ve toplayıcı duktus papillaya ulaşırken hiç koyu hücre kalmaz⁵¹.

2.3. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler (AG) gentamisin, tobramisin, amikasin, streptomisin, neomisin, paromomisini içeren bir antibiyotik grubudur¹. Aminoglikozid isimlendirmesi molekülün 2 veya daha fazla amino şekerinin merkezi pozisyonundaki heksoz veya aminosiklitolle glisidik bağla bağlanması sonucunda verilmiştir. İsimlendirilmesi kökeni ile ilişkilidir. ‘Mycin’ ile sonlananlar direk veya indirek Streptomyces derivesi iken ‘micin’ ile sonlananlar direk veya indirek Micromonospora türevidir.

2.3.1. Farmakolojik Özellikleri

Aminoglikozidler molekül ağırlığı 445 ve 600 Dalton arasındadır, suda yüksek çözünürlüğe sahiptir, pH 6-8 arası stabildir ve katyonik yapı oluşturur bu onların oral absorpsiyonunu engeller ve interselüler alana penetrasyonu veya hematoenselafalik bariyeri geçişini zorlaştırır. Antimikrobiyal etkileri; mikrobiyal hücrelere transportunda oksijen gerektiği için aerob ortamda ve alkali koşullarda asit ortamdan daha aktif oldukları için alkali pH’da oluşur¹⁰⁴. Aminoglikozidler, polar ilaçlar olduğu için lipofilik değildir bunun da ötesinde sağlıklı gastrointestinal sistemden zayıf absorbe olur. Bundan dolayı intramusküler veya daha sık olarak, intravenöz yoldan uygulanmalıdır¹⁰⁵. İntramusküler uygulamadan 30 ile 90 dakika sonra, intravenöz uygulamadan 30 dakika sonra maksimum konsantrasyona ulaşır. Böbrek fonksiyonu normal olan kişilerde kandaki yarı ömrü 2-3 saattir. Aminoglikozidler düşük oranda plazma proteinlerine bağlanır (<10%)¹⁰⁶ istisnai olarak streptomisin %30 oranında proteine bağlanır. Hidrofilik yapıları gereği esas olarak ekstraselüler sıvıya dağılır¹⁰⁴. Bundan dolayı Vücut dağılım hacmi(Vd) (ilacın vücut dokularına dağılımını tanımlar) düşüktür, erişkinlerde 0.2-0.3 L/kg aralığındadır¹⁰⁶, ancak total vücut suyunun oran olarak daha yüksek olduğu neonatal dönemde Vd artmıştır¹⁰⁷. Ayrıca sepsis, ciddi yanık ve febril nötropeni durumlarında Vd artmıştır¹⁰⁶. Eliminasyonları glomerüler filtrasyonla ve eş zamanlı tübüler reabsorpsiyonla temizlenen kreatinin %66’i civarında olur. Böbrek korteksindeki yarı ömrü tahmini 30 ile 700 saat arasındadır, dolayısıyla son uygulamadan 20-30 gün sonrasına kadar ürinal eliminasyonu devam eder¹⁰⁴. Aminoglikozidler konsantrasyon bağımlı bakterisidal etki gösterir bu yüzden bakterisidal etki maksimum konsantrasyonda (Cmaks)’ta maksimumdur¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Konsantrasyon düştüğünde bakterisidal etki de düşeceği için yüksek bir tepe değeri elde

edilmesi amaçlanır, bunun sağlanması için de günlük toplam doz tek seferde verilir¹¹¹. Tepe değerinin Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK)'in en az 10 katı olması gerektiğini gösteren pek çok çalışma mevcuttur¹¹²⁻¹¹⁴. Konsantrasyon bağımlı patern olarak Cmaks/MİK prediktiftir¹¹¹. Hastane kaynaklı pnömoni hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada, Cmaks/MİK değerinin 10 veya daha yüksek olmasının, ateş ve lökosit sayısı baz alındığında %90 klinik başarı ile sonuçlandığı gösterilmiştir¹¹⁵. Post-antibiyotik etki konsantrasyon bağımlı antibiyotiklerde genellikle uzundur, bu etki toplam ilaç miktarıyla ilişkili olduğu için Eğri Altında Kalan Alan (EAA)/MİK de prediktif olarak kullanılabilir¹¹¹. Çalışmalarda Gram(-) basillere karşı aminoglikozid EAA/ MİK değerinin 100-125 arası olması gerektiği gösterilmiştir^{116, 117, 110, 118}.

Aminoglikozidler dar terapötik indekse sahiptir, en önemli toksik etkileri ototoksisite, nefrotoksisite ve nöromusküler bloktur. Yan etkilerin frekansı tanıda kullanılan farklı kriterlere bağlı olarak değişken olmakla beraber nöromusküler blok nadirken; ototoksisite %0-62 civarında (kohlear), %0-19 arası (vestibüler); nefrotoksisite 0 ile %50 arası değişkenlik gösterir¹⁰⁵. Nefrotoksisite ilacın katyonik yükü ve tübül epitel hücrelerine bağlanması ile ilgilidir: neomisin 6 katyonik amino grubuna sahip olduğu için en nefrotoksik olanken; gentamisin ve tobramisin 5 katyonik gruba sahiptir, amikasin 4 amino grubuna sahiptir, streptomisin ve netilmisin 3 amino grubuna sahiptir dolayısıyla en az nefrotoksik olanlardır. Aminoglikozidlerin membrana bağlanması toksisiteyi belirleyen en önemli faktörlerden birisi olmasına rağmen, hücreye afinite gentamisinin tobramisinden fazla birikmesine yol açmıştır⁶. Gentamisin ve tobramisin esas olarak vestibulotoksikken; neomisin, kanamisin ve amikasin kohleotoksiktir¹¹⁹. Nöromusküler blokaj için potens sırasıyla neomisin, kanamisin, amikasin, gentamisin ve tobramisin azalır. Nöromusküler blokajın klinik bulgularıysa; dilate pupil, zayıf solunum kasları ve flask paralizidir¹²⁰.

Aminoglikozidler elektrostatik etkiyle hızla hücre duvarına bağlanırlar. Bağlanma (Gram-negatif bakterilerde Lipopolisakkarite (LPS)'ye, fosfolipidlerin polar ucuna ve anyonik dış membranın diğer proteinlerine) pasiftir ve enerji gerektirmez¹²¹. Bu yüksek polariteye sahip moleküllerin gram negatif bakteri^{122, 123} dış membranından geçişi lipopolisakkaritler arasındaki Mg köprülerinin kırılması ile kendiliğinden gerçekleşir¹²⁴. Porin kanallarından geçiş büyük boyutları (1.8x1.0x1.0 nm¹²⁵ nedeniyle

mümkün görünmemektedir. Sitoplazmik (iç) membrandan geçişleri elektron transportuna bağlıdır ve enerji bağımlı faz (EDP-I¹²⁶) olarak adlandırılır. Hız kısıtlayıcıdır, divalen katyonlar, hiperozmolarite ve düşük pH¹²⁷, anaerob ortam tarafından inhibe edilir veya bloklanır. Sitozolda, aminoglikozidler yine enerji bağımlı bir işlemle ribozomun 30S alt birimine bağlanır (enerji bağımlı faz II (EDPII)¹²⁶). Bu bağlanma her ne kadar peptid sentezinin inisiyasyon kompleks oluşumunu (mRNA, fMetRNA bağlanması ve 50S subunit ile bağlanma) engellemiyor olsa da, translasyon doğruluğunun kontrolünü (yanlış okuma ve/veya prematür sonlandırma¹²⁸) bozarak yeni zincirin uzamasını engeller. Ayrıca hatalı katlanmış protein hücre membran yapısına katılıp, geçirgenliği değiştirerek aminoglikozid transportunu stimule edebilir¹²⁹. 2-deoksi-streptamin ve amino şekerle primeri translasyona uygunluğun kaybından sorumludur¹³⁰. Aminoglikozid bağlanmasından sorumlu olan nükleotidler nonkanonik baz çiftlerinin neden olduğu asimetrik internal loop meydana getirir^{130, 131}. Klinikte kullanılan aminoglikozidler, kullanılan terapötik konsantrasyonlarda ($\leq 25 \mu\text{g/ml}$) prokaryotik protein sentezinin inhibitörüdür; daha yüksek konsantrasyonlarda olasılıkla ökaryotik ribozoma ve/veya nükleik aside nonspesifik bağlanma ile memeli hücrelerinin¹³² de protein sentezini etkileyebilirler.

2.3.2. Aminoglikozidlerin Klinik Kullanımı

Aminoglikozidlerin en sık klinik kullanımı (yalnız veya kombinasyon tedavide) aerob gram negatiflerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlardır^{2, 3}. Daha az sıklıkla olmakla beraber, bazı gram pozitif enfeksiyon tedavisinde de kullanılırlar. Ek olarak, belirli aminoglikozidler protozoa (paramomisin), *Neisseria gonorrhoeae* (spektinomisin), mikobakteriyal enfeksiyon (tobramisin, streptomisin ve en sık olarak amikasin) karşı etkin aktivite gösterir¹³³. İn vitro duyarlılığı bölgesel farklılıklar gösterse de, çoğu aerobik ve fakültatif gram negatif basil hala duyarlıdır. *Burkholderia cepacia* veya *Stenotrophomonas maltophilia*'ya karşı etkin değildir. Buna karşın koagülaz negatif stafilokok ve metisilin duyarlı *Stafilokok aureus* türlerinin %95'inden fazlası aminoglikozidler tarafından inhibe edilir (özellikle gentamisin ve netilmisin), dirençli varyantlar eş zamanlı antistafilokkal β -laktam ve vankomisin uygulanmadığı takdirde 24 saat içinde ortaya çıkarlar. Toplum kaynaklı metisilin dirençli *Stafilokok aureus*un bazı kolonileri ve *Streptococcus pneumoniae*'yı kapsayan tüm streptokoklar

dirençlidir. Aminoglikozidlerin antimikrobiyal etkileri için aerobik ortam gerektiği için, tüm anaerobik bakteriler ve anaerobik ortamda gelişen fakültatif anaerob bakteriler intrinsik dirençlidir¹³⁴. Aminoglikozidler, geniş antibakteriyel etki spektrumu nedeniyle febril nötropenin ampirik tedavisi ve hastane enfeksiyonlarının tedavisinde öneme sahiptir. Enterokoklar gibi bakterilere beta laktam grubu antibiyotiklerle sinerjistik aktiviteye sahip olması avantaj sağlamaktadır. Genellikle aminoglikozidlerin tek başına uygulandıkları tek klinik kullanım idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisidir¹³⁵. Aminoglikozidlerin klinik kullanımı tablo 1’de özetlenmiştir:

Tablo 1. Aminoglikozidlerin klinik kullanımları ve özellikleri¹³⁶

Aminoglikozidler	Klinik kullanım	Veriliş yolu
Streptomisin	- Tüberküloz tedavisinde izoniazid ve etambutolle birlikte - Bakteriyel endokarditte penisilinle kombine - Bruselloz tedavisinde tetrasiklinle birlikte - Tularemi ve vebada ilk ilaç	IM
Paromomisin	- AIDS’li hastalardaki kriptosporidiosis tedavisinde - <i>Dientamoeba fragilis</i> , <i>Taenia saginata</i> , <i>Taenia solium</i> , <i>Hymenolepsis nana</i> gibi paraziter enfeksiyonların tedavisinde	IV kullanımı toksik, oral kullanılır
Neomisin	- Eritromisinle birlikte kolon cerrahisi profilaksisinde - Hepatik komada enterik bakteri sayısını düzeltmede	IV kullanımı toksik,
Gentamisin Amikasin Netilmisin Tobramisin	- Hastane kökenli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında (bakteremi, intraabdominal ve üriner sistem enfeksiyonlar vb) diğer antibiyotiklerle kombine - Bakteriyel endokardit tedavisinde genellikle penisilinle kombine - Nötropenik ateşli hastalarda antipsödomonal bir beta-laktamla kombine - Hastanede gelişen infeksiyöz artrit ve osteomyelit tedavisinde diğer antibiyotiklerle kombine	IM veya IV

2.3.3. Yan Etki Profili

Geçmişte aminoglikozidlerin kullanımı yaygınlaştıkça; ototoksisite ve nefrotoksisiteye daha sık rastlanmıştır; daha güvenli, antimikrobiyal ajanlar mevcut olduğunda, aminoglikozidlerin kullanımı keskin bir şekilde azalmıştır. Ancak çoklu ilaç direncine sahip bakteri gelişimi klinisyenleri ciddi enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidleri tekrar gözden geçirmeye itmiştir⁴. İstenmeyen toksik etkilerine rağmen aminoglikozidlerin tercih edilme nedenleri arasında; diğer antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların tedavisinde kullanımı, kimyasal stabilitesi, hızlı bakterisidal etki göstermesi, Beta laktam antibiyotiklerle sinerjistik etki göstermesi, az direnç gelişimi ve düşük maliyeti vardır⁵. Nefrotoksisiteye en çok neden olan aminoglikozidlerden birisi olmasının aksine, gentamisin çeşitli klinik durumların tedavisinde ilk veya ikinci seçeneği oluşturur. Bunun da ötesinde, gentamisin bir ilacın grup deney hayvanı ve insanlarda nefrotoksisitesinin incelenmesinde model oluşturur¹³⁷⁻

¹³⁹. Aminoglikozid nefrotoksitesinden sorumlu mekanizmalarla ilgili mevcut bilgilerin çoğu gentamisin prelinik hayvan veya hücre kültürü çalışmalarından elde edilmiştir¹⁴⁰.

2.3.3.1. Nefrotoksisite

Aminoglikozid kullanımıyla ilişkili Akut Böbrek Yetmezliği (ABY) insidansı, diagnostik kriterlere ve çalışılan popülasyonlara göre farklılık gösterir¹⁰⁴. Ancak, nefrotoksisite frekansı %0 ile 50 aralığındadır¹⁴¹⁻¹⁴³. Bir grup genç sağlıklı gönüllüde insidansı sıfır bulunmuşken, multisistemik hastalığı olan yaşlı kişilerde bu oran %50'ye ulaşmıştır¹⁴⁴. Yoğun bakımda hospitalize kişilerde aminoglikozid nefrotoksisite tanısında kullanılan kriterler değişiklik göstermekle beraber oran %76'ya varabilmektedir¹⁴⁵. Klinik pratikte hem profilaksi hem de önce bahsedilen enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı için kullanım alanı geniştir, böbreklerin kan akımının yüksek olması (kardiyak outputun %20'si), toksik maddeleri konsantre edip atılımını sağlaması nedeniyle renal hasar insidansı da yüksek olabilmektedir.

AG nefrotoksitesi için risk faktörleri¹⁴⁶:

AG tedavisi süresi: Renal yetersizliğin gelişmesi için genellikle tedavinin başlangıcından itibaren 7 gün geçmesi gerekir. Bununla birlikte, eşlik eden renal iskeminin (volüm azalması ve hipotansiyona bağlı) varlığında bir ya da iki gün içinde dahi renal yetmezlik gelişebilir.

Sepsis veya nefrotoksinler: Sepsiste renal vazokonstriksiyona bağlı azalmış renal perfüzyon nefrotoksisite gelişimini kolaylaştırır. Ayrıca endotoksinler tübüllerde ilaç birikimini artırarak nefrotoksik etkinin ortaya çıkmasına neden olurlar.

Yüksek plazma aminoglikozid konsantrasyonu: Plazma ilaç seviyelerinin dikkatli monitörizasyonu önemlidir. Ancak tedavi süresi uzarsa, ilaç seviyesi çok iyi kontrol edilse de, renal kortikal dokuda birikim artacağından, renal fonksiyonlarda bozulma görülebilir¹⁴⁷. Yüksek plazma aminoglikozid konsantrasyonu glomerüler filtrasyon hızındaki azalmanın ilk belirtisi olacağından, yararlı bir böbrek fonksiyon testi olma özelliğini de gösterir. Bölünmüş doz tedavi uygulamasında gentamisin ve tobramisin için tavsiye edilen minimum zirve konsantrasyonu 5 µg/mL'dir.

Doz sıklığı: Yapılan deneysel araştırmalarda, günlük tek seferde yüksek doz ilaç uygulamasının geleneksel bölünmüş doz uygulamalarına kıyasla daha az akut böbrek yetmezliği yaptığı gzlenmiřtir¹⁴⁸. Bu koruyucu etki renal kortekste daha az ilaç depolanmasına bağlıdır. Tek sefer ilaç uygulamasında günde bir kez uygulanan yüksek plazma ilaç seviyesinde taşıyıcı reseptörlerin doymasına bağlı olarak renal tübüllerde günlük geri emilen ilaç miktarı azalacaktır. Bolus tedaviyle ortaya çıkan yüksek zirve plazma seviyesi günün büyük bölümünde göreli olarak düşük aminoglikozid düzeyine rağmen bakteri ölümünü sağlamada yeterli görülmektedir. Tek doz uygulama antibiyotiğin gram (-) infeksiyonlardaki kullanımı için önerilmektedir. İnsanlarda günde bir kez AG uygulamasının nefrotoksisite gelişimi üzerine olan sonuçları kesin belirlenmiş değildir.

Karaciğer hastalıkları: Karaciğer hastalığı (zellikle ilerlemiş siroz) ve obstrüktif sarılık artmış aminoglikozid nefrotoksitesisi ile ilişkilidir.

Hayvan deneylerinde ise; erkek cinsiyet¹⁴⁹, asidoz, volüm azlığı, sodyum azlıęı¹⁵⁰ hiperkalemi¹⁵¹ hipomagnezemi¹⁵² ve eş zamanlı vankomisin¹⁵³, teikoplanin¹⁵⁴, siklosporin¹⁵⁵, sisplatin¹⁵⁶ gibi ilaç kullanımı aminoglikozid nefrotoksitesisi ile ilişkilendirilirken; tek doz uygulanım¹⁵⁵, dişi cinsiyet¹⁵⁶, alkaloz¹⁵⁷, tiroid hormonu¹⁵⁸, kalsiyum yklemeři¹⁵⁹, diyabet⁴¹, eş zamanlı geniş spektrumlu penisilin¹⁶⁰ ve poliaspartik asit¹⁶¹ kullanımı nefrotoksitesiteyi azaltan faktörler olarak bulunmuştur.

Aminoglikozid nefrotoksitesisinin klinik bulguları nonoligürik veya hatta poliürik renal atılım bozukluğuna^{43, 162-164} eşlik eden plazma kreatinin, üre ve diğer metabolik artıkların artışı, proteinüri, enzimri, aminoasidüri, glukozüri ve elektrolit değişimi (hiperkalsiüri, hipermagnezri, hipokalsemi, hipomagnezemi)^{165, 163} dir. İdrar tetkikleri karakteristik patern sergilemez, bazen lökositüri, proteinüri, silendirri grlebilmektedir¹⁶⁶. İdrarda enzim atılım artışı tübüler hasarın (alanin aminopeptidaz, β-D-glukozamin ve alkalen fosfataz) gstergesidir¹⁶⁷. İdrar sodyum konsantrasyonu (40 mEq/L üzerindedir) ve sodyum atılım fraksiyonu (%1) genellikle yüksektir. İdrar volümünde değişim meydana gelmediği için nefrotoksisite sıklıkla serum kreatininde artışla deęerlendirilir¹⁶⁶. Aminoglikozid uygulanımını kestikten sonra 21 gün içinde serum kreatinin konsantrasyonu normale dönmektedir. İrreversibl tubulointerstisyel hasar, akut nefrotoksitede sık görülmez, ancak düşük dozlarla¹⁶⁸ uzun süre tedavide ve önceden bozulmuş böbrek fonksiyonu olanlarda¹⁶⁹ meydana gelebilmektedir. İnsan

terapötik dozlarının azı hayvanlara (sıçanlar için 10-20 mg/kg/vücut ağırlığı) uygulandığında proksimal tübül hücresi lizozomlarında polar lipid birikimi meydana gelmektedir^{170, 15, 171, 172}. Yüksek doz (gentamisin için 40 mg/kg) tedavi ise hayvanlarda hızlıca kortikal nekroz oluşturup disfonksiyona yol açar^{171, 173}.

2.3.3.1.1. Glomerüler Etkileri

Nefronun kimyasal ajanlarla ilk karşılaşan kısmı glomerüldür. Gentamisinin glomerüler etkileri¹⁴⁰: (i) mezangial kontraksiyona neden olarak¹⁷⁴ Kf (ultrafiltrasyon faktörü) ve GFR'nin azaltılması^{39, 175} (ii) mezengial hücrelerde eş zamanlı olarak hem apoptoz hem de mezengial proliferasyon meydana gelişi ki bu olaylar birbirini kompanse eder^{174, 176} (iii) glomerul morfolojisinde ciddi değişime neden olmadığı bilgisinin aksine, yüksek doz tedavide, glomerul boyutunda az miktarda artış, yuvarlak şekil ve dansitesinde bozulma nedeniyle filtrasyon bariyerinin bozulması ve nötrofil infiltrasyonu ile filtrasyon bariyerinin genişlemesi¹⁷⁷, negatif yükünün nötralizasyonuna bağlı filtrasyon bariyer selektivitesinde kayıp¹⁷⁸ şeklindedir ki bu durum proteinüriye katkıda bulunduğu için özellikle tübüler nekroz gibi reabsorbsiyonun karşılanmadığı durumlarda önem kazanır.

Çalışmalar; gentamisinin glomerüler endotel fenestral por sayı ve büyüklüğünü azalttığını¹⁷⁹⁻¹⁸¹, bu nedenle lizozim gibi düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin elenme katsayısında bir düşüş olduğunu¹⁷⁹ ve glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nin azaldığını göstermiştir. Bu etkilerin mezengial kontraksiyonun sonucu da olabileceği düşünülmektedir¹⁴⁰. Gentamisinin indüklediği çeşitli faktörler, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunu artırmakta, bu da mezangial hücre kontraksiyonuna neden olmaktadır¹⁷⁴. Bu faktörler¹⁴⁰: i) platelet aktive edici faktör (PAF) sekresyonu ve otokrin aktivasyonu¹⁸²; ii) renin anjiotensin aldosteron sistem aktivasyonu; iii) endotelin 1 ve tromboksan A2 gibi endotelial disfonksiyon sonucu ortaya çıkan vazokonstriktör üretimi¹⁸³; iv) Kalsiyum duyarlı reseptör (CaSR) stimülasyonu, v) reaktif oksijen radikal (ROS) üretiminde artış ve oksidatif stres¹⁸⁴ tir. Fosfolipaz A2 aktivasyonu, bu mediatörlerin bazılarının sentezi ve mezengial hücreler üzerinde etkileri ile ilişkilidir¹⁸⁵. Fosfolipaz A2, araşidonik asit oluşumunu katalizler; araşidonik asit siklooksijenaz ile mezengial kontraksiyona neden olan tromboksan A2'yi meydana getirir. Ek olarak solubl fosfolipidlerden fosfolipaz A2 aktivitesi ile PAF sentezlenir. PAF ise mezengial

kontraksiyonda rol alan; GFR'yi azaltan mediatördür¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Mezangial hücre apoptozu artan ROS^{189, 176} ve muhtemelen aşırı NO üretimi nedeniyle meydana gelmektedir¹⁷⁴. Gentamisin indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS)'u stimüle edip glomerül ve mezangial hücrede NO üretimine neden olmaktadır^{190, 191}. iNOS'a bağlı üretilen fazla miktarda NO; süperoksit anyonu ile etkileşir ve peroksinitriti meydana getirir ki bu sitotoksik etki gösterir⁴⁶. Mezangial proliferasyon kalsiyum bağımlı AP-1 aracılığıyla olmaktadır¹⁷⁶. Muhtemelen apoptoz-proliferasyon süreci doku bütünlüğünün sağlanması açısından kompanzasyon için gelişmektedir. Nükleer faktör kappa B (NF-κB), ROS'u içeren çok sayıda kimyasal ve biyolojik stimulusla aktive olan anahtar transkripsiyon faktörüdür²⁹. Gentamisinin indüklediği nefrotoksisitede ise oksidatif stres NF-κB transkripsiyon faktörünü stimüle eder. Stimülasyona bağlı NF-κB, NF-κB-IκB kompleksinden ayrılır, nükleusa transloke olur ve böbrek hasarına neden olan hedef genlerin^{29, 30}, İnterlökin 6 (IL-6), iNOS, Tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa), Siklooksijenaz-2 (COX-2), transkripsiyonel aktivasyonuna neden olur. Ek olarak intraselüler Ca²⁺ konsantrasyon ([Ca²⁺]_i) artışının da NF-κB aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir^{31, 32}.

2.3.3.1.2. Vasküler Etkileri

Gentamisin, vasküler yatak direncini arttırdığı¹⁹² için renal kan akımı azalmaktadır^{193, 44}. Azalmış kan akımı, tübüler oksijen ve ATP'nin de azalmasına neden olarak hücreleri ölüme yatkın hale getirmektedir. Tübüler reabsorbsiyonun azalması nedeniyle TGF aktivasyonu ve TGF'ye adaptasyon sürecinde vasküler ağaç ve mezangial kompartmandan salınan vazokonstrüktörler; renal kan akımının başlangıçtaki azalmasına neden olur. Endotel ve mezangial hücreden¹⁷⁴ endotelin-1¹⁸³, PAF ve başta prostoglandin ve tromboksan A2 olmak üzere araşidonik asit metabolitleri^{194, 185, 195} gibi vazokonstrüktörlerin salınımı parakrin olarak vasküler miyositleri kasarak vazokonstrüksiyona yol açar. Gentamisin vazokonstrüktör üretimine ek olarak vazodilatör prostoglandin sentezini de bloke eder¹⁹⁵. Endotelyal NO sentaz tarafından üretilen NO düşük seviyede vazodilatasyon yaparken, iNOS'a bağlı aşırı NO üretimi komşu hücrelerde sitotoksiktir. NO, süperoksit anyonuyla birleşip peroksinitriti meydana getirir. Peroksinitrit, hücre ve protein hasarını indükler, endotelyal NO sentazı,

vasküler oksidatif strese katkıda bulunan işlevsiz bir süperoksit üreten enzim haline getirir¹⁹⁶.

2.3.3.1.3. Tübüler Etkileri

Gentamisin sitotoksitesitesi ilacın biriktiği alanlarda meydana gelmektedir. Deney hayvanları⁷ ve insanlarda⁸ esas olarak proksimal tübül olmak üzere, distal ve toplayıcı tübülün⁹ etkilendiği gösterilmiştir. Gentamisinin bu hücrelerde birikimi, varlığı proksimal tübülle sınırlı olan megalin ve cubulin tarafından oluşturulan büyük endositotik kompleks olarak adlandırılan taşıyıcıların varlığı nedeniyledir. Bu kompleks aminoglikozidlerin endositozunu sağlamaktadır¹². İlaçlar endositotik kompartmanlardan sonra lizozom başta olmak üzere, golgi ve endoplazmik retikulumda birikir^{13, 14} Gentamisin membran fosfolipidlerine bağlanır, bunların metabolizma ve turnoverını etkileyerek insan¹⁵ ve deney hayvanında^{16, 17} fosfolipidoza neden olur. Endozom içinde aşırı miktarda aminoglikozid biriktiğinde, membran bütünlüğü bozulur ilaç sitoplazmaya dağılır^{18, 19}. Sitolik gentamisin, kaspaz aktivasyonuna neden olarak apoptotik sinyalizasyonu tetikler. Apoptotik aktivasyon direk (Bax aktivasyonunu takiben mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu²⁰) olabileceği gibi indirek (proteazomal yıkımın inhibisyonu ile ubiquitinlenmiş Bax artışı²¹) de olabilmektedir. Ayrıca gentamisin poliunsatüre lipid varlığında in vitro şartlarda reaktif oksijen radikal oluşumu ile de apoptotik süreci tetikleyebilmektedir²². Gentamisin, endoplazmik retikulumda (ER) protein sentezini inhibe edip translasyonu ve posttranslasyonel modifikasyonu²³ bozduğu için ER stres meydana gelir. Bunun sonucunda da ER'den kalsiyum salınımı²⁴ sonrasında kaspaz 12 ve kalpain²⁵ aracılı apoptoz meydana gelir. Sharma ve Rohrer yaptıkları çalışmada intraselüler kalsiyum artışının, kalpain aktivasyonuna neden olduğunu, kalpainin de kaspaz 3 modülasyonu ile apoptozu tetiklediğini göstermiştir²⁶. Spletstoeser ve ark. HeLa-S3 hücre hattında 2-APB ile sisplatinin indüklediği Ca⁺² girişinin azaltılarak kalpain aktivasyonunu ve apoptoz indüksiyonunun engellenebileceğini öne sürmüştür²⁷.

2.4. Kalsiyum Bağımlı Süreçler

Kalsiyum iyonları hücre siklusu, diferansiasyonu, mitoz, apoptoz, ETozis, hücre mobilitesi, makrofaj aktivitesi, kromatin paketlenmesi ve modifikasyonu, protein

katlanması gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır²⁸. Kalsiyum bağımlı işlemlerin uygun olmayan aktivasyonunu engellemek için intraselüler kalsiyum düzeyinin kritik kontrolünün sağlanması gereklidir. Bunun için kalsiyum ekstraselüler alanda tipik olarak 1 mM veya daha fazlayken, sitozolde 100 nM düzeyinde tutulur. İntraselüler Ca^{2+} regülasyonu: 1) ER ve mitokondrion gibi intraselüler organellerden salınım, 2) ekstraselüler alandan Ca^{2+} girişi ve 3) depo Ca^{2+} seviyesinin yeniden düzenlenmesi ile sitozolik Ca^{2+} 'un azaltılması ile sağlanmaktadır. Depo Ca^{2+} salınımını ekstraselüler Ca^{2+} girişine bağlayan işlem depo aracılı kalsiyum girişi (*Store Operated Calcium Entry* (SOCE)) olarak adlandırılır²⁰. SOCE; ligandın reseptörüne bağlanması gibi bir olay ile ER'de depolanmış kalsiyumun salınımına neden olmaktadır.

2.4.1. Kalsiyum, Endoplazmik Retikulum-Mitokondrion ve Apoptozis

Yukarıda sayılan fizyolojik işlemler için gereken enerjinin sağlanmasında salınan kalsiyumun ATP sentezinde görevli kalsiyum bağımlı enzimlerin aktivasyonu için mitokondrionda birikimi gereklidir. Bu işlemin düzgün şekilde yürütülmesinde İnozitoltrifosfat reseptöründen (IP_3R) Ca^{+2} salınımı gerektiği için ER ve mitokondrion membranının yakın komşulukta olması gerekir. Apoptotik stimulus altında, ER'den IP_3 reseptörü aracılı Ca^{+2} salınımı, apoptotik yolları aktive eder. Mitokondrionda Ca^{+2} birikimi mitokondrial membran permeabilite geçiş poru (mPTP) oluşumunu tetikler¹⁹⁷. mPTP oluşumu proapoptotik faktörlerin (sitokrom c gibi) salınımı ile sonuçlanır¹⁹⁸. Ek olarak Boehning ve ark. tarafından salınan az miktarda sitokrom c'nin dahi ER'deki IP_3 reseptörüne bağlanıp kalsiyum sentezini pozitif feedback ile artırabileceği öne sürülmüştür¹⁹⁷. Protein katlanması da kalsiyum gerektireceği için, ROS nedeniyle ER'nin protein katlama kapasitesi aşıldığında kalsiyum salınımı tetiklenebilmektedir.

2.5. 2-Aminoetoksidifenil borat (2-APB)

2-APB, ilk olarak Ronderstvent ve arkadaşları¹⁹⁹ tarafından 1954 yılında trifenilboran ve etanol aminden sentezlenmiştir. Daha sonra, 2-APB sentezi için hidroksidifenilboran ve etanol amin metodu Weidman ve Zimmermann²⁰⁰, Letsinger ve Skoog²⁰¹, Pavlock ve Lippincott²⁰² tarafından bildirilmiştir.

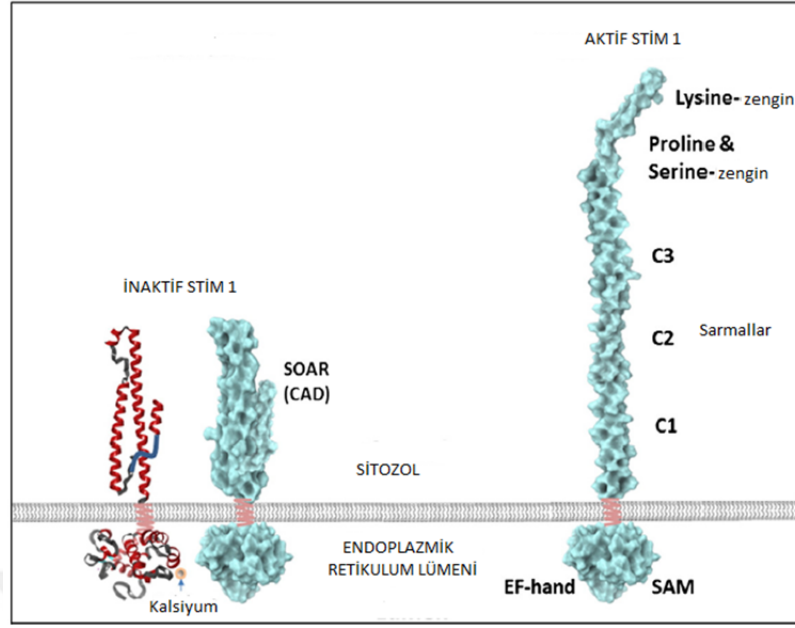
2-APB, İnozitol 1,4,5-trifosfat reseptörünün¹⁰ antagonistidir. Ayrıca Depo aracılı kalsiyum kanalının (SOC) ve sarko/endoplazmik retikulum Ca^{+2} ATPaz pompasının

inhibitörüdür ¹¹. Bunun da ötesinde 2-APB; Geçici reseptör potansiyel (*Transient receptor potential*) (TRP) kanal modülatörüdür. Şöyle ki; Hu ve ark. 2-APB'nin V1,V2,V3 kanallarını aktive ettiğini ²⁰³, Kovacs ve ark 22 µM IC₅₀ değeriyle heterolog TPRV6 kanallarını inhibe ettiğini göstermiştir. İlginçtir ki aynı çalışmada homolog TPRV5 kanallarını inhibe etmediği gösterilmiştir²⁰⁴. 2-APB ayrıca TRPC1, TRPC4, TRPC5^{205, 206} ve TRPC6²⁰³ kanallarını da inhibe etmektedir. Bu nedenle 2-APB intraselüler Ca⁺² sinyalizasyonunun düzenlenmesinde kullanılan farmakolojik araçtır.

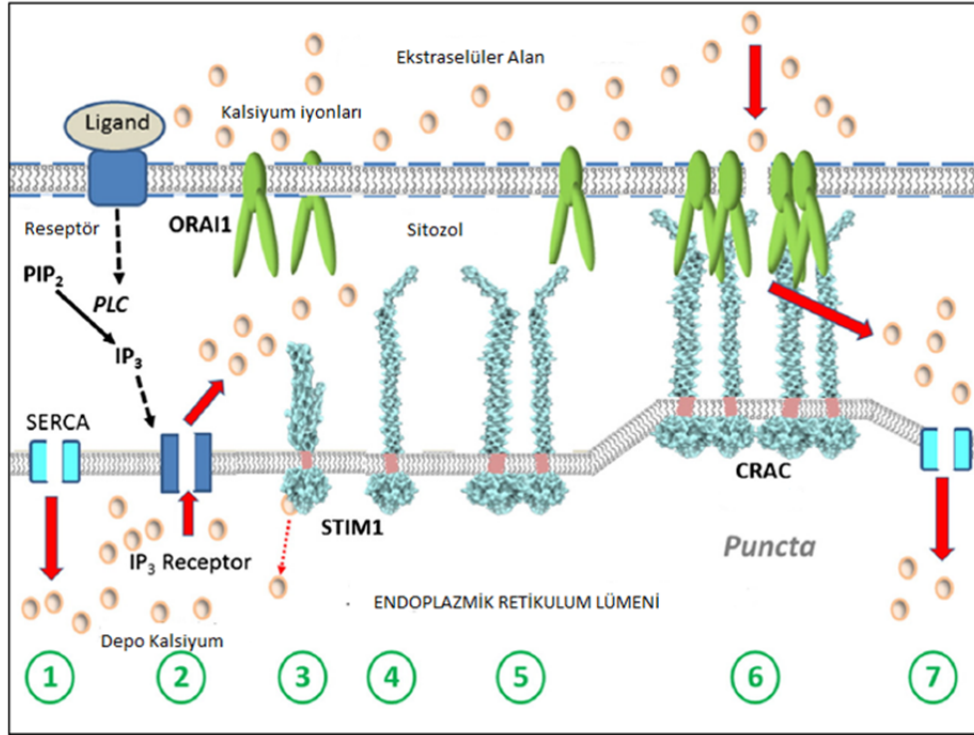
2.5.1. Depo Aracılı Kalsiyum Girişi (*Store Operated Calcium Entry*) (SOCE)

2-APB'nin SOCE aktivitesi üzerine etkileri gayet komplekstir. Genel olarak, 2-APB, düşük konsantrasyonda I_{CRAC} akımını potansiyalize ederken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedir²⁰⁷. SOCE, yapısında por oluşturan subünitlerin Orai1, Orai2 ve/veya Orai3 olduğu, I_{CRAC} (Ca²⁺-salınımı ile aktive olan akım) akımıdır. ORAI kanalları Ca⁺² girişine aşırı selektiftir, STIM tarafından ORAI kanal aktivasyonu, STIM'in puncta olarak adlandırılan ER'nin plazma membranına en yakın bölgesine transloke olması ve STIM'in ORAI molekülü ile etkileşimini gerektirir²⁸. ER Ca²⁺ sensörü gibi davranan ve SOCE aktivasyonunda major role sahip olan STIM1'in hücresel dağılımı da 2-APB'den etkilenir²⁰⁸

ER'de depo Ca⁺² azaldığında STIM'e bağlı kalsiyum iyonu kaybolur ve STIM aktive olur. STIM'i aktive eden bu değişim (şekil 3'te gösterilmiştir) STIM dimerizasyonunu kolaylaştıran konformasyonel değişikliklere ve ER membranından plazma membranına daha yakın konumda olan puncta'ya lateral migrasyonuna izin verir. Bu işlemle, STIM ORAI molekülü ile etkileşir, bu etkileşimle, ORAI por-olusturucu moleküller Ca⁺² girişi için selektif aktif açık kanallar haline gelir (şekil 4). Bu kanal kompleksi kalsiyum salınımıyla aktive kalsiyum kanalı (CRAC) olarak adlandırılır ve SOCE için temel konsepti temsil eder. SOCE aktivitesinin 3 mekanizma ile başlatıldığını biliyoruz: 1)ER membranındaki IP3 reseptör aktivasyonu, 2)ER membranındaki SERCA kanal blokajı veya 3) ER membranındaki Ca⁺² iyonoforları.



Şekil 3. STIM yapısal değişim^{209, 210}.

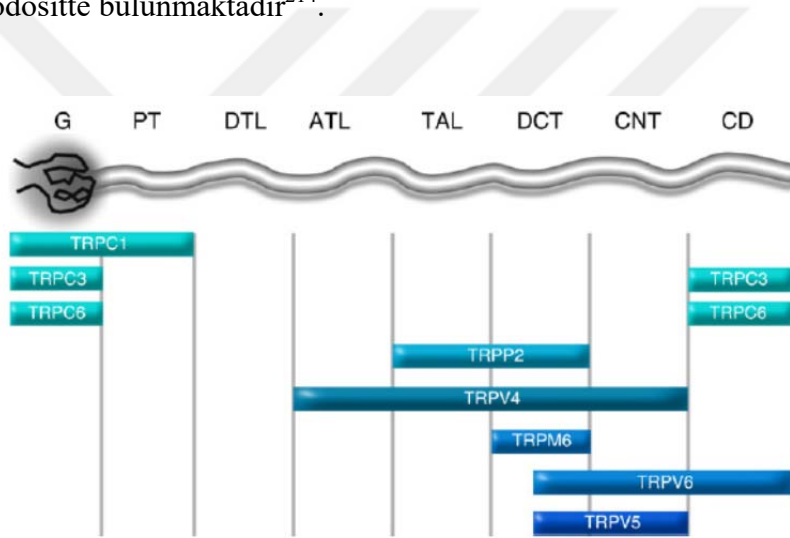


Şekil 4. Depo aracı kalsiyum kanalları: Kalsiyum girişi: 1) SERCA ile ATP bağımlı yollarla Ca^{+2} 'nin depolanması, 2) Ligand reseptörüne bağlandığında, fosfolipaz C aktive olur Fosfatidil inozitol 4,5 bifosfatı (PIP2) İnozitol 1,4,5 trifosfata (IP3)'a dönüştürür, IP3, IP3 reseptöründen depolanmış Ca^{+2} , un salınımını tetikler. 3) STIM1, düşük ER Ca^{+2} 'unu algılar 4) aktive olur ve 5)homodimer haline gelir. 6) STIM1, puncta'ya hareket eder ve plazma membranında ORAI1 ile oligomerize hale gelir ve böylece CRAC (Kalsiyum salınımıyla aktive kalsiyum) kanallarını aktiveştirir. 7)Sitozolik Ca 'u efektif seviyeye getirmek için ekstraselüler Ca^{+2} girer. Ca^{+2} bağımlı aktivite bittiğinde, ER; SERCA tarafından Ca^{+2} ile doldurulmuştur^{209, 210}.

2.5.2. Geçici Reseptör Potansiyel Kanalları (Transient Receptor Potential Channels) (TRP)

TRP süperailisi 6 alt gruba ayrılır: TRPA (Ankrin), TRPV (Vaniloid), TRPM (Melastatin), TRPC (Canonical), TRPP (Polikistin) ve TRPML (Mukolipin)²¹¹⁻²¹³. Nefronun farklı segmentlerinde yer alan kanallar şekil 5'te gösterilmiştir.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmada TRPC1 immunfloresan boyanması glomerülde gözlenmiş, proksimal tübül ve inen kalın kolda aquaporin-1 ile yakın lokalizasyonda bulunmuştur. TRPC3 ve TRPC6'nın dominant olarak glomerül ve toplayıcı tübül esas hücresinde aquaporin 2 ile eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Glomerül yapısında, TRPC1 esas olarak mezangial hücrede eksprese olurken, TRPC3 ve TRPC6 podositte bulunmaktadır²¹⁴.

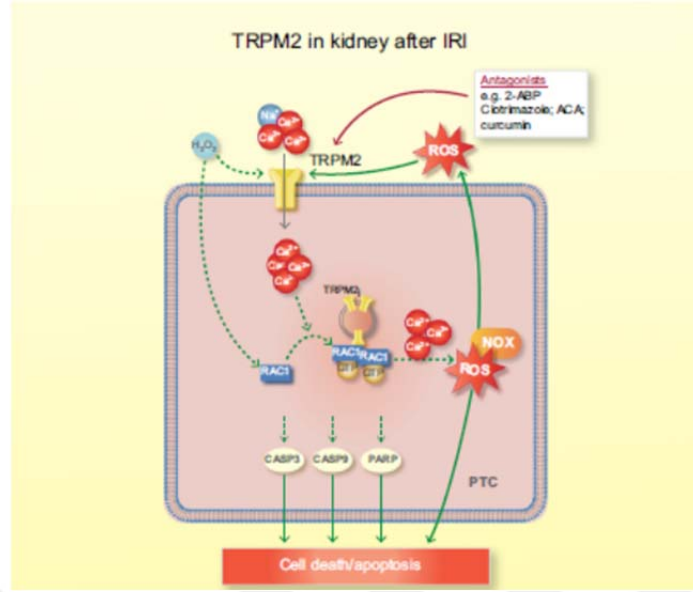


Şekil 5. TRP kanallarının böbrekte dağılımı. G, glomerül; PT, proksimal tübül; DTL, inen ince kol; ATL, çıkan ince kol; TAL, çıkan kalın kol; DCT, distal kıvrıntılı tübül; CNT, bağlayıcı tübül; CD, toplayıcı duktus²¹⁵.

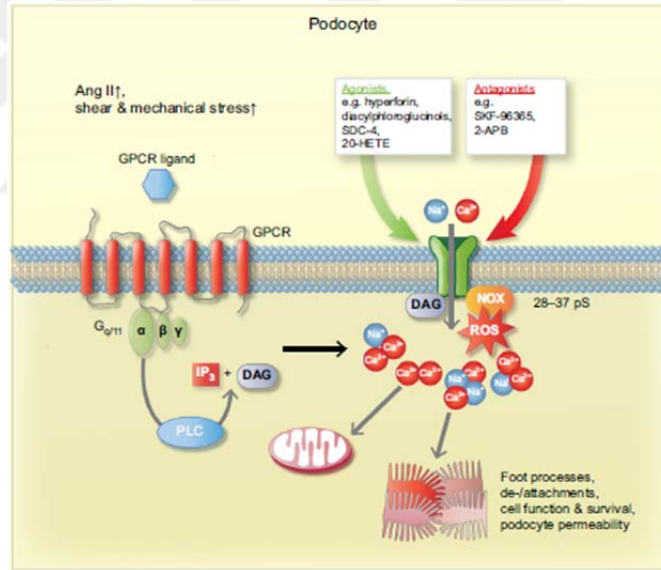
TRPM2; hem ADP riboz hidrolaz enzimatik aktivitesine hem de iyon kanal aktivitesine sahiptir²¹⁶. TPRM2 proksimal tübül epiteli³³, endotel hücresi²¹⁷, hemopoietik hücre²¹⁸, kardiyak miyosit²¹⁹ olmak üzere birçok hücrede eksprese olmaktadır. İmmunohistokimyasal olarak TPRM2 kanallarının plazma membranı lokalizasyonu göstermeden intraselüler olarak da bulunabileceği gösterilmiştir³³. TPRM 2'yi bloke eden maddeler arasında AMP, 8-Br-ADPr, 2-ABP bulunmaktadır²¹⁶. Gao ve ark. yaptıkları çalışmada TPRM2 delesyonunun iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu olduğunu göstermiştir. Hasarda altta yatan mekanizmanın Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz kompleks komponenti olan RAC1 ve buna bağlı

oksidatif stres ve mitokondrial apoptotik yolların aktivasyonuna bağlı olduğu vurgulanmıştır³³. (Şekil 6). Araştırmacılar TPRM 2'nin proksimal tübül epiteli gibi parankimal hücrelerde RAC-1 bağımlı oksidatif stres sonucunda artmış strese bağlı apoptozdan sorumlu olduğunu göstermiştir³³. Başka bir çalışmada, böbrekte, 2-APB'nin TPRM2 inhibisyonu ile I/R sonrası sitoproteksiyon sağlandığı gösterilmiştir³³.

TRPC6; voltaj bağımsız katyon geçirgen kanaldır²²⁰. TRPC izoformları amino asid benzerliği ve homo- ve/veya heterotetra-/multimer oluşturma özelliğine göre 2 gruba ayrılabilir: TRPC 1/4/5 ve TRPC 3/6/7²²¹⁻²²³. TRPC 6'nın böbrekte dağılımı şekil 5'te görülmektedir. Podositin fonksiyon görebilmesi uygun intraselüler kalsiyum düzeyinin sağlanmasına bağlıdır. Örneğin fazla kalsiyum girişi ayaksı çıkıntılarda silinme, apoptoz ve takiben glomeruler hasara neden olmaktadır. Podosite kalsiyum girişinden sorumlu olan ana proteinlerden birisi TRPC 6'dır²²⁴. Damarda, TRPC 6 kanallarının vasküler düz kas hücresinde eksprese olup α_1 -adrenoreseptör ve vazopresin aracılı vazokonstrüksiyonda rol aldığı söylenmektedir²²⁵⁻²²⁷. Mekanizması her ne kadar tam olarak anlaşılamamış olsa da NAD(P)H oksidaz (NOX) tarafından ROS oluşumu, podosit ve damar düz kasında TRPC 6 aktivasyonuna neden olmaktadır²²⁸⁻²³¹. TRPC6, redoks duyarlı bir kanaldır ve Ca^{+2} aracılı modülasyonu podosit dahil çeşitli hücrelerde hasarı tetikler²¹⁶. TRPC 6'nın doğal agonistleri olduğu gibi farmakolojik modülatörleri de bulunmaktadır. SKF-96365 ve 2-APB, TRPC 3/6/7 kanal blokeri olarak fonksiyon görmektedir²³². Şekil 7'de ROS oluşumuna bağlı TRPC6 aktivasyonu, TRPC6 agonist ve antagonistleri görülmektedir. Li ve ark. TRPC 6 yokluğunda mezangial hücrenin anjiotensin II stimülasyonu ile olan kontraksiyonunun ve kalsiyum girişinin azalmış olduğu göstermiştir²³³. Ayrıca sürekli intraselüler kalsiyum artışının TRPC6'nın aşırı çalışmaya zorlayıp, podositi sitoskelette remodelinge sürüklemekte ve proteinüriye neden olmaktadır²³⁴.



Şekil 6. TRPM 2'nin ABY'deki olası rolü. PTC: proksimal tübül h., ROS: Reaktif oksijen radikalleri; NOX: NAD(P)H oksidaz; CASP3: Kaspaz 3; CASP9: Kaspaz-9; TRPM2i: intraselüler TRPM2 reseptörü, ACA: Antranilik Asit; RAC1 NADPH oksidaz kompleksin bir parçasıdır²¹⁶.



Şekil 7. Podositteki muhtemel TRPC6 kanal aktivasyon mekanizması. TRPC6 kanalı yeşil renkte görülmektedir. 2-APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate; DAG, diaçilgliserol; 20-HETE, 20-hidroksieikozanoik asit; SKF-96365, 1-b[3-(4-metoksifenil)propoksil]-4-metoksifenil}1H-imidazol hidroklorür; NOX, NAD(P)H oksidaz; pS, pico Siemens (single conductance akım); ROS, reaktif oksijen radikalleri; SDC-4, Sindekan 4; Ang II, anjiyotensin II; GPCR, G-protein-eşlenik reseptör; DAG, diaçilgliserol; IP3, inozitol-3-fosfat³³.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 40 adet ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışmamızda erkek sıçanların tercih edilme nedeni dişilerde menstrüel siklusa görülen seks hormon değişimlerinin sonuçları etkilemesini engellemektir. Ayrıca çalışmalarda erkek sıçanların dişilere göre renal toksisiteye daha duyarlı olduğu da gösterilmiştir^{235,236}. Sıçanlar çalışma süresince ortalama 22°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde paslanmaz tel kapaklı kafeslerde tutuldu. Sıçanların her bir grubu ayrı kafeslere konarak yeterli miktarda içme suyu ve standart sıçan pellet yemi verildi. Çalışmada sıçanlar rastgele 5 gruba ayrıldı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=8)

Herhangi bir işlem uygulanmadı.

Grup 2: DMSO grubu (n=8)

10 gün boyunca günde 1 kez %10 DMSO intraperitoneal (i.p.) uygulandı.

Grup 3: 2-APB grubu (n=8)

10 gün boyunca 2 mg/kg i.p. 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB) (Sigma D9754) %10 DMSO içinde çözündürülerek uygulandı.

Grup 4: Gentamisin grubu (n=8)

10 gün boyunca 100 mg/kg intramusküler (i.m.) Gentamisin (Genta 160 mg, İbrahim Ethem Ulugay) uygulandı.

Grup 5: Gentamisin + 2-APB grubu (n=8)

10 gün boyunca 100 mg/kg dozunda i.m. Gentamisin ve Gentamisin uygulamasından yarım saat önce 2 mg/kg i.p. 2-APB uygulandı.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneklere Gentamisin flakon (Genta 160 mg, İbrahim Ethem Ulugay) intramusküler (i.m.) olarak 100 mg/kg olacak şekilde 10 gün uygulandı. Tedavi grubuna Nicolaud ve ark. belirttiği şekilde²³⁷ 2-Aminoethyl diphenylborinate (Sigma-Aldrich, Inc, Louis, D9754), %100 DMSO (Carlo Erba) içinde çözünecek şekilde hazırlanmış normal salin ile son konsantrasyonu %10 olacak şekilde dilue edilmiştir. DMSO grubundaki hayvanlara da eşit volümde DMSO salin içerisinde verilmiştir. DMSO'nun çalışmamızda tercih edilme nedeni yapılan deneysel çalışmalarda DMSO'nun mitokondrial Ca^{2+} (mCa^{2+}) alımı üzerine etkisinin olmadığına gösterilmiş olmasıdır²³⁸.

3.3. Işık Mikroskopi Yöntemi

Işık mikroskopik inceleme için alınan böbrek örnekleri %10'luk nötral formalin içerisinde konulup 3 gün bekletilerek tespit olmaları sağlandı. Daha sonra formalinin uzaklaştırılması için dokular su ile yıkandı ve Leica TP 1020 Ototeknikon Cihazı ile Tablo 2'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Tablo 2. Işık mikroskopik doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lık etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+ Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60 ⁰ C'de	Parafin	1 saat
60 ⁰ C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Doku takibinden sonra böbrek örnekleri parafin bloklar haline getirildi ve 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri

IL-6, TNF- α ve kaspaz 3 immünreaktivite incelemeleri için böbrek doku örnekleri nötral formalinde tespit edildi. Leica TP 1020 ototeknikon cihazı ile rutin doku takipleri yapıldıktan sonra parafine gömülen doku örneklerinden, polilizin kaplı lamlara 4 µm kalınlığında parafin kesitler alındı. Kesitler ilk olarak fön makinesi ile kurutulduktan sonra 15 dakika (dk) buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan kesitler tekrar fönle kurutuldu ve ardından 60°C' de etüvde ksilol içerisinde 3 dk daha bekletilen böbrek doku kesitleri, derecesi giderek azalan alkol serileri ile hidrate edildi. Distile suyun ardından sitrat solüsyonu (pH: 6) içerisine alınan kesitler 95°C'lik su banyosunda, 30 dk bekletilerek antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Ardından oda sıcaklığında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkanarak endojen peroksitlerin bloklanması için %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alındı ve 15 dk kadar bekletildikten sonra, distile su ve fosfat tamponundan (PBS, Ph: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice kurulandıktan sonra üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek için blocking solüsyonu (ab93705, Abcam, USA) damlatıldı ve oda sıcaklığında 20 dk bekletildi. Ardından kesitler distile su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurutma kağıdı ile kurulandı. 1/400 oranında sulandırılan Anti-IL-6 (IL-6; anti- rat rabbit polyclonal antibody, ab6672, Abcam, USA), 1/500 oranında sulandırılan Anti-TNF α (TNF- α ; anti- rat rabbit polyclonal antibody, ab6671, Abcam, USA) ve 1/500 oranında sulandırılan Anti- kaspaz 3 (kaspaz-3; anti rat rabbit polylonal antibody, ab4051, Abcam, USA) primer antikörleri damlatıldı. Primer antikör damlatılan tüm kesitler +4°C'de, nemli ortamda 1 gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikör yerine, dilüsyon solüsyonu damlatıldı. Ertesi gün oda sıcaklığına alınan kesitler 1 saat daha primer antikör ile muamele edildi. 1 saatin sonunda distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin etrafı kurulandı. Üzerlerine Biotin (ab93705, Abcam, USA) damlatılarak 20 dk bekletildi. Sonrasında distile su ve PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, Abcam, USA) damlatılarak 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin üzerine

aminoetilkarbazol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu ile yıkandı ve doku kesitleri zıt boya için hematoksilin solüsyonunda 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamelle kapatıldı. Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.4.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

IL-6, TNF- α ve kaspaz 3 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immünohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için 40'lık objektifte rastgele seçilen 15 alanda H skorlama sistemi kullanıldı. H skoru, pozitif hücre yüzdesiyle birlikte dört farklı boyanma yoğunluğunun çarpımı toplanarak hesaplandı. Bu sisteme göre;

Boyanma derecesi = 0 (Hiç boyanma yok)

= 1 (Zayıf derecede boyanma)

= 2 (Orta derecede boyanma)

= 3 (Güçlü derecede boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H skor değerini hesaplamak için 'I x PC' formülü kullanıldı.

I: İntensity (Yoğunluk)

PC: Percentage of positive cells (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Böbrek doku örnekleri, elektron mikroskobik doku analizi için Millonig fosfat tamponu (pH:7.4) ile hazırlanmış %5'lik gluteraldehit solüsyonuna konulmuştur. Böbrek doku parçası 1 saatin sonunda dişçi mumu ile kaplı petri kabına alınıp üzerine birkaç damla gluteraldehit konulduktan sonra jilet ile 1 mm³'lük parçalara ayrılmış ve tekrar %5'lik gluteraldehit solüsyonuna alınıp 3 saat tespit edilmiştir. Böylelikle dokuların toplam 4 saat tespiti sağlanmıştır. Gluteraldehit ile yapılan birinci tespit işleminden sonra buffer solüsyonu olan Millonig fosfat tamponunda 2 kez 10'ar dakika bekletilerek yıkandı. Sonrasında Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit ile tespiti alınmıştır. İkinci tespit solüsyonu olan %1'lik osmium tetraoksitte 2 saat bekletilmiştir. Ardından yine fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika

yıkanmıştır. Daha sonra Tablo 3’de belirtilen sıraya göre derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate olmaları sağlanmıştır.

Tablo 3. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi

%50’lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%70’lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%86’lık etil alkol	+4°C	15 dakika
%96’lık etil alkol	+4°C	15 dakika
%100’lük etil alkol	+4°C	15 dakika
%100’lük etil alkol	+4°C	15 dakika

Buraya kadar +4°C’de gerçekleştirilen işlemlerin devamında Tablo 4’te gerçekleştirilen işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi

%100 Etil alkol	Oda sıcaklığı	15 dakika
Propilen oksit	Oda sıcaklığı	15 dakika
Propilen oksit	Oda sıcaklığı	15 dakika

Dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemlerinden sonra, doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezinden (gömme materyali) oluşturulan karışım içerisinde 2’şer defa 30’ar dakika süreyle bekletildi ve immerse edildi. Bu işlemlerden sonra doku parçaları taze hazırlanmış rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı ve rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Taze rezinin hazırlanışı Tablo 5’te belirtildiği gibidir.

Tablo 5. Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldehit (CY 212)	20 ml
Sertleştirici (HY 964)	20 ml
Hızlandırıcı (DY 064)	0.6 ml
Plastikleştirici – Dibütil Fitalat	1 ml

Ertesi gün rotatordan alınan doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü ve 60°C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Ultracut S mikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ile Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelendi.

3.6. Biyokimyasal Analiz

Tüm deney gruplarından alınan intrakardiyak kan örnekleri 5000 devirde 8 dakika santrifüj edilerek plazma kısmı ayrıldı. Plazma kısmı epandorf tüplerde işleme kadar -20°C'de bekletildi. Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda kit ile kreatinin ölçümü (Abcam, ab65340) ve üre ölçümleri (MAK006-1KT) yapıldı.

Oksidatif stresin belirlenmesinde Süperoksit dismutaz (SOD) ve Malondialdehit (MDA) kullanılmıştır. Süperoksit dismutaz aktivitesi plazmada kolorimetrik olarak kit ile değerlendirilmiştir (Abcam ab65354). Bu işlemde ksantin oksidaz aktivitesi ile süperoksit anyonu üretilir. SOD ile süperoksit anyonu hidrojen peroksit ve O₂'ye katalize olur. Süperoksit anyonu WST-1'i (Water soluble tetrazolium salt) indirgeyerek suda-çözünür formazan boyası oluşturur. Bu da 450 nm absorbansta artış ile belirlenebilir. WST-1 indirgenmesi SOD ile inhibe edilebilir. Böylece SOD aktivitesi WST-1 indirgenmesinin yüzde inhibisyonu ile hesaplanır ki bu da süperoksit anyon inhibisyon yüzdesini yansıtır. Lipid peroksidasyonu plazmadan manuel olarak TBA yöntemi ile MDA seviyelerinin ölçümü ile belirlendi ve sonuçlar uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel analiz

Analiz öncesinde verilerin normal dağılıma uygunluğu test edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin analizinde bağımsız grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis test kullanılmıştır. Grup karşılaştırmalarında p

değerinin $<0,05$ olduğu durumlar istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir. Farkın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için ikili karşılaştırmalar yapılmış, bu karşılaştırmalarda Mann-Whitney U Testi kullanılmıştır ve Bonferroni düzeltmesi uygulanarak (p/yapılan karşılaştıma sayısı, $p=0,1/7=0,014$) p değeri değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma(SS) olarak ifade edilmiştir. Veriler SPSS 24.0 istatistik paket programında analiz edilmiştir.

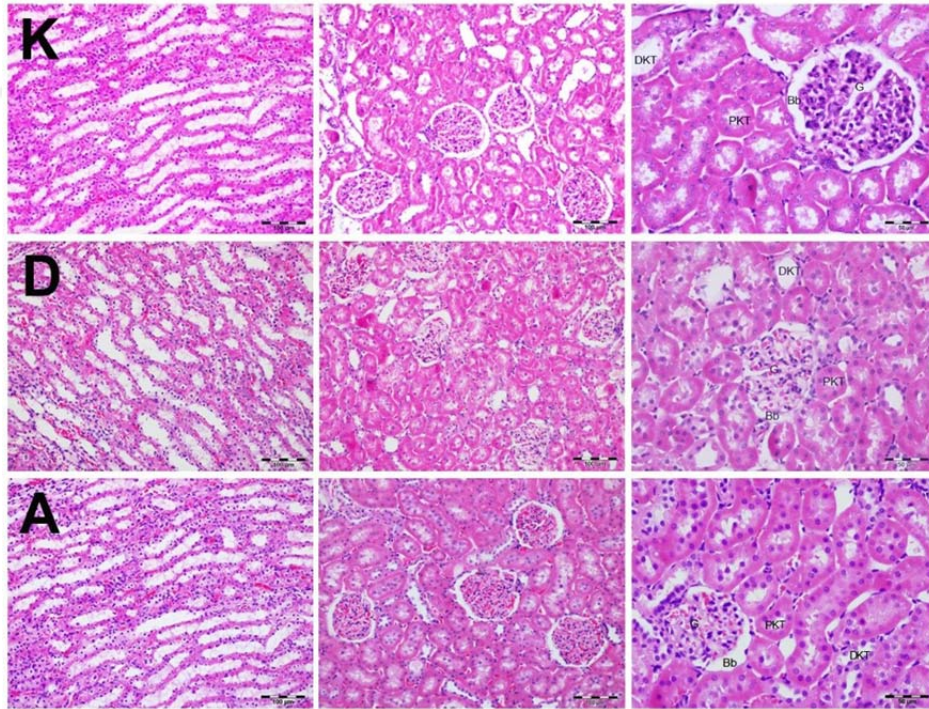


4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları

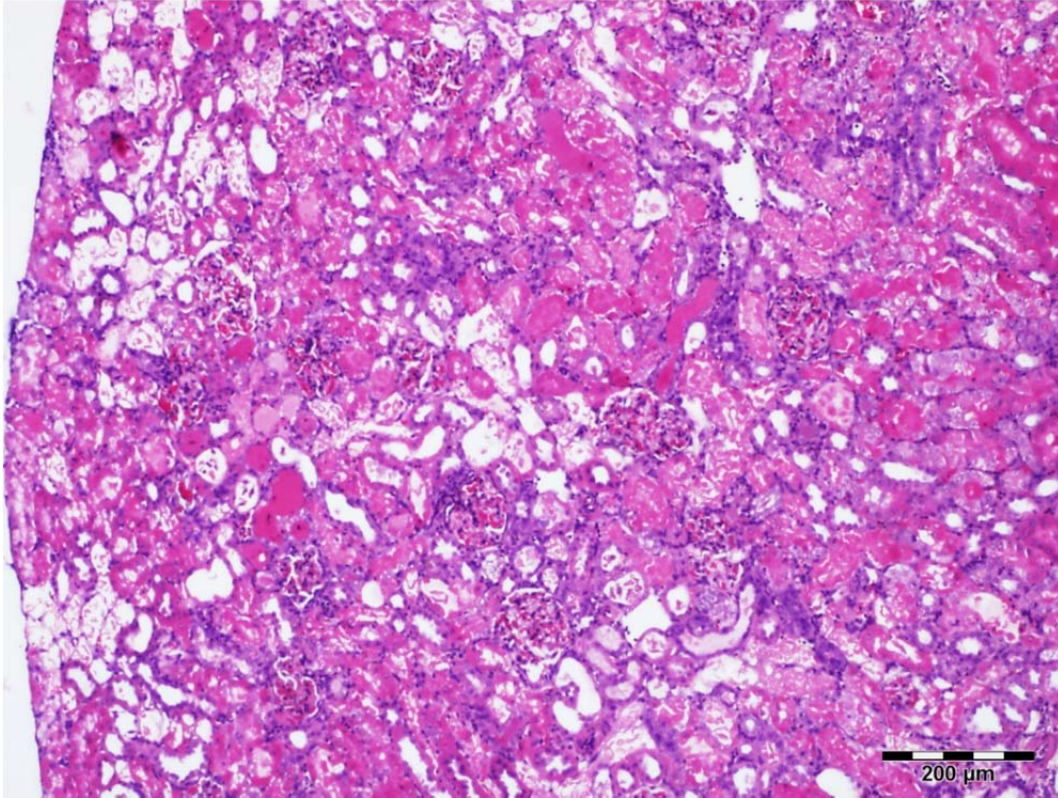
Deneklerden alınan böbrek korteks ve medulla materyalleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, normal görünümlü renal cisimcikler, proksimal tübüller ve distal tübüller, toplayıcı tübüller, damarlar ve interstisyel alanlar gözlenmiştir. Renal cisimciğin çapı normaldir. Proksimal tübüller alçak prizmatik hücrelerden oluşan epitelleri ile dar bir lümene sahip olarak normal morfolojide gözlenmiştir. Tübül hücrelerinin apikal yüzey farklılaşmaları olarak bilinen fırçamsı kenar oluşumu proksimal tübüllerde düzenli bir görünüm sergilemiştir. Geniş bir lümene sahip olan distal tübüller alçak prizmatik hücrelerle döşelidir. Medulladaki toplayıcı tübüller normal çapta gözlenmiştir (Şekil 8).



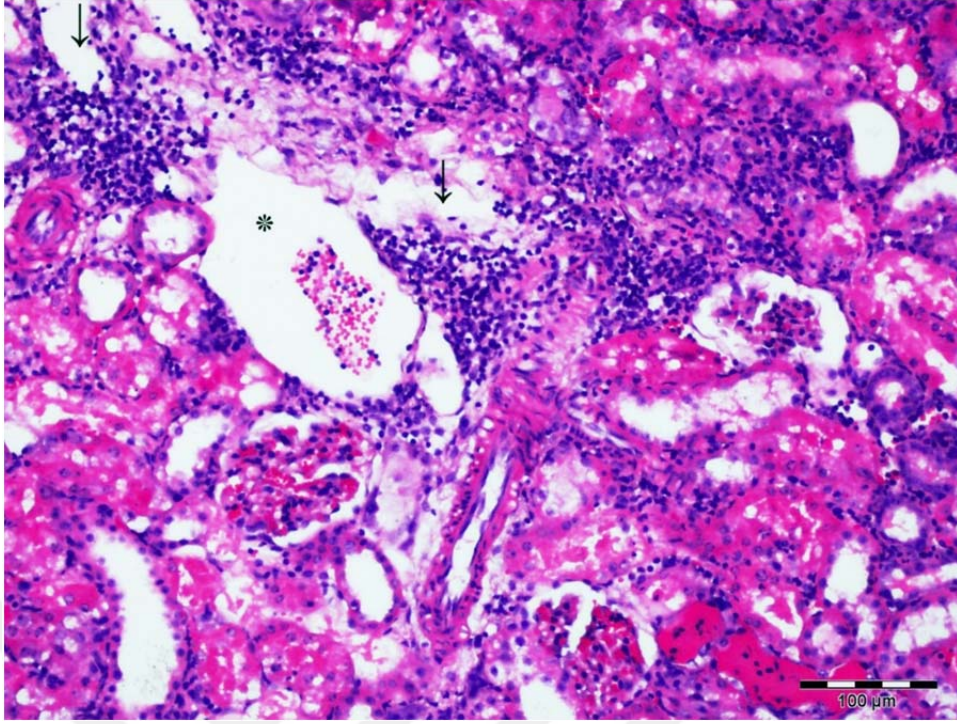
Şekil 8. Kontrol grubu (K) (üst panel), DMSO grubu (D) (orta panel), 2-APB grubuna (A) (alt panel) ait ışık mikroskopik görüntü. G: Glomerül, Bb: Bowman boşluğu, PKT: Proksimal kıvrıntılı tübül, DKT: Distal kıvrıntılı tübül. Bar=100 µm, 100 µm, 50 µm.

4.1.2. Gentamisin Grubu

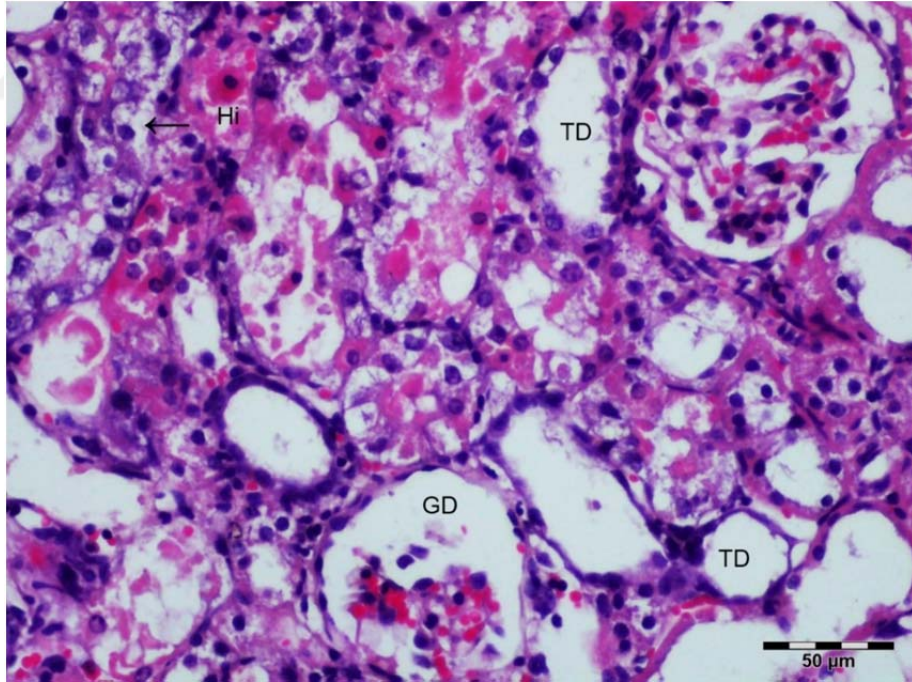
Sadece Gentamisin verilen deneklerin böbrek korteksi incelendiğinde; kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarından farklı olarak, en belirgin değişiklik tübüler alanlarda gözlenmiştir. Hasar özellikle de dış kortikal alanda olup tübüler dilatasyon ve nekroz dikkati çekmekteydi (Şekil 9). Kortekste, kortikomeduller sahada, interstisyel alan ve renal cisimcik çevresinde çok sayıda lökositik infiltrasyon odaklarına rastlanmıştır (Şekil 10,11,12). Kortekste, hemorajik odaklara rastlanmıştır (Şekil 10,12). Ayrıca tübüleri döşeyen epitel hücrelerinin yer yer lümene döküldüğü (deskuamasyon), hücre içi vakuolleşmenin belirtisi olarak sitoplazmada köpüksü bir görünüm oluştuğu (sitoplazmik vakuolizasyon) (Şekil 11) ve tübül lümeninde *hyalin cast* olarak adlandırılan eozinofilik yapıların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 12). Bunlara ek olarak renal cisimciklerin bazıları, normal şekillerini kaybederek dejenere olmuştur (Şekil 12).



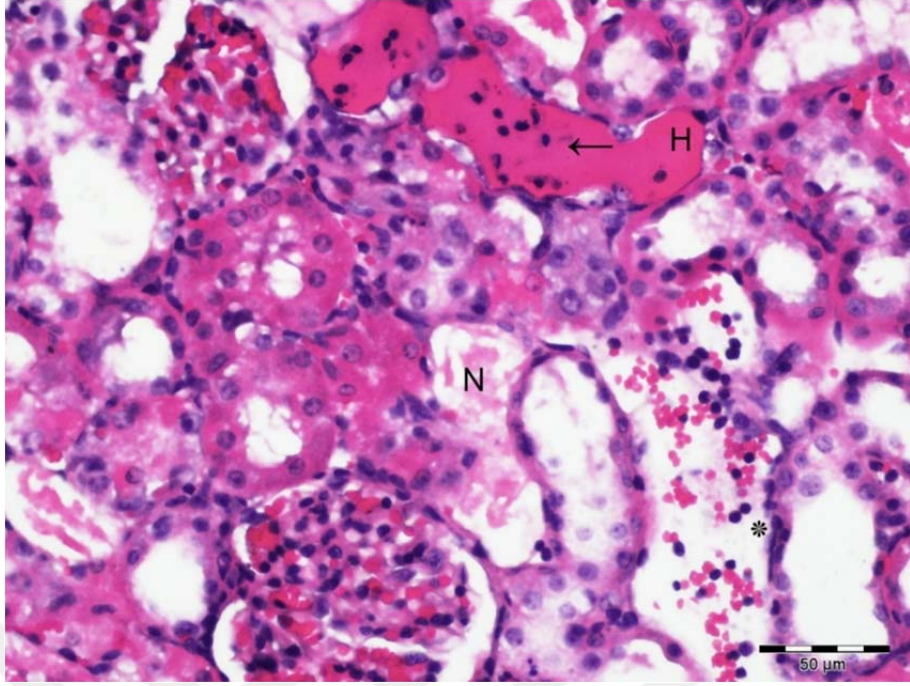
Şekil 9. Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü. Özellikle dış kortekste yoğun nekrotize alanlar. Tübül lümeninde hyalin cast birikimi, interstisyel ödem. H&E. Bar= 200 µm.



Şekil 10. Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü. Yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu (oklar), hemorajik alan (*). H&E. Bar=100 µm



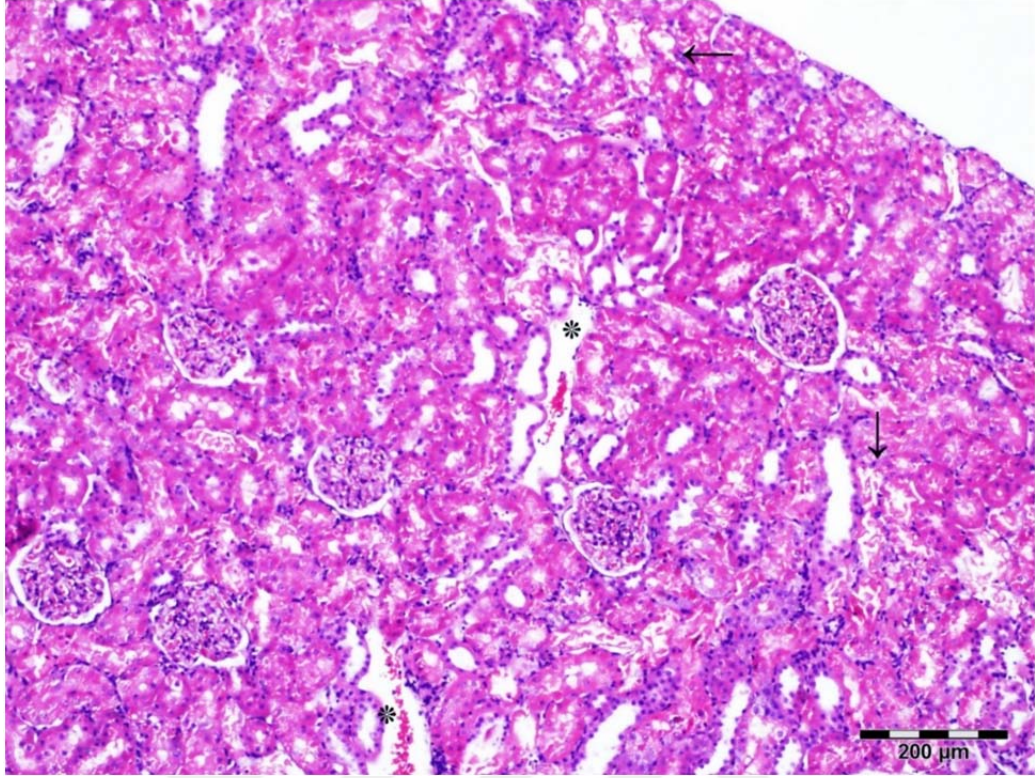
Şekil 11. Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü. Tübül epitelinde vakuolizasyon (ok), tübüler dilatasyon (TD), glomerüler dejenerasyon (GD) ve histiyosit (makrofaj) birikimi (Hi). H&E. Bar= 50 µm.



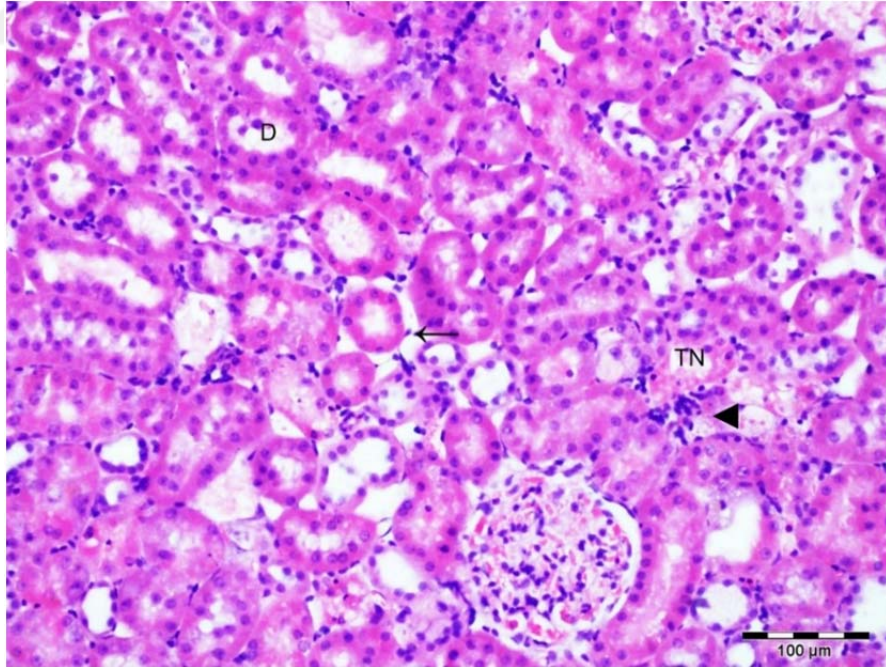
Şekil 12. Gentamisin grubu ışık mikroskopik görünümü. Tübüler dilatasyon, nekroz (N); tübül lümeninde deskuame hücreler (ok), eozinofilik hyalin cast (H), hemorajik alan (*)görülmektedir. H&E. Bar=50 µm.

4.1.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu

Böbrek korteks materyalleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; Gentamisin grubuna göre genel olarak yapının korunduğu, korteks bölgesinin çok daha düzgün bir histolojik görünüme sahip olduğu ve kortekste ve kortikomeduller sahada kan damarlarının ve renal cisimciklerin çevresine yerleşim gösteren lökositik infiltrasyon alanlarının sayı ve çap olarak oldukça azaldığı gözlenmiştir (Şekil 14). Gentamisin grubunda gözlenen, özellikle korteksin çoğunu kaplayan geniş tübüllerin sayısı ve çapları belirgin olarak azalmıştır. Ayrıca, çoğu tübülü çevreleyen hücrelerin intakt olduğu ve deskuamasyonun azalmış olduğu, hyalin castların azaldığı görülmüştür. Renal cisimciklerinin çoğu, şekil ve yapı bakımından normale yakın olarak gözlenmiştir (Şekil 13,14).



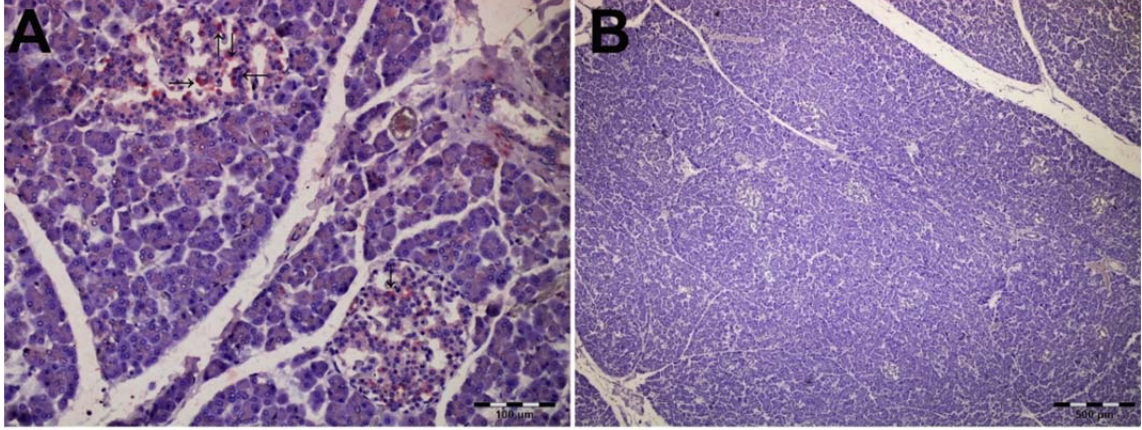
Şekil 13. Gentamisin+ 2-APB grubu ışık mikroskopik görünümü. İnterstisyel alanda lökosit infiltrasyonu, hemorajik alan (*). Tübüler nekroz (ok). H&E. Bar= 200 µm.



Şekil 14. Gentamisin+ 2-APB grubu ışık mikroskopik görünümü. Tübüler nekroz (TN), interstisyel alanda ödem (ok) ve hücresel infiltrasyon (ok başı), deskuame hücreler (D) görülmekte. H&E. Bar= 100 µm.

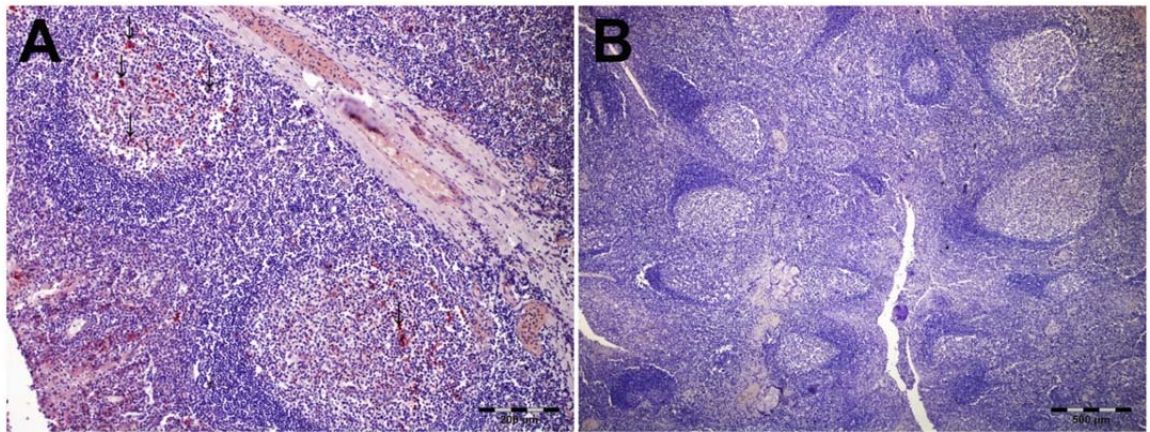
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

IL-6 immunoreaktivitesini göstermek amacıyla insan pankreas bezinden alınan biyopsi örnekleri primer antikor damlatılan pozitif kontrol (Şekil 15A), primer antikor damlatılmayan negatif kontrol olarak değerlendirildi (Şekil 15B).



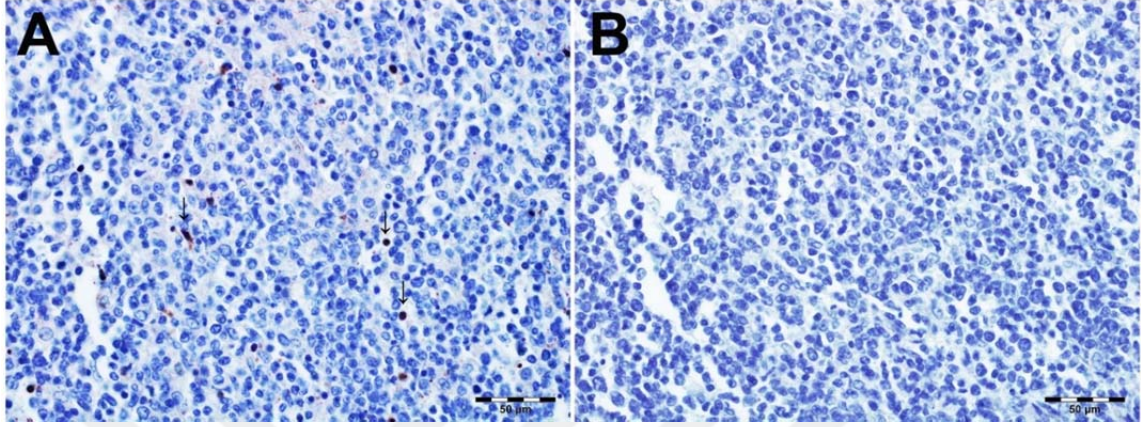
Şekil 15. IL-6 immünreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Pankreas dokusunda özellikle adacıklarda ve ekzokrin pankreas asinuslar çevresinde IL-6 immünreaktivitesi izlenmektedir (oklar). Bar= 100 µm. B) Negatif kontrol. IL-6 için, primer antikor damlatılmamış pankreas doku kesitinde herhangi bir boyanmanın olmadığı görülmektedir. Bar= 500 µm.

TNF- α immünreaktivitesini göstermek amacıyla tonsilla palatinadan alınan doku örnekleri primer antikor damlatılan pozitif kontrol (Şekil 16A), primer antikor damlatılmayan negatif kontrol olarak değerlendirildi (Şekil 16B).



Şekil 16. TNF- α immünreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Tonsilla palatinada lenf foliküllerinde özellikle germinal merkezde belirgin olmak üzere TNF- α immünreaktivitesi görülmektedir (oklar). Bar= 200 µm. B) Negatif kontrol. Tonsilla palatinada TNF- α immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar= 500 µm.

Kaspaz 3 immünreaktivitesini göstermek amacıyla lenf düğümünden alınan doku örnekleri primer antikor damlatılan pozitif kontrol ( ekil 17A), primer antikor damlatılmayan negatif kontrol olarak değerlendirildi ( ekil 17B).

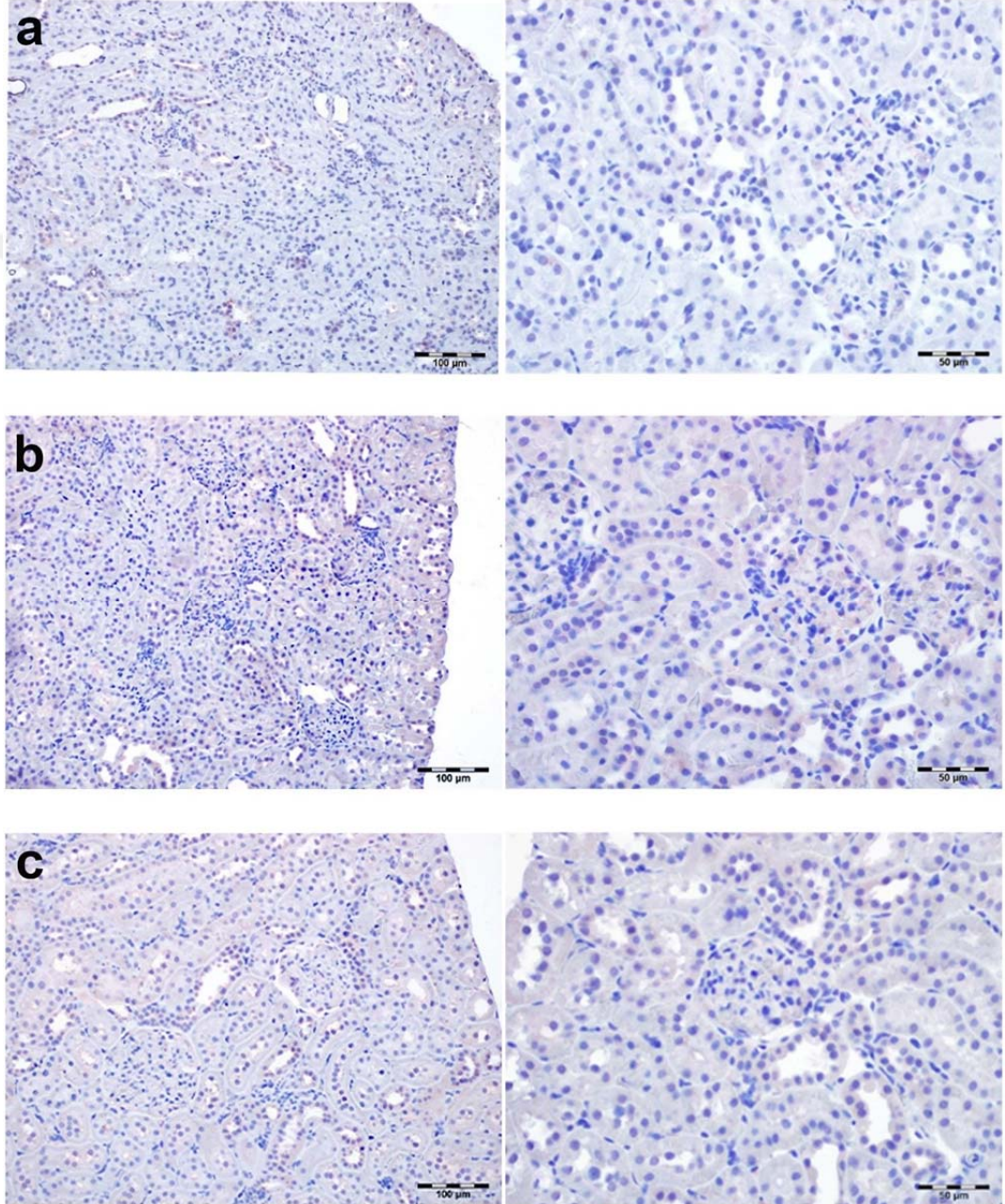


Şekil 17. Kaspaz 3 immünreaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Lenf düğümünde lenf nodülü germinal merkezinde belirgin kaspaz-3 immünreaktivitesi görülmektedir (oklar). Bar= 50  m. B) Negatif kontrol. Kaspaz 3 için, primer antikor damlatılmayan lenf düğümü doku kesitinde immünreaktivite görülmemektedir. Bar= 50  m.

4.2.1. IL-6 İmmünohistokimyasal Bulguları

4.2.1.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları

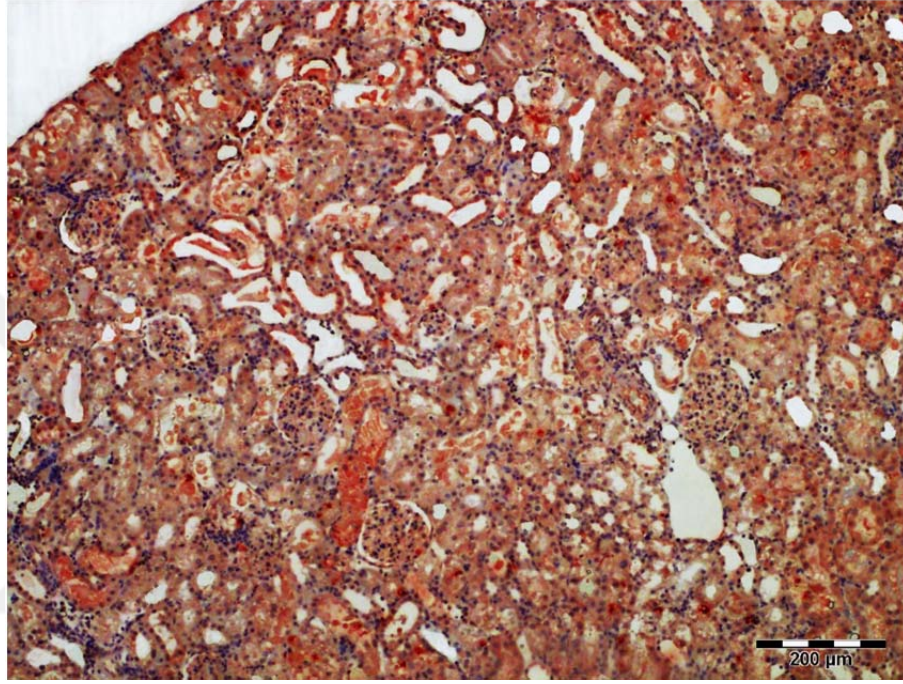
Böbrek kesitlerinde glomerül, tübül epitel hücrelerinde ve interstisyel alanda belirgin IL-6 ekspresyonu olmadığı gözlemlendi.



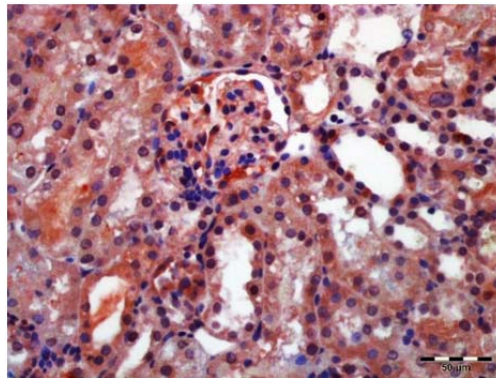
Şekil 18. Kontrol (a), DMSO (b), 2-APB (c) grubu IL-6 immünreaktivitesi. Bar=100 µm, 50 µm.

4.2.1.2. Gentamisin Grubu

Böbrek kesitlerinde IL-6 ekspresyonu hem tübüler hem de glomerüler alanlarda kontrol, DMSO ve 2-APB grubuna göre artmıştı, orta-şiddetli ekspresyon vardı. Bu artış tübül lümenindeki sitoplazmik artıklarda daha fazlaydı. İnterstisyel alanda ise ekspresyon ortaydı.



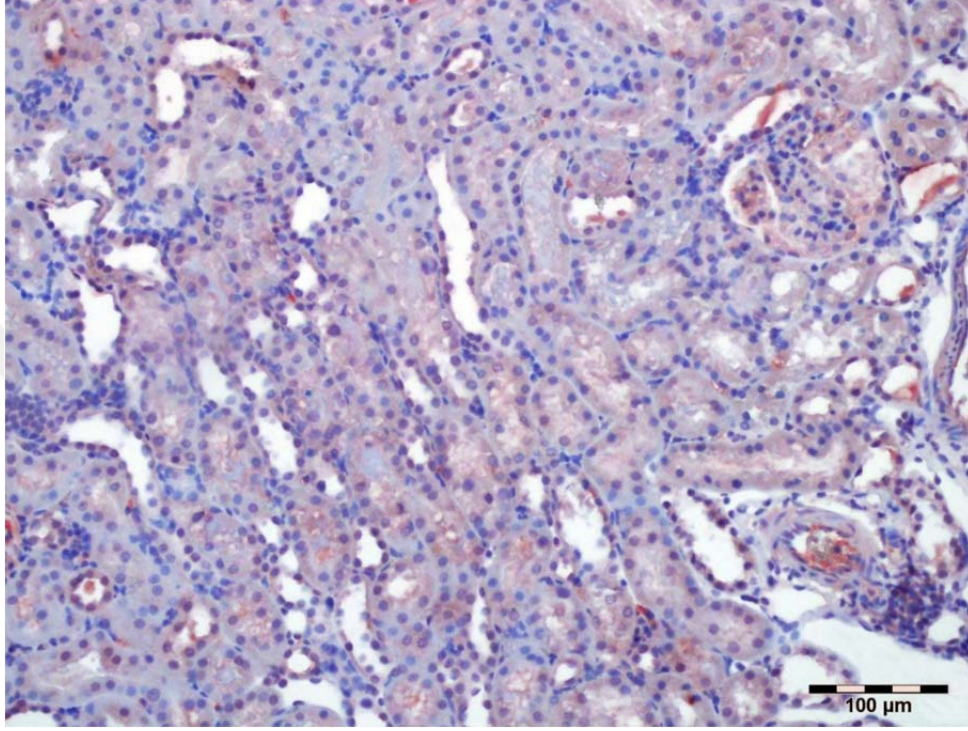
Şekil 19. Gentamisin grubu IL-6 immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde orta-şiddetli IL-6 ekspresyonu. Bar=200 µm.



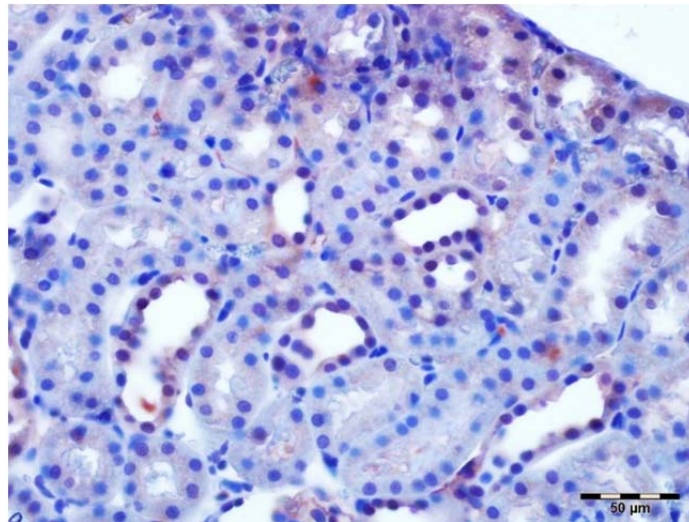
Şekil 20. Gentamisin grubu IL-6 immünreaktivitesi. Bar=50 µm

4.2.1.3. Gentamisin+2 APB Grubu

Böbrek kesitlerinde IL-6 ekspresyonu Gentamisin grubuna göre azalmıştı. Tübül ve glomerüllerde hafif-orta ekspresyon görüldü. Tübül lümenindeki sitoplazmik artıklarda ekspresyon orta, interstisyel alanlarda hafifti.



Şekil 21. Gentamisin+ 2-APB grubu IL-6 immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde zayıf-orta IL-6 ekspresyonu. Bar 100 µm.

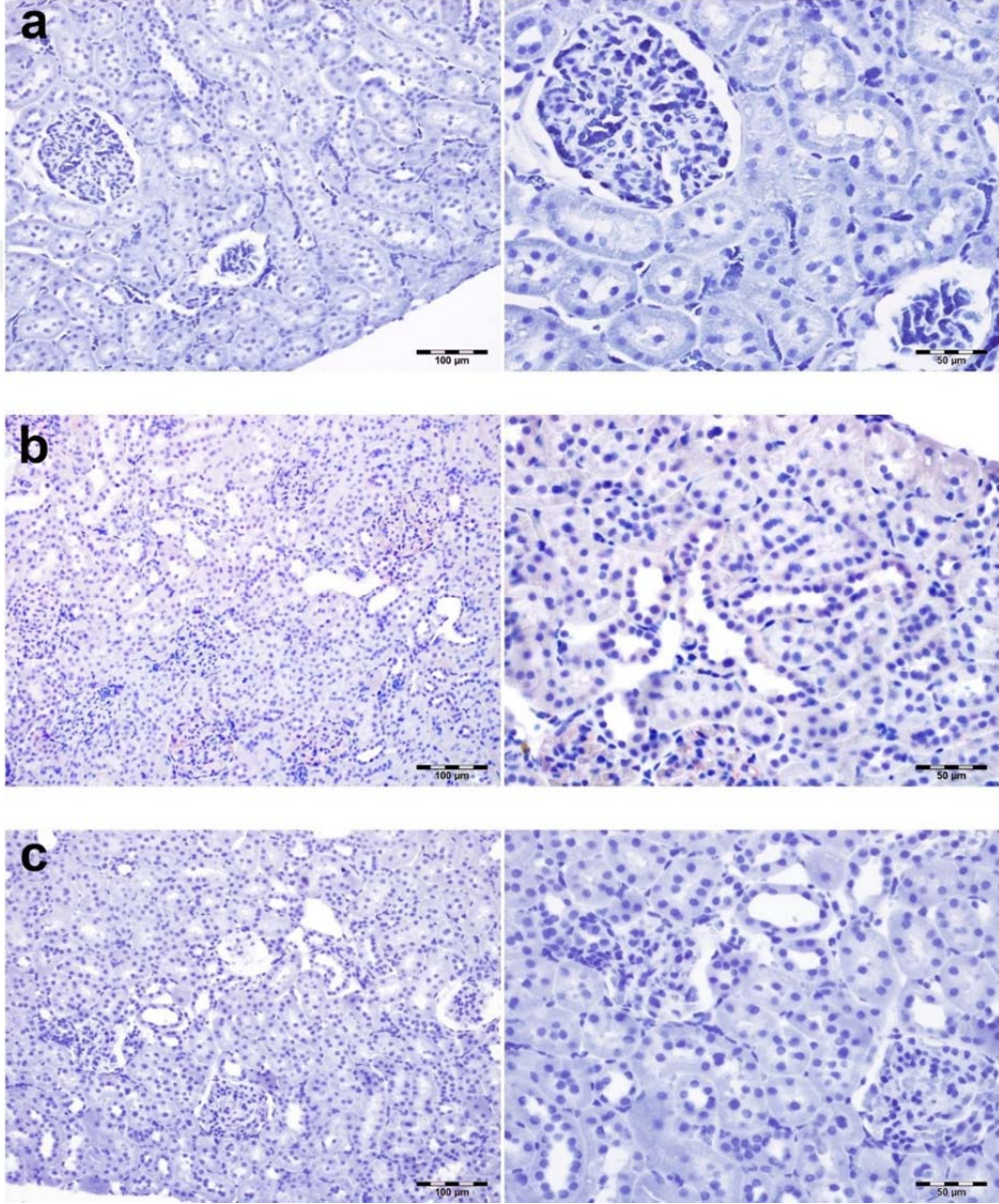


Şekil 22. Gentamisin+ 2-APB grubu IL-6 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.

4.2.2. TNF- alfa İmmünohistokimyasal Bulguları

4.2.2.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları

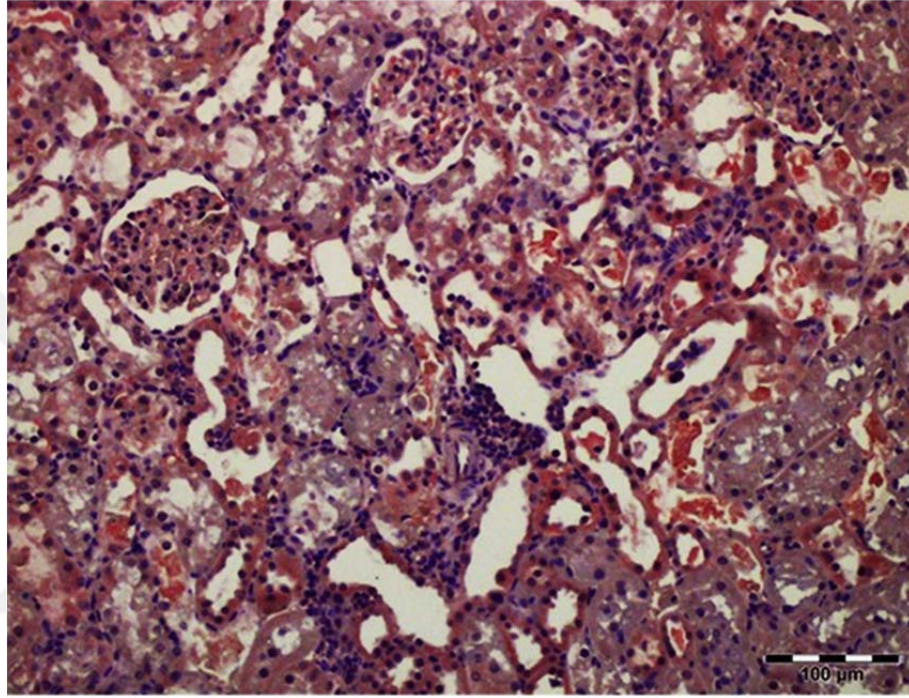
Gruplara ait böbrek dokularının immünreaktivite değerlendirilmesinde glomerüller, tübüler ve interstisyel alanda boyanma zayıftı.



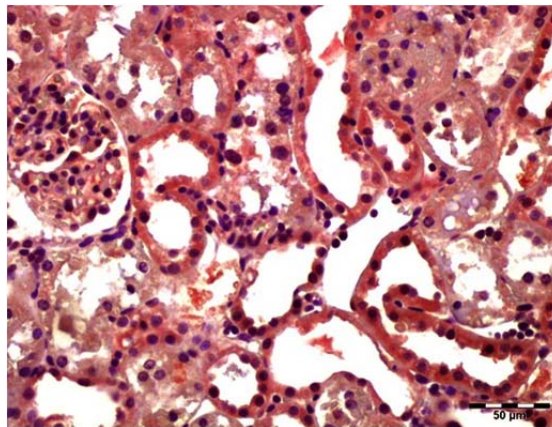
Şekil 23. Kontrol (a), DMSO (b) ve 2-APB (c) gruplarında TNF alfa immünreaktivitesi. Bar=100 µm, 50 µm.

4.2.2.2. Gentamisin Grubu

Nefrotoksisite oluşturulan gruptan elde edilen doku örneklerinde, TNF- α immünreaktivitesinin değerlendirilmesinde, tübül ve glomerülde TNF- α ekspresyonunun kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarına göre artmış olduğu görüldü. Özellikle hasarlı tübül lümenindeki artıklarda ekspresyon orta- kuvvetliydi.



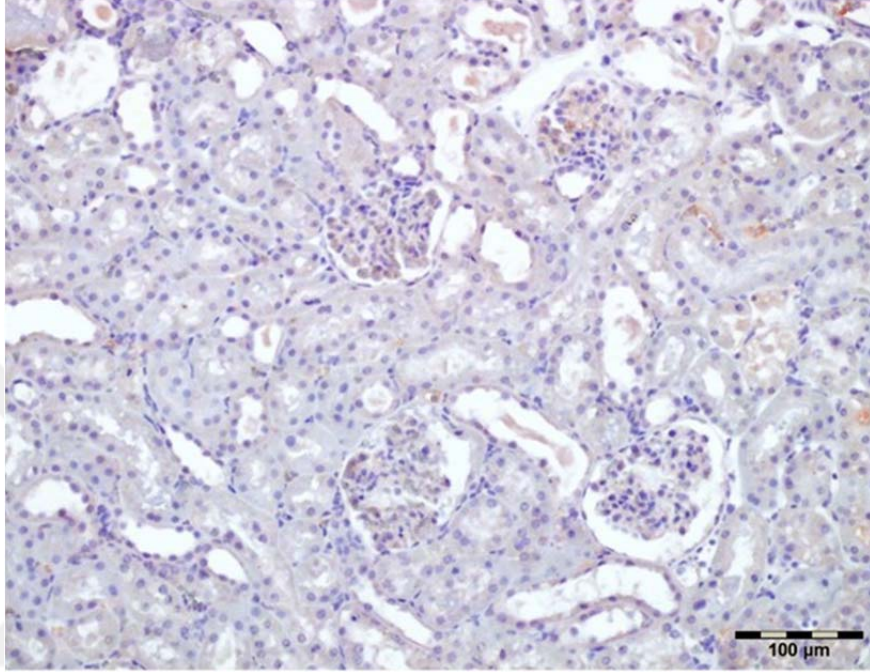
Şekil 24. Gentamisin grubu TNF- α immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde hafif-orta TNF- α ekspresyonu. Bar=100 μ m.



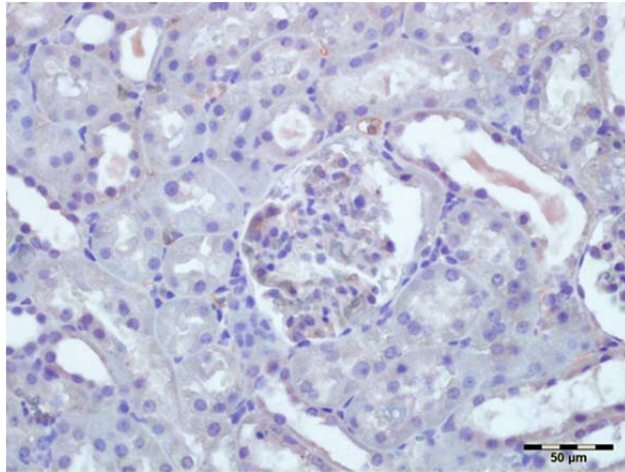
Şekil 25. Gentamisin grubu TNF- α immünreaktivitesi. Bar= 50 μ m.

4.2.2.3. Gentamisin+ 2- APB Grubu

Tedavi grubuna ait kesitlerde TNF- α ekspresyonu Gentamisin grubuna göre azalmış olmakla beraber ekspresyon tübüler, glomerüler ve interstisyel alanlarda devam etmekteydi.



Şekil 26. Gentamisin+ 2-APB grubu TNF- α immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde zayıf-orta TNF- α ekspresyonu. Bar=100 μ m.

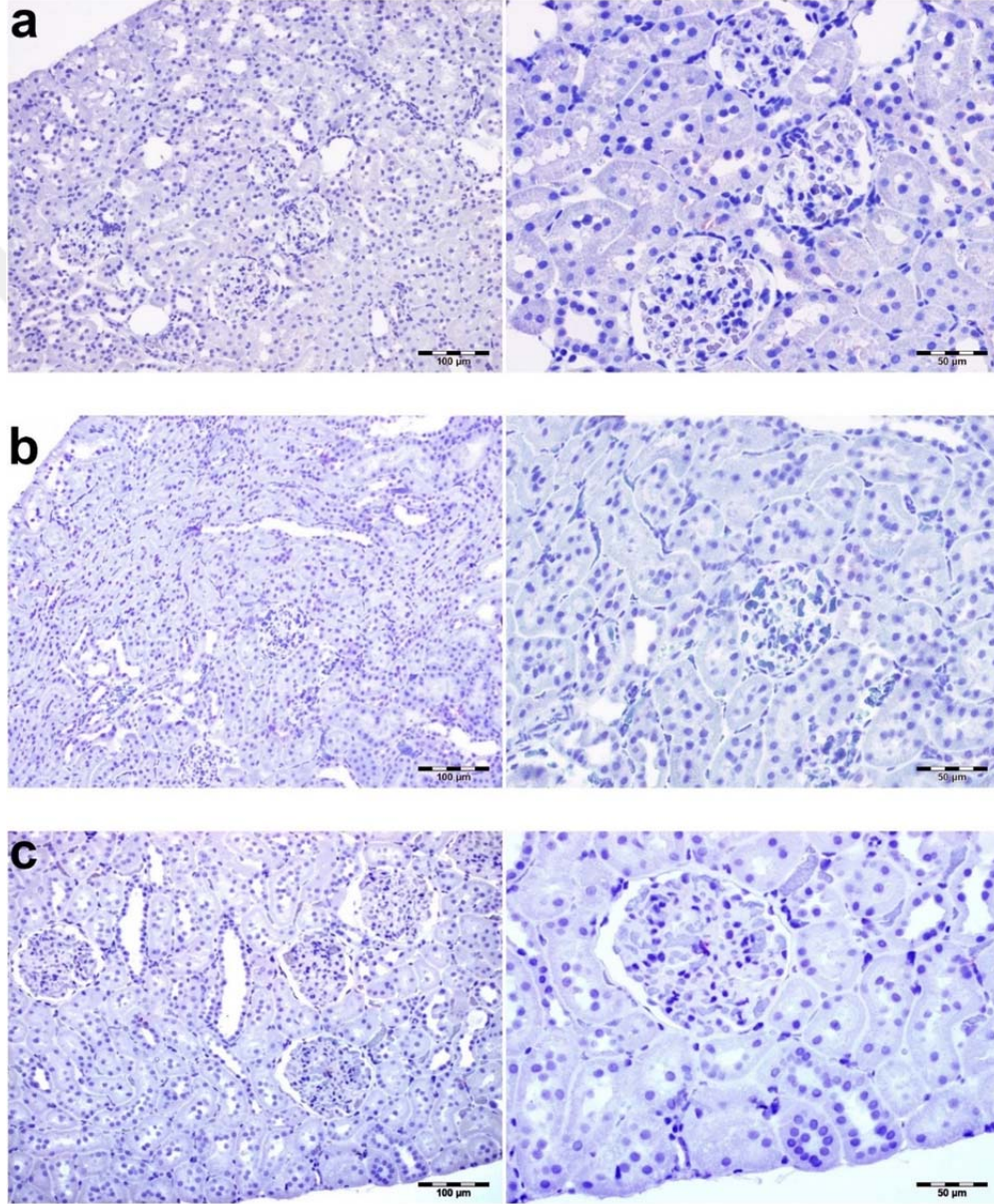


Şekil 27. Gentamisin+ 2-APB grubu TNF- α immünreaktivitesi. Bar= 50 μ m.

4.2.3. Kaspaz 3 İmmünohistokimyasal Bulguları

4.2.3.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları

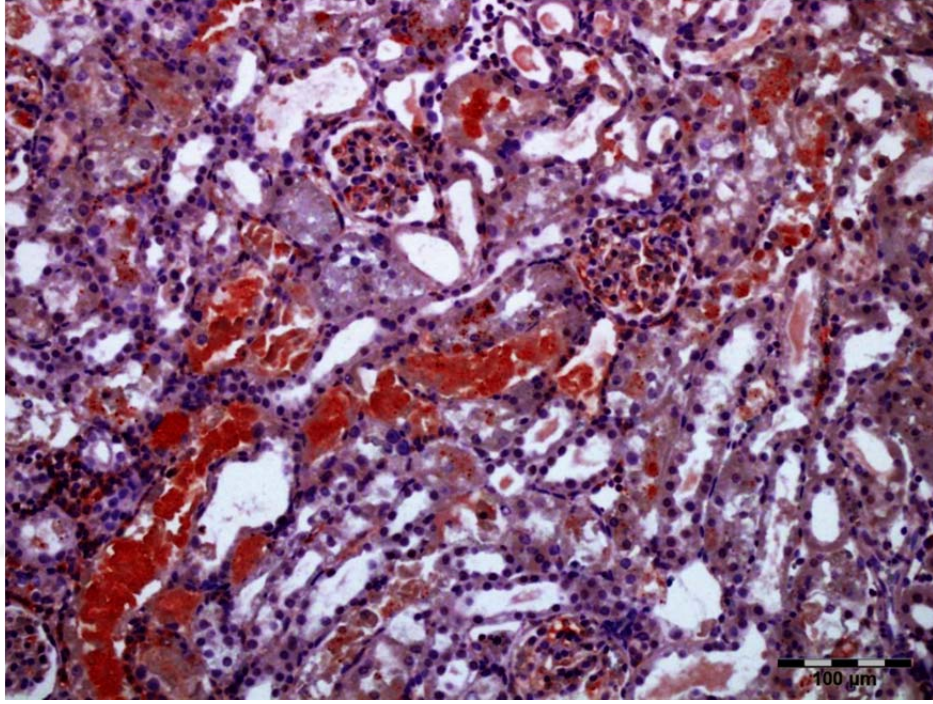
Böbrek doku örneklerinde kaspaz 3 immünreaktivitesinin değerlendirilmesinde tübül epiteli, glomerül ve interstisyel bölgelerde ekspresyonun zayıf olduğu gözlemlendi.



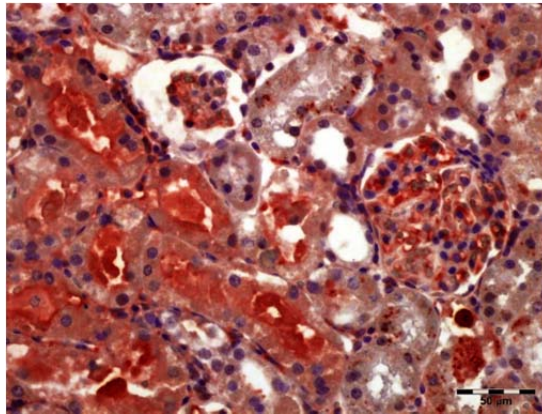
Şekil 28. Kontrol (a), DMSO (b), 2-APB (c) grubunda kaspaz 3 immünreaktivitesi. Bar=100 µm, Bar=50 µm.

4.2.3.2. Gentamisin Grubu

Böbrek kesitlerinde hem glomerüller hem de tübüler yapılarda kaspaz 3 ekspresyonu kontrol, DMSO ve 2- APB gruplarına göre artmıştı. Glomerüllerde orta- kuvvetli ekspresyon varken bütünlüğünü koruyan tübüllerde ekspresyon genellikle orta olmakla birlikte tübül lümenindeki sitoplazmik artıklarda kuvvetli ekspresyon gözlemlendi. İnterstisyel alanda orta ve kuvvetli ekspresyon mevcuttu.



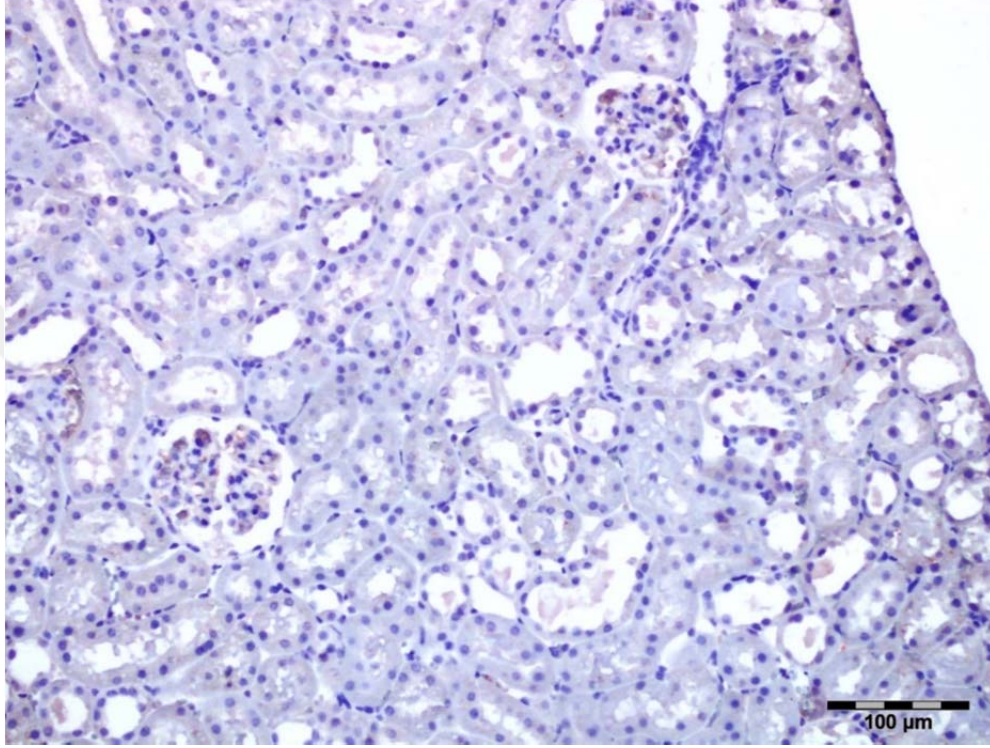
Şekil 29. Gentamisin grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde orta- şiddetli Kaspaz 3 ekspresyonu, sitoplazmik artıklarda kuvvetli Kaspaz 3 ekspresyonu. Bar= 100 µm.



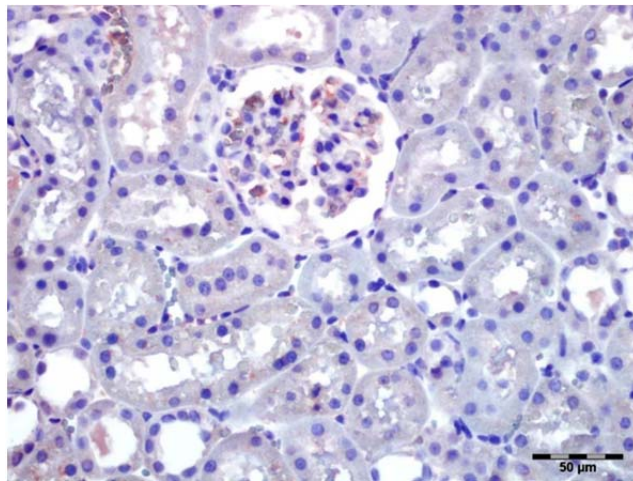
Şekil 30. Gentamisin grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.

4.2.3.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu

Gentamisin grubuna göre tübüler, glomerüler ve interstisyel alanda kaspaz 3 ekspresyonu azalmıştı. Tübül lümeninde biriken sitoplazmik artıklarda da ekspresyon azdı.



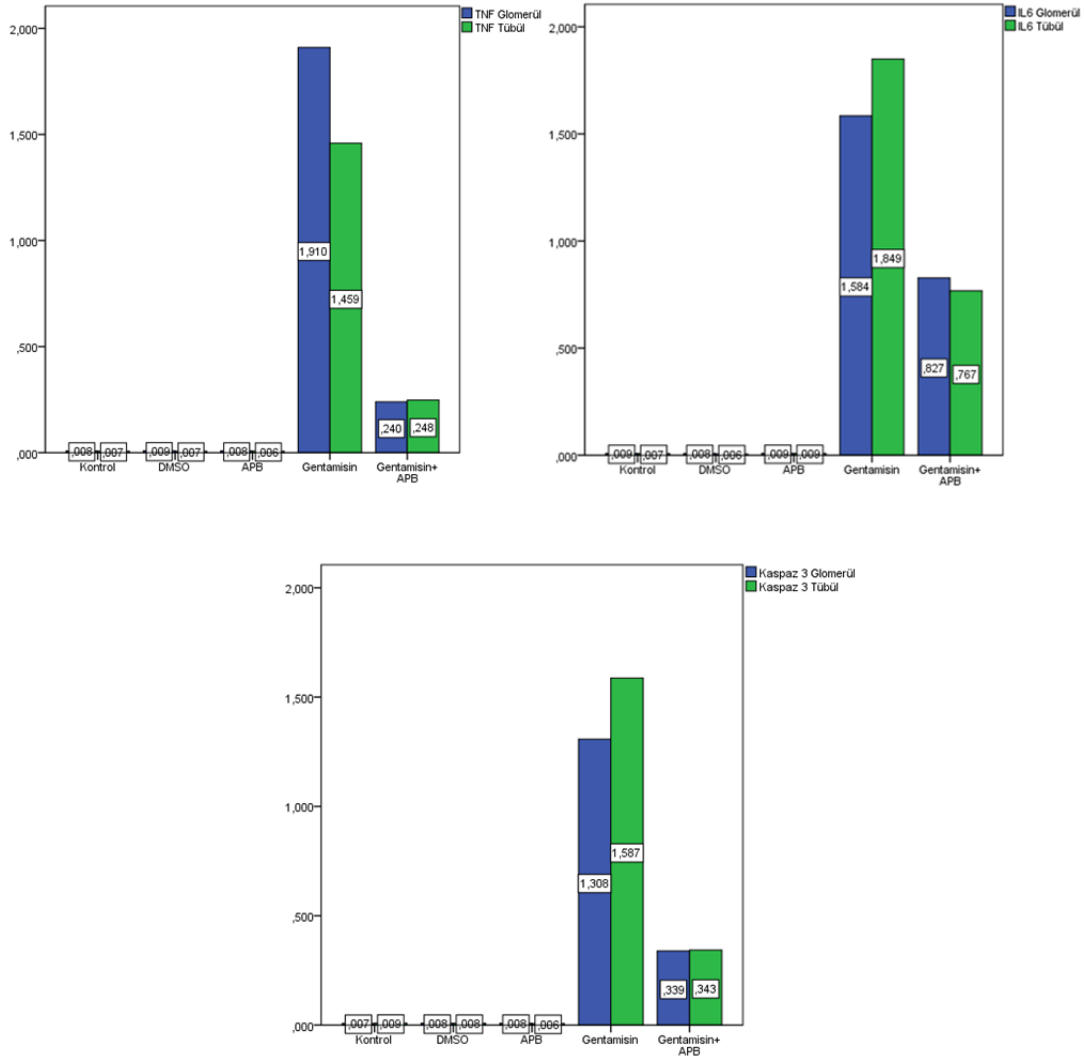
Şekil 31. Gentamisin+ 2-APB grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi. Glomerül ve tübülde zayıf- orta Kaspaz 3 ekspresyonu. Bar= 100 µm.



Şekil 32. Gentamisin+ 2-APB grubu kaspaz 3 immünreaktivitesi. Bar= 50 µm.

4.2.4. İmmünohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal skorlama sonuçlarına göre kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarında TNF- α , IL-6, kaspaz 3 ekspresyonunun glomerül ve tübüllerde minimal seviyede olduğu görüldü. Gentamisin verilen grupta TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 ekspresyonunun glomerül ve tübüllerde kontrol, DMSO,2-APB ve Gentamisin+ 2-APB gruplarından anlamlı yüksek olduğu görülmüştür. Gentamisin+ 2-APB grubunda ise TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 ekspresyonu gentamisin grubuna göre glomerül ve tübüllerde anlamlı olarak azalmış ancak kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarına göre ekspresyon anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.



Grafik 1. TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 için immünohistokimyasal skorlama

Tablo 6. P<0.014 için anlamlı farklılık kontrol ve Gentamisin grupları için a, DMSO ve Gentamisin grupları için b, 2-APB ve Gentamisin grupları için c, kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g ile belirtilmiştir.

GRUP ADI	KONTROL	DMSO	2-APB	GENTAMİSİN	GENTAMİSİN+ 2- APB
	ORT±SS	ORT±SS	ORT±SS	ORT±SS	ORT±SS
TNF	0,008±	0,009±	0,007±	1,909±	0,239±
GLOMERÜL	0,005 ^{a,d}	0,005 ^{b,e}	0,004 ^{c,f}	0,019 ^{a,b,c,g}	0,044 ^{d,e,f,g}
TNF TÜBÜL	0,006±	0,006±	0,006±	1,459±	0,248±
	0,004 ^{a,d}	0,005 ^{b,e}	0,005 ^{c,f}	0,060 ^{a,b,c,g}	0,054 ^{d,e,f,g}
IL6	0,008±	0,008±	0,009±	1,584±	0,767±
GLOMERÜL	0,005 ^{a,d}	0,005 ^{b,e}	0,005 ^{c,f}	0,176 ^{a,b,c,g}	0,103 ^{d,e,f,g}
IL6 TÜBÜL	0,007±	0,006±	0,008±	1,850±	0,767±
	,005 ^{a,d}	,004 ^{b,e}	,005 ^{c,f}	,081 ^{a,b,c,g}	,166 ^{d,e,f,g}
KASPAZ 3	0,007±	0,008±	0,008±	1,850±	0,767±
GLOMERÜL	,004 ^{a,d}	,005 ^{b,e}	,005 ^{c,f}	,081 ^{a,b,c,g}	,166 ^{d,e,f,g}
KASPAZ 3	0,009±	0,008±	0,006±	1,587±	0,343±
TÜBÜL	,004 ^{a,d}	,008 ^{b,e}	,005 ^{c,f}	,116 ^{a,b,c,g}	,058 ^{d,e,f,g}

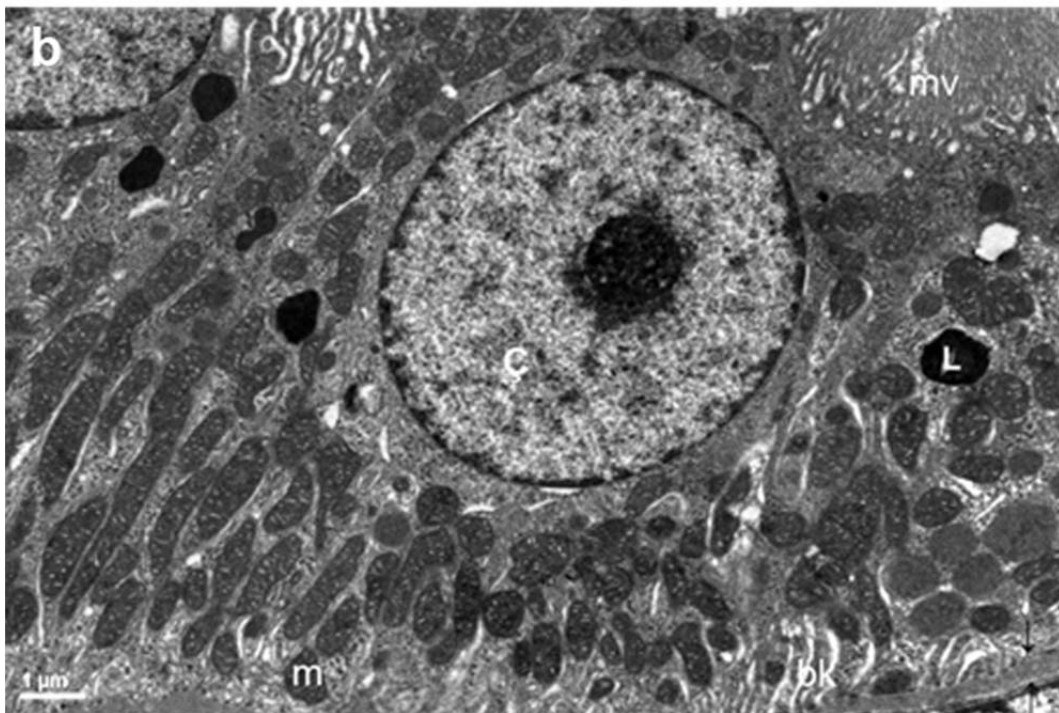
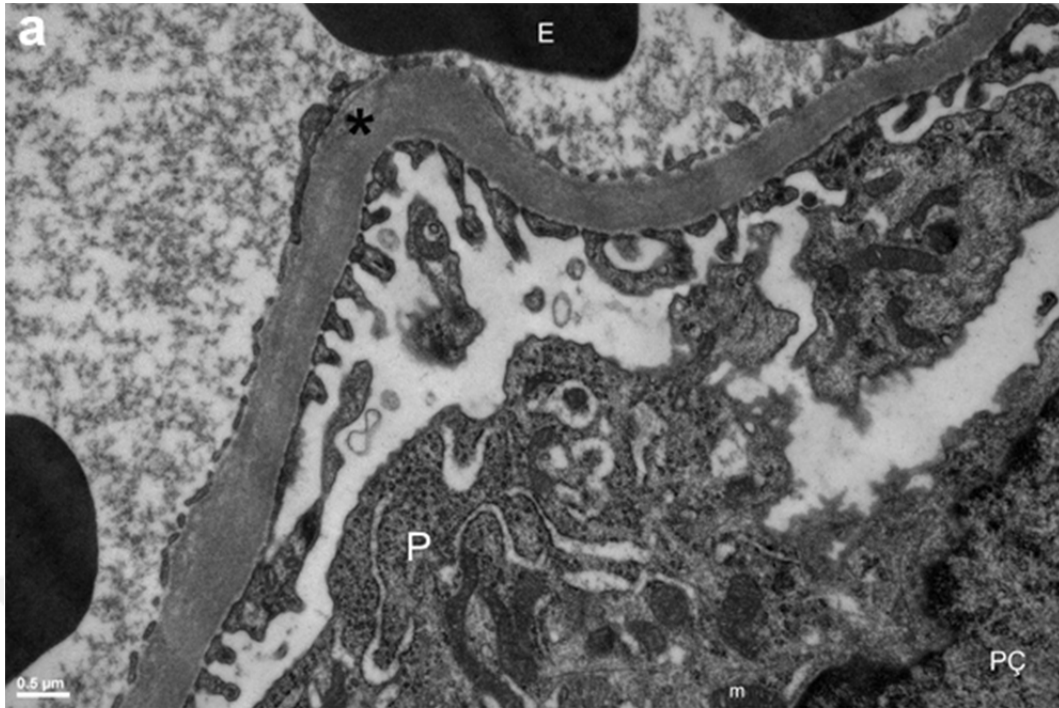
4.3. Elektron Mikroskopik Bulgular

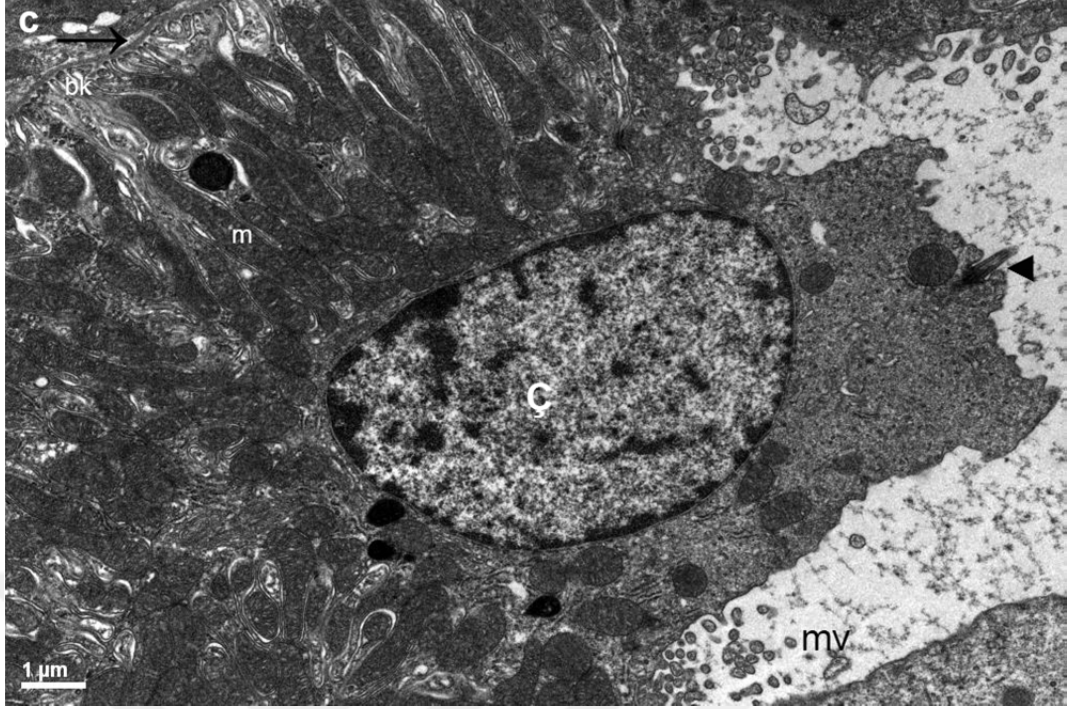
4.3.1. Kontrol, DMSO, 2-APB Grupları

Gruplara ait incelemelerde filtrasyonla görevli renal glomerül kapiller endotel hücreleri ve podosit uzantısı olan pedisellerin bazal membran üzerine normal morfolojide yerleştiği görüldü. Pediseller arası mesafe normal uzunlukta, filtrasyon yarık diyaframı normal kalınlıktaydı. Endotel hücreleri fenestraları normal genişlikteydi. Glomerül bazal membranı, ortada lamina densa, her iki yanında lamina rara olarak normal kalınlıktaydı (Şekil 33a, 34a, 35a).

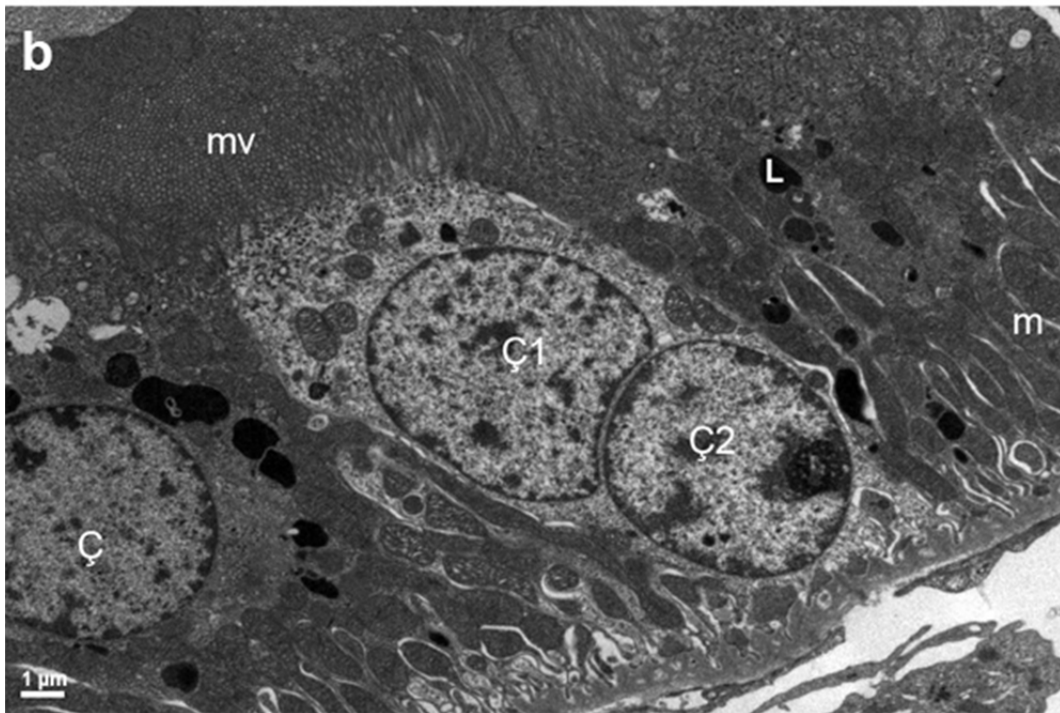
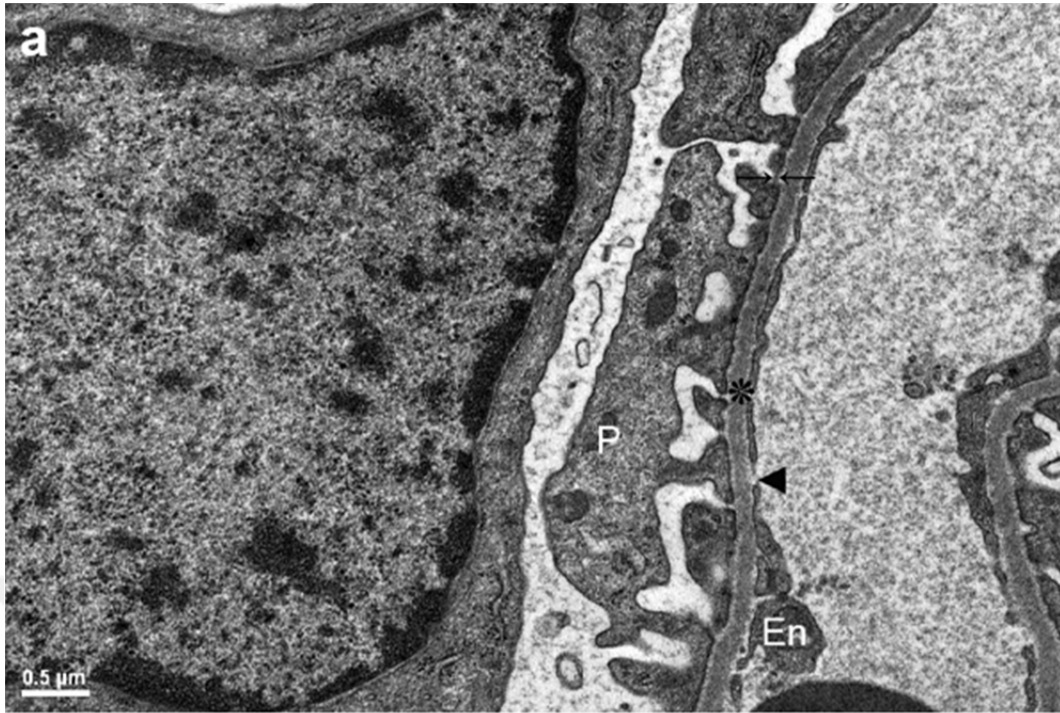
Grupların proksimal tübül epitel hücreleri fırçamsı kenar oluşturan uzun mikrovilluslara sahipti. Hücreler arasında adherens tipi bağlantılar mevcuttu. Apikal sitoplazmada endositotik veziküller, bazal yüzeye dik konumlanan çok sayıda uzun, krista yapısı sağlam mitokondrionlar vardı. Epitel altında uzanan bazal lamina intakttı ve çokça bazal katlantıya sahipti (Şekil 33b,34b,35b).

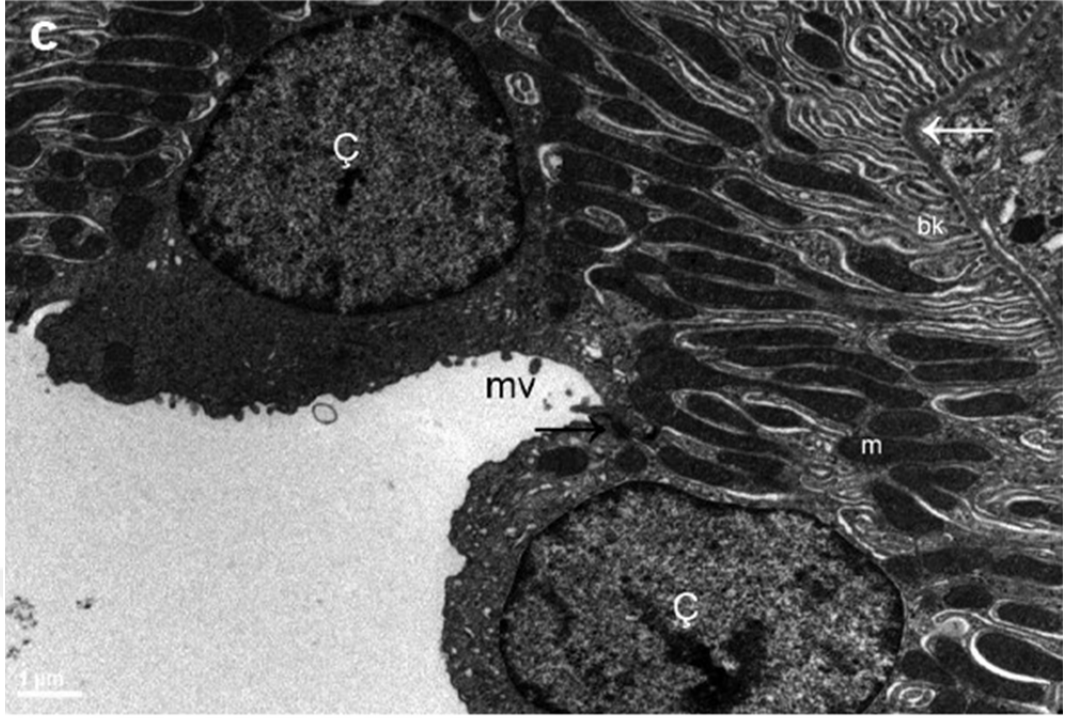
Grupların distal tübül epitel hücreleri apikalde az sayıda, kısa mikrovillusa sahipti. Hücreler arası adherens tipi bağlantılar mevcuttu. Bazal lamina çokça katlantı içermekte ve bunlarla ilişkili çok sayıda krista yapısı sağlam mitokondrion vardı (Şekil 33c,34c,35c).



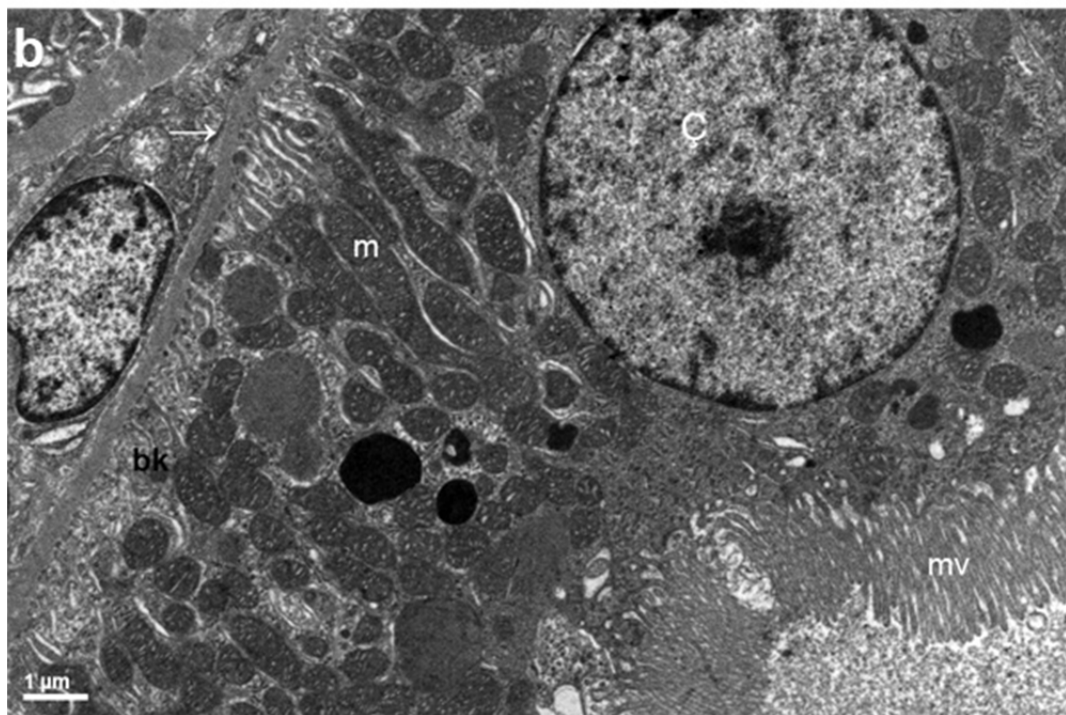
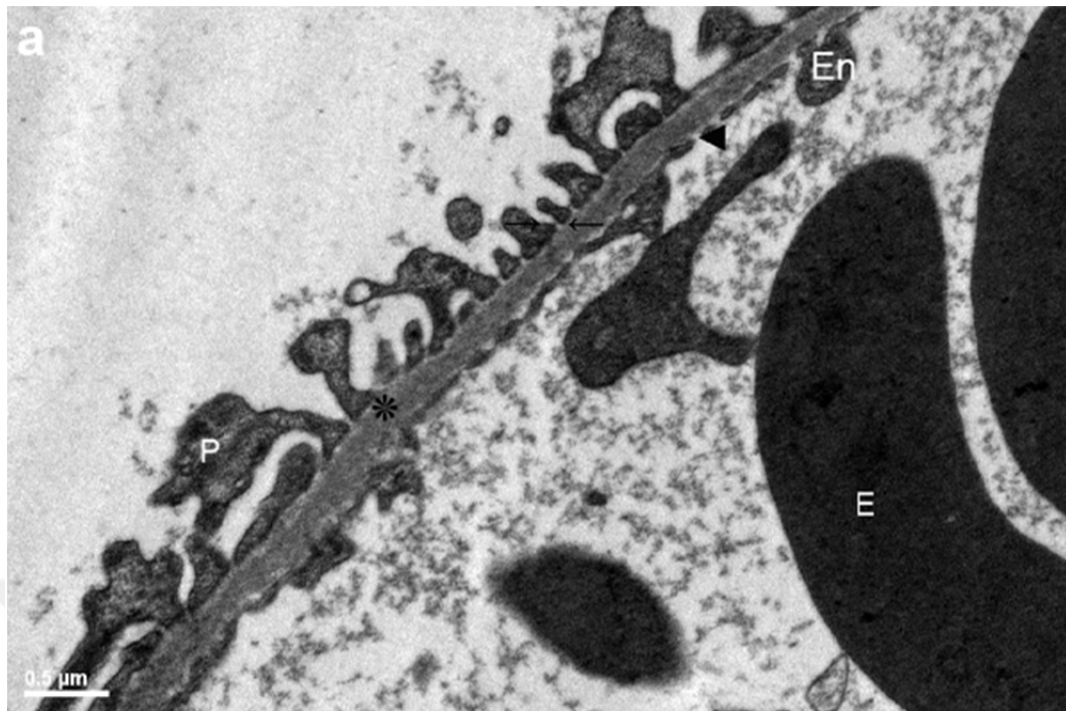


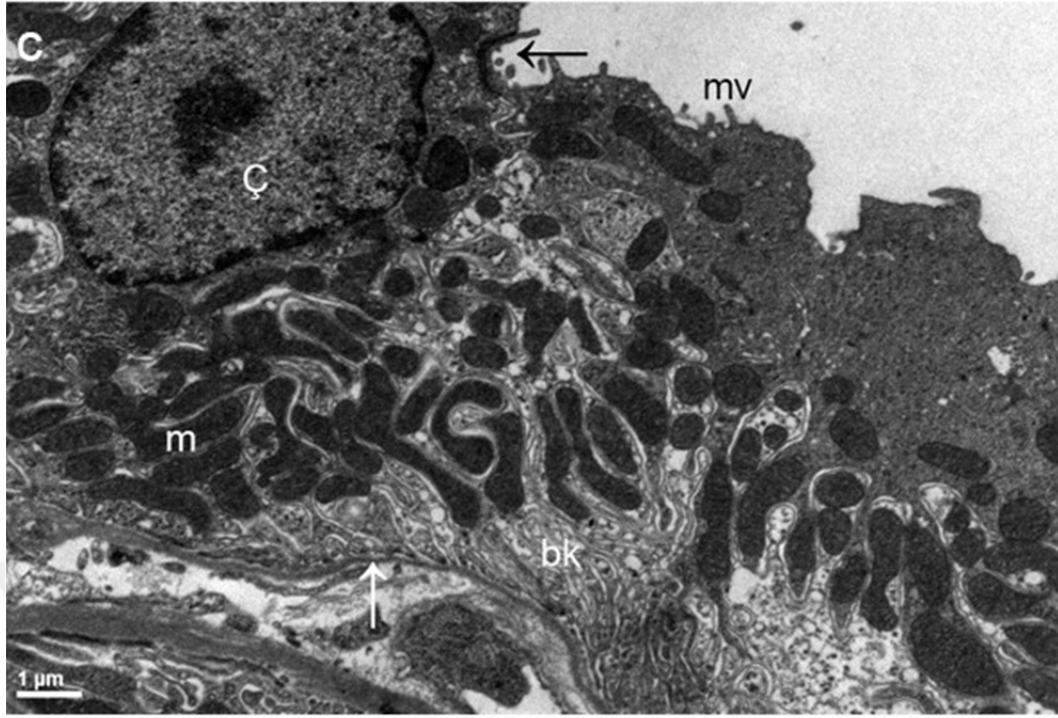
Şekil 33. Kontrol grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerül yapısında (a); glomerüler kapiller içerisinde eritrosit (E), ve fenestralı endotel hücresi kesiti, glomerüler bazal membran (*), podosit ve podosit içerisinde mitokondrionlar (m) ve çekirdeği (PÇ) görülmekte. Bar=0,5 µm. Kontrol böbrek dokusu proksimal tübül hücresi (b) apikalde mikrovillus (mv), sitoplazmada çekirdek (Ç), bazal katlantılar (bk) ve arasına yerleşmiş mitokondrionlar (m) görülmekte. Bar=1 µm. Kontrol böbrek dokusu distal tübülünün (c) apikalinde kısa az mikrovillus (mv) ve primer silyum (ok başı), sitoplazmada mitokondrionlar (m), bazalde bazal katlantılar (bk) ve bazal lamina (ok) görülmekte. Bar=1 µm.





Şekil 34. DMSO grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerülde (a), podosit (P), pediseller arası uzanan filtrasyon yarık diyaframı (karşılıklı oklar), glomerüler kapiller içinde endotel hücresi (En) fenestrası (ok başı) arada uzanan glomerüler bazal membran (*) izlenmekte. Bar=0.5 µm. DMSO grubuna ait proksimal tübülde (b) çift çekirdekli (Ç1, Ç2) hücre apikalinde uzanan mikrovilluslar (mv), bazalde bazal lamina ve bazal katlantılar, sitoplazmada mitokondrionlar (m), komşu hücre sitoplazmasında çok sayıda lizozom (L) izlenmekte. Bar=1 µm. DMSO grubuna ait distal tübül (c) epiteli apikalinde az sayıda kısa mikrovillus (mv), hücrelerin üst sınırında bağlantı kompleksi (siyah ok), sitoplazmada mitokondrionlar, bazalde bazal lamina (beyaz ok) ve bazal katlantılar (bk) izlenmekte. Bar=1 µm.

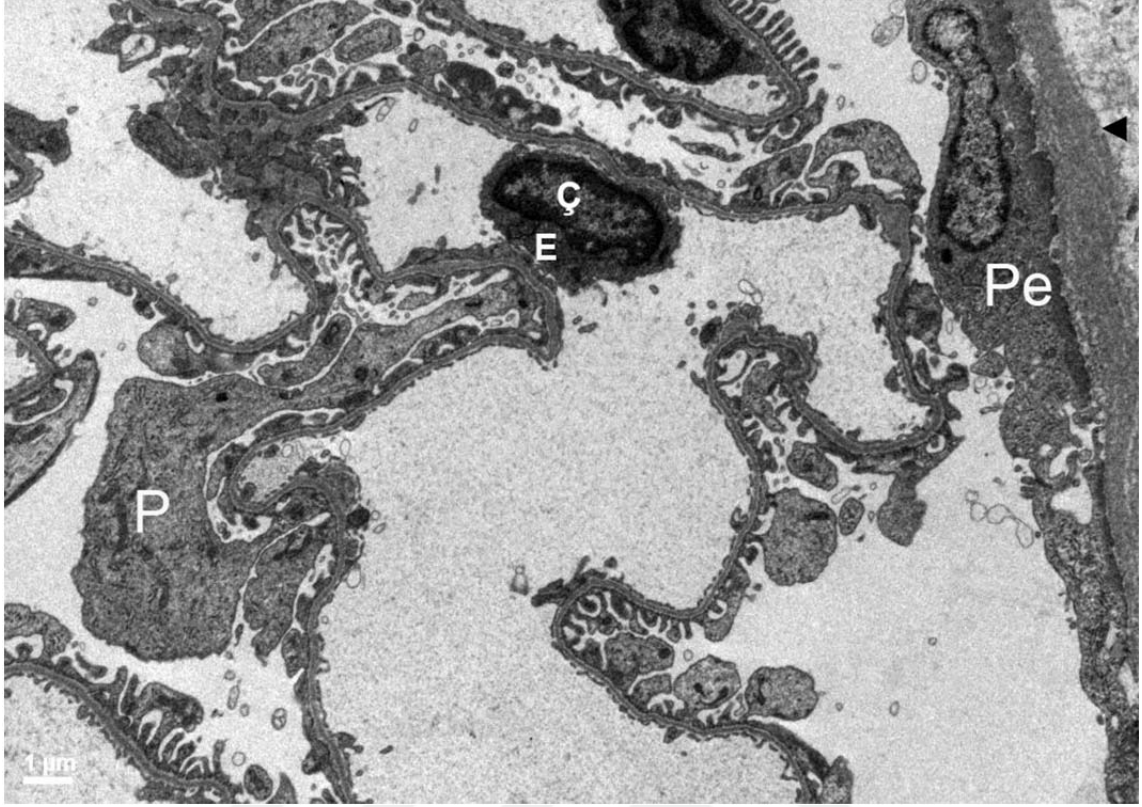




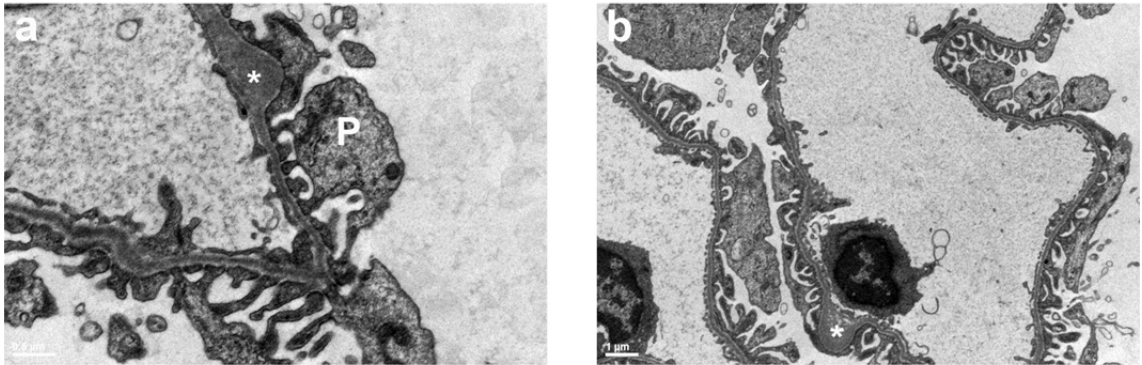
Şekil 35. 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerülde (a) podosit (P) pediselleri arası filtrasyon yarık diyaframı (karşılıklı oklar) normal kalınlıkta, glomerüler bazal membran (*) normal kalınlıkta, glomerüler kapiller içi endotel (En) fenestrası (ok başı) normal genişliktedir ve kapiller içinde eritrosit (E) görülmektedir. Bar= 0.5 µm. Proksimal tübül epitelinde (b); fırçası kenar oluşturan mikrovillus (mv), sitoplazmada bazal katlantılarda (bk) uzun mitokondrion (m) ve çekirdek (Ç), bazalde bazal lamina (ok) görülmekte. Bar= 1 µm. Distal tübül epiteli (c) apikalinde mikrovillus (mv) kesitleri, hücreler arası bağlantı kompleksleri (siyah ok), sitoplazmada çekirdek (Ç), bazal katlantılar (bk) arasında mitokondrionlar (m), bazalde bazal lamina (beyaz ok) izlenmekte. Bar= 1 µm.

4.3.2. Gentamisin Grubu

Gentamisin nefrotoksitesine bağlı hasarda glomerül yapısı nispeten korunmuş olup, glomerüler kapiller endoteli morfolojik olarak normal görünümde, fenestralar normal genişlikteydi. Yine podositler normal görünümde ve pediseller arası mesafe normal uzunlukta idi. Bowman kapsülü pariyetal yaprağı epiteline ait bazal laminada laminasyon gözlemlendi (Şekil 36). Glomerüler bazal membran yer yer kalınlaşmıştı (Şekil 37).

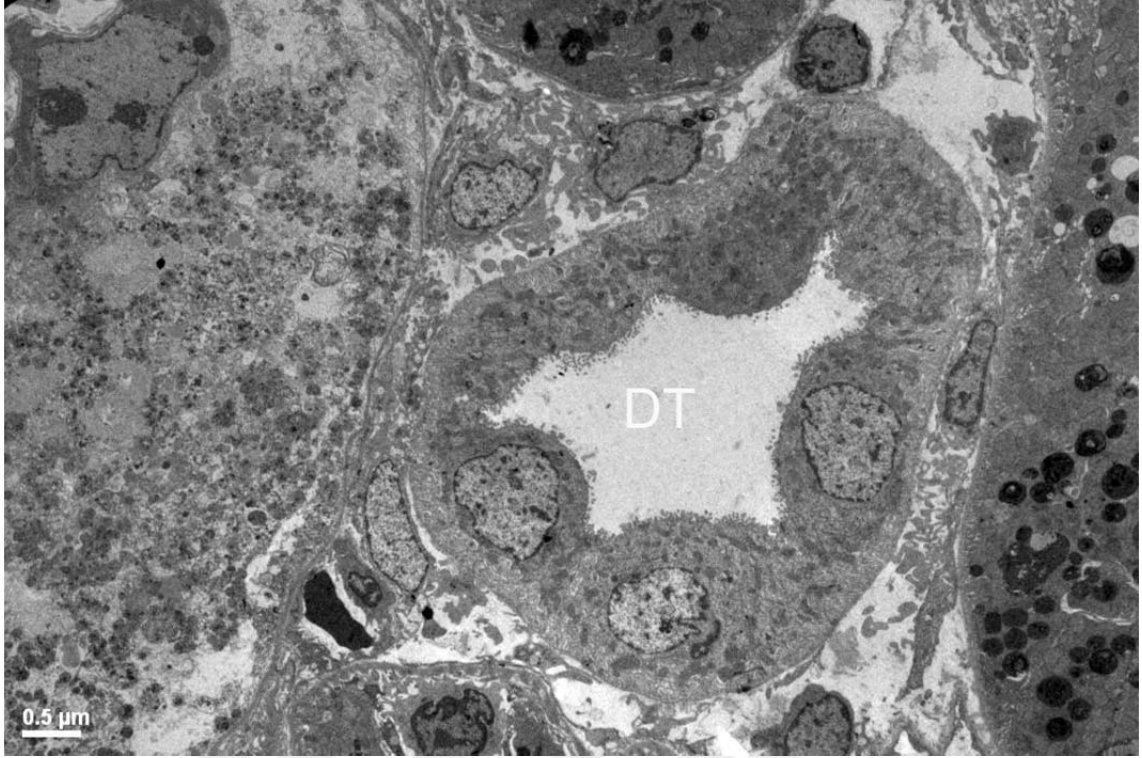


Şekil 36. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerül yapısı. E: kapiller endoteli, Ç: kapiller endoteli çekirdeği, P: podosit , Pe: Bowman kapsülü pariyetal yaprak epiteli (Pe) bazal membranında laminasyon (ok başı). Bar= 1 µm.



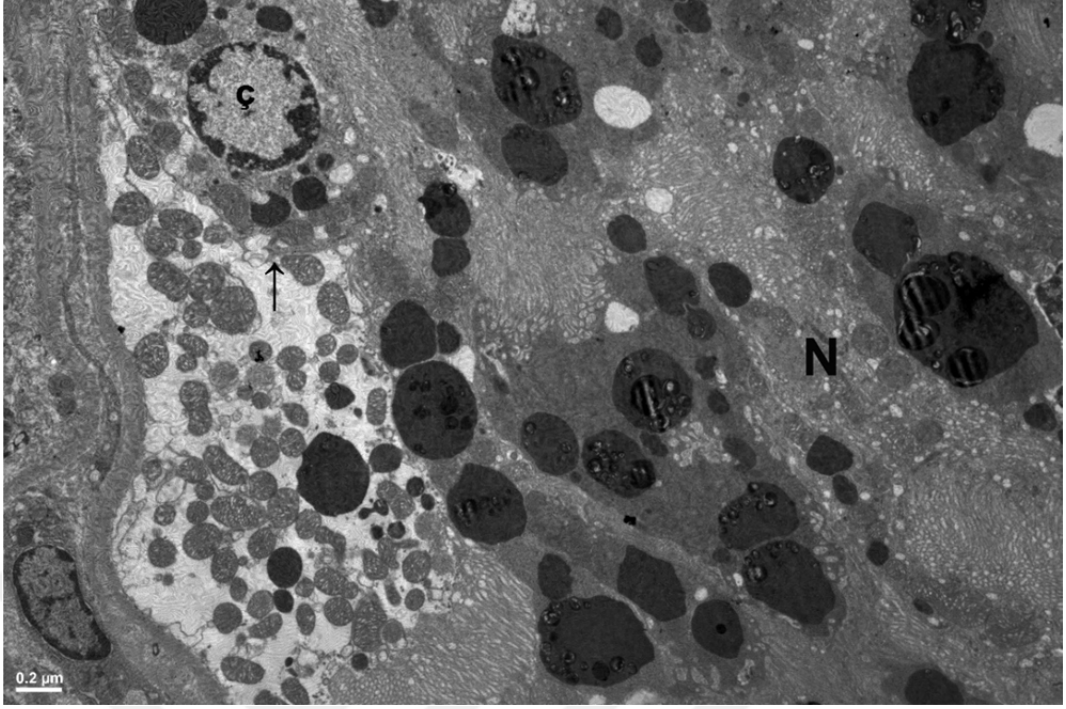
Şekil 37. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Bazal membranda lokalize kalınlaşma (*) . Podosit (P). a:Bar =0.5 µm, b: Bar= 1 µm.

Tübül yapıları incelendiğinde, distal tübüllerin yapısı nispeten korunmuş olmasına rağmen başlıca hasarın proksimal tübül epitelinde olduğu gözlemlendi. (Şekil 38).

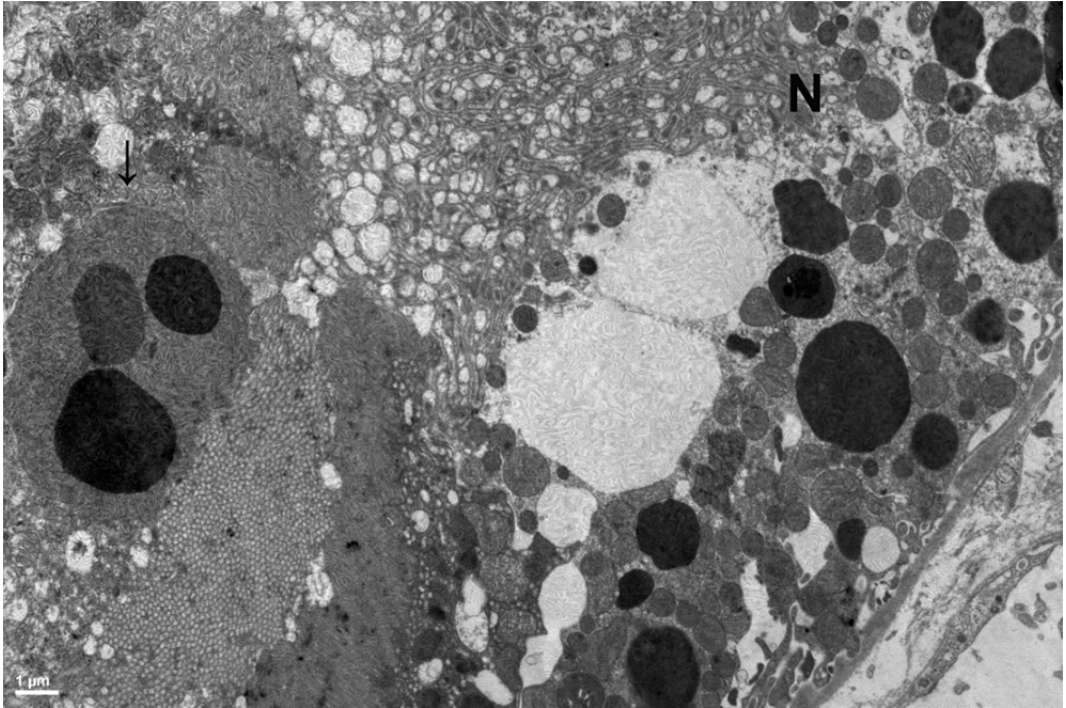


Şekil 38. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Merkezi konumlu distal tübül (DT) nispeten bütünlüğünü korumakta iken interstisyel alanda ödem meydana gelmiştir. Proksimal tübüllerde nekroz ve dejenerasyon gözlenmektedir. Proksimal tübülde intrasitoplazmik myeloid cisimcikler ve dejenere organeller vardır. Bar=0.5 µm.

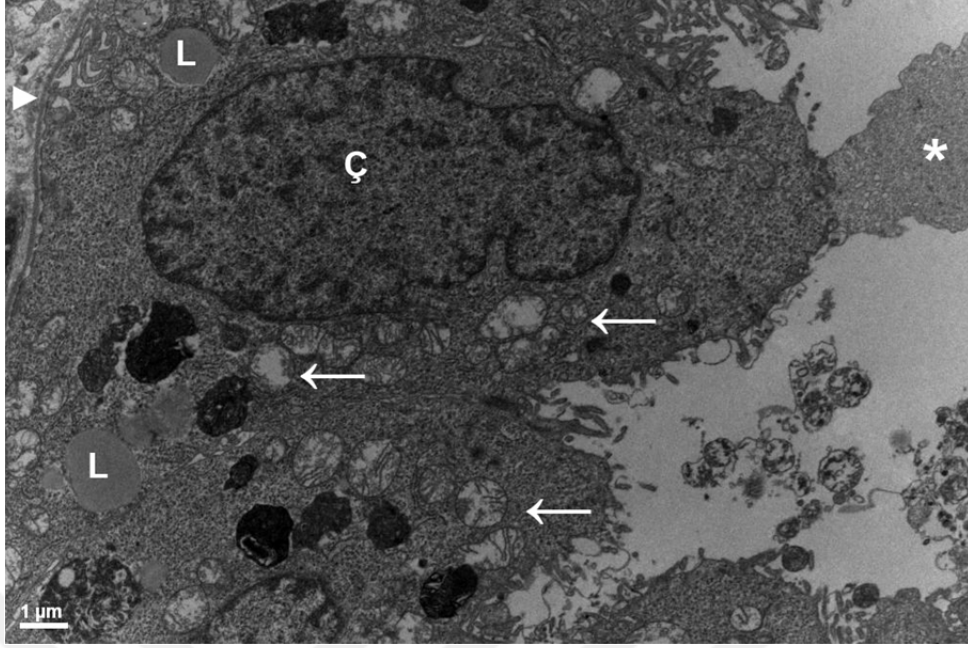
Proksimal tübül epitelinde nekroz ve apoptoz görüldü. Apoptotik hücre çekirdeğinde periferik dens kromatin düzenlenimi ve çekirdek fragmentasyonu dikkati çekmekteydi (Şekil 39,40). Hücre yüzeyinde mikrovilluslarda düzensizleşme, apikal sitoplazmada lümeneye doğru blebleşme (Şekil 41), hücre içerisinde lipid birikimi (Şekil 41,42,43), yuvarlaklaşmış, krista bütünlüğünü kaybetmiş mitokondrionlar (Şekil 41) mevcuttu. Lizozomların genişleyip sayıca arttığı (Şekil 42), lizozom içinde *myeloid cisimcik* olarak adlandırılan multisentrik multilamellar membran yapıların bulunduğu dikkati çekmekteydi. Epitelin bazı tübüllerde yer yer bazal laminadan ayrılmaya başladığı (Şekil 43) görüldü.



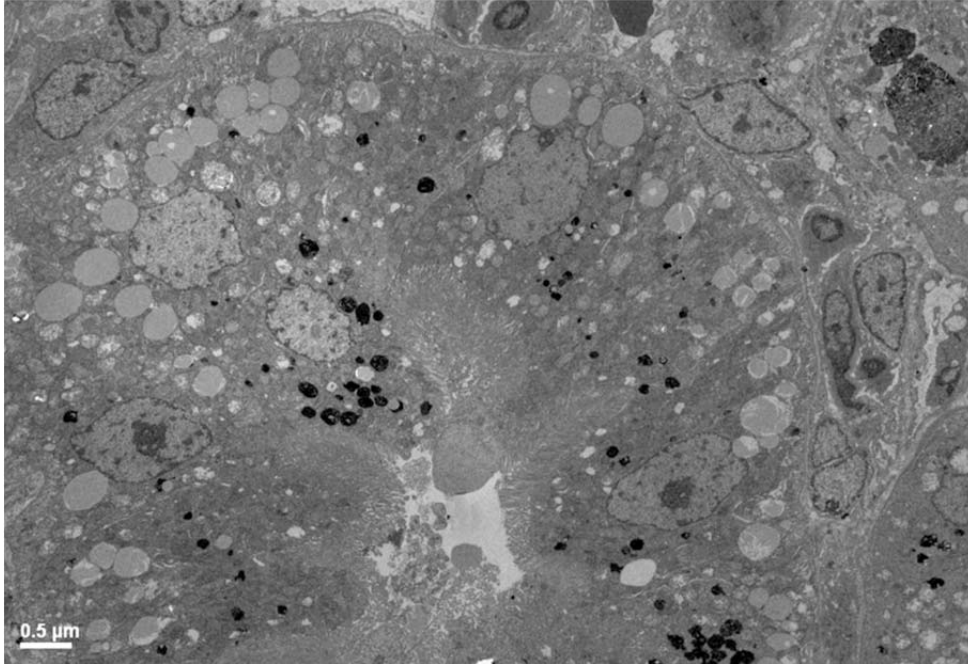
Şekil 39. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Apoptoz erken evresindeki hücrenin(ok), hücre çekirdeğinde (Ç) periferal yerleşimli dens kromatin içeriği. Bu hücreye komşu nekrotik tübül hücreleri (N). Bar 0,2 µm.



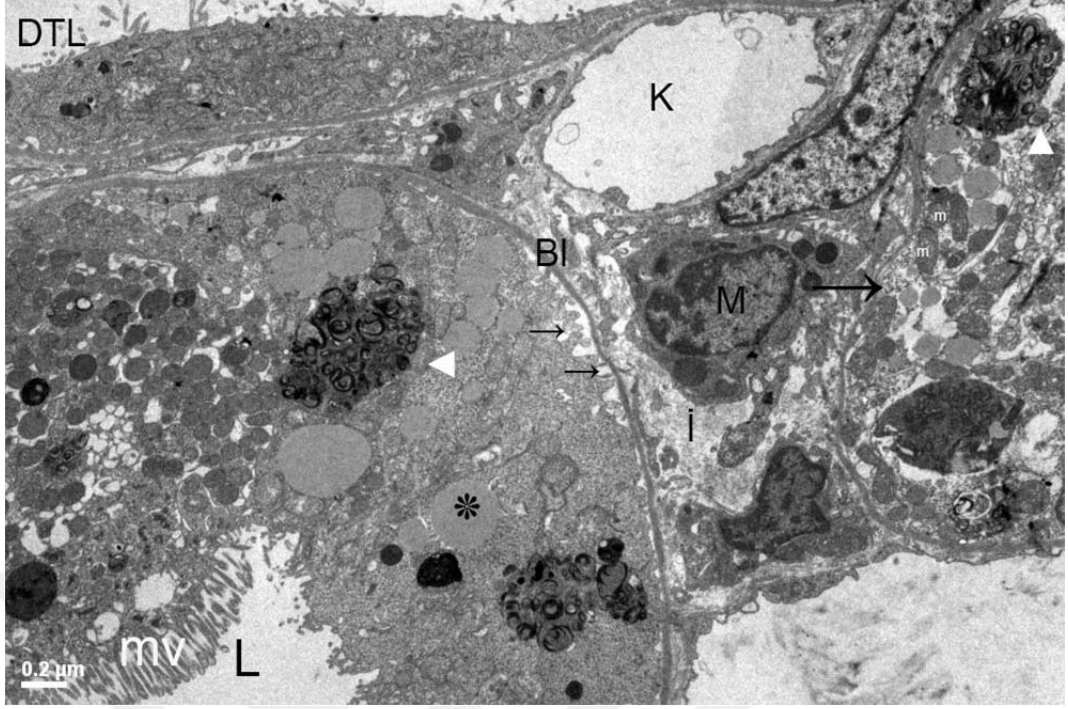
Şekil 40. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Apoptotik değişime uğrayan hücrede (ok) hücre çekirdeğinde fragmentasyon, bazı hücrelerde nekroz (N). Bar=1 µm.



Şekil 41. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübül hücre sitoplazması apikalde lümene blebleşip (*), mikrovilluslar düzensizleşmiştir. Sitoplazmada çok sayıda lipid birikimi (L), krista yapısını kaybetmiş mitokondrionlar (ok) görülmekte. Bazalde intakt bazal lamina (ok başı) görülmektedir. Bar=1 µm.

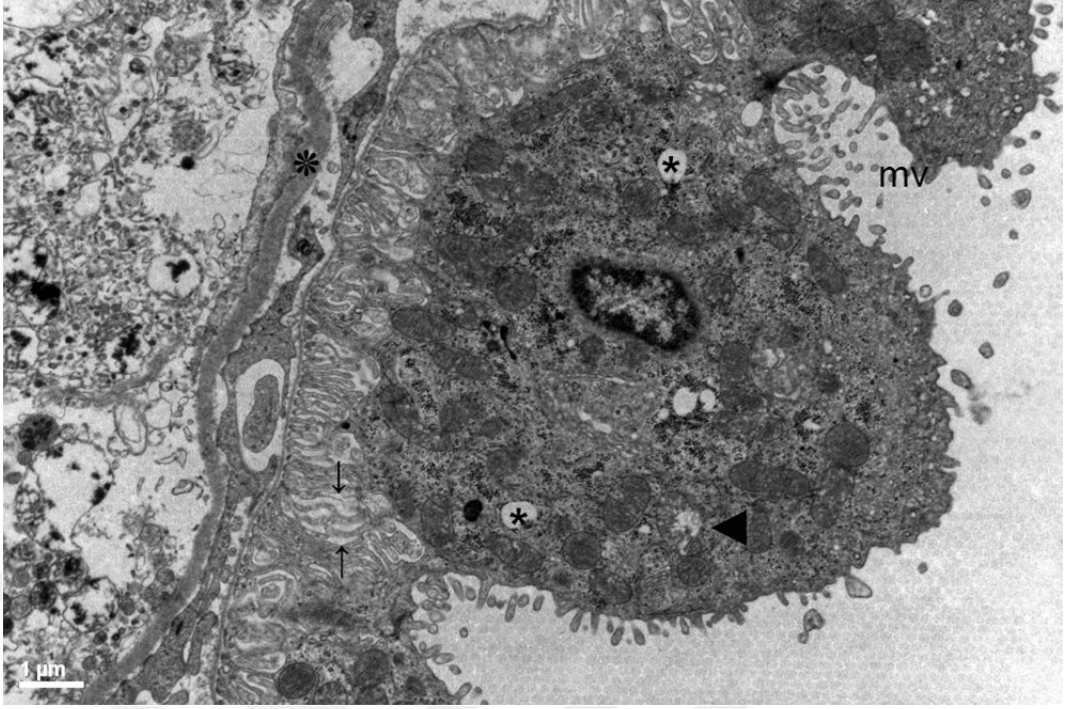


Şekil 42. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübül epitelinde sayıca artmış lizozom ve lipid birikimi izlenmekte. Bar= 0.5 µm

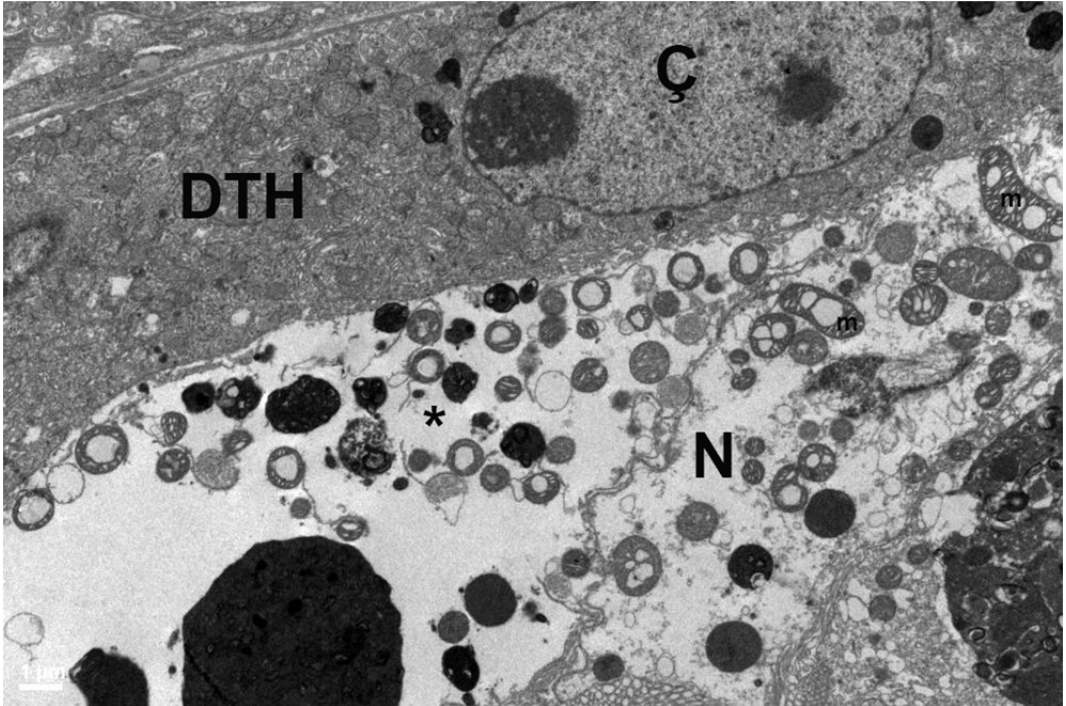


Şekil 43. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Sol altta proksimal tübül epitelinin lümenine (L) bakan yüzeyinde yer yer mikrovillus (mv) kaybı, lizozom içerisinde myeloid cisimcik (ok başı), lipid birikimi (*), intakt bazal lamina (BI) hücrenin yer yer bazal laminadan ayrıldığı (küçük ok) görülmekte. İnterstisyel alanda (İ) mononükleer hücre (M) infiltrasyonu vardır, kapiller (K) dilate görünümündedir. Sağdaki proksimal tübül bazal laminasında kıvrımlar gözlenmekte (büyük ok), mitokondrion (m) ve lizozomlar genişlemiş ve lizozom içerisinde myeloid cisimcik görülmektedir. Bar= 0,2 µm

Distal tübüllerde de nekroza varan değişiklikler olmasına rağmen hasarlı tübüller proksimal tübüllere göre daha azdı. Tübül lümeninde dejeneratif değişiklikler gösteren organeller mevcuttu. Mikrovilluslar kısmen korunmuştu. Sitoplazmada lipid birikimi, bazal katlantılar arası mesafede genişleme, mitokondriyal matrikste litik değişimler ve kristalarda parçalanma şeklinde mitokondrial değişimler görülmekteydi (Şekil 44,45).



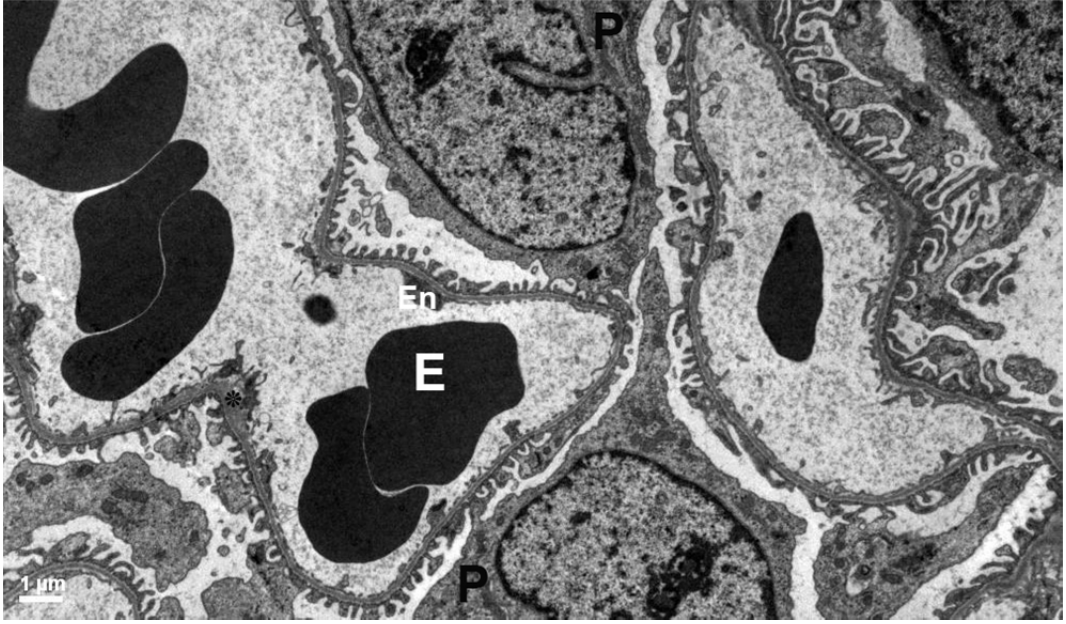
Şekil 44. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Distal tübülde hücre apikalinde mikrovilluslar (mv), sitoplazmada lipid birikimi (*), krista yapısı kısmen dejenere mitokondrionlar (ok başı) bulunmakta. Bazal katlantılar arası aralığın (oklar) genişlemiş olduğu dikkati çekmekte. Distal tübüle komşu nekrotik tübülde sitoplazmik artıklar ve kalınlaşmış bazal lamina görülmekte. Bar=1 µm.



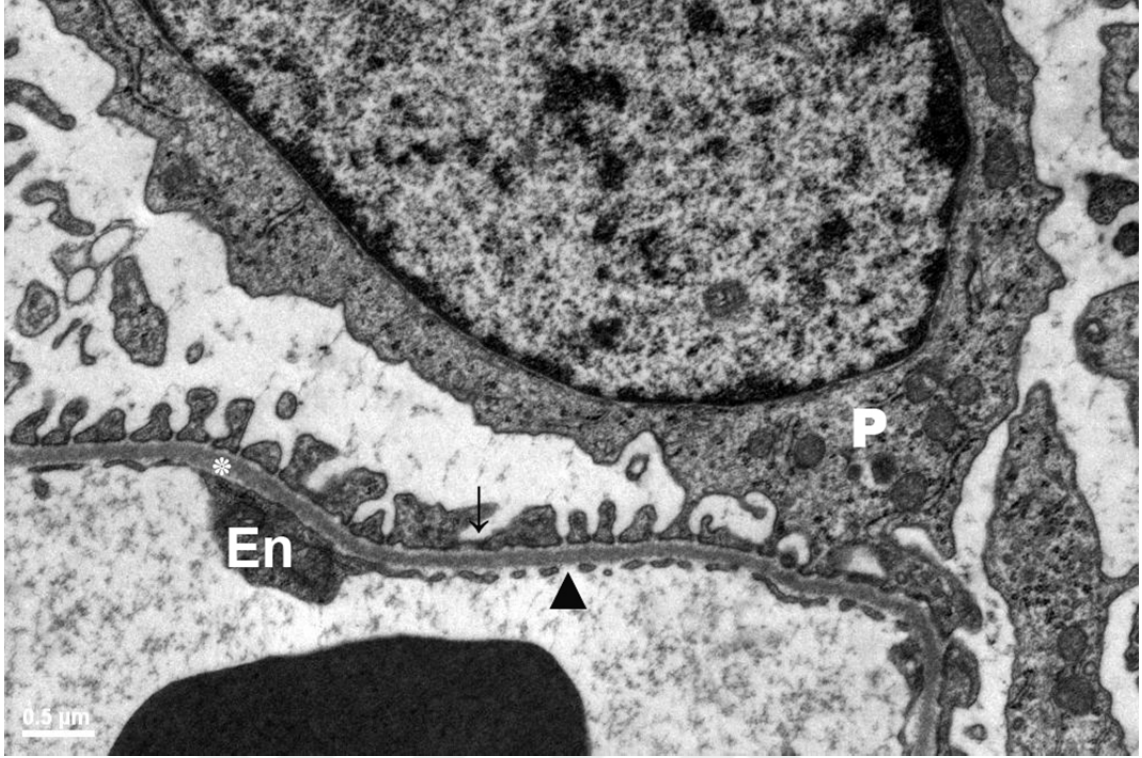
Şekil 45. Gentamisin grubu elektron mikroskopik görünümü. Distal tübül hücresinde (DTH) çekirdek (Ç) ve içeriği lümeneye dökülen komşu nekrotik hücrede (N) mitokondrial (m) matrikste litik değişim ve kristada parçalanma, lümeneye dejeneratif değişiklik gösteren organeller (*) izlenmektedir. Bar= 1 µm.

4.3.3. Gentamisin+ 2-APB Grubu

Tedavi grubuna ait glomerül incelendiğinde; glomerül kapiller endotel hücresi ve podosit uzantısı olan pedisellerin bazal membran üzerine normal morfolojide yerleştiği, pediseller arası mesafenin normal genişlikte, filtrasyon yarık diyaframının normal kalınlıkta ve endotel hücresi fenestralarının normal genişlikte olduğu görüldü. Glomerül bazal membranı, ortada lamina densa her iki yanında lamina rara olarak normal kalınlıktaydı (Şekil 46,47).

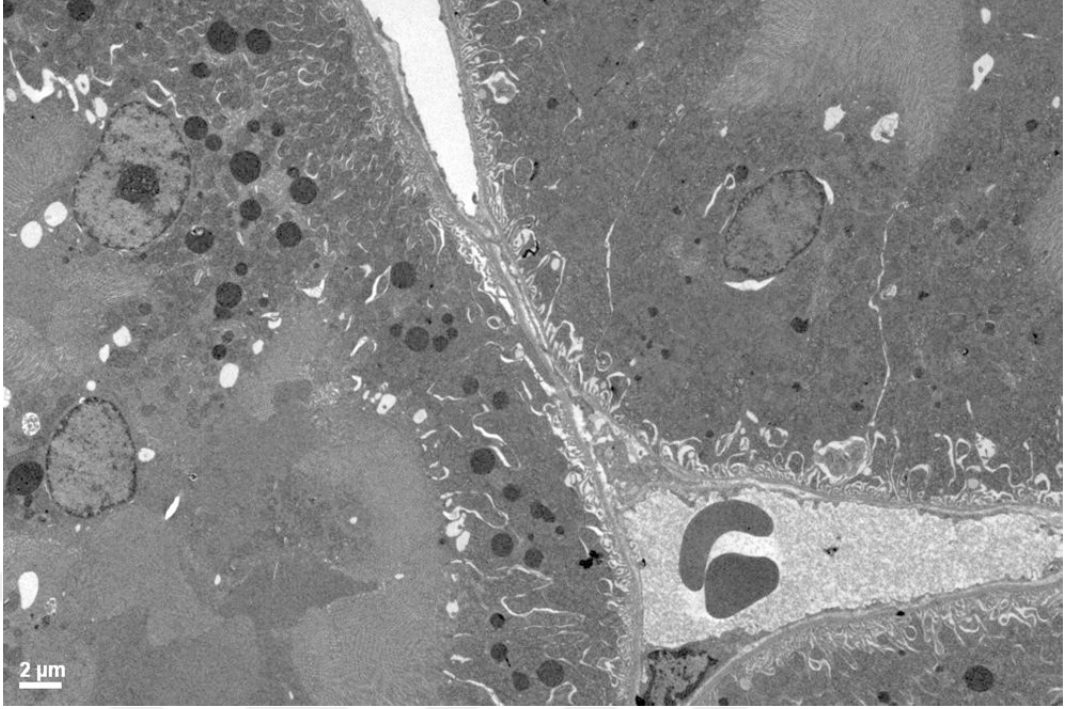


Şekil 46. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerül yapısında kapiller endoteli (En), bazal membran (*), podosit (P) ve uzantıları olan pediseller düzenli aralıklarla uzanmıştır. Glomerül kapilleri içinde eritrositler (E), endotel kesiti (En) görülmektedir. Bar= 1 µm.

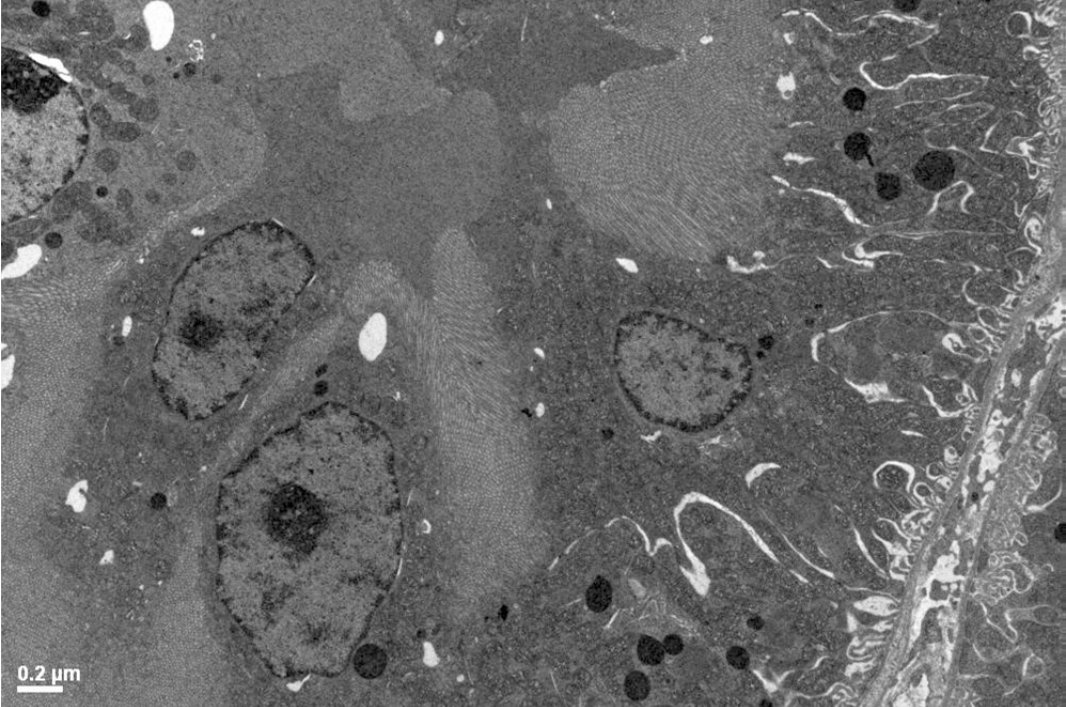


Şekil 47. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Glomerülün daha büyük büyütmesinde podosit (P) pediselleri arası uzanan filtrasyon yarık diyaframı (ok), bazal membran (*), endotel hücresi (En) fenestraları (ok başı) ile görülmekte. Bar= 0,5 µm.

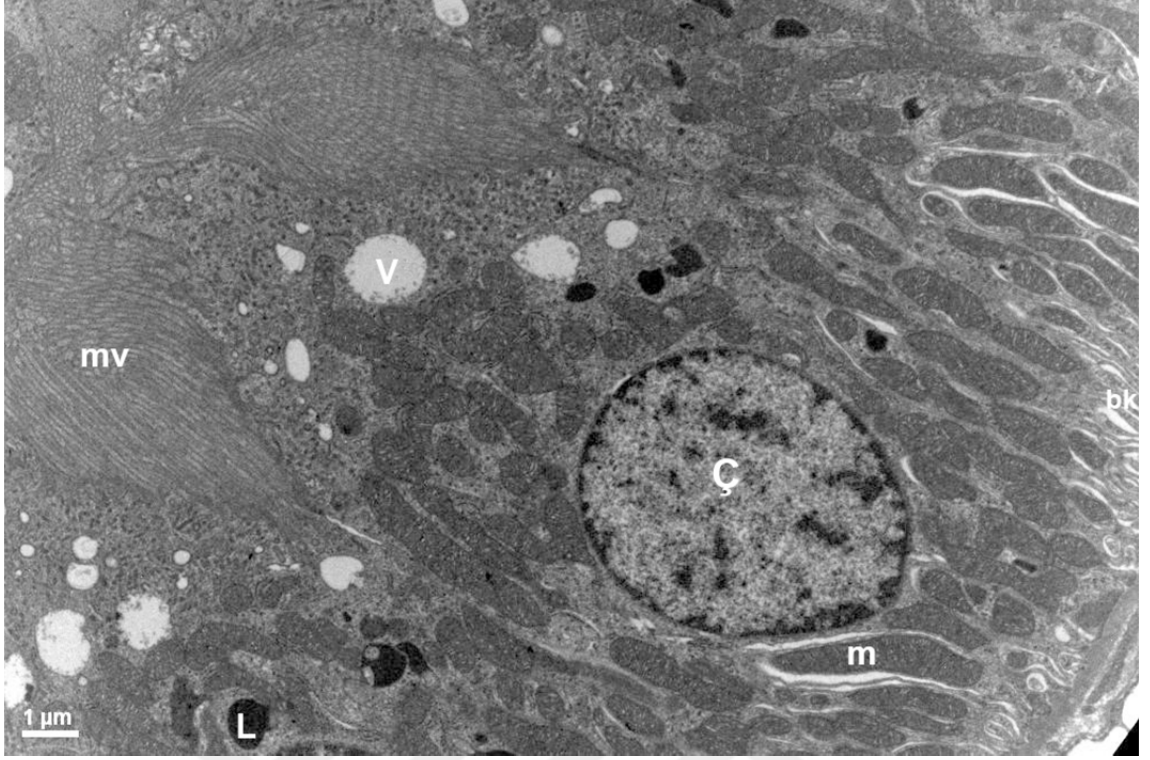
Gentamisin+ 2-APB grubu proksimal tübül yapısı gentamisin grubuna oranla daha az hasarlı bulundu. Tübül hücreleri daha az nekroza uğramıştı, genellikle hücreler bazal lamina ile olan bağlantısını sürdürmüştü. Epitel hücreleri çoğunlukla fırçamsı kenar oluşturan uzun mikrovillus düzenlenimine sahipti. Bazal lamina intakttı. Bazolateral katlantılar yer yer genişlemiş olmasına rağmen hücreler bağlantısını korumuştur. Sitoplazma içerisinde lizozomlar sayıca artmasına rağmen myeloid cisimcikler sayıca azalmıştı. Hücre apikalinde endositotik fonksiyonla ilgili veziküler yapılar gözlenmekte olup bazal katlantılar arasında krista yapıları düzenli uzun mitokondrionlar bulunmaktaydı (Şekil 48,49,50).



Şekil 48. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübüllerde epitel hücreleri bazal lamina ile bağlantısını kaybetmemiş olup sitoplazmada çok sayıda lizozom, bazalde bazal lamina ve bazal katlantılar ve sitoplazma apikalinde endositotik veziküller görülmekte. Bar= 2 µm.

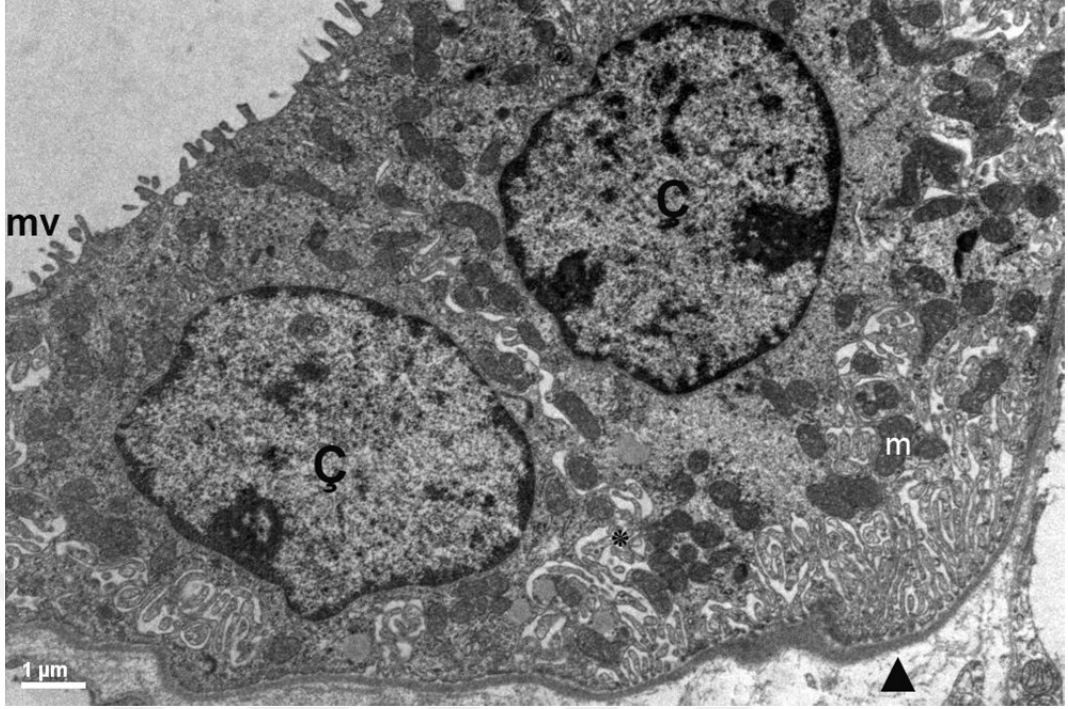


Şekil 49. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübüle ait kesitte hücrelerin çoğunun bazal lamina ile bağlantısını kaybetmediği, bazolateral katlantıların, çekirdeğin ve apikalde uzun mikrovillusların intact olduğu görülmekte. Bar= 0,2 µm.

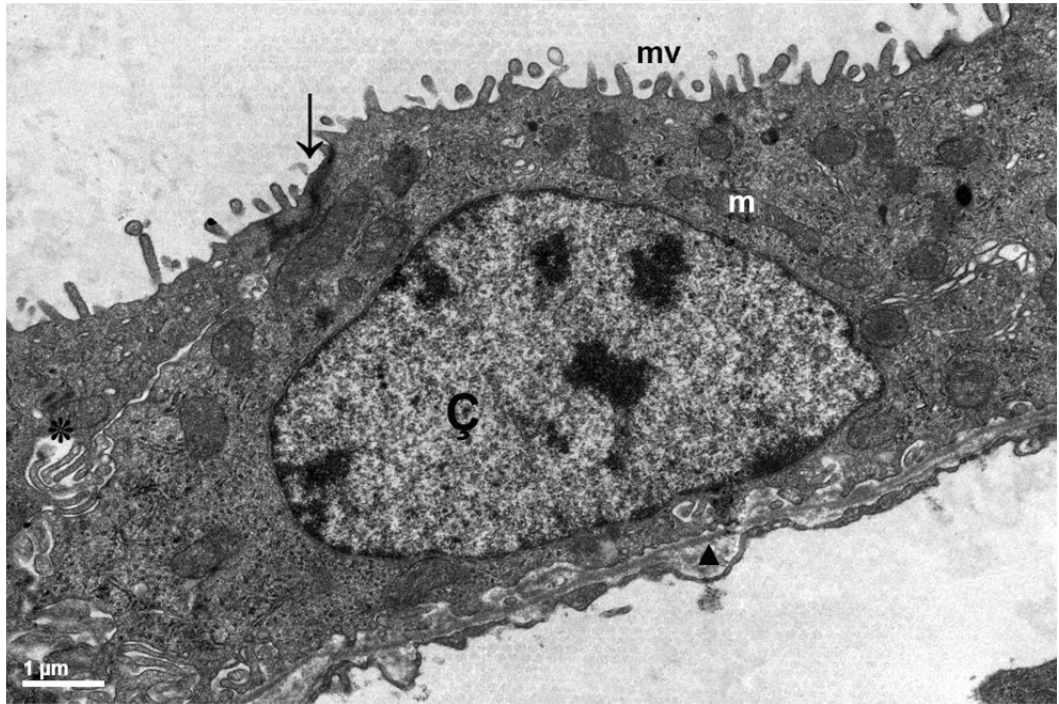


Şekil 50. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Proksimal tübül epitelinin apikalinde uzun mikrovillus (mv), apikal sitoplazmada endositotik veziküller (V) vardır. Bazalde bazal katlantılar arasında bütünlüğünü korumuş mitokondrionlar ve lizozomlar (L) görülmekte. Bar=1 µm.

Gentamisin+ 2-APB grubu distal tübül kesitlerinde; hücrelerin apikalinde kısa mikrovilluslar ve sağlam adherens tipi bağlantılar, bazolateral katlantılar ve bazal katlantılarla ilişkili krista yapısı sağlam mitokondrionlar gözlendi (Şekil 51,52).



Şekil 51. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Distal tübüle ait hücre çekirdekleri (Ç), apikalde kısa mikrovilluslar (mv), bazalde intakt bazal lamina (ok başı) ve bazalolateral katlantılar ile bunlarla ilişkili mitokondrionlar (m) görülmekte. Bar= 1 µm.



Şekil 52. Gentamisin+ 2-APB grubu elektron mikroskopik görünümü. Distal tübüle ait hücre çekirdeği (Ç) ve mitokondrionlar (m), apikalde kısa mikrovilluslar (mv) ve hücreler arası bağlantı kompleksleri (ok), lateral katlantılar (*), bazalde katlantılar ve bazal lamina (ok başı) izlenmekte. Bar= 1 µm.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

4.4.1. Denek Ağırlık Bulguları (Gram)

Deneyin başında deneklerin vücut ağırlıkları ölçülmesi sonucunda aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Deney sonunda kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarındaki deneklere kıyasla Gentamisin verilen deneklerin vücut ağırlıklarında anlamlı bir azalma görüldü. Gentamisin+ 2-APB uygulanan grupta ise Gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarındaki düşüşte istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü.

Tablo 7. $P < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.

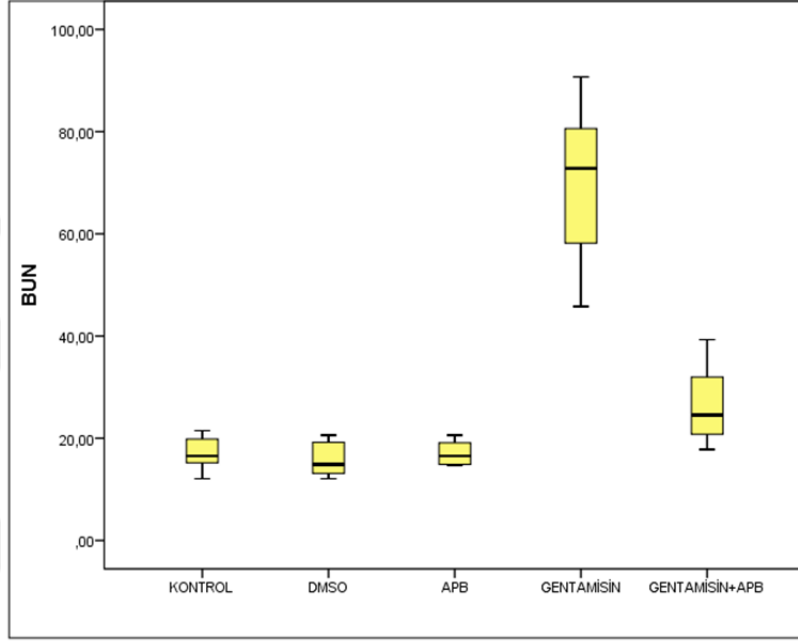
Grup Adı	KONTROL	DMSO	2-APB	GENTAMİSİN	GENTAMİSİN+ 2-APB
	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS
Deney	273,4± 18,2	275,4± 12,8	270,4± 15,6	280,3± 20,9	266,8± 16,4
Başı					
Deney	293± 17,6 ^{a,b}	293,4± 12,1 ^{c,d}	288,6± 16 ^{e,f}	250,1± 16,4 ^{a,c,e}	253,6± 17,2 ^{b,d,f}
Sonu					
FARK	19,6± 2,7 ^{a,b}	18± 2,3 ^{c,d}	18,3± 2,1 ^{e,f}	-30,1± 26,4 ^{a,c,e,g}	-13,1± 4,3 ^{b,d,f,g}

4.4.2. Kan Üre Azotu (BUN) (mg/dl)

Çalışma sonunda elde ettiğimiz üre ölçümlerine göre en düşük değerlere sahip olan kontrol, DMSO ve 2-APB grupları arasında anlamlı fark gözlenmedi. En yüksek üre seviyesine sahip grup ise Gentamisin grubu olarak gözlendi. Kontrol, DMSO ve 2-APB grupları ile kıyaslandığında Gentamisin alan grupta üre seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı görüldü. Ancak bu artışın Gentamisin+ 2-APB grubunda; kontrol, DMSO ve 2-APB grupları seviyesine inmemesine rağmen anlamlı şekilde azaldığı gözlendi.

Tablo 8. $p < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.

Grup Adı	KONTROL	DMSO	2-APB	GENTAMİSİN	GENTAMİSİN+ 2-APB	P
	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	
BUN	17,1±3,2 ^{a,b}	15,9± 3,3 ^{c,d}	17,1±2,4 ^{e,f}	70± 15,4 ^{a,c,e,g}	26,5± 8,2 ^{b,d,f,g}	0,000



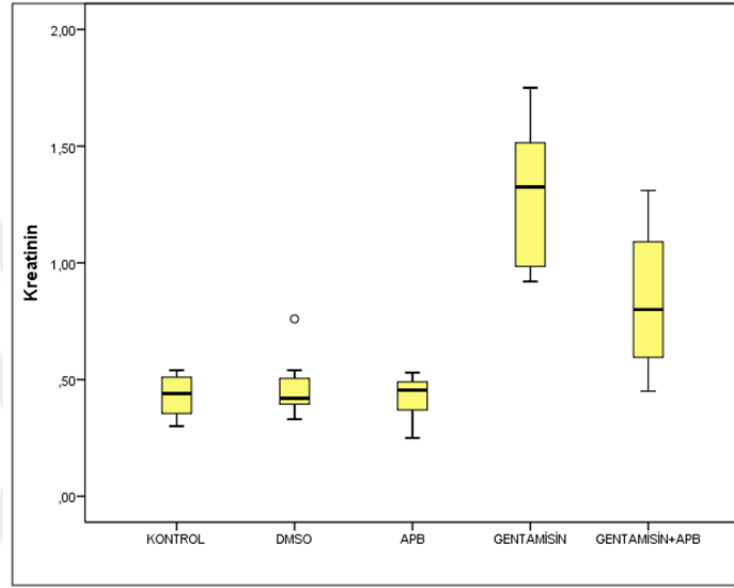
Grafik 2. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait ortalama BUN değerleri

4.4.3. Kreatinin (mg/dl)

Kontrol, DMSO ve 2-APB grupları en düşük kreatinin seviyelerine sahip olmakla birlikte düzeyleri arasında anlamlı fark yoktu. Gentamisin grubunda kreatinin seviyesi en yüksek değerde ve kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarından anlamlı olarak yüksekti. Gentamisin+ 2-APB grubunda ise kreatinin seviyesi kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarından yüksek olmasına rağmen Gentamisin grubundan anlamlı olarak düşüktü.

Tablo 9. $P < 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.

Grup Adı	KONTROL	DMSO	2-APB	GENTAMİSİN	GENTAMİSİN+ 2-APB	P
	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	
Kreatinin	0,4± 0,1 ^{a,b}	0,5± 0,1 ^{c,d}	0,4± 0,1 ^{e,f}	1,3± 0,3 ^{a,c,e,g}	0,8± 0,3 ^{b,d,f,g}	0,000



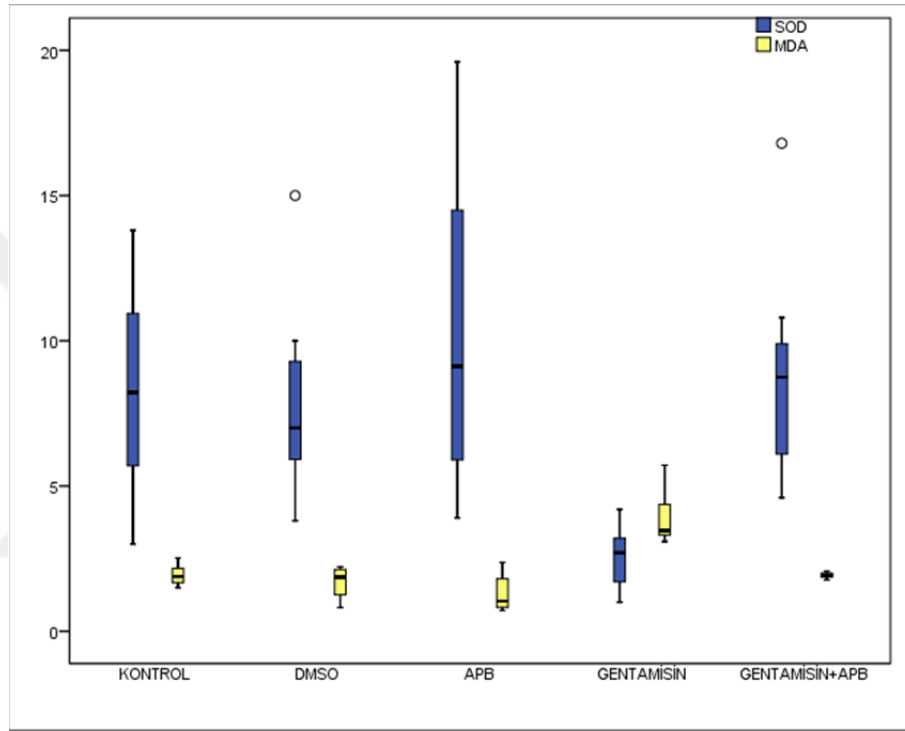
Grafik 3. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait kreatinin ortalama değerleri

4.4.4. SOD (IU/ml), MDA (nmol/ml)

Gentamisin grubunda SOD değerleri kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalırken, MDA’da anlamlı artış olmuştur. Gentamisin+ 2-APB uygulaması ile SOD seviyesinde Gentamisin grubuna göre anlamlı artış olduğu ve seviyesinin kontrol, DMSO ve 2-APB ile anlamlı bir fark göstermediği gözlenmiştir. MDA seviyesinin ise Gentamisin+ 2-APB grubunda Gentamisin grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği, ayrıca kontrol, DMSO ve 2-APB ile anlamlı fark göstermediği bulunmuştur.

Tablo 10. $p \leq 0,014$ için anlamlı farklılık; Kontrol ve Gentamisin grupları için a, Kontrol ve Gentamisin+ 2-APB grupları için b, DMSO ve Gentamisin grupları için c, DMSO ve Gentamisin+ 2-APB grupları için d, 2-APB ve Gentamisin grupları için e, 2-APB ve Gentamisin+ 2-APB grupları için f, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB grupları için g.

Grup Adı	KONTROL	DMSO	2-APB	GENTAMİSİN	GENTAMİSİN+ 2-APB	P
	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	Ort± SS	
SOD	8,3± 3,6 ^a	7,9± 3,4 ^c	10,3± 5,4 ^e	2,6± 1,1 ^{a,c,e,g}	8,9± 3,8 ^g	0,001
MDA	1,9± 0,4 ^a	1,7± 0,6 ^c	1,3± 0,6 ^e	3,9± 0,9 ^{a,c,e,g}	1,9± 0,1 ^g	0,000



Grafik 4. Kontrol, DMSO, 2-APB, Gentamisin ve Gentamisin+ 2-APB gruplarına ait SOD ve MDA ortalama değerleri.

5. TARTIŞMA

Aminoglikozidler, Gram (-) enfeksiyonların önlenmesinde etkili olan antibiyotikler olarak uzun zamandır bilinmektedir. Hızlı ve yüksek antibakteriyel etkinlik, düşük direnç gelişme potansiyeli, beta laktam antibiyotiklerle sinerjistik etki ve düşük maliyet gibi avantajlarına rağmen yan etkileri ve özellikle yüksek nefrotoksisite insidansı nedeniyle klinik kullanımları sınırlanmaktadır. Bu yüzden aminoglikozid antibiyotikler üzerinden nefrotoksisite modeli geliştirilerek çok sayıda tedavi edici ajan denenmiştir³⁵⁻⁴⁸. Biz bu deneysel çalışmada gentamisin nefrotoksisitesine TRP kanal modülatörü 2-APB koruyucu etkisini araştırmayı planladık. Çalışmamızda gentamisine bağlı hasar ve 2-APB'nin koruyucu etkilerinin ortaya koyulması amacıyla böbrek fonksiyonları ve oksidatif hasar için BUN, kreatinin, SOD ve MDA'nın biyokimyasal ölçümleri yapılırken, apoptoz ve inflamasyon kaspaz 3, TNF- α ve IL-6 ekspresyonları ile immünohistokimyasal olarak, histopatolojik değişiklikler ise ışık ve elektron mikroskopik olarak değerlendirildi.

Çalışmamızda tüm gruplara ait deneklerin deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlık ölçümleri yapıldı. Buna göre, kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarında deney öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarının arttığı ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Gentamisin grubunda vücut ağırlığı kontrol, DMSO, 2-APB gruplarına göre anlamlı olarak azalırken; Gentamisin+ 2-APB grubunda ise Gentamisin grubu ile karşılaştırıldığında deneklerin vücut ağırlıklarındaki azalmada belirgin bir düşüş olduğu görüldü. Daha önce yapılan çalışmalarda bu kilo kaybının en muhtemel nedeni; Erdem ve ark. tarafından akut böbrek yetmezliğinde görülen artan katabolizma sonucunda gelişen asidoz ve anoreksi olarak rapor edilirken⁴⁰, başka bir çalışmada tübüler hasar sonucu su reabsorbsiyonunda azalma ve dehidratasyona³⁵, bir diğer çalışmada ise iştah ve yiyecek tüketiminin azalmasına bağlı olduğu kaydedilmiştir²³⁹.

Aminoglikozid nefrotoksisitesinin klinik bulguları: nonoligürik veya hatta poliürik renal atılım bozukluğuna^{43, 162-164} eşlik eden plazma kreatinin, üre ve diğer metabolik artıkların artışı, proteinüri, enzimüri, aminoasidüri, glukozüri ve elektrolit değişimi (hiperkalsiüri, hipermagnezüri, hipokalsemi, hipomagnezemi)^{165, 163}dir. İdrar volümünde değişim meydana gelmediği için nefrotoksisite sıklıkla serum kreatininde artışla değerlendirilir¹⁶⁶. Çalışmamızda, kan üre azotu (BUN) ve kreatinin böbrek

fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan biyokimyasal parametreler olmuştur. BUN seviyesinde artış genellikle glomerüler filtrasyon hızındaki (GFR) azalma nedeniyledir. Gentamisin nedeni glomeruler filtrasyon hızındaki azalma, Gentamisinin belirgin şekilde hem hücre dışı kaynaklardan Ca^{+2} girişini hem de hücre içi kaynaklardan Ca^{+2} salınımına neden olarak intraselüler Ca^{+2} 'u artırmasına, artan sitoplazmik kalsiyum nedeniyle mezengial hücrelerde kontraksiyon ve proliferasyon meydana getirilmesine yorulmuştur²⁴⁰. Bizim çalışmamızda da kontrol, DMSO ve 2-APB gruplarında üre ve kreatinin düzeyleri normal değerlerde seyrederken, Gentamisin verilen grupta anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı. Gentamisin+ 2-APB verilen grupta ise bu değerler istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdi ancak kontrol, DMSO ve 2-APB seviyesine inmedi. Çalışmamızla uyumlu olarak Yıldar ve ark. böbrek iskemi reperfüzyon çalışmasında 2-APB uygulaması ile iskemi reperfüzyonda artan kreatinin değerinde anlamlı düşüş olduğunu göstermişlerdir³⁴. Bir diğer çalışmada pankreatite bağlı böbrek hasarında 2-APB ile tedavi sonucunda kreatininde anlamlı düşüş gözlenmiştir²⁴¹.

Çalışmamızda böbrek hasarı ayrıca morfolojik olarak ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelendi. Gentamisinin glomerül morfolojisinde ciddi değişime neden olmadığı düşüncesinin aksine, yüksek doz tedavide; glomerül boyutunda artış olduğu, şekil ve dansitesinde bozulma nedeniyle filtrasyon bariyerinin bozulduğu, nötrofil infiltrasyonu ile filtrasyon bariyerinin genişlediği gösterilmiştir¹⁷⁷. Bunlarla uyumlu olarak çalışmamızda da Gentamisin grubunda glomerülerin bazılarının normal şeklini kaybettiği ve dejenere olduğu gözlenmiş (Şekil 11), Ashraf ve ark. çalışmasıyla²⁴² uyumlu olarak elektron mikroskopik kesitlerde bazı alanlarda glomerül bazal membranında yer yer kalınlaşmalar (Şekil 37) görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, gentamisinin medullar alandan ziyade kortikal alanı etkilediği²⁴³ ve hasarın deney hayvanları⁷ ve insanlarda⁸ esas olarak proksimal tübül olmak üzere, distal ve toplayıcı tübülde⁹ olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da hasarın en fazla dış kortekste olduğu görülmektedir (Şekil 9).

Çalışmamızda histolojik olarak en belirgin bulgu disfonksiyonun esas nedeni olarak gösterilen tübüler nekrozdu (Şekil 9,12). Aminoglikozid kullanımında nekroz gelişim mekanizmasında 3 hipotez öne sürülmüştür¹⁶³. Bunlardan ilki aminoglikozidlerin toksisiteye lokal konsantrasyonları ile orantılı olarak neden

olduğudur. İlacın büyük kısmı lizozomda biriktiği için lizozomlar burada kilit rol üstlenmektedir. Ancak bu görüşte lizozom değişimleri ve hücre nekrozu arasında ilişki tam olarak kurulamamıştır. İkinci hipotez aminoglikozidlerin lizozomdan salınıncı toksik olduğunu öne sürmektedir. Burada salınının muhtemelen eşik değere ulaşıncı veya lizozomlarda yapısal değişim olunca gerçekleşeceği ve hücre ölümünü tetikleyen metabolik değişimlere yol açacağı kaydedilmiştir. Ancak salınımına bağlı direk toksik etkilerin mi yoksa mitokondrial solunum, lipid peroksidasyonu vs. gibi ikincil etkilerin mi hasara neden olduğu ortaya konulmamıştır. Bununla birlikte lizozomdan salınan aminoglikozidlerin direk nefrotoksin gibi davrandığı, mitokondrial demirle şelat oluşturup hücre ölümüne neden olan oksidatif Fe(II)-gentamisin kompleksi oluşturduğu gösterilmiştir²⁴⁴. Son olarak üçüncü hipotezse lizozomda biriken ilacın ilacın toksik olmadığı, endositotik alımda lizozom dışı hedeflere giden ilacın toksik olduğu yönündedir. Bu hipotezde ilacın girişinde apikal ve bazolateral membranlar en muhtemel yollar olarak görülmektedir çünkü (hücre dışı sıvılardan) kolayca erişilebilirler ve seviyelerindeki değişimler birçok potansiyel etkiye neden olabilir. Aminoglikozidlerin non lizozomal lokasyonu ile erken toksisitenin başlangıcı arasındaki bağlantı hücre fraksiyon²⁴⁵, otoradyografik²⁴⁶ ve hücre kültür²⁴⁷ çalışmalarına rağmen belirsizliğini korumaktadır. Hipotezler varlığını korumakla birlikte aminoglikozidlerin akut tübüler nekroz (ATN) oluşturduğuna dair benzer görüntülerin olduğu çok sayıda çalışma bulunmaktadır^{38, 40, 248}.

Çalışmamızda ayrıca diğer çalışmalarda gösterildiği gibi tübüllerde dilatasyon^{243, 249, 47} gözlenmiş, bazı dilate tübüllerin dejenere, deskuame²⁴¹ hücrelerle dolu olduğu görülmüştür. Yine tübül epitelinde bazı hücreler şeklini kaybederek yassılaşmıştır. Tübül epitel hücresinde görülen bir diğer değişimse sitoplazmada köpüksü görünüme neden olan ve çalışmalarda vakuolizasyon olarak adlandırılan yapılardır^{243, 40, 47, 241} ki Kohn ve ark bu oluşumların dilate ve hasarlı organellerce oluştuğunu öne sürmüştür²⁵⁰ (Şekil 10, 11).

Gentamisin grubunda böbrekte görülen bir diğer yapı ise Gentamisin nefrotoksitesisi oluşturulmuş diğer çalışmalarda da gösterilen eozinofilik birikimler^{243, 47} olan hyalin kastlardır (Şekil 10). Çalışmamızda hem kortikal hem de medullar alanlarda hyalin kastlara rastlanmıştır. Çalışmalarda bu yapıların genellikle distal ve toplayıcı tübüllerde görüldüğü²⁵¹, içeriğinin ana komponentinden birinin Tamm-

Horsfall proteini olduğu bildirilmiştir²⁵². Monomer halindeki Tamm-Horsfall'in lümeni obstrükte edici jel benzeri polimere dönüşümü, akut böbrek hasarında artmış luminal sodyum konsantrasyonuna bağlanmıştır²⁵³.

Ultrastrüktürel çalışmalarda erken dönem ve düşük doz tedavide; lizozom harici yapıların korunduğu ancak var olan lizozomların füzyonu ve polar lipidlerin progresif birikimi ile konsantrik lamellar yapı kazanması sonucu lizozomal genişleme olduğu bildirilmiştir. Uzun süreli veya yüksek doz tedavide ise lizozomların rüptürü (sitozole myeloid cisim salınımı), ileri derece mitokondrial genişleme ve hasar, ER sisternalarında genişleme, fırçamsı kenar oluşturan mikrovillusların dökülmesi, kesintili periselüler membran ve apoptotik nükleus görünümünün olduğu rapor edilmiştir^{16, 245, 171, 139, 254, 255, 172}.

Çalışmamızda, kaydedilen elektron mikroskopik olarak bulgularla uyumlu olarak tübül hücrelerinin apikal mikrovilluslarında kayıp, genişlemiş ve krista yapılarını kaybetmiş mitokondrionlar⁴⁷ mevcuttu (Şekil 41,45). Bunlara ek olarak hücreler arası mesafenin genişlediği, ATP yokluğu nedeniyle apikal aktin sitoskelet yapısının bozulması sonucu geliştiği söylenen²⁵⁶ sitoplazmada blebleşme (Şekil 41) görüldü.

Çalışmalarda, Gentamisin'in düşük dozda (10-20 mg/kg) hayvanlarda proksimal tübül hücresi lizozomlarında polar lipid birikimine (*myeloid cisim*) neden olduğu^{170, 15, 171, 172}, yüksek dozda (40 mg/kg) ise hayvanlarda hızlıca kortikal nekroz oluşturup disfonksiyona yol açtığı^{171, 173} gösterilmiştir. Çalışmamızda da özellikle proksimal tübüllerde belirgin olmak üzere lizozomların genişlediği ve sayıca arttığı, hücre içinde fosfolipid içeren dens lamellar ve konsantrik yapılar olarak tanımlanan²⁵⁰ myeloid cisimciklerin bulunduğu dikkati çekmekteydi (Şekil 43). Aminoglikozidlerin katyonik olduğu için membrandaki negatif yüklü fosfolipidlere bağlanarak fosfolipidoza neden olduğu, lizozomun asidik pH'sının da bu olayda kolaylaştırıcı rolünün olduğu ileri sürülmektedir. İn vitro çalışmalarda lizozomal fosfolipazların aktivitesi için negatif yük gerektiği, aminoglikozidlerin lizozomun çift tabakalı fosfolipid membranına bağlanmasının fosfolipaz aktivitesini azaltarak fosfolipidoza dolayısıyla myeloid cisim oluşumuna neden olduğu söylenmektedir²⁵⁷.

Gentamisin nefrotoksitesinde inflamasyon anahtar rolü üstlenmektedir. İnflamasyon birçok mekanizma üzerinden meydana gelmektedir. Bunlardan birisi Gentamisin uygulaması sonucu gelişen oksidatif stresin transkripsiyon faktörü NF-

κB 'yi stimüle etmesidir. Stimülasyonun sonucu olarak NF- κB , kompleksten (NF- κB -I κB) ayrılır; nükleusa transloke olur ve IL-6, iNOS, TNF- α , COX-2 gibi hedef genlerin^{29, 30} transkripsiyonel aktivasyonunu başlatır³⁰. Ek olarak Gentamisin direkt NF- κB inhibitörü (I κB - α) protein seviyesinde azalmaya neden olup sitoplazmik NF- κB ekspresyonu ve nükleer NF- κB -DNA bağlanma yeteneğinde artış meydana getirebilir, bunun sonucu olarak da yine inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 sentezi stimüle olur³⁷. Ayrıca Gentamisin, makrofaj infiltrasyonuna ve makrofaj, mezangial ve epitelyal hücreler tarafından üretilen TNF- α seviyesinde artışa neden olmakta²⁵⁸, yine stimüle olan makrofajlar, immün ve inflamatuvar süreçlerde rol alan IL-6 sekrete etmektedir. Yani gentamisin hem oksidatif stres üzerinden hem de ilaca bağlı infiltre olan hücreler üzerinden proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 sentezini stimüle etmektedir. Sonuç olarak da sitokinler nedeniyle hücre infiltrasyonu tetiklenerek hücrelerden salınan sitokinlerle inflamasyon kısır bir döngü halinde şiddetlenmektedir. Gentamisin nefrotoksisitesi oluşturulan modellerde, daha çok kortekste olmak üzere medullada da yerleşim gösteren⁴⁷, özellikle interstisyel alanlarda belirgin olan orta derecede lökosit infiltrasyonu rapor edilmiştir⁴⁸. Çalışmamızda da bu bulgularla uyumlu olarak Gentamisin grubunda hem ışık hem elektron mikroskopik olarak interstisyel alanlarda hücre infiltrasyonu ve ödem gözlemlendi. Yine sunulan çalışmada immünohistokimyasal olarak TNF- α ekspresyonunun Gentamisin grubunda en yüksek seviyede olduğu ve ekspresyonun da dejenerasyonun en fazla olduğu alanlarda tübül hücrelerinde en fazla olmak üzere mezangial hücrelerde de olduğu izlenmiştir. Ayrıca tübül ve glomerüllerde gözlenen immünohistokimyasal IL-6 ekspresyonunun Gentamisin grubunda kontrol, DMSO ve 2-APB grubuna göre anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi. Gentamisin+ 2-APB uygulanan grupta ise ekspresyonda anlamlı olarak düşüş saptanmış olup bunun 2-APB'nin antiinflamatuvar etkisine bağlı olarak meydana geldiği düşünüldü. Glutasyon (GSH), serbest oksijen radikallerine bağlı hasarda hem çeşitli enzimlere indirgen ekivalan sağlayarak hem de hidroksil ve tekli oksijenin temizliği ile koruyucu rol üstlenir²⁵⁹. Çalışmalarda aminoglikozid kullanımında GSH seviyesinin azalmış olduğu^{260, 259}, glutasyon yetersizliğine bağlı oksidatif stresin TRPM2 kanalını aktive ettiği gösterilmiştir²⁶¹. Lee ve ark. mikroglial hücrede glutasyon yokluğundan kaynaklanan oksidatif stresin TRPM2 kanallarını aktive ederek, TRPM2 aracılı kalsiyum girişi ile MAPK ve NF- κB sinyal yolları üzerinden TNF- α ve IL-6

üretimine neden olduğunu öne sürmüştür²⁶². TRP melastin (TRPM2) non-selektif katyon kanalıdır, sitoplazma ve intraselüler organellerde, böbrekte ise özellikle proksimal tübülde eksprese olmaktadır²¹⁶. TRPM2 kanalını inhibe eden maddelerden birisi de 2-APB'dir. Çalışmamızda Gentamisin+ 2-APB grubunda Gentamisinle artan TNF- α ve IL-6 ekspresyonunda düşüş gözlenmesi TRPM2 kanalı üzerinden inflamasyonun tetikleneceği yolun 2-APB tarafından engellenmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda Gentamisin endositozunun, varlığı proksimal tübülle sınırlı olan megalin ve cubulin tarafından oluşturulan büyük endositotik kompleks olarak adlandırılan taşıyıcılar ile gerçekleştiği gösterilmiştir¹². İlaçlar endositotik kompartmanlardan sonra lizozom başta olmak üzere, Golgi ve endoplazmik retikulumda birikir^{13, 14}. Endozom içinde aşırı miktarda aminoglikozid biriktiğinde, membran bütünlüğü bozulur ve ilaç sitoplazmaya dağılır^{18, 19}. Sitozolik Gentamisin, kaspaz aktivasyonuna neden olarak apoptotik sinyalizasyonu tetikler. Bu sinyalizasyon direkt olarak (Bax aktivasyonunu takiben ER'den IP₃ (inozitol trifosfat) reseptörü aracılı Ca⁺² salınımı sonucu mitokondriden sitokrom c salınımı ve kaspaz 3 aktivasyonu²⁰) olabileceği gibi indirekt (proteazomal yıkımın inhibisyonu ile ubiquitinlenmiş Bax artışı²¹) de olabilmektedir. Ayrıca aminoglikozidler reaktif oksijen radikalleri üzerinden de apoptotik sürece katılabilir²². Gentamisin nedenli oluşan ROS, endoplazmik retikulumda (ER) protein sentezini inhibe edip translasyonu ve posttranslasyonel modifikasyonu²³ bozarak ER stresi meydana getirip ve ER'den kalsiyum salınımı²⁴ sonucu kaspaz 12 ve kalpain²⁵ aracılı apoptozu tetikleyebilmektedir. İntraselüler kalsiyum artışının, kalpain aktivasyonuna neden olduğu, kalpainin de kaspaz 3 modülasyonu ile apoptozu tetiklediğini gösterilmiş²⁶, HeLa-S3 hücre hattında 2-APB ile sisplatinin indüklediği Ca⁺² girişinin azaltılarak kalpain aktivasyonunu ve apoptoz indüksiyonunun engellenebileceği öne sürülmüştür²⁷. Hücre membranı Ca⁺² kanalı (TRPM2 gibi) ile intraselüler Ca⁺² kanalının artmış aktivasyonu sitoplazmik Ca⁺² konsantrasyonu artışına neden olur²⁶³. Bu durum da mitokondride aşırı Ca⁺² yüklenmesine neden olarak mitokondrial membran depolarizasyonu, ROS birikimi, ATP azalması ile mitokondrial apoptozu aktive eder²⁶⁴. Önceki çalışmalarda apoptoz, kaspaz 3, kaspaz 9, Poli-ADP-riboz Polimeraz 1 (PARP-1), Matriks metalloproteinaz (MMP) ve intraselüler ROS'un; TRPM2 blokerleri (ACA ve 2-APB) ile tedavi sonrası

azaldığı, viabilite ve antioksidan seviyelerin arttığı gösterilmiştir²⁶⁵⁻²⁶⁹. Kalsiyumun apoptoz üzerinde düzenleyici etkisi çalışmamızda 2-APB'nin tercih nedenlerinden birisi olmuştur. Çalışmamızda da immünohistokimyasal olarak kaspaz 3 ekspresyonu ile Gentamisin glomerül ve tübüllerde apoptoza yol açtığı, kaspaz 3 ekspresyonunun dolayısıyla apoptozun 2-APB tedavisi ile azaltıldığı gösterilmiştir. Bu etki elektron mikroskopik olarak da gentamisin grubunda tübül hücrelerinin çekirdeklerinde periferik yerleşimli dense kromatin ve nükleer fragmentasyonların gösterilmesi ile desteklenmiştir (Şekil 39,40). Gentamisin+2-APB grubunda kaspaz 3 ekspresyonu Gentamisin grubuna göre azalmış, elektron mikroskopik olarak da apoptotik değişimler gözlenmemiştir. Tüm bu bilgiler ışığında 2-APB'nin muhtemelen hem IP3 kanal blokajı ile endoplazmik retikulumdan mitokondriona kalsiyum geçişini engelleyip apoptozun intrinsik yolağını ve kalpain aktivasyonunu engelleyerek hem de Gentamisin nefrotoksisitesinde artan intraselüler kalsiyumu SOCE inhibisyonu ile azaltarak antiapoptotik etki gösterdiği düşünülmüştür.

Canlıda serbest radikaller elektron alıcı moleküller olarak, serbest radikallerin aktif oksijen türevleri de oksidan olarak tanımlanır²⁷⁰. Oksidanların hücre hasarı oluşturmada hedef moleküllerden elektron alabilmesi anahtar rolü oynar, böylece molekülün yapısını ve fonksiyonlarını değiştirerek hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik materyali ve değişik enzimatik reaksiyonları etkileyebilmektedirler. Biyomembranlar ve hücre içi organeller, membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidan saldırısına duyarlıdır. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğini ve enzim aktivitesini değiştirebilir veya DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik olabilir²⁷¹. Çalışmalarda gentamisin nefrotoksisitesinde MDA'da belirgin artış olduğu gözlenmiştir^{272, 42}. Yıldar ve ark. oluşturduğu iskemi reperfüzyona bağlı böbrek hasar modelinde artan MDA düzeylerinin 2-APB ile azaldığını göstermiştir³⁴. Bizim çalışmamızda da Gentamisin verilmesiyle MDA'nın anlamlı şekilde arttığı dolayısıyla nefrotoksisitede lipid peroksidasyonunun etkin olduğu görüldü. Gentamisin+ 2-APB verilen grupta ise MDA'da anlamlı düşüşün gözlenmesi 2-APB'nin antioksidan etkisini göstermiştir.

Reaktif oksijen radikallerine karşı defans sisteminde rol alan enzimlerden biri süperoksit dismutaz(SOD)dir. Yapılan bir çalışmada 8 günlük (günde 100 mg/kg) gentamisin tedavisinden sonra SOD aktivitesinin %39 azaldığı gösterilmiştir²⁷³. Ancak başka bir çalışmada da 4 gün subkutan 100 mg/kg Gentamisin uygulanan sıçanlarda SOD aktivitesinde değişim gözlenmediği söylenmiştir²⁶⁰. Yine bir başka çalışmada böbrek dokusu SOD aktivitesinin gentamisinle azalmış olduğu söylenmektedir²⁷⁴. Ali ve ark. ise süperoksit dismutaz tedavisinin gentamisin nefrotoksisitesine olan iyileştirici etkilerini göstermiştir³⁶. Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar görülmekle beraber çalışmamızda Gentamisinle SOD aktivitesinde anlamlı düşüş ; Gentamisin+ 2-APB verilen grupta ise anlamlı artış olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, 2-APB'nin; Gentamisinin oluşuracağı böbrek hasarını önlemede, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstererek hasarın önüne geçebileceği kanısına varıldı.

6. SONUÇLAR

Gentamisin verilerek oluşturulan böbrek hasarına karşı 2-APB'nin koruyucu etkisinin mikroskopik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelendiği bu çalışma sonucunda;

- 1 Kontrol, DMSO ve 2-APB grubundaki deneklerin ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde böbrek glomerül ve tübül yapısının normal histolojik yapıya sahip oldukları gözlemlendi.
- 2 Aynı grupların immünohistokimyasal değerlendirilmesinde, TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 ekspresyonunun minimal seviyede olduğu,
- 3 Yine aynı grupların BUN, kreatinin, SOD ve MDA değerlerinin normale yakın olduğu,
- 4 Gentamisin verilen grupta, böbrek dokusunda tübüler alanlar başta olmak üzere, interstisyel alan ve renal cisimciklerde histolojik değişikliklerin meydana geldiği,
- 5 Bu değişimlerin ışık mikroskopik olarak; glomerüller dejenerasyon, tübüler genişleme, hücre vakuolizasyonu, tübül lümenine hücre deskuamasyonu ve hyalin kast birikimi, lökositik infiltrasyon şeklinde; elektron mikroskopik olarak glomerül bazal membranında yer yer kalınlaşma, tübül hücrelerinde mikrovillus yapısında düzensizleşme, apikal sitoplazmada blebleşme, lipid birikimi, myeloid cisimcik, lizozom sayısında artış, mitokondrionlarda şişme ve krista yapısının bozulması, apoptotik değişimler ve hücreler arası mesafenin genişlemesi şeklinde olduğu,
- 6 Aynı grupta, immünohistokimyasal olarak TNF- α , IL-6 ve kaspaz 3 ekspresyonlarının arttığı,
- 7 Yine Gentamisin grubunda BUN, kreatinin, MDA değerlerinin arttığı; SOD'un azaldığı
- 8 Gentamisin+ 2-APB grubunda ise, böbrekte gözlenen histopatolojik değişikliklerin, TNF- α , IL-6, kaspaz 3 immünreaktivitesinin ve BUN, kreatinin, MDA değerlerinin belirgin olarak azaldığı; SOD'un arttığı görüldü.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, Gentamisinle beraber verilen 2-APB'nin; Gentamisinin oluşuracağı böbrek hasarını önlemede, antioksidan, antiapoptotik, antiinflamatuvar etki göstererek hasarın önüne geçebileceği kanısına varıldı.



KAYNAKLAR

1. **Kumana CR, Yuen KY.** Parenteral aminoglycoside therapy. *Drugs.* **1994**;47(6):902-913.
2. **D.N. G.** Aminoglycosides. Mandell, Douglas, and Bennett's PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES, **2005**, p. 328.
3. **Kummana C, Yuen K.** Parenteral aminoglycoside therapy. Selection, administration and monitoring. *Drugs.* **1994**;47:902-913.
4. **Wargo KA, Edwards JD.** Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Journal of pharmacy practice.* **2014**;27(6):573-577.
5. **Edson RS, Terrell CL.** The Aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceedings.* **1999**;74(5):519-528.
6. **Schentag JJ, Plaut ME, Cerra FB.** Comparative nephrotoxicity of gentamicin and tobramycin: pharmacokinetic and clinical studies in 201 patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **1981**;19(5):859-866.
7. **Pattyn V, Verpooten G, Giuliano R, Zheng F, De Broe M.** Effect of hyperfiltration, proteinuria and diabetes mellitus on the uptake kinetics of gentamicin in the kidney cortex of rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **1988**;244(2):694-698.
8. **Verpooten GA, Giuliano RA, Verbist L, Eestermans G, De Broe ME.** Once-daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* **1989**;45(1):22-27.
9. **Fujiwara K, Shin M, Matsunaga H, Saita T, Larsson L-I.** Light-microscopic immunocytochemistry for gentamicin and its use for studying uptake of the drug in kidney. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **2009**;53(8):3302-3307.
10. **Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K.** 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1, 4, 5) P₃-induced Ca²⁺ release. *The Journal of Biochemistry.* **1997**;122(3):498-505.
11. **Bilmen JG, Wootton LL, Godfrey RE, Smart OS, Michelangeli F.** Inhibition of SERCA Ca²⁺ pumps by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) 2-APB reduces both Ca²⁺ binding and phosphoryl transfer from ATP, by interfering with the pathway leading to the Ca²⁺-binding sites. *European journal of biochemistry.* **2002**;269(15):3678-3687.
12. **Schmitz C, Hilpert J, Jacobsen C, Boensch C, Christensen EI, Luft FC, et al.** Megalin deficiency offers protection from renal aminoglycoside accumulation. *Journal of Biological Chemistry.* **2002**;277(1):618-622.
13. **Silverblatt F.** Pathogenesis of nephrotoxicity of cephalosporins and aminoglycosides: a review of current concepts. *Reviews of infectious diseases.* **1982**;4(Supplement_2):S360-S365.
14. **Silverblatt FJ, Kuehn C.** Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney international.* **1979**;15(4):335-345.
15. **De Broe ME, Paulus GJ, Verpooten GA, Roels F, Buysens N, Wedeen R, et al.** Early effects of gentamicin, tobramycin, and amikacin on the human kidney. *Kidney international.* **1984**;25(4):643-652.

16. **Giuliano RA, Paulus GJ, Verpooten GA, Pattyn VM, Pollet DE, Nouwen EJ, et al.** Recovery of cortical phospholipidosis and necrosis after acute gentamicin loading in rats. *Kidney international*. **1984**;26(6):838-847.
17. **Nonclercq D, Wrona S, Toubeau G, Zanen J, Heuson-Stiennon J-A, Schaudies RP, et al.** Tubular injury and regeneration in the rat kidney following acute exposure to gentamicin: a time-course study. *Renal failure*. **1992**;14(4):507-521.
18. **Ngaha EO, Ogunleye IO.** Studies on gentamicin-induced labilization of rat kidney lysosomes in vitro: Possible protection by selenium. *Biochemical pharmacology*. **1983**;32(18):2659-2664.
19. **Regec AL, Trump BF, Trifilis AL.** Effect of gentamicin on the lysosomal system of cultured human proximal tubular cells: Endocytotic activity, lysosomal pH and membrane fragility. *Biochemical pharmacology*. **1989**;38(15):2527-2534.
20. **Servais H, Van Der Smissen P, Thirion G, Van der Essen G, Van Bambeke F, Tulkens PM, et al.** Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. *Toxicology and applied pharmacology*. **2005**;206(3):321-333.
21. **Servais H, Jossin Y, Van Bambeke F, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq M-P.** Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **2006**;50(4):1213-1221.
22. **Servais H, Ortiz A, Devuyst O, Denamur S, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq M-P.** Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. *Apoptosis*. **2008**;13(1):11-32.
23. **Horibe T, Matsui H, Tanaka M, Nagai H, Yamaguchi Y, Kato K, et al.** Gentamicin binds to the lectin site of calreticulin and inhibits its chaperone activity. *Biochemical and biophysical research communications*. **2004**;323(1):281-287.
24. **Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, López-Novoa JM, López-Hernández FJ.** An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. *Toxicological Sciences*. **2010**;119(2):245-256.
25. **Peyrou M, Hanna PE, Cribb AE.** Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys. *Toxicological sciences*. **2007**;99(1):346-353.
26. **Sharma AK, Rohrer B.** Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line. *Journal of Biological Chemistry*. **2004**;279(34):35564-35572.
27. **Splettstoesser F, Florea AM, Büsselberg D.** IP3 receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca²⁺-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis. *British journal of pharmacology*. **2007**;151(8):1176-1186.
28. **Mukherjee S, Brooks WH.** Stromal interaction molecules as important therapeutic targets in diseases with dysregulated calcium flux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. **2014**;1843(10):2307-2314.
29. **Amigó M, Payá M, Braza-Boils A, De Rosa S, Terencio MC.** Avarol inhibits TNF- α generation and NF- κ B activation in human cells and in animal models. *Life sciences*. **2008**;82(5-6):256-264.
30. **Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willoughby DA.** Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nature medicine*. **2001**;7(12):1291.
31. **Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JJ.** Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*. **1997**;386(6627):855.

32. **Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS.** Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*. **1998**;392(6679):933.
33. **Gao G, Wang W, Tadagavadi RK, Briley NE, Love MI, Miller BA, et al.** TRPM2 mediates ischemic kidney injury and oxidant stress through RAC1. *The Journal of clinical investigation*. **2014**;124(11):4989-5001.
34. **Yildar M, Aksit H, Korkut O, Ozyigit MO, Sunay B, Seyrek K.** Protective effect of 2-aminoethyl diphenylborinate on acute ischemia–reperfusion injury in the rat kidney. *Journal of surgical research*. **2014**;187(2):683-689.
35. **Ali B, Al-Wabel N, Mahmoud O, Mousa H, Hashad M.** Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundamental & clinical pharmacology*. **2005**;19(4):473-477.
36. **Ali B, Bashir A.** Effect of superoxide dismutase treatment on gentamicin nephrotoxicity in rats. *General Pharmacology: The Vascular System*. **1996**;27(2):349-353.
37. **Ansari MA, Raish M, Ahmad A, Ahmad SF, Mudassar S, Mohsin K, et al.** Sinapic acid mitigates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated oxidative/nitrosative stress, apoptosis, and inflammation in rats. *Life sciences*. **2016**;165:1-8.
38. **Ayşe Erdem NÜG, Alp Usubütün.** The antioxidant action of N-acetylcysteine on gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Gazi Med*. **1999**;10:21-28.
39. **dos Santos OFP, Boim MA, Barros EJ, Schor N.** Role of platelet activating factor in gentamicin and cisplatin nephrotoxicity. *Kidney international*. **1991**;40(4):742-747.
40. **Erdem A, Gündogan NÜ, Usubütün A, Kılınc K, Erdem ŞR, Kara A, et al.** The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **2000**;15(8):1175-1182.
41. **Ernest S.** Model of gentamicin-induced nephrotoxicity and its amelioration by calcium and thyroxine. *Medical hypotheses*. **1989**;30(3):195-202.
42. **Karahan İ, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı A, Sakin F.** Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. *Toxicology*. **2005**;215(3):198-204.
43. **Kays SE, Crowell WA, Johnson MA.** Iron supplementation increases gentamicin nephrotoxicity in rats. *The Journal of nutrition*. **1991**;121(11):1869-1875.
44. **Morales AI, Buitrago JM, Santiago JM, Fernández-Tagarro M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F.** Protective effect of trans-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Antioxidants and Redox Signaling*. **2002**;4(6):893-898.
45. **Morales AI, Detaille D, Prieto M, Puente A, Briones E, Arévalo M, et al.** Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway. *Kidney international*. **2010**;77(10):861-869.
46. **Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, et al.** S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clinical Pharmacology*. **2004**;4(1):5.
47. **Soliman KM, Abdul-Hamid M, Othman AI.** Effect of carnosine on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Medical science monitor*. **2007**;13(3):BR73-BR83.

48. **Yarijani ZM, Najafi H, Madani SH.** Protective effect of crocin on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian journal of basic medical sciences.* **2016**;19(3):337.
49. **Altunören O, Aydın G, Güngör Ö.** Böbrek Fizyopatolojisi. **2017.** p. 1.
50. **Ders AÜA.**
51. **Pawlina W.** Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas 6ed., Palme Yayıncılık, **2014.**
52. **Leslie P. Gartner JLH.** Color Atlas and Text of Histology. **2012.**
53. **Tang R, Han Y, Wu M, DongdongZhu, Liu B.** The Effects of Endothelial Injury in Renal Fibrosis Progression. *Austin Journal of Nephrology and Hypertension.* **2014**;1(5).
54. **Luksha L, Stenvinkel P, Hammarqvist F, Carrero JJ, Davidge ST, Kublickiene K.** Mechanisms of endothelial dysfunction in resistance arteries from patients with end-stage renal disease. *PloS one.* **2012**;7(4):e36056.
55. **Drenckhahn D, Franke R.** Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* **1988**;59(5):673-682.
56. **Adler S.** Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *The American journal of pathology.* **1992**;141(3):571.
57. **Raats CI, van den Born J, Bakker MA, Oppers-Walgreen B, Pisa BJ, Dijkman HB, et al.** Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *The American journal of pathology.* **2000**;156(5):1749-1765.
58. **Regele HM, Fillipovic E, LANGER B, POCZEWKI H, KRAXBERGER I, BITTNER RE, et al.** Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology.* **2000**;11(3):403-412.
59. **Mundel P, Shankland SJ.** Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology.* **2002**;13(12):3005-3015.
60. **Stanton BA, Koeppen BM.** Elements of Renal Function, 6 ed., Elsevier, **2008.**
61. **Rostgaard J, Qvortrup K.** Electron microscopic demonstrations of filamentous molecular sieve plugs in capillary fenestrae. *Microvascular research.* **1997**;53(1):1-13.
62. **Rabelink TJ, De Zeeuw D.** The glycocalyx—linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nature reviews nephrology.* **2015**;11(11):667.
63. **Schlondorff D.** Roles of the Mesangium in Glomerular Function. *Kidney International.* **1996**;49:1583-1585.
64. **Abboud HE.** Mesangial cell biology. *Experimental cell research.* **2012**;318(9):979-985.
65. **Cangiotti AM, Lorenzi T, Zingaretti MC, Fabri M, Morroni M.** Polarized Ends of Human Macula Densa Cells: Ultrastructural Investigation and Morphofunctional Correlations. *The Anatomical Record.* **2018**;301(5):922-931.
66. **Jameson L, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J.** Harrison's Principles of Internal Medicine. **2013.**
67. **Kriz W, Kaissling B.** Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology. **2013.**

68. **Madsen KM, Tisher C.** Brenner and Rector's The Kidney. *The Nephron*. **2004**.
69. **Jacobson HR, Kokko J.** Intrinsic differences in various segments of the proximal convoluted tubule. *The Journal of clinical investigation*. **1976**;57(4):818-825.
70. **Zhuo JL, Li XC.** Proximal nephron. *Comprehensive Physiology*. **2013**;3(3):1079-1123.
71. **Imai M, Yoshitomi K.** Heterogeneity of the descending thin limb of Henle's loop. *Kidney international*. **1990**;38(4):687-694.
72. **Sands JM, Kokko JP.** Current concepts of the countercurrent multiplication system. *Kidney International Supplement*. **1996** (57).
73. **Maeda Y, Smith BL, Agre P, Knepper MA.** Quantification of Aquaporin-CHIP water channel protein in microdissected renal tubules by fluorescence-based ELISA. *The Journal of clinical investigation*. **1995**;95(1):422-428.
74. **Nielsen S, Agre P.** The aquaporin family of water channels in kidney. *Kidney international*. **1995**;48(4):1057-1068.
75. **Nielsen S, Pallone T, Smith BL, Christensen EI, Agre P, Maunsbach AB.** Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin limbs and in descending vasa recta in rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1995**;268(6):F1023-F1037.
76. **Shayakul C, Knepper M, Smith C, DiGiovanni S, Hediger M.** Segmental localization of urea transporter mRNAs in rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1997**;272(5):F654-F660.
77. **Uchida S, Sasaki S, Furukawa T, Hiraoka M, Imai T, Hirata Y, et al.** Molecular cloning of a chloride channel that is regulated by dehydration and expressed predominantly in kidney medulla. *Journal of Biological Chemistry*. **1993**;268(6):3821-3824.
78. **Uchida S, Sasaki S, Nitta K, Uchida K, Horita S, Nihei H, et al.** Localization and functional characterization of rat kidney-specific chloride channel, ClC-K1. *The Journal of clinical investigation*. **1995**;95(1):104-113.
79. **Vandewalle A, Cluzeaud F, Bens M, Kieferle S, Steinmeyer K, Jentsch T.** Localization and induction by dehydration of ClC-K chloride channels in the rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1997**;272(5):F678-F688.
80. **Nielsen S, Maunsbach AB, Ecelbarger CA, Knepper MA.** Ultrastructural localization of Na-K-2Cl cotransporter in thick ascending limb and macula densa of rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1998**;275(6):F885-F893.
81. **Tsuruoka S, Koseki C, Muto S, Tabei K, Imai M.** Axial heterogeneity of potassium transport across hamster thick ascending limb of Henle's loop. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1994**;267(1):F121-F129.
82. **Yoshitomi K, Kondo Y, Imai M.** Evidence for conductive Cl-pathways across the cell membranes of the thin ascending limb of Henle's loop. *The Journal of clinical investigation*. **1988**;82(3):866-871.
83. **Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al.** Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. **1987**;237(4812):268-275.

84. **Bostanjoglo M, Reeves WB, Reilly RF, Velázquez H, Robertson N, Litwack G, et al.** 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase, mineralocorticoid receptor, and thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter expression by distal tubules. *Journal of the American Society of Nephrology*. **1998**;9(8):1347-1358.
85. **Meneton P, Loffing J, Warnock DG.** Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **2004**;287(4):F593-F601.
86. **Dörup J.** Ultrastructure of distal nephron cells in rat renal cortex. *Journal of ultrastructure research*. **1985**;92(1-2):101-118.
87. **Subramanya AR, Ellison DH.** Distal Convolutd Tubule. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. **2014**:2147-2163
88. **Sampogna RV, Al-Awqati Q.** Salt and pepper distribution of cell types in the collecting duct. *Am Soc Nephrol*; **2013**.
89. **Liu W, Xu S, Woda C, Kim P, Weinbaum S, Satlin LM.** Effect of flow and stretch on the [Ca²⁺] i response of principal and intercalated cells in cortical collecting duct. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **2003**;285(5):F998-F1012.
90. **Madsen KM, Verlander JW, Tisher CC.** Relationship between structure and function in distal tubule and collecting duct. *Journal of electron microscopy technique*. **1988**;9(2):187-208.
91. **Clark SL.** Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope. *The Journal of Cell Biology*. **1957**;3(3):349-362.
92. **Flume JB, Ashworth C, James JA.** An electron microscopic study of tubular lesions in human kidney biopsy specimens. *The American journal of pathology*. **1963**;43(6):1067.
93. **Griffith LD, Bulger RE, Trump BF.** Fine structure and staining of mucosubstances on “intercalated cells” from the rat distal convoluted tubule and collecting duct. *The Anatomical Record*. **1968**;160(3):643-661.
94. **Hancox N, Komender J.** Quantitative and qualitative changes in the “dark” cells of the renal collecting tubules in rats deprived of water. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences*. **1963**;48(4):346-354.
95. **Latta H, Maunsbach AB, Madden SC.** Cilia in different segments of the rat nephron. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. **1961**;11(1):248.
96. **Pfaller W, Klima J.** A critical reevaluation of the structure of the rat uriniferous tubule as revealed by scanning electron microscopy. *Cell Tissue Res* **1976**;166:91-100.
97. **Schwartz EA, ML L, R B, SS B.** Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1977**;272.
98. **Schwartz JH, Steinmetz PR.** CO₂ requirements for H⁺ secretion by the isolated turtle bladder. *Am J Physiol*. **1971**;220:2051-2057.
99. **Stetson DL, Steinmetz PR.** Alpha and beta types of carbonic anhydrase-rich cells in turtle bladder. *American Journal of Physiology*. **1985**;249.
100. **Harvey BJ.** Energization of sodium absorption by the H(+)-ATPase pump in mitochondria-rich cells of frog skin. *J Exp Biol*. **1992**:289-309.

101. **Madsen K, C.Tisher C.** Structural-functional relationship along the distal nephron. *Am J Physiol* **1986**;250(Am J Physiol).
102. **Roy A, Al-bataineh MM, Pastor NM.** Collecting duct intercalated cell function and regulation. *Clinical journal of the american society of nephrology: CJASN.* **2015**;10(2):305-324.
103. **Moe OW, Giebisch GH, Seldin DW.** Logic of kidney. **2009**.
104. **Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA.** Aminoglycoside nephrotoxicity. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery.* **2006**;21(4):444-452.
105. **Germovsek E, Barker CI, Sharland M.** What do I need to know about aminoglycoside antibiotics? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice.* **2017**;102(2):89-93.
106. **Turnidge J.** Pharmacodynamics and dosing of aminoglycosides. *Infect Dis Clin North Am.* **2003**;17(3):503-528.
107. **Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE.** Developmental pharmacology—drug disposition, action, and therapy in infants and children. *New England Journal of Medicine.* **2003**;349(12):1157-1167.
108. **Abdelraouf K, Linder KE, Nailor MD, Nicolau DP.** Predicting and preventing antimicrobial resistance utilizing pharmacodynamics: part II Gram-negative bacteria. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology.* **2017**;13(7):705-714.
109. **Drusano GL.** Human pharmacodynamics of beta-lactams, aminoglycosides and their combination. *Scand J Infect Dis.* **1991**;74:235-248.
110. **Lode H, Borner K, Koeppe P.** Pharmacodynamics of fluoroquinolones. *Clinical Infectious Diseases.* **1998**;27(1):33-39.
111. **Gümüştas T, Küçük N, Melli M.** Antibiyotik Tedavisinde Farmakokinetik/Farmakodinamik Yaklaşımın Önemi.
112. **Moore RD, Lietman PS, Smith CR.** Clinical response to aminoglycoside therapy: importance of the ratio of peak concentration to minimal inhibitory concentration. *Journal of Infectious Diseases.* **1987**;155(1):93-99.
113. **Moore RD, Smith CR, Lietman PS.** The association of aminoglycoside plasma levels with mortality in patients with gram-negative bacteremia. *Journal of infectious diseases.* **1984**;149(3):443-448.
114. **Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL, Chow AT, Dornseif B, et al.** Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. *Jama.* **1998**;279(2):125-129.
115. **Kashuba AD, Nafziger AN, Drusano GL, Bertino JS.** Optimizing aminoglycoside therapy for nosocomial pneumonia caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **1999**;43(3):623-629.
116. **Forrest A, Nix DE, Ballow CH, Goss TF, Birmingham M, Schentag J.** Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* **1993**;37(5):1073-1081.
117. **Lister PD, Sanders CC.** Pharmacodynamics of moxifloxacin, levofloxacin and sparflaxacin against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **2001**;47(6):811-818.

118. **Woodnutt G.** Pharmacodynamics to combat resistance. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. **2000**;46(suppl_3):25-31.
119. **Matz G.** Aminoglycoside cochlear ototoxicity. *Otolaryngologic Clinics of North America*. **1993**;26(5):705-712.
120. **Burton M, Shaw LM, Schentag JJ, Evans WE.** Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics Principles of Therapeutic Drug Monitoring. *American Journal of Pharmaceutical Education*. **2006**;70(6):148.
121. **Mıstık R.** Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları. *Klimik Dergisi*. **2000**;13(2):43-45.
122. **Hancock R, Farmer SW, Li Z, Poole K.** Interaction of aminoglycosides with the outer membranes and purified lipopolysaccharide and OmpF porin of Escherichia coli. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1991**;35(7):1309-1314.
123. **Hancock RE.** Aminoglycoside uptake and mode of action—with special reference to streptomycin and gentamicin: I. Antagonists and mutants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1981**;8(4):249-276.
124. **Vaara M.** Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **1992**;56(3):395-411.
125. **Chung L, Kaloyanides G, McDaniel R, McLaughlin A, McLaughlin S.** Interaction of gentamicin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids. *Biochemistry*. **1985**;24(2):442-452.
126. **Bryan L, Kwan S.** Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1983**;23(6):835-845.
127. **Xiong Y-Q, Caillon J, Drugeon H, Potel G, Baron D.** Influence of pH on adaptive resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides and their postantibiotic effects. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1996**;40(1):35-39.
128. **Melancon P, Tapprich WE, Brakier-Gingras L.** Single-base mutations at position 2661 of Escherichia coli 23S rRNA increase efficiency of translational proofreading. *Journal of bacteriology*. **1992**;174(24):7896-7901.
129. **BUSSE H-J, WÖSTMANN C, BARKER EP.** The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of Escherichia coli and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *Microbiology*. **1992**;138(3):551-561.
130. **Fourmy D, Recht MI, Blanchard SC, Puglisi JD.** Structure of the A site of Escherichia coli 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science*. **1996**;274(5291):1367-1371.
131. **Miyaguchi H, Narita H, Sakamoto K, Yokoyama S.** An antibiotic-binding motif of an RNA fragment derived from the A-site-related region of Escherichia coli 16S rRNA. *Nucleic acids research*. **1996**;24(19):3700-3706.
132. **Takano M, Okuda M, Yasuhara M, Hori R.** Cellular toxicity of aminoglycoside antibiotics in G418-sensitive and-resistant LLC-PK 1 cells. *Pharmaceutical research*. **1994**;11(5):609-615.
133. **Drew RH.** Aminoglycosides. In: Hooper DC, editor. **2019**.

134. **Legget JE.** Aminoglycosides. In: Cohen J, Powderly WG, Opal SM, editors. *Infectious Diseases E-book*.
135. **Pancoast SJ.** Aminoglycoside antibiotics in clinical use. *Medical Clinics of North America*. **1988**;72(3):581-612.
136. **Yamazhan T.** Sülfonamidler ve Aminoglikozidler. *Ankem Dergisi*. **2007**;21(Ek2):52-56.
137. **Carlier M-B, Rollman B, Van Hoof Fi, Tulkens P.** Mechanism of aminoglycoside-induced lysosomal phospholipidosis: in vitro and in vivo studies with gentamicin and amikacin. *Biochemical pharmacology*. **1982**;31(23):3861-3870.
138. **Kacew S, Bergeron MG.** Pathogenic factors in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Toxicology letters*. **1990**;51(3):241-259.
139. **Laurent G, Kishore BK, Tulkens PM.** Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology*. **1990**;40(11):2383-2392.
140. **Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ.** New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney international*. **2011**;79(1):33-45.
141. **Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT.** Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. *The American journal of medicine*. **1983**;74(2):243-248.
142. **Rasmussen HH, Ibels LS.** Acute renal failure multivariate analysis of causes and risk factors. *The American journal of medicine*. **1982**;73(2):211-218.
143. **Shusterman N, Strom BL, Murray TG, Morrison G, West SL, Maislin G.** Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure: clinical epidemiologic study. *The American journal of medicine*. **1987**;83(1):65-71.
144. **Paterson DL, Robson JM, Wagener MM.** Risk factors for toxicity in elderly patients given aminoglycosides once daily. *Journal of general internal medicine*. **1998**;13(11):735-739.
145. **Schentag J, Cerra F, Plaut M.** Clinical and pharmacokinetic characteristics of aminoglycoside nephrotoxicity in 201 critically ill patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1982**;21(5):721-726.
146. **Sipahioğlu MH.** Aminoglikozid kullanımına bağlı gelişen ABY. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. **2006**;15 (Ek / Supplement 1):48-50.
147. **Smith CR, Lipsky JJ, Laskin OL, Hellmann DB, Mellits ED, Longstreth J, et al.** Double-blind comparison of the nephrotoxicity and auditory toxicity of gentamicin and tobramycin. *New England Journal of Medicine*. **1980**;302(20):1106-1109.
148. **Barza M, Ioannidis JP, Cappelleri JC, Lau J.** Single or multiple daily doses of aminoglycosides: a meta-analysis. *Bmj*. **1996**;312(7027):338-344.
149. **Beauchamp D, Gourde P, Theriault G, Bergeron MG.** Age-dependent gentamicin experimental nephrotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **1992**;260(2):444-449.
150. **Bennett WM, Hartnett MN, Gilbert D, Houghton D, Porter GA.** Effect of sodium intake on gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1976**;151(4):736-738.
151. **Thompson JR, Simonsen R, Spindler MA, Southern PM, Cronin RE.** Protective effect of KCl loading in gentamicin nephrotoxicity. *American Journal of Kidney Diseases*. **1990**;15(6):583-591.

152. **Camps J, Sola X, Rimola A, Parés A, Rives A, Salmeron JM, et al.** Comparative study of aminoglycoside nephrotoxicity in normal rats and rats with experimental cirrhosis. *Hepatology*. **1988**;8(4):837-844.
153. **Wood C, Kohlhepp S, Kohnen P, Houghton D, Gilbert D.** Vancomycin enhancement of experimental tobramycin nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1986**;30(1):20-24.
154. **Kohlhepp S, Gilbert D, Kohnen P.** Teicoplanin enhancement of experimental tobramycin nephrotoxicity. Proceedings of the 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents Chemotherapy. Washington. DC: American Society for Microbiology **1991**.
155. **Whiting PH, Simpson JG.** The enhancement of cyclosporin A-induced nephrotoxicity by gentamicin. *Biochemical pharmacology*. **1983**;32(13):2025-2028.
156. **Jongejan HT, Provoost AP, Molenaar JC.** Potentiated nephrotoxicity of cisplatin when combined with amikacin comparing young and adult rats. *Pediatric Nephrology*. **1989**;3(3):290-295.
157. **Powell S, Thompson W, Luthe M, Stern R, Grossniklaus D, Bloxham D, et al.** Once-daily vs. continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmicin, and tobramycin. *Journal of Infectious Diseases*. **1983**;147(5):918-932.
158. **Bennett WM, Parker RA, Elliott WC, Gilbert DN, Houghton DC.** Sex-related differences in the susceptibility of rats to gentamicin nephrotoxicity. *Journal of Infectious diseases*. **1982**;145(3):370-373.
159. **Peterson LN.** Inhibition of tobramycin reabsorption in nephron segments by metabolic alkalosis. *Kidney international*. **1990**;37(6):1492-1499.
160. **Teixeira RB, Kelley J, Alpert H, Pardo V, Vaamonde CA.** Complete protection from gentamicin-induced acute renal failure in the diabetes mellitus rat. *Kidney international*. **1982**;21(4):600-612.
161. **Gouvea W, Vaamonde CM, Owens B, Alpert H, Pardo V, Vaamonde CA.** The protection against gentamicin nephrotoxicity in the streptozotocin-induced diabetic rat is not related to gender. *Life sciences*. **1992**;51(22):1747-1758.
162. **Klastersky J, Hensgens C, Henri A, Daneau D.** Comparative clinical study of tobramycin and gentamicin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1974**;5(2):133-138.
163. **Mingeot-Leclercq M-P, Tulkens PM.** Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **1999**;43(5):1003-1012.
164. **Trollfors B, Alestig K, Krantz I, Norrby R.** Quantitative nephrotoxicity of gentamicin in nontoxic doses. *Journal of Infectious Diseases*. **1980**;141(3):306-309.
165. **Banday AA, Farooq N, Priyamvada S, Yusufi AN, Khan F.** Time dependent effects of gentamicin on the enzymes of carbohydrate metabolism, brush border membrane and oxidative stress in rat kidney tissues. *Life sciences*. **2008**;82(9-10):450-459.
166. **Burdmann E, Vieira Junior J, Vidal E.** Nefropatia tóxica e tubulointersticial. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólitos 3ª ed São Paulo: Guanabara Koogan*. **1996**:325-50.
167. **Morales A, Arevalo M, Perez-Barriocanal F.** Mechanisms implied in aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *Nefrologia: publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia*. **2000**;20(5):408-414.

168. **Houghton DC, English J, Benett WM.** Chronic tubulointerstitial nephritis and renal insufficiency associated with long-term "subtherapeutic" gentamicin. *Translational Research*. **1988**;112(6):694-703.
169. **Luft FC.** Clinical significance of renal changes engendered by aminoglycosides in man. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **1984**;13(suppl_A):23-28.
170. **Begg EJ, Barclay ML.** Aminoglycosides--50 years on. *British journal of clinical pharmacology*. **1995**;39(6):597.
171. **Kosek J.** Nephrotoxicity of gentamicin. *Lab invest*. **1974**;30:48-57.
172. **Watanabe M.** DRUG-INDUCED LYSOSOMAL CHANGES and NEPHROTOXICITY IN RATS. *Pathology International*. **1978**;28(6):867-889.
173. **Parker R, Bennett W, Porter G.** The aminoglycosides: microbiology, clinical use and toxicology. **1982**.
174. **Martinez-Salgado C, Lopez-Hernandez FJ, Lopez-Novoa JM.** Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicology and applied pharmacology*. **2007**;223(1):86-98.
175. **Schor N, Ichikawa I, Rennke HG, Troy JL, Brenner BM.** Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney international*. **1981**;19(2):288-296.
176. **Martínez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Eleno N, López-Novoa JM.** Gentamicin induces Jun-AP1 expression and JNK activation in renal glomeruli and cultured mesangial cells. *Life sciences*. **2005**;77(18):2285-2298.
177. **Stojiljkovic N, Mihailovic D, Veljkovic S, Stoilkovic M, Jovanovic I.** Glomerular basement membrane alterations induced by gentamicin administration in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **2008**;60(1):69-75.
178. **De-Barros-e-Silva M, Varanda W, Lachat J, Alves-da-Silva C, Coimbra T.** Glomerular permeability to macromolecules in gentamicin-treated rats. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. **1992**;25(4):409-417.
179. **Cojocel C, Docius N, Maita K, Smith JH, Hook JB.** Renal ultrastructural and biochemical injuries induced by aminoglycosides. *Environmental health perspectives*. **1984**;57:293-299
180. **Luft FC, Aronoff GR, Evan AP, Connors BA.** The effect of aminoglycosides on glomerular endothelium: a comparative study. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*. **1981**;34(1):89-95.
181. **Maita K, Cojocel C, Dociu N, Sleight SD, Hook JB.** Effects of aminoglycosides on glomerular ultrastructure. *Pharmacology*. **1984**;29(5):292-300.
182. **Rodriguez-Barbero A, Rodriguez-Lopez AM, Gonzalez-Sarmiento R, López-Novoa JM.** Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. *Kidney international*. **1995**;47(5):1346-1353.
183. **Valdivielso JM, Rivas-Cabañero L, Morales AI, Arévalo M, López-Novoa JM, Pérez-Barriocanal F.** Increased renal glomerular endothelin-1 release in gentamicin-induced nephrotoxicity. *International journal of experimental pathology*. **1999**;80(5):265-270.
184. **Duque I, Garcia-Escribano C, Rodriguez-Puyol M, Diez-Marques M, Lopez-Novoa J, Arribas I, et al.** Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1992**;263(3):F466-F473.

185. **Martínez-Salgado C, Rodríguez-Barbero A, Rodríguez-Puyol D, Pérez de Lema G, López-Novoa JM.** Involvement of phospholipase A2 in gentamicin-induced rat mesangial cell activation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **1997**;273(1):F60-F66.
186. **Friedlander G, Pirotzky E, Amiel C, Benveniste J.** Renal effects of platelet-activating factor in the rat. *Agents and actions*. **1987**;22(1-2):165-170.
187. **López-Novoa JM.** Potential role of platelet activating factor in acute renal failure. *Kidney international*. **1999**;55(5):1672-1682.
188. **Santos CX, Tanaka LY, Wosniak Jr J, Laurindo FR.** Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxidants & redox signaling*. **2009**;11(10):2409-2427.
189. **Martínez-Salgado C, Eleno N, Morales AI, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, López-Novoa JM.** Gentamicin treatment induces simultaneous mesangial proliferation and apoptosis in rats. *Kidney international*. **2004**;65(6):2161-2171.
190. **Rivas-Cabañero L, Montero A, López-Novoa J.** Increased glomerular nitric oxide synthesis in gentamicin-induced renal failure. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology*. **1994**;270(1):119-121.
191. **Rivas-Cabanero L, Rodríguez-López A, Martínez-Salgado C, Saura M, Lamas S, López-Novoa J.** Gentamicin treatment increases mesangial cell nitric oxide production. *Experimental nephrology*. **1997**;5(1):23-30.
192. **Klotman PE, Yarger WE.** Reduction of renal blood flow and proximal bicarbonate reabsorption in rats by gentamicin. *Kidney international*. **1983**;24(5):638-643.
193. **Hishida A, Nakajima T, Yamada M, Kato A, Honda N.** Roles of hemodynamic and tubular factors in gentamicin-mediated nephropathy. *Renal failure*. **1994**;16(1):109-116.
194. **Assael B, Chiabrando C, Gagliardi L, Nosedà A, Bamonte F, Salmona M.** Prostaglandins and aminoglycoside nephrotoxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. **1985**;78(3):386-394.
195. **Papanikolaou N, Peros G, Morphaké P, Gkikas G, Maraghianné D, Tsipás G, et al.** Does gentamicin induce acute renal failure by increasing renal TXA2 synthesis in rats? *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. **1992**;45(2):131-136.
196. **Förstermann U.** Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. **2010**;459(6):923-939.
197. **Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH.** Cytochrome c binds to inositol (1, 4, 5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nature cell biology*. **2003**;5(12):1051.
198. **Joseph SK, Hajnóczky G.** IP 3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. *Apoptosis*. **2007**;12(5):951-968.
199. **RONDESTVEDT jr CS, SCRIBNER RM, WULFMAN CE.** Alcoholysis of triarylboranes. *The Journal of Organic Chemistry*. **1955**;20(1):9-12.
200. **Weidmann H, Jr K. Z Immerman H.** Borsäure-ester von N-substituierten Aminoalkoholen. *Justus Liebig's Annalen der Chemie*. **1958**;619(1):28-35.
201. **Letsinger RL, Skoog I.** Organoboron Compounds. IV. 1 Aminoethyl Diarylborinates. *Journal of the American Chemical Society*. **1955**;77(9):2491-2494.

202. Povlock TP, Lippincott WT. The Reaction of Trimethoxyboroxine with Aromatic Grignard Reagents. A New Synthesis of Borinic Acids¹. *Journal of the American Chemical Society*. 1958;80(20):5409-5411.
203. Hu H-Z, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(34):35741-35748.
204. Kovacs G, Montalbetti N, Simonin A, Danko T, Balazs B, Zsembery A, et al. Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell calcium*. 2012;52(6):468-480.
205. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007;131(6):1047-1058.
206. Rychkov G, Barritt G. TRPC1 Ca²⁺-permeable channels in animal cells. Transient Receptor Potential (TRP) Channels, Springer, 2007, p. 23-52.
207. Prakriya M, Lewis RS. Potentiation and inhibition of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP₃ receptors. *The Journal of physiology*. 2001;536(1):3-19.
208. DeHaven WI, Smyth JT, Boyles RR, Bird GS, Putney JW. Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(28):19265-19273.
209. Feske S, Prakriya M. Conformational dynamics of STIM1 activation. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(8):918.
210. Zheng L, Stathopoulos PB, Schindl R, Li G-Y, Romanin C, Ikura M. Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(4):1337-1342.
211. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003;426(6966):517.
212. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(6):387.
213. Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, Bindels RJ, Bruford EA, Caterina MJ, et al. A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Molecular cell*. 2002;9(2):229-231.
214. Goel M, Sinkins W, Keightley A, Kinter M, Schilling WP. Proteomic analysis of TRPC5-and TRPC6-binding partners reveals interaction with the plasmalemmal Na⁺/K⁺-ATPase. *Pflügers Archiv*. 2005;451(1):87-98.
215. Hsu Y-J, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRP channels in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2007;1772(8):928-936.
216. Markó L, Manna M, Haschler T, Krämer S, Gollasch M. Renoprotection: focus on TRPV 1, TRPV 4, TRPC 6 and TRPM 2. *Acta Physiologica*. 2017;219(3):591-614.
217. Hecquet CM, Zhang M, Mittal M, Vogel SM, Di A, Gao X, et al. Cooperative interaction of trp melastatin channel transient receptor potential (TRPM2) with its splice variant TRPM2 short variant is essential for endothelial cell apoptosis. *Circulation research*. 2014;114(3):469-479.
218. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, et al. TRPM2-mediated Ca²⁺ influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nature medicine*. 2008;14(7):738.

219. **Yang K, Chang W, Yang P, Chien C-L, Lai M, Su M, et al.** Activation of the transient receptor potential M2 channel and poly (ADP-ribose) polymerase is involved in oxidative stress-induced cardiomyocyte death. *Cell death and differentiation*. **2006**;13(10):1815.
220. **Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B.** TRP channels: an overview. *Cell calcium*. **2005**;38(3-4):233-252.
221. **Bandyopadhyay BC, Swaim WD, Liu X, Redman RS, Patterson RL, Ambudkar IS.** Apical localization of a functional TRPC3/TRPC6-Ca²⁺-signaling complex in polarized epithelial cells role in apical Ca²⁺ influx. *Journal of Biological Chemistry*. **2005**;280(13):12908-12916.
222. **Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T.** Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **2002**;99(11):7461-7466.
223. **Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE.** Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *Journal of Biological Chemistry*. **2003**;278(40):39014-39019.
224. **Ilatovskaya DV, Staruschenko A.** TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. **2015**;309(5):F393-F397.
225. **Inoue R, Okada T, Onoue H, Hara Y, Shimizu S, Naitoh S, et al.** The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α 1-adrenoceptor-activated Ca²⁺-permeable cation channel. *Circulation research*. **2001**;88(3):325-332.
226. **Jung S, Strotmann R, Schultz Gn, Plant TD.** TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **2002**;282(2):C347-C359.
227. **Kong F, Ma L, Zou L, Meng K, Ji T, Zhang L, et al.** Alpha1-adrenergic receptor activation stimulates calcium entry and proliferation via TRPC6 channels in cultured human mesangial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2015**;36(5):1928-1938.
228. **Ding Y, Winters A, Ding M, Graham S, Akopova I, Muallem S, et al.** Reactive oxygen species-mediated TRPC6 protein activation in vascular myocytes, a mechanism for vasoconstrictor-regulated vascular tone. *Journal of Biological Chemistry*. **2011**;286(36):31799-31809.
229. **Kim EY, Anderson M, Wilson C, Hagmann H, Benzing T, Dryer SE.** NOX2 interacts with podocyte TRPC6 channels and contributes to their activation by diacylglycerol: essential role of podocin in formation of this complex. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **2013**;305(9):C960-C971.
230. **Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, et al.** Novel gp91 phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circulation research*. **2001**;88(9):888-894.
231. **Ma R, Chaudhari S, Li W.** Canonical transient receptor potential 6 channel: a new target of reactive oxygen species in renal physiology and pathology. *Antioxidants & redox signaling*. **2016**;25(13):732-748.
232. **Harteneck C, Gollasch M.** Pharmacological modulation of diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 channels. *Current pharmaceutical biotechnology*. **2011**;12(1):35-41.

233. **Graham S, Gorin Y, Abboud HE, Ding M, Lee DY, Shi H, et al.** Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. **2011**;301(2):C304-C315.
234. **Ramirez G, Coletto L, Sciorati C, Bozzolo E, Manunta P, Rovere-Querini P, et al.** Ion channels and transporters in inflammation: special focus on TRP channels and TRPC6. *Cells*. **2018**;7(7):70.
235. **Eshraghi-Jazi F, Talebi A, Mirsaeedi FS, Ahmadian S, Moslemi F, Nematbakhsh M.** Gentamicin induced nephrotoxicity: the role of sex hormones in gonadectomized male and female rats. *Scientifica*. **2016**;2016.
236. **Gautier J-C, Gury T, Guffroy M, Masson R, Khan-Malek R, Hoffman D, et al.** Comparison between male and female Sprague-Dawley rats in the response of urinary biomarkers to injury induced by gentamicin. *Toxicologic pathology*. **2014**;42(7):1105-1116.
237. **Nicoud IB, Knox CD, Jones CM, Anderson CD, Pierce JM, Belous AE, et al.** 2-APB protects against liver ischemia-reperfusion injury by reducing cellular and mitochondrial calcium uptake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **2007**;293(3):G623-G630.
238. **Knox CD, Belous AE, Pierce JM, Wakata A, Nicoud IB, Anderson CD, et al.** Novel role of phospholipase C- δ 1: regulation of liver mitochondrial Ca^{2+} uptake. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **2004**;287(3):G533-G540.
239. **Fartashvand M, Mousavi G, Hajisadeghi Y.** Gentamicin-induced nephrotoxicity in adult sheep. *Advances in Bioresearch*. **2012**;3(4).
240. **Randjelovic P, Veljkovic S, Stojiljkovic N, Sokolovic D, Ilic I.** Gentamicin nephrotoxicity in animals: current knowledge and future perspectives. *EXCLI journal*. **2017**;16:388.
241. **Yildar M, Basbug M, Ozkan O, Cavdar F, Yaman I, Aksit H, et al.** The effects of 2-aminoethyl diphenylborinate on L-Arginine induced acute pancreatitis in the rats. *Medical Science and Discovery*. **2015**;2(6):352-7.
242. **Ashraf A. Mohamed ASA-S, Mohamed D. Sleem.** The Possible Protective Effect OF Panax Ginseng on Gentamicin- Induced Nephrotoxicity of the Adult Albino Rats: (Morphological and Ultrastructural study). *Nature and Science*. **2017**;15(4):1-12.
243. **Alarifi S, Al-Doaiss A, Alkahtani S, Al-Farraj S, Al-Eissa MS, Al-Dahmash B, et al.** Blood chemical changes and renal histological alterations induced by gentamicin in rats. *Saudi journal of biological sciences*. **2012**;19(1):103-110.
244. **Priuska EM, Schacht J.** Mechanism and prevention of aminoglycoside ototoxicity: outer hair cells as targets and tools. *Ear, nose & throat journal*. **1997**;76(3):164-172.
245. **Giurgea-Marion L, Toubreau G, Laurent G, Heuson-Stiennon J, Tulkens PM.** Impairment of lysosome-pinocytic vesicle fusion in rat kidney proximal tubules after treatment with gentamicin at low doses. *Toxicology and applied pharmacology*. **1986**;86(2):271-285.
246. **Wedeen R, Batuman V, Cheeks C, Marquet E, Sobel H.** Transport of gentamicin in rat proximal tubule. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **1983**;48(2):212-223.
247. **Sandoval R, Leiser J, Molitoris BA.** Aminoglycoside antibiotics traffic to the Golgi complex in LLC-PK1 cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. **1998**;9(2):167-174.

248. Nakaš-Ićindić E, Avdagić N, Mijanović M, Prašović S, Začiragić A, Tahirović G. Nitric oxide in gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2005;5(2):70-74.
249. Büyükaşar K, Yazar A, Düşmez D, Öztürk H, Polat G, Levent A. Effect of trapidil, an antiplatelet and vasodilator agent on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological research*. 2001;44(4):321-328.
250. Kohn S, Fradis M, Ben-David J, Zidan J, Robinson E. Nephrotoxicity of combined treatment with cisplatin and gentamicin in the guinea pig: glomerular injury findings. *Ultrastructural pathology*. 2002;26(6):371-382.
251. Sato J, Doi T, Wako Y, Hamamura M, Kanno T, Tsuchitani M, et al. Histopathology of incidental findings in beagles used in toxicity studies. *Journal of toxicologic pathology*. 2012;25(1):103-134.
252. Hoyer JR, Seiler MW. Pathophysiology of Tamm-Horsfall protein. *Kidney international*. 1979;16(3):279-289.
253. Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney international*. 2001;59(3):932-940.
254. Laurent G, Maldague P, Carlier M, Tulkens PM. Increased renal DNA synthesis in vivo after administration of low doses of gentamicin to rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1983;24(4):586-593.
255. Toubeau G, Laurent G, Carlier M, Abid S, Maldague P, Heuson-Stiennon J, et al. Tissue repair in rat kidney cortex after short treatment with aminoglycosides at low doses. A comparative biochemical and morphometric study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1986;54(4):385-393.
256. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney international*. 2004;66(2):871-883.
257. M.P. Mingeot-Leclercq FVB, P.M. Tulkens. Lipidosis induced by antibiotics accumulating in the lysosomes.
258. Sahu BD, Kuncha M, Sindhura GJ, Sistla R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. *Phytomedicine*. 2013;20(5):453-460.
259. Yazar E, Elmas M, Altunok V, Sivrikaya A, Oztekin E, Birdane YO. Effects of aminoglycoside antibiotics on renal antioxidants, malondialdehyde levels, and some serum biochemical parameters. *Canadian journal of veterinary research*. 2003;67(3):239.
260. Ramsammy L, Ling K-Y, Josepovitz C, Levine R, Kaloyanides GJ. Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex. *Biochemical pharmacology*. 1985;34(21):3895-3900.
261. Malko P, Mortadza S, McWilliam J, Jiang L-H. TRPM2 channel in microglia as a new player in neuroinflammation associated with a spectrum of central nervous system pathologies. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:239.
262. Lee M, Cho T, Jantaratnotai N, Wang YT, McGeer E, McGeer PL. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. *The FASEB Journal*. 2010;24(7):2533-2545.

263. **Naziroğlu M.** New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical research*. **2007**;32(11):1990-2001.
264. **Suvanish Kumar V, Gopalakrishnan A, Naziroglu M, Rajanikant G.** Calcium ion—the key player in cerebral ischemia. *Current medicinal chemistry*. **2014**;21(18):2065-2075.
265. **An X, Fu Z, Mai C, Wang W, Wei L, Li D, et al.** Increasing the TRPM2 channel expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells augments the susceptibility to ROS-induced cell death. *Cells*. **2019**;8(1):28.
266. **Belrose JC, Xie Y-F, Gierszewski LJ, MacDonald JF, Jackson MF.** Loss of glutathione homeostasis associated with neuronal senescence facilitates TRPM2 channel activation in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Molecular brain*. **2012**;5(1):11.
267. **Li X, Jiang L-H.** Multiple molecular mechanisms form a positive feedback loop driving amyloid β 42 peptide-induced neurotoxicity via activation of the TRPM2 channel in hippocampal neurons. *Cell death & disease*. **2018**;9(2):195.
268. **Övey I, Naziroğlu M.** Homocysteine and cytosolic GSH depletion induce apoptosis and oxidative toxicity through cytosolic calcium overload in the hippocampus of aged mice: involvement of TRPM2 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. **2015**;284:225-233.
269. **Özgül C, Naziroğlu M.** TRPM2 channel protective properties of N-acetylcysteine on cytosolic glutathione depletion dependent oxidative stress and Ca^{2+} influx in rat dorsal root ganglion. *Physiology & behavior*. **2012**;106(2):122-128.
270. **Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. **2006**;160(1):1-40.
271. **MERCAN U.** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. **2004**;15(1):91-96.
272. **ABDEL-NAIM AB, ABDEL-WAHAB MH, ATTIA FF.** Protective effects of vitamin E and probucol against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research*. **1999**;40(2):183-187.
273. **C. Yang XHD, W. Z. Zou, W. Chen.** Protective effect of Zinc-induced metallothionein synthesis on gentamicin nephrotoxicity in rats. *Renal Failure*. **1991**;13:227-232.
274. **Ramsammy LS, Josepovitz C, Ling K-Y, Lane BP, Kaloyanides GJ.** Failure of inhibition of lipid peroxidation by vitamin E to protect against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *Biochemical pharmacology*. **1987**;36(13):2125-2132.

EKLER

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
3	04.07.2018	Ç.Ü- SABİDAM	Doç.Dr.M.Bertan YILMAZ

KARAR NO 23- Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Başkanlığı'nda görevli öğretim üyesi Prof. Dr. Ufuk Özgü METE'nin sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen 40 adet wistar ratta yapılması planlanan **"2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB)'nin, Aminoglikozid Nefrotoksitesisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi"** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

Doç. Dr. M. Bertan YILMAZ
Başkan
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Y. Kenan DAĞLIOĞLU
Sorumlu Veteriner Hekim
Ç.Ü - SABİDAM Müdürü

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gökhan GÖKÇE
Araştırmacı Uzman Üye
Su Ürünleri Fakültesi Öğretim Üyesi

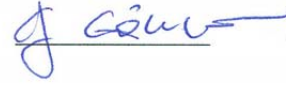
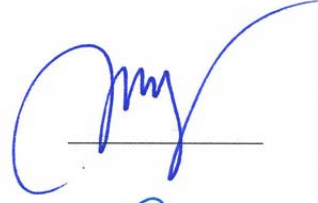
Doç. Dr. Uğur SERBESTER
Araştırmacı Uzman Üye
Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Bilge Kaan TEKELİOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Ç.Ü. CEYHAN Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Görevlisi Fariz SALİMOV
Araştırmacı Uzman Üye
Diş Hekimliği Fakültesi Öğretim Görevlisi

Av. Hasan SOYLU
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]



KATILANADI



ÖZGEÇMİŞ

Özge KENDİRLİAN, 1987 yılında Adana’da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Adana’da tamamladı. 2008 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi’ni kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. Mezuniyetini takiben, 2016 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Uzmanlık eğitime başladı. Arş. Gör. Dr. Özge KENDİRLİAN, halen aynı anabilim dalında görevini sürdürmektedir.

