

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



**ADRIAMİSİN UYGULANAN SIÇANLARIN
BÖBREK DOKULARINDA SPEKSİN
İMMÜNREAKTİVİTESİ ÜZERİNE N-
ASETİLSİSTEİN'İN ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Tuba YALÇIN

ELAZIĞ

2022

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mesut AKSAKAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Durrin Özlem DABAK

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN

2. Danışman

Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Doktora Tezi Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İ. Enver OZAN

Prof. Dr. Murat AKKUŞ

Prof. Dr. Engin DEVECİ

Prof. Dr. D.Özlem DABAK

Dr.Öğr.Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Tuba YALÇIN

04.07.2022

1. DANIŞMAN

Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN

2. DANIŞMAN

Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

İTHAF

Canım Aileme.....



TEŞEKKÜR

"Adriamisin Uygulanan Sıçanların Böbrek Dokularında Speksin İmmünreaktivitesi Üzerine N-asetilsistein'in Etkisi " başlıklı bu çalışma, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında 2018-2022 yılları arasında doktora tez çalışması olarak hazırlanmıştır.

Yapmış olduğum bu tez çalışmasında bilgisiyle ve emeğiyle beni yalnız bırakmayan, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, akademik hayatıma başlamama vesile olan, öğrencisi olduğum ilk günden bugüne yol gösterici olan ve sadece hocalığıyla değil insani yönüyle de her zaman örnek alacağım çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN'a öncelikle gönülden teşekkür ederim. Tezimin oluşum aşamasında gerekli ortamı hazırlayarak karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yol gösterici olan, araştırmamın tasarlanma aşamasında beni yönlendiren, bilgi ve tecrübesiyle her zaman sabır göstererek bana desteklerini esirgemeyen, bu yolda yürümemi teşvik ederek yardımcı olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum ayrıca kapılarını bana her zaman açan değerli hocam sayın Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca kendilerinden ders alarak bilgilerinden istifade ettiğim ve her zaman desteklerine ihtiyaç duyduğum ve duyacağım bölümümüzün değerli hocaları sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, sayın Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na, sayın Prof. Dr. Dürrin Özlem DABAK'a ve sayın Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a şükranlarımı sunarım. Ayrıca doktora tezi

Çalışmalarım boyunca yardım ve nerilerini esirgemeyen tez izleme komitesi kurul yesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Ramazan Fazıl AKKOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimimin her aşamasında beni destekleyen, gerek laboratuvar çalışmalarımda gerekse de yazım aşamasında bıkmadan usanmadan bana sabırla önerilerini sunarak yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, arkadaşım, dostum sevgili hocam sayın Arş. Gör. Dr. Nalan KAYA TEKTEMUR'a ve sayın Arş. Gör. Dr. Ahmet TEKTEMUR'a, ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan akademik çalışmalarımda bana çok şey katan, değerli meslektaşım sayın Dr. Öğr. Üyesi Sercan KAYA'ya emeklerinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında bana destek olan değerli dostlarım sayın Uzman Dr. Sena ÖZCAN YILDIRIM'a, sayın Uzman Dr. Merve KAVAK BALGETİR'e, sayın Arş. Gör. Dr. Fatma Tuba KARAKAş'a, sayın Arş. Gör. Dr. Serhat HANÇER'e, sayın Arş. Gör. Dr. Fatma GÜÇLÜ'ye ve sayın Arş. Gör. Dr. Teslime Melikhan ALKAN'a teşekkür ederim.

TF.21.11. nolu doktora tez projesi kapsamında bu çalışmayı maddi yönden destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (FÜBAP) teşekkür ederim.

Son olarak, yaşamıma vesile olan dualarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Naciye YALÇIN'a, babam İsmet YALÇIN'a, her zaman bana destek olan hayallerimin peşinden koşmama yardımcı olan beni destekleyen tek kardeşim, arkadaşım, dostum Dr. Öğr. Üyesi Erkut YALÇIN'a, değerli eşi Beyza Furtana YALÇIN'a ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
ETİK BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ.....	5
3.1. Böbrek	5
3.1.1.Böbrek Anatomisi.....	5
3.1.2.Böbrek Embriyolojisi	6
3.1.2.1 Ara Mezoderm.....	6
3.1.2.2 Mezonefrik Kanal	6
3.1.2.3 Pronefroz	6
3.1.2.4 Mezonefroz.....	7
3.1.2.5 Metanefroz: Kalıcı Böbrek	7
3.1.2.6 Böbreğin Pozisyonu.....	9
3.1.2.7 Böbrek Kanlanmasıdaki Değişiklikler.....	9
3.1.3.Böbrek Histolojisi.....	9
3.1.3.1 Nefron.....	11
3.1.3.2. Nefronun bölümleri	11
3.1.3.2.1 Nefron tipleri.....	12
3.1.3.2.2 Proksimal tübül.....	16
3.1.3.2.3 Henle kulpu.....	17
3.1.3.2.4 Distal tübül.....	17
3.1.3.2.5 Toplama boruları.....	18

3.1.3.2.6 Renal intertisyum	19
3.1.4. Böbrek Fizyolojisi	19
3.1.4.1. Böbreklerin Kanlanması ve inervasyonu	19
3.1.4.2 Nefronun Yapısı ve Fonksiyonları	20
3.2. Serbest Radikaller	22
3.2.1. Serbest Radikal Üretimi	23
3.2.2. Oksidatif Stres	25
3.3. Antioksidanlar	26
3.4. Apoptozisin Biyolojik Süreçlerdeki Rolü	28
3.5. Adriamisin	30
3.5.1. Adriamisin'in Enerji Metabolizmasındaki Rolü	34
3.5.2. Adriamisin ve Apoptozis	35
3.6. <i>N</i> - Asetil sistein	36
3.7. Speksin	37
3.8. Çalışmanın Amacı	39
4. GEREÇ VE YÖNTEM	40
4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları	40
4.2. Deney Grupları ve Uygulamalar	40
4.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Alınması	41
4.4. Histolojik Değerlendirmeler	42
4.5. İmmünohistokimyasal Çalışma	43
4.6. TUNEL Çalışması	44
4.7. Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) Analizler	45
4.8. İstatistiksel Analizler	45
5. BULGULAR	46
5.1. Biyokimyasal Bulgular	46
5.1.1. Serum ve Böbrek Dokusu Total Oksidan Status (TOS) Düzeyleri	46
5.1.2. Serum ve Böbrek Dokusu Total Antioksidan Status (TAS) Düzeyleri	46
5.1.3. Serum ve Böbrek Dokusu Speksin Düzeyleri	47
5.2. Histolojik Bulgular	48
5.3. TUNEL Bulgular	55
5.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	58

6. TARTIŞMA	61
7. KAYNAKLAR.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	76



TABLO LİSTESİ

Tablo 1:	Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve serbest radikal olmayan türler .	24
Tablo 2:	Histolojik takip serisi prosedürü	42
Tablo 3:	Serum ve böbrek dokusu TOS ve TAS düzeyleri	47
Tablo 4:	Serum ve böbrek dokusu speksin düzeyleri	47
Tablo 5:	Histopatolojik değerlendirme	49
Tablo 6:	Histopatolojik değerlendirme skoru	49
Tablo 7:	Histopatolojik toplam değerlendirme skoru	49
Tablo 8:	Apoptotik İndeks	55
Tablo 9:	Speksin immünreaktivitesi histoskoru	58

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1:	Böbrek histolojisi,	12
Şekil 2:	Renal korpüskül ve glomerüler kapiller yapısı	22
Şekil 3:	Reaktif oksijen türlerinin kaynakları	24
Şekil 4:	Antioksidant sistem ve aktif oksijen türleri arasındaki denge	26
Şekil 5:	Adriamisinin kimyasal formülü	31
Şekil 6:	N-asetil sistein'in kimyasal formülü	
Şekil 7:	Çalışmada uygulanacak deneysel program.	41
Şekil 8:	Kontrol grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, H&E.	50
Şekil 9:	Kontrol grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, Masson trikrom.	50
Şekil 10:	NAS grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, H&E.	51
Şekil 11:	NAS grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, Masson trikrom.	51
Şekil 12:	ADR grubuna ait böbrek dokusu. Eritrosit ekstrevasasyonu (kırmızı ok), tübüler vakuolizasyon (siyah ok), ödem (kahverengi yıldız), H&E.	52
Şekil 13:	ADR grubuna ait böbrek dokusu. Eritrosit ekstrevasasyonu (kırmızı ok), H&E.	52
Şekil 14:	ADR grubuna ait böbrek dokusu. Tübüler dilatasyon (siyah yıldız), hiyalin kast oluşumu (çentikli siyah ok), H&E.	53
Şekil 15:	ADR grubuna ait böbrek dokusu. Fibrozis (kırmızı yıldız), Masson trikrom.	53
Şekil 16:	ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusu. H&E.	54
Şekil 17:	ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusu. Masson trikrom.	54
Şekil 18:	Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok).....	56
Şekil 19:	NAS grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok).....	56
Şekil 20:	ADR grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok).....	57
Şekil 21:	ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok).....	57
Şekil 22:	Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok).....	59
Şekil 23:	NAS grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok).....	59

Şekil 24:	ADR grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok).....	60
Şekil 25:	ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok).....	60



KISALTMALAR LİSTESİ

ADR	: Adriamisin
AEC	: 3-amino-9-ethylcarbazole
AI	: Apoptotik indeks
AN	: Adriamisin nefropatisi
APAF-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
APO-1	: Apoptoz Antijeni-1
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
CIO-	: Hipoklorit
Cu	: Bakır
CRF	: Kortikotropin releasing faktör
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DM	: Diyabetes mellitus
DISC	: Ölüme neden olan sinyal kompleksi
ELISA	: Enzym Linked Immuno Sorbent Assay
EMC	: Hücre dışı matriks
EMT	: Epitelyal mezenkimal geçiş
FADD	: Fas adaptör proteini
FasL	: Fas Ligandı
Fe	: Demir
FNT	: Fenintrithinon toksisitesine
FÜBAP	: Fırat Üni. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi

Gal	: Galanin
GALR2	: Galanin reseptörü tip2
GALR3	: Galanin reseptörü tip3
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon S- Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂O	: Su
H&E	: Hematoksilen- Eozin
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
IL-1β	: Interleukin 1 beta
İ.P	: İntraperitoneal
Kispeptin	:Kiss
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
KBH	: Kronik böbrek hastalığı
LH	: Luteinleştirici hormon
LPO	: Lipid Peroksit
LOO$\cdot$	: Lipit peroksit radikali
MAPK	: Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
MDA	: Malondialdehid
Mn	: Manganez
NAS	: <i>N</i> - Asetil sistein

NPQ	: Nöropeptid Q
NO·	: Nitrik Oksit radikali
O₂·	: Süper Oksit Radikali
¹O₂	: Singlet Oksijen
O₃	: Ozon
O₂	: Oksijen
OH·	: Hidroksil Radikali
ONOO·	: Peroksinitiri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
RF	: Böbrek fibrozu
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
SPX	: Speksin
TAS	: Total Antioksidan Seviye
TOS	: Total Oksidan Seviye
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü α
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick endlabeling
Zn	: Çinko

1. ÖZET

Adriamisin (ADR), çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antrasiklin tipi kemoterapötik (antineoplastik veya sitostatik) bir ajandır. Kanser hücrelerini yok etmek üzere üretilen birçok antineoplastik ilaç, sağlıklı hücrelere de doğrudan etki göstermektedir. Bu etkiler antineoplastik ilaçların toksik etkilerini ortaya çıkarmaktadır. *N*-asetil sistein (NAS); mukolitik bir ajan olup, etkili bir antioksidan olan glutasyon oluşumunda rol oynamaktadır. Antioksidanların, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, çeşitli kanser türleri ve oksidatif stres ile ilişkili çeşitli hastalıkların önlenmesinde etkili oldukları bilinmektedir. Yakın zamanda tanımlanan speksin (SPX) hormonunun vücut enerji metabolizmasını ve homeostazı düzenleyici rolü vardır.

Bu çalışmada ADR uygulamasının sıçan böbrek dokularında SPX immünreaktivitesi üzerine NAS'ın etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, çalışmada 28 adet Sprague-Dawley cinsi (8-10 haftalık) erkek sıçan eşit sayıda rastgele dağıtılarak 4 gruba ayrıldı (n=7). 14 gün boyunca kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmazken NAS ve ADR+NAS gruplarına 14 gün süreyle 150 mg/kg/gün dozunda NAS intraperitoneal (i.p) uygulanmıştır. ADR ve ADR+NAS gruplarında deneyin başlangıcında tek doz 15mg/kg ADR i.p uygulandı.

Deney sonunda sıçanlar dekapite edildi ve biyokimyasal analiz ve histolojik değerlendirmeler için kan örnekleri ve böbrek dokuları alındı.

Total oksidan düzeyleri (TOS) ve total antioksidan düzeyleri (TAS) ile serum SPX düzeyi Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemiyle belirlendi. Böbrek dokusunda SPX immünreaktivitesi için immunohistokimyasal

boyamalar, apoptotik hücrelerin belirlenmesi için de TUNEL boyaması uygulandı. Ayrıca tüm sıçanların böbrek dokuları rutin hematoksilen ve eosin boyaması uygulanarak histolojik açıdan değerlendirildi.

Kontrol grubuna göre ADR grubu böbrek dokusunda, ödem, hiyalin kast oluşumu, tubuler dilatasyon, fibrozis, tübüler vakuolizasyon ve eritrosit ekstrasvazasyonu gibi çeşitli histopatolojik değişiklikler, serum/doku TOS ve SPX düzeylerinde artış ve TAS düzeylerinde azalma tespit edildi. NAS tedavisi sonrasında bu bulgularda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde iyileşme görüldü.

Sonuç olarak, Adriamisin uygulamasının TOS, apoptozis ve SPX seviyelerini arttırdığı, Tedavi olarak verilen NAS'ın TOS, apoptozis ve SPX seviyelerini azalttığı, SPX nin ADR ye bağlı oluşabilen böbrek hasarının patogenezinde rolünün olabileceği, gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla, ADR ye bağlı oluşabilen böbrek hasarı ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, böbrek hasarının oluşumunu önlemek ve/veya tedavi etmek amacıyla SPX ile ilişkili yeni tedavi yaklaşımları da denenebileceği kanaatindeyiz.

2. ABSTRACT

Effect of N-acetylcysteine on Spexin Immunoreactivity in Kidney Tissues of Rats Treated with Adriamycin

Adriamycin (ADR) is an anthracycline type chemotherapeutic (antineoplastic or cytostatic) agent used in the treatment of various types of cancer. Many antineoplastic drugs produced to destroy cancer cells also have a direct effect on healthy cells. These effects reveal the toxic effects of antineoplastic drugs. N-acetyl cysteine (NAC); is a mucolytic agent and plays a role in the formation of glutathione, an effective antioxidant. It is known that antioxidants are effective in preventing cardiovascular diseases, diabetes, various types of cancer, and various diseases associated with oxidative stress. Spexin (SPX), recently identified hormone, has a regulatory role in body, energy metabolism and homeostasis.

This study was aimed to investigate the effect of NAC administration on SPX immunoreactivity in rat kidney tissues. For this purpose, 28 Sprague-Dawley male rats (8-10 weeks old) were randomly distributed in equal numbers and divided into 4 groups (n=7). While no administration was made to the control group for 14 days, NAC was administered intraperitoneally (i.p) at a dose of 150 mg/kg/day to the NAC and ADR+NAC groups for 14 days. A single dose of 15mg/kg ADR was administered i.p to the ADR and ADR+NAC groups at the beginning of the experiment. At the end of the experiment, rats were decapitated and blood samples and kidney tissues were taken for biochemical analysis and histological evaluations. Total oxidant levels (TOS), total antioxidant levels (TAS), and serum SPX levels were determined by Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) method.

Immunohistochemical staining was used for detection of SPX immunoreactivity in kidney tissue and TUNEL staining was applied to detect apoptotic cells. In addition, kidney tissues of all rats were evaluated histologically by routine hematoxylin and eosin staining. Various histopathological changes in kidney tissues such as edema, hyaline cast formation, tubular dilatation, fibrosis, tubular vacuolization, and erythrocyte extravasation, increase in serum/tissue TOS and SPX levels, and decrease in serum/tissue TAS levels was detected in ADR group compared to the control group. A statistically significant improvement was observed in all of these findings after NAC treatment in ADR+NAC group.

As a result, it has been determined that adriamycin administration increases TOS, apoptosis, and SPX levels, NAC was given as treatment to decrease TOS, apoptosis, and SPX levels, and SPX may have a role in the pathogenesis of ADR-related kidney damage, with further and detailed studies in the future. We believe that if the pathophysiological mechanisms associated with kidney damage can be clarified, new treatment approaches related to SPX can be tried to prevent and/or treat the formation of kidney damage.

3. GİRİŞ

3.1. Böbrek

İnsan vücudundaki yapısal ve işlevsel olarak en karmaşık organlardan biri olan böbrekler (1) üreterler, mesane ve üretra ile birlikte üriner sistemi oluşturarak; çeşitli metabolik artıkları içeren idrarı oluşturup vücut dışına atılmasını sağlarlar. Ayrıca erkek üretrası üriner ve genital sistemin ortak elemanlarıdır (2).

3.1.1. Böbrek Anatomisi

Retroperitoneal yerleşimli olan böbrekler; 12. sırt (torakal) omuru ile 3. bel (lumbar) omurları arasında bulunur. Sol böbrek 12.sırt omuru ile 2. bel omuru, sağ böbrek 12.sırt ile 3. bel omurları arasında bulunur. Sağ böbreğin, karaciğer lokalizasyonu sebebiyle sol böbreğe göre aşağı pozisyonda bulunmaktadır. İnce fibröz bağ doku yapısında kapsül ile sarılı, kuru fasulye şeklinde bilateral bulunan organlardır (3). Yetişkin bir insanda her bir böbreğin ortalama ağırlığı 150 gr dır. Fibroblast ve kollajen lifler kapsülün dış bölümünde, miyofibroblastlar ise kapsülün iç kısmında oldukça fazla bulunmaktadır. Kapsülün bağ dokusu septum oluşturmadığından dolayı organın içinde bağ dokusu ince ve belirsizdir (2,4).

Her bir böbreğin iç kenarında (vücuda bakan kenarı) hilus olarak adlandırılan bir girinti bulunur. Böbreğe ait arter, ven, sinir ve pelvis yapıları hilustan böbreğe girer veya çıkarlar. Medulla ve korteks olmak üzere böbrek yüzeyinde iki bölüm izlenmektedir (5). Korteks ve medulla bölümü; nefron, lenfatik damarlar, kan damarları ve renal piramit adı verilen sayıları 8-18 arasında değişen piramitlerden oluşmaktadır. Böbrek piramidinin tepesine renal papilla denir. Her renal papilla, piramitlerden idrar toplayan minör kaliks olarak bilinen bir

yapı ile ilişkilendirilir. Birkaç küçük kaliks (minör kaliks), büyük bir kaliks (majör kaliks) oluşturmak için birleşir. İdrar, büyük kalikslerden düzleştirilmiş ve huni şeklindeki bir yapı olan ve üreterin üst-geniş bölgesini oluşturan renal pelvise geçer. Renal pelvisten üretere akan idrar depolanmak için mesaneye taşınır (6,7).

3.1.2. Böbrek Embriyolojisi

İntrauterin yaşam boyunca, kranialden- kaudale doğru pronefroz, mezonefroz ve metanefroz olmak üzere farklı üç böbrek sistemi ard arda ve kısmen de üst üste olacak biçimde oluşmaktadır (8). Pronefroz, ilk temel böbreği oluşturur ve yapıları işlevsel değildir. Kısmen gelişmiş olan mezonefroz böbrekler kısa süre işlev gördükten sonra kalıcı metanefroz böbrekler oluşur (9).

3.1.2.1 Ara Mezoderm

Gelişme sağ-sol yönde yanal olarak simetrik gerçekleşmektedir. Dorsal aortun yanında bulunan orta mezoderm başlangıçta mezonefrik tübülleri oluşturur. Bu tübüller ortak bir kanala, mezonefrik kanala bağlanır. Mezonefrik kanal daha sonra mezoderm içinde rostro-kaudal yönde uzanır. Sonunda kloak ile temas kurar (10).

3.1.2.2 Mezonefrik Kanal

Gelişimin sonraki aşamasında, hem mezonefrik kanal hem de kloaka farklılaşmaya ve kapsamlı olarak yeniden şekillenmeye devam eder (10).

3.1.2.3 Pronefroz

Bu iki taraflı geçici ve işlevsel olmayan yapılar dördüncü haftanın başlarında ortaya çıkmaktadır (11). Boyun bölgesinde birkaç hücre kümeleri ve

tübüler yapılarla temsil edilirler. Bu hücre grupları daha kaudaldeki oluşmadan gerileyerek işlevsiz boşaltım birimlerini, nefrotomları, oluştururlar. Pronefrik kanallar kaudal tarafa uzanır ve kloaka açılır. Pronefroz kısa sürede dejenere olur. Pronefrik kanalların uzunluğunun çoğu devam eder ve sonraki böbrek grubu tarafından kullanılır (10).

3.1.2.4 Mezonefroz

Bu büyük, uzun boşaltım organları dördüncü haftanın sonlarına doğru rudimenter olan pronefrozların kaudal kısmında ortaya çıkar. Mezonefroz iyi gelişmiştir. Daimi böbrekler meydana gelene kadar ara böbrek olarak fonksiyon görürler. Mezonefrik böbrek yapısı; tübüllerden ve glomerullardan oluşur. Mezonefrik tübüller, başlangıçta pronefrik kanallar olan bilateral mezonefrik kanallara açılır. Bu kanallar ise kloakaya açılır. Mezonefroz ilk trimester sonuna doğru dejenere olur. Ancak erkeklerde, mezonefrik tübüller testislerin efferent kanallarını meydana getirir. Kadınlarda ise bu kanal dejenere olur (12).

3.1.2.5 Metanefroz: Kalıcı Böbrek

Kalıcı böbreklerin ilk hali olan metanefroz, beşinci haftanın başlarında gelişmeye ve yaklaşık 4 hafta sonra işlev görmeye başlar. İdrar, fetal yaşam süresince oluşmaya devam eder. İdrar amniyotik boşluğa atılır ve amniyon sıvısı ile karışır. Fetüs her gün bağırsaklarından emilen birkaç yüz mililitre amniyon sıvısını yutar. Fetal atık ürünler, maternal böbrekler tarafından elimine edilmek üzere plasental membrandan anne kanına aktarılır. Kalıcı böbrekler, metanefrik divertikül (üreter tomurcuğu) ve metanefrojenik blastema veya metanefrik mezenşim olmak üzere iki kaynaktan gelişir (13).

Metanefrik divertikül, kloaka girişine yakın bir yerde mezonefrik kanaldan çıkan bir çıkıntıdan gelişir. Üreter tomurcuğu; üreter, renal pelvis, minör ve majör kaliksler ve toplayıcı tübülleri oluşturur (14). Metanefrojenik blastema, nefrojenik kordun kaudal kısmından türetilir. Metanefrik divertikül, uzadıkça mezenşim kütlesi olan metanefrojenik blastemaya nüfuz eder. Metanefrik divertikülün sapı üreteri oluşturur. Divertikülün kraniyal kısmı, metanefrozun toplama tübüllerine farklılaşan dallarını oluşturmak için tekrarlayan dallanma olaylarına maruz kalır. İlk dört yeni tübüller büyür ve ana kaliksleri oluşturmak için birleşirler. İkinci dört yeni tübül birleşerek küçük kaliksleri oluştururlar. Her bir toplayıcı tübülün sonu, metanefrik mezodermde bulunan mezodermal hücrelerin uyarılmasıyla metanefrik vezikülleri oluşturur. Bu veziküller uzar ve metanefrik tübüller haline gelir. Bu tübüllerin proksimal uçları glomerüller tarafından kaplanır. Glomerulus ve kapsülü ile birlikte henle kulpu, distal ve proksimal tübüller bir nefronu meydana getirir. Her bir distal kıvrımlı tübül, kavisli bir toplama tübülü ile temas ederek tübüller birleşir. Fetal böbrekler lobludur. Lobülasyon genellikle bebeklik döneminde nefronlar arttıkça ve büyüdükçe kaybolur. Zamanla nefron oluşumu tamamlanır ve her böbrek 400.000 ila 2.000.000 nefron bulunur. Doğumdan sonra böbrek boyutundaki artış, esas olarak proksimal kıvrımlı tübüllerin uzamasının yanı sıra interstisyel dokunun artmasından kaynaklanmaktadır. Prematüre bebekler dışında nefron oluşumu doğumda tamamlanır. Glomerüler filtrasyon yaklaşık olarak dokuzuncu fetal haftada başlamasına rağmen, böbreklerin fonksiyonel olgunlaşması ve filtrasyon oranlarının artması doğumdan sonra meydana gelir (15,16).

3.1.2.6 Böbreğin Pozisyonu

Başlangıçta pelviste, sakrumun ventralinde birbirine yakın uzanan metanefrik böbrekler karın ve pelvis büyüdükçe yavaş yavaş karın içinde uzanarak birbirinden uzaklaşırlar. Dokuzuncu haftada böbrekler son pozisyonlarına ulaşırlar. Bu göreceli yükselme, esas olarak embriyonun kaudalının böbreklere doğru büyümesinden kaynaklanır. Gerçekte, embriyonun kaudal kısmı böbreklerden uzaklaşır ve böylelikle giderek daha fazla kraniyal seviyeye yerleşirler. Başlangıçta, damarların ve sinirlerin girip çıktığı böbreğin hilusu ventrale bakar; ancak böbrek yer değiştirdikçe (yükseldikçe), medialde neredeyse 90 derece döner. Dokuzuncu haftada hilum orta çizgi yönündedir. Sonunda, böbrekler arka karın duvarında retroperitoneal bölgede yerleşirler (9,15).

3.1.2.7 Böbrek Kanlanmasındaki Değişiklikler

Böbrek pozisyonundaki değişiklikler sırasında kanlarını kendilerine yakın damarlardan alırlar. İlk aşamada ana iliak arterlerin dalları, renal arterlerdir. Sonra böbrekler kan akışını aortun uzak ucundan alır. Daha üst seviyede bulunduklarında aortun yeni dallarından kan alırlar. Normalde böbrek damarlarının kaudal dalları gerileyerek kaybolur. Dokuzuncu haftada böbrek üstü bezlerle temas ettiklerinde böbreklerin pozisyonu sabit hale gelir. Böbrekler en kraniyal arter dallarını abdominal aorttan alırlar; bu dallar kalıcı renal arterler haline gelir. Sol renal arter sağ renal artere göre daha kısa ve daha aşağıda yer almaktadır (13,15).

3.1.3. Böbrek Histolojisi

Böbrekler birleşik tübüler bezlerdir. Parankimanın kapsüle yakın dış kısmına korteks adı verilir ve bu kısım renal korpüskülleri, kıvrımlı ve düz tübülleri,

toplama tübüllerini ve kanalları içerir. Parankimanın iç kısmı ise medulla olarak adlandırılır ve düz tübüller ile toplama kanallarını içeren bu kısımda renal korp sk ller bulunmaz. Böbrekte hilum adı verilen böbreğin yatay eksenine dik ve derin bir çukur mediyal kısmında bulunmaktadır (17).

Hilum renaliste üreter yapıları genişleyerek pelvisi oluşturur ve renal pelvis dallanarak renal kaliksleri meydana getirir. Major kaliksler minör kaliksleri oluşturur. Minor kalikslerin u  bölümlerine papilla denir. Her papillanın u  bölümlerinde açıklıklar vardır ve bunlara area cribrosa denir. Vertikal kesitlerde her papillanın piramidal şekilli bir böbrek dokusunun tepe noktasında bulunduğu görülür. Bu alanlar, meduller piramid şeklinde isimlendirilip düz seyirli tübül yapıları ve bunlara paralel kan damarlarından dolayı çizgili olarak g r l rl r. Her piramidin, dış ve i  medulla olmak üzere iki bölümü vardır. Dış medulla bölümü de dış ve i  bölge olmak üzere ikiye ayrılır (18). Bu farklı bölümler nefronun farklı bölümlerinin farklı seviyelerde yerle mesinden kaynaklanmaktadır. Dış meduller bölgenin dış zonunda proksimal düz tübüller, i  zonunda inen ince parça, çıkan kalın parça (distal düz tübül), toplama tübülü, i  medullar bölgede inen ince parça, çıkan ince parça ve toplama kanalı bulunur. Medullar piramidlerin kortekse bakan tabanlarından korteks dokusuna doğru 400-500 adet tübül demeti uzanır. Bunlara medüller ışınlar veya Ferrein'in medüller ışınları da denir. Korteks dokuda medulla piramidleri arasından medullaya ilerleyerek Bertini sütunlarını oluşturur. Medulla piramidlerin tabanı i  korteks ile dış medulla arasındaki sınırdır. Korteks dokusu medullaya Bertini sütunları ile medulla dokusu ise kortekse medulla kordonları ile uzanır (19).

Bir medulla piramidi ve piramidin tabanını saran korteks dokusuna böbrek lobu denir. Böbrek lobül yapısı ise medulla ışını ve çevresindeki korteks dokusundan ibarettir. Bir grup nefronun drene olduğu toplama kanalların içeren medulla ışını renal sekreatuar üniteyi oluşturur (18,19).

3.1.3.1 Nefron

İdrar oluşumundan sorumlu olan nefronlar, korteks ve medullada yerleşmiş farklı yapı ve fonksiyona sahip birbiri ile bağlantılı bölümlerden oluşur (20).

3.1.3.2. Nefronun bölümleri

Renal korpüskül (Malpighi'nin renal korpüskülü): Kortekste yer alan, nefronun başlangıcı olarak kabul edilir ve iki tabakalı Bowman kapsülü ile sarılı glomerül yumağından oluşur (20).

Proksimal kıvrımlı tübül: Malpighi'nin renal korpüskülün idrar kutbundan başlayarak kıvrımlı olarak devam edip medulla ışınlarına girer düzleşerek proksimal düz tübüle dönüşür (20).

Proksimal düz parça: Medullaya doğru inen parça Henle'nin kalın inen parçasını oluşturur (20).

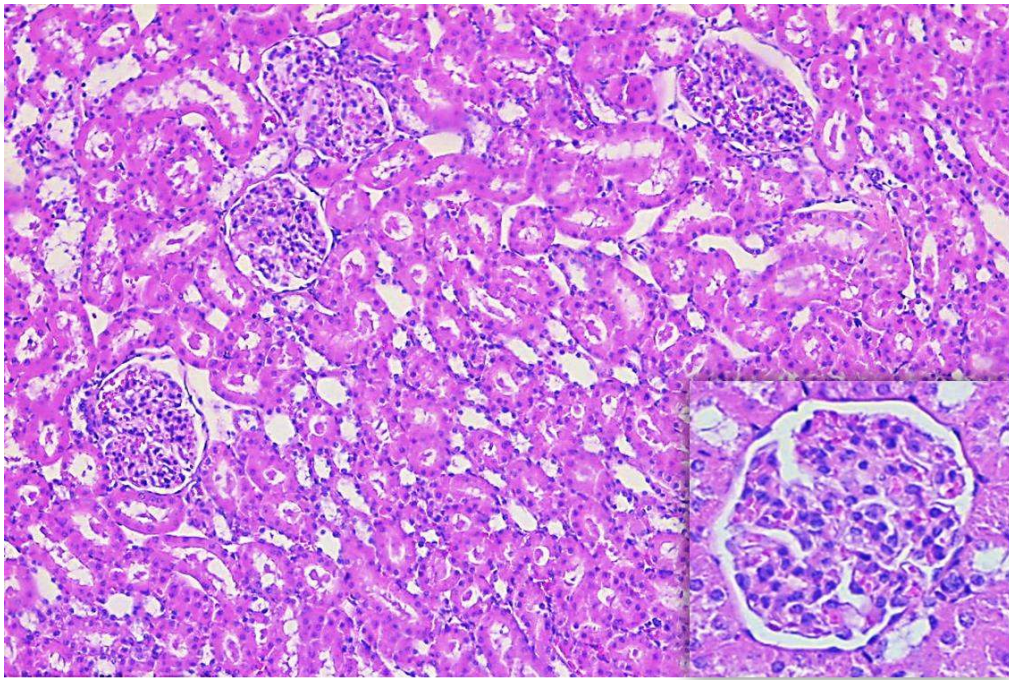
İnce inen parça: Proksimal düz tübülün medulladaki devamı olup, kıvrılarak kortekse doğru döner (20).

İnce çıkan parça: İnce parçanın kortekse doğru çıkan bölümüdür (20).

Distal düz tübül: Henle'nin kalın çıkan parçasını oluşturur. Medullada bir miktar yol aldıktan sonra medulla ışınlarında kortekse girer. Medulla ışınlarını terk

ettikten sonra renal korpüskülün vasküler kutbu ile temas kurar. Burada glomerülün afferent arteriyoline yakın konumda bulunan distal tübül epitel hücreleri sıkıca bir araya gelir, boyları uzar. Böylece özel bir yapı olan makula densa oluşur (20).

Distal kıvrımlı tübül: Korpüskül bölgesini terk eden tübül, kıvrımlı bir hal alarak bu parçayı oluşturur. Bu parça toplayıcı tübülü takiben, toplayıcı kanala açılır. Toplayıcı kanal medulla ışınlarında yer alır (20).



Şekil 1: Böbrek histolojisi, (H&E x10).

3.1.3.2.1 Nefron tipleri

Renal korpüsküllerinin korteks içindeki yerleşimlerine göre tanımlanmışlardır (21).

Subkapsüler veya kortikal nefronlar: Renal korpüskülleri korteksin dış bölümünde yer alır. Henle kulpu kısa olup, medullanın dış bölümüne kadar uzanabilir. Henle'nin kıvrımı distal düz tübüle denk gelir (21).

Jukstameduller nefronlar: Renal korpüskülleri medullar piramidlerin bazalinin proksimalinde yer alır. Henle kulpu uzundur, uzun inen segment piramidin iç bölümüne kadar uzanır. Henle'nin kıvrımı ince parçaya denk gelir (21).

İntermediyer veya midkortikal nefronlar: Renal korpüskülleri korteksin ortalarında yer alır. Henle kulpu orta uzunluktadır (21).

Malpighi'nin renal korpüskülü: Nefronun ilk parçası olarak kortekste bulunur. Renal korpüsküller glomerül ve Bowman kapsülünden oluşur. Glomerül kapillerine kan arteriyollerle gelerek drene olur. Her renal korpüskülün glomerüle giren afferent arteriyolü, glomerülü terk eden efferent arteriyolü ve proksimal tübülle açılan bir idrar kutbu bulunmaktadır (22). Bowman kapsülü visseral ve pariyetal olmak üzere iki tabakaya ayrılmıştır. Bowman kapsülünün pariyetal tabakası bazal membrana yaslanmış tek sıra yassı hücrelerinden oluşur. Glomerülün üzerini saran visseral yaprağın hücreleri ise yıldız şekilli uzantılı hücrelerdir. Bu hücrelere podosit denir. Podositler uzantılı hücreler olduğundan dolayı hücre gövdeleri ile bazal membran arasında dar bir aralık kalır. Podositlerin hücre gövdesinden çıkan primer uzantılar dallanarak, bazal membrana temas eden pedisel adı verilen sekonder uzantıları oluşturur. Sekonder uzantılar arasında kalan mesafeye filtrasyon yarığı denir (20,23) Pariyetal tabaka ile visseral tabaka arasındaki boşluğa Bowman aralığı (idrar boşluğu) olarak bilinir. Bowman aralığı proksimal tübülün lümeni ile devamlılık gösterir. Pariyetal tabakanın epiteli idrar kutbunda birbirileri ile devam ederler. Proksimal tübülün sırasıyla kıvrımlı ve düz parçasını ince parça takip ederek, ince parçadan sonra sırasıyla distal tübülün düz, kıvrımlı parçaları gelir. Kesitlerde proksimal ve distal tübülün kıvrımlı parçaları kortekste renal korpüskül çevresinde görülmektedir (19).

Filtrasyonun oluşmasını sağlayan elemanlar

Glomerül kapillerin endoteli: Diyaframsız pencerele kapiller tipindedir (24).

Glomerüler bazal membran: Bazal lamina kalındır. Tip IV kollajenden, siyaloglikoproteinlerden, laminin, fibronektin gibi glikoproteinlerden, heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlardan zengindir. Lamina rara interna ve eksterna ile lamina densa olmak üzere üç tabakalı bir yapı gösterir. Kapiller endoteline bitişik lamina rara interna ile Bowman kapsülünün visseral tabakasındaki hücrelere komşu lamina rara eksterna tabakası yapı olarak birbirine benzer. Lamina rara interna ve eksterna arasında yer alan lamina densa ise tip IV kolajenden zengindir (24).

Bowman kapsülünün visseral yaprağı: Bowman kapsülünün pariyetal yaprağı tek katlı yassı hücrelerden oluşurken, visseral yaprağı hücreleri oldukça özel hücrelerdir. Podosit olarak isimlendirilen bu hücreler glomerüller kapillerleri saran uzantılar gönderir. Primer sitoplazmik uzantılar dallanarak sekonder uzantıları yapar. Bunlara pedisel veya ayaklı çıkıntılar denir. Pediseller komşu hücrelerin pedisellerinin aralarına sokulurlar. Ayakçıklar arasında kalan mesafe filtrasyon yarığı olarak bilinir. Filtrasyon yarığının geçirgenliğini kontrol eden bir faktör burada bulunan ince bir membrandır. Bu membrana filtrasyon yarığı membranı denir (24).

Renal tübül (ürinifer tübül): Nefronun tübüllerine ilaveten toplama tübülleri ve toplama kanallarını kapsar (24).

Mezengiyal hücreler: Mezengiyal hücreler ve ürettikleri matriks mezengiyum olarak isimlendirilir. Renal korpüskülde yerleşimlerine göre iki tip mezengiyal hücre tanımlanmıştır (24).

İntraglomerüler mezengiyal hücreler: Glomerüler kapiller ile podositler arasında bulunan kontraktil hücrelerdir. Özelleşmiş perisit olarak kabul edilebilirler (24).

Ekstraglomerüler mezengiyal hücreler (Lacis hücreleri, Polkissen hücreleri): Glomerülün vasküler kutbunda, glomerül dışında bulunan hücrelerdir. Bu hücrelerin fagositoz yetenekleri sayesinde glomerül bazal membranındaki artıkları ve burada biriken proteinleri temizledikleri gösterilmiştir (24).

Juksta glomerüler aparat: Sıvı-elektrolit dengesinin ve kan basıncının düzenlenmesinde görev alan juksta glomerüler aparat aşağıdaki üç hücre grubundan oluşur:

Makula densa: Distal tübül ile afferent arteriyolun komşu epitel hücrelerinin değişikliğe uğrayarak oluşturduğu yapıdır. Kesitlerde bu bölgede çok sayıda uzun boylu epitel hücresi ve üst üste konumlanmış çok sayıda nükleus izlenir. Makula densa tübül lümenindeki Na^+ miktarına duyarlıdır. Bu hücreler hem jukstaglomerüler hücrelerin renin salınımını hemde glomerüler filtrasyon oranını düzenler (24).

Jukstaglomerüler hücreler: Makula densa bölgesinde afferent arteriyolün duvarında yer alan düz kas hücreleri de değişime uğrayarak jukstaglomerüler hücreleri oluşturur. Yuvarlak çekirdekleri olan bu hücrelerin sitoplazmalarında

PAS pozitif boyanan granüller bulunur. Renin salgılayarak kan basıncını düzenlerler (24).

Ekstraglomerüler mezengiyal hücreler: Afferent ve efferent arteriyol arasında yer alan ekstraglomerüler mezengiyal hücreler daha önce belirtildiği gibi fagositozla glomerüler bazal membranda birirken artık ürünleri, ortadan kaldırırlar (24).

3.1.3.2.2 Proksimal tübül

Nefronun en uzun ve geniş parçası olan proksimal tübülün yapısının kıvrımlı parçası kortekste seyrederken, düz parçası ise medullaya doğru inerek Henle'nin kalın inen parçasını oluşturur. Korteks içinde proksimal tübülün kıvrımlı parçasına ait çok sayıda enine ve oblik kesitlerine rastlanır. Proksimal tübülün lümeni belirgin değildir. Bowman kapsülünün tek katlı yassı epitele sahip pariyetal yaprağı, idrar kutbunda proksimal kıvrımlı tübülün tek katlı kübik veya prizmatik epiteline dönüşür. Genellikle bir proksimal tübülün enine kesitinde 6-12 adet koyu asidofil sitoplazmalı epitel hücresi bulunur. Hücrelerin ortasında yuvarlak bir nükleus, belirgin bir nükleolus görülür (25). Hücrelerin apikal yüzünde yer alan çok sayıda mikrovilluslar nedeniyle, ışık mikroskopik düzeyde fırçası kenar izlenir. Fırçası kenarı parmak şeklindeki plazma membran katlantıları olan mikrovilluslar oluşturur. Fırçası kenar, mikrovilluslar üzerinde yer alan kalın glikokaliks tabakası nedeni ile periyodik asit-schiff (PAS) pozitif boyanır. Bu özellik proksimal tübülün diğer tübüllerden kolay ayrımını sağlar. Bazal plazma membran katlantıları arasında kalan sitoplazmada mitokondriyonlar dizilmiştir (26). Proksimal tübülün kıvrımlı ve düz parçalarının özellikleri bir ölçüde farklıdır. Düz

parçası daha kısa ve yüzeyinde proksimal tübüle kıyasla az gelişmiş bir fırçamsı kenar bulunur. Fazla belirgin olmayan bazal ve lateral membran katlantıları, az sayıda mitokondriyon, daha az lizozom ve endozom içerir. Bu bölgenin absorpsiyon yeteneği kıvrımlı tübül kadar gelişmemiştir (27).

3.1.3.2.3 Henle kulpu

Proksimal kıvrımlı tübülden sonra gelen bölümdür. Jukstamedullar nefronlarda uzun, kortikal nefronlarda kısa seyirlidir. Henle kulpu; inen kalın ve ince kollar ile çıkan ince ve kalın kollardan oluşmaktadır. İnen kalın kol proksimal tübülün düz parçasından, çıkan kalın kol ise distal tübülün düz parçasından oluşur. Henle kulpu, korteks dokusu içinde başlar, medullanın derinlerine doğru Henle'nin inen parçası olarak devam eder. Distal kıvrımlı tübüle dönüşmeden Henle'nin çıkan parçası olarak medulladan kortekse geri döner. Bu nedenle kesitlerde Henle kulpu en iyi medullada izlenir. Medullanın dış zonunda proksimal tübülün düz parçası aniden ince segmente dönüşür. Proksimal tübülün tek katlı kübik epitelinin yerini ince segmentin epiteli alır. Işık mikroskopik düzeyde ayırt edilmesi zor olsada Henle kulpunun ince parçasında bazı bölümlerde uzun boylu hücrelerden veya kübik hücrelerden oluşan epitel tiplerine rastlanabilir. Bu epitellerdeki hücrenin ince yapıları da birbirlerinden farklıdır (28).

3.1.3.2.4 Distal tübül

İnce segmentten distal tübülün düz parçasına geçiş ani olur. İnce segmentin tek katlı yassı epiteli, tek katlı kübik epitele dönüşür. Distal tübül, proksimal tübülden daha kısadır. Distal tübülün lümeni proksimal tübülün lümeninden daha geniştir. Proksimal ve distal tübüller arasında ayırım yapmak kolaydır. Proksimal

tübül hücreleri distal tübül hücrelerindendaha büyük ve asidofiliktir. Proksimal tübül hücrelerinin apikalinde fırçasms kenar bulunur. Ayrıca PAS ile boyanmış kesitlerde proksimal tübülün apikalinde pozitif boyanan fırçasms kenarın bulunması da kolay ayırım sağlar. Düz ve kıvrımlı distal tübüllerin epitel hücrelerinin özellikleri birbirine benzer. Distal tübülün epiteli fırçasms kenar içermeyen tek katlı kübik epitelidir. Proksimal tübül epitelinden daha soluk boyanması öğrenciler için ayıt edici bir özelliktir. Epitel hücreleri geniştir, lateral sınırları belirgin değildir. Ancak bazal çizgilenme belirgin olarak izlenir. Epitel hücrelerinin nükleusları apikal sitoplazmaya yakın bulunma eğilimindedir. Nükleuslar zaman zaman lümene doğru çıkıntı yaparlar. Daha önce belirtildiği gibi makula densa, distal tübül ile afferent arteriyolun komşu epitel hücrelerinin değişikliğe uğraması sonucu oluşur. Kesitlerde bu bölgede çok sayıda uzun boylu epitel hücresi ve üst üste konumlanmış çok sayıda nükleus izlenir (29).

3.1.3.2.5 Toplama boruları

Distal kıvrımlı tübüllerden geçen idrar, düz toplama tübülleri ve kanallarından devam ederek idrar toplayıcı tübüllere boşalmaktadır. Toplama tübülleri ve korteksin toplama kanalları genellikle tek katlı kübik epitle döşelidir ve medullaya doğru toplama kanalları kübik epitle, medullanın derinliklerine doğru inen daha geniş kanallar ise tek katlı prizmatik epitle döşelidir. Bu kanallar hücreler arasındaki sınırın belirgin olmasından dolayı proksimal ve distal tübüllerden kolayca ayrılmasını sağlar. Toplama tübülleri ve kanallarının epitelinde koyu ve açık hücreler olmak üzere iki tip hücre bulunur. Açık hücreler bazal plazma membran katlantıları, monosilyum, mikrovillus içerir, sitoplazmalarında küçük, küre şekilli mitokondriler ve az sayıda organel yer alır. Daha az sayıda görülen koyu

hücreler (İnterkalat hücreler) çok miktarda mitokondriler bulunur. Apikallerinde mikrovillus ve mikropikalar yer alır ve bazal plazma membran katlantıları bulunmaz (19,29).

3.1.3.2.6 Renal intertisyum

Renal intertisyum korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Kortekste bağ dokusu azdır, kollajen lifler ancak damarlar çevresinde izlenir. İntertisyel bağ dokusu medullada, papilla bölgesinde daha fazladır. Korteksin intertisyel bağ dokusu içinde fibroblasta benzer intertisyel hücreler ve makrofajlar bulunur. Medullada intertisyumun primer hücreleri miyofibroblastlardır (18).

3.1.4. Böbrek Fizyolojisi

3.1.4.1. Böbreklerin Kanlanması ve inervasyonu

Böbreğin işlevinin kanı filtre etmek olduğu düşünüldüğünde, bu organ organizmanın diğer bölümlerine kıyasla orantısız bir şekilde yüksek miktarda kan almaktadır. Vücut ağırlığının yalnızca yaklaşık% 0,4'ünü oluşturan bu organ, kalpten çıkan kanın % 20 ile 25'ini almaktadır. Böbreklerde kan arterler yoluyla ulaşır ve venler aracılığıyla organı terk eder. Renal arter, böbreğin hilus denilen kısmından renal sinüse girer ve sırayla interlober artere daha sonra yatay olarak uzanan arkuat arterlere dönüşerek birkaç segmental artere bölünür. Buradan ayrılan ve ince dallar hâlinde kortekse uzanan interlobüler arterler, her bir renal korpüskül içindeki glomerüler kılcal damarları oluşturan her glomerüle kanı taşıyarak birçok dala ayrılan glomerüler kılcal damarları oluşturan son arter segmenti olan afferent arteriole bölünür. Renal korpüskülden çıkarken, glomerüler kılcal damarlar birleşerek efferent arteriyolu oluşturarak nefronlara yakından ilişkili olan ve kan

sağlayan, nefronun proksimal ve distal kıvrımlı tübülleri ile yakın konumda bulunan peritübüler kılcal oluşturmak için tekrar dallara ayrılır. Jukstamedüller nefronların uzun henle kulpu ile peritübüler kılcal damarlar daha sonra medullaya doğru ilerleyerek vasa recta ya dönüşür. Son olarak, vasa recta birleşerek interlobüler vene dönüşür. İnterlobüler venlerin birkaçı bir araya gelerek arkuat venlere dökülür. Birkaç arkuat ven, renal kolondan renal vene doğru ilerleyen interlober veni oluşturur. İnterlober ven, renal vene drene olduktan sonra böbreği renal sinüs yoluyla terk eder ve inferior vena kavadan bir bağlantı yoluyla genel dolaşıma katılır (30).

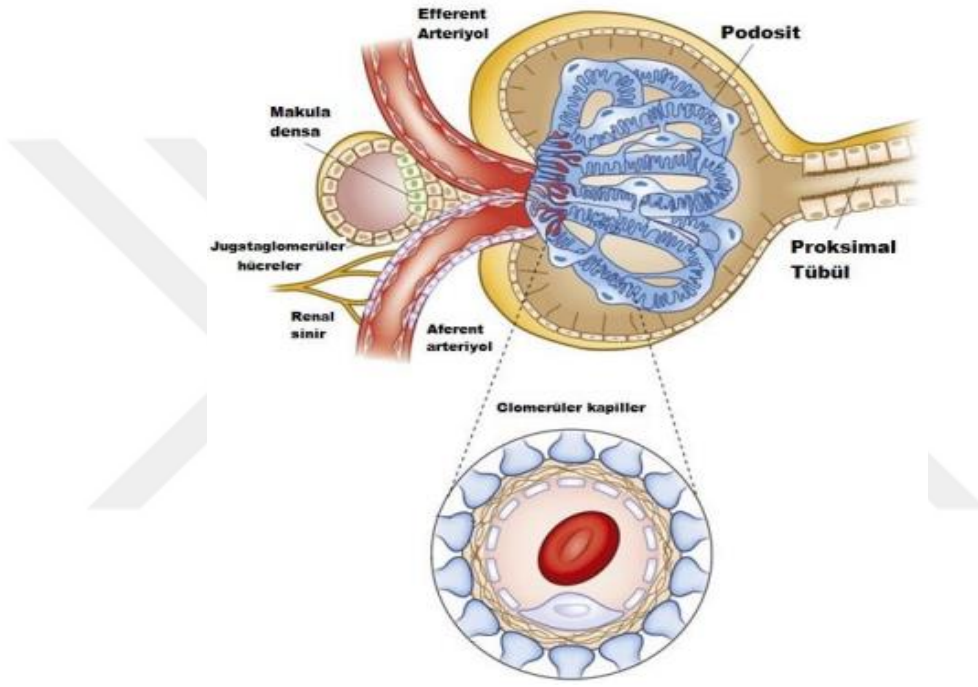
Böbreğin ana inervasyonu, celiac plexustan kaynaklanan sempatik sinirlerden oluşur. Esas olarak küçük arterler ve afferent arteriyoller, juxtaglomerular apparatus ve böbrek tübülleriyle bağlantı halindedirler. Sempatik uyarının temel amacı, bu damarların vazokonstriksiyonuna neden olarak şiddetli stres altındayken süzüntü ve idrar oluşumunu azaltmaktır. Ayrıca dopamin ve norepinefrini sempatik sinirler salgılar. Bu sinirlerin işlevlerinin artmasıyla da renin salgılanır. Böbrek glomerüler filtrasyon hızı, kan akımı, nefronlarda tuz ve su reabsorpsiyonu böbrekteki sinirler tarafından düzenlenir (31).

3.1.4.2 Nefronun Yapısı ve Fonksiyonları

Nefronlar böbreğin en küçük işlevsel birimleridir. İnsanın her iki böbreğinde yaklaşık 2-2,5 milyon kadar nefron bulunur. Bir nefron; Bowman kapsülü, glomerulus, glomerulusa kan getiren (afferent) damar, glomerulden kanı uzaklaştıran götüren (efferent) damar, Tübüller; proksimal ve distal tübül, henle kulbu ve kollektörlerden (toplayıcı) oluşur. Kortikal ve jukstaglomerüle nefron

olmak üzere başlıca iki tip nefron bulunur. Her nefron, böbreğin korteksinde yer alan bir renal korpüskülden ve jukstamedüller nefronlarda böbrek piramidinin ucuna doğru böbreğin medullasının derinliklerine uzanan tübüler bir bileşenden oluşmaktadır (30,32). Kortikal nefronlarda tübüler bileşenin çoğu böbreğin korteksinde bulunur. Renal korpüskül, glomerulus ve glomerulusu çevreleyen Bowman kapsülünden oluşur. Tübüler bileşen, proksimal kıvrımlı tübül ile başlar, arkasından henle kulpu gelir. Kortekste henle kulpu, hem afferent hem de efferent arteriyoller ile renal kapsülün girişinden geçerek distal kıvrımlı tübüle dönüşür. Daha sonra bu tübül, medulladan böbrek piramidinin ucuna doğru ilerlerken birçok nefronun içeriğini alan ve çapı artan toplama kanalını oluşturur. Bu noktada, toplama kanalı papiller kanal haline gelir ve daha sonra renal papillada boşaltılır ve bu da küçük bir kalikse dönüşür. Renal korpüskülün dışı Bowman kapsülü veya kapsül glomerülleri olarak adlandırılan yapılar yer alır. Bu yapı, ağzı vasküler kutup olarak da bilinen, afferent arteriyolün girdiği ve efferent arteriyolün renal korpüskülü terk ettiği, küresel bir huni gibidir. Huninin çıkışı proksimal kıvrımlı tübül ile birleşir. Bowman kapsülünün dış duvarı, süzüntüyü boru şeklindeki uca doğru yönlendirmek için bir tutma duvarı görevi görür. Sonra süzüntüyü toplayan bir idrar boşluğu veya kapsüler boşluk bulunur. Bowman kapsülünün iç duvarında podosit adı verilen çok özel hücreler yer alır. Bu hücreler, glomerüler kılcal damarların dışını kaplayan glomerüler taban zarının üstünde uzanan parmak benzeri çıkıntılardan oluşur. Podositler, parmaklar arasında filtrasyon yarıkları bırakarak kalın bir hücre tabakası oluşturur. Bu yarıklar, süzüntünün glomerüler kılcal damarlardan kapsüler boşluğa geçişine izin verir. Glomerüler kılcal damarlar, renal korpüskülün vasküler yapısını oluşturur. Glomerül girişte daha sonra bir pleksus

oluşturan çok sayıda damara bölünen ve daha sonra efferent kılcal damar oluşturmak için kapsülün çıkışında birleşen afferent kılcal damar bulunur. Glomerulustaki kılcal damarların tamamı pencerelidir, yani filtratı yapacak olan tüm moleküllerin geçişine izin veren çoklu porlara sahiptirler. Her bir kılcal damar, podositlerden önce bazal membran ile sarılıdır (Şekil 2) (31,33).



Şekil 2: Renal korpüskül ve glomerüler kapiller yapısı (33).

3.2.Serbest Radikaller

Bir serbest radikal, atomik yörüngesinde eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak var olabilen herhangi bir moleküler tür olarak tanımlanabilmektedir. Eşleşmemiş bir elektronun varlığı, çoğu radikal tarafından paylaşılan bazı ortak özelliklerle sonuçlanır. Birçok radikal kararsız ve oldukça reaktiftir. Diğer moleküllere ya bir elektron vererek ya da onlardan bir elektron

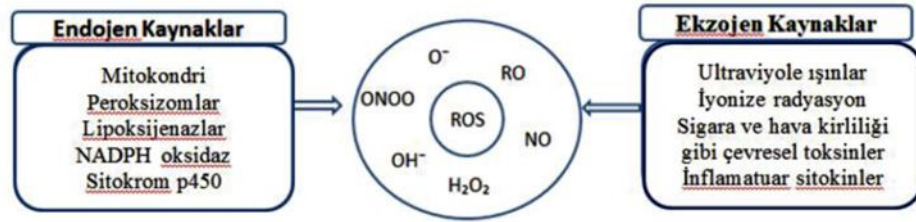
olarak, oksidan veya indirgeyici olarak davranırlar. Oksijen içeren en önemli serbest radikaller; hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijen singleti ($^1\text{O}_2$), hipoklorit (ClO^-), nitrik oksit radikali ($\text{NO}^\bullet$) ve peroksinitrit (ONOO^-) radikali gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenleri olarak bilinir ve birçok hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Serbest radikaller; çekirdek, DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipidler gibi biyolojik moleküllere zarar veren ve hücrelerin zarlarında bulunan oldukça reaktif türlerdir. Serbest radikaller, hücre hasarına ve homeostatik bozulmaya yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Vücuttaki her türlü molekül serbest radikallerin hedefleridir. Bunların arasında lipidler, nükleik asitler ve proteinler esas hedefleridir (34).

3.2.1. Serbest Radikal Üretimi

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS), ozon (O_3), sigara tüketimi, hava kirliliği, X ışınları ve endüstriyel kimyasallara maruz kalma gibi dışsal faktörlerden veya insan vücudundaki normal temel metabolik süreçlerden meydana gelir. Hem enzimatik olmayan hem de enzimatik reaksiyonların bir sonucu olarak hücrelerde sürekli serbest radikal üretimi olur. Solunum zincirinde, fagositozda, prostaglandin sentezinde ve sitokrom P-450 sisteminde yer alan reaksiyonlar serbest radikallerin kaynağı olarak görev yapan enzimatik reaksiyonlar içinde yer alır. Oksijenin organik bileşiklerle enzimatik olmayan reaksiyonlarında olduğu gibi iyonlaştırıcı reaksiyonlarla başlatılanlarda da serbest radikaller oluşabilir. Mitokondri, ksantin oksidaz, peroksizomlar, inflamasyon, fagositoz, araşidonat yolları, egzersiz yapmak ve iskemi / reperfüzyon hasarı hücre kendi içyapısı yollarında serbest radikal kaynakları arasında sayılabilir. Ayrıca hücre

dışından alınan sigara içmek, radyasyon, bazı ilaçlar, endüstriyel çözücüler, çevresel kirleticiler, böcek ilaçları ve O₃ serbest radikal kaynakları arasında sayılabilir (Şekil 3).

Serbest radikal reaksiyonların, vücutta yaşla birlikte artan hücre hasarını oluşturur ve yaşla birlikte bu tür "normal" adlandırılan değişiklikler vücudumuzda oluşumu yaygınlaşır. Bununla birlikte, bu normal değişikliklerin yanında genetik ve çevresel farklılıklar da serbest radikal hasarını meydana getirir. Bunlar, genetik ve çevresel faktörlerin belirlediği belirli yaşlarda kanser, ateroskleroz gibi hastalıkları ortaya çıkarır (34).



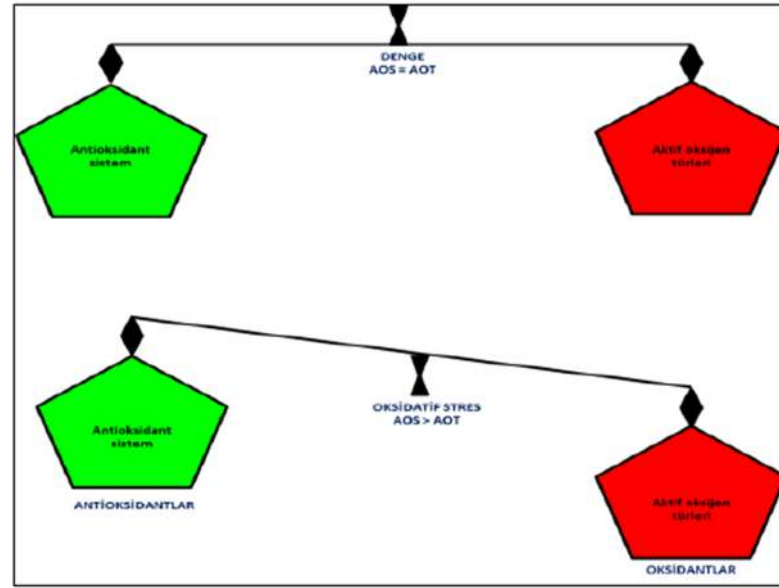
Şekil 3: Reaktif oksijen türlerinin kaynakları (35).

Tablo 1: Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve serbest radikal olmayan türler (36).

Reaktif Oksijen Türleri		Radikal Olmayan Türler	
Hidroksil radikali	HO•	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Süperoksit radikali	O ₂ • ⁻	Singlet Oksijen	¹ O ₂
Hidroperoksil radikali	HOO•	Ozon	O ₃
Lipid radikali	L•	Lipid hidroperoksit	LOOH
Lipid peroksil radikali	LOO•	Hipoklorit	HOCl
Peroksil radikali	ROO•	Peroksinitrit	ONOO•
Lipid alkoksi radikali	LO•	Dinitrojen dioksit	N ₂ O ₃
Nitrojen dioksit radikali	NO ₂ •	Nitröz asit	HNO ₂
Nitrik oksit radikali	NO•	Nitril klorit	NO ₂ Cl
Nitrosil katyon	NO ⁺	Nitroksil anyonu	NO•
Tıl radikali	RS•	Peroksinitröz asit	ONOOH
Protein radikali	P•	Azot Protoksit	N ₂ O

3.2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres terimi, serbest radikal (ROS oluşumu) ve antioksidan savunma sistemi arasındaki kritik dengenin ROS'un veya reaktif nitrojen türlerinin (RNS) lehine bozulması yönünde ortaya çıkan oksidatif hasarı tanımlamak için kullanılmaktadır. Serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sisteminin arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak oluşan oksidatif stres (Şekil 5); lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde dahil olmak üzere çok çeşitli moleküler türlere verilen hasarla ilişkilidir. Travma, enfeksiyon, ısı yaralanması, hipertoksi, toksinler ve aşırı egzersiz sonucu yaralanan dokularda kısa süreli bir oksidatif stres meydana gelebilir. Bu hasarlı dokular, fagositlerin artış gösteren radikal üreten enzimlerin (örneğin, ksantin oksidaz, lipojenaz, siklooksijenaz) aktivasyonu, bakır iyonları, serbest demir salınımı, veya oksidatif fosforilasyonun elektron taşıma zincirlerinde bir bozulma meydana getirerek aşırı ROS üretimini oluşturur. Kanser oluşumu, ilerlemesi, ilerlemesi ile birlikte yapılan radyasyon ve kemoterapi tedavilerinde kullanılan sisplatin, adriamisin ve metotreksat gibi ilaçların yan etkileri sonucunda ROS ve antioksidan savunma sistemi arasında dengesizliğe yol açarak oksidatif strese neden olur (Şekil 4) (34).



Şekil 4: Antioksidant sistem ve aktif oksijen türleri arasındaki denge (37).

3.3. Antioksidanlar

Antioksidanlar; gıda ve farmasötik ürünlerde oksidatif hasara karşı oksidatif stresin aracılık ettiği patolojik süreçlerde koruyucu rolleri nedeniyle artan bir öneme sahiptir. Antioksidanların faydaları sağlığımız için inanılmaz derecede önemlidir. İnsan vücudu, çeşitli fizyolojik süreçleri sırasında doğal olarak çok sayıda serbest radikal üretir. Serbest radikallere zamanında müdahale edilmezse alzheimer, kanser, diyabet, romatoid artrit gibi birçok hastalığa neden olabilmektedir. Yani serbest radikal üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin korunmasında serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltma ve önlemede antioksidan savunma mekanizmaları önemli bir rol oynamaktadır. Ancak çoğu zaman serbest radikallerin sayısı doğal olarak oluşan antioksidanlardan çok daha fazla artarak bu hassas dengeyi istemediğimiz bir yönde bozmaktadır. Bu hassas dengeyi korumak için antioksidanlardan

maksimum fayda sağlamamız gerekmektedir. Bunun için de sürekli bir dışarıdan antioksidan kaynağına ihtiyaç vardır. Antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize etmesi ve kan dolaşımından uzaklaştırması vücudumuza fayda sağlamanın yolları arasında yer almaktadır (38).

Antioksidanları, faaliyetlerine bağlı olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayırabiliriz. Enzimatik antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu ($\text{LOO}\bullet$) inhibe etmesi, serbest radikallerin parçalanmasını ve uzaklaştırılmasını katalize edilmesi işlevlerindendir. Bunlar ayrıca oksidatif ürünlerin H_2O_2 'e dönüştürülmesinde de rol oynarlar. H_2O_2 daha sonra bakır (Cu), çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi kofaktörlerin varlığında çok aşamalı bir işlemle suya dönüştürülmesini sağlayarak detoksifikasyonunu sağlamaktadır. Öte yandan en önemlileri arasında yer alan A, E ve C vitaminleri karotenoidler ve bilirubin, ferritin, glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesintiye uğratırlar. Günümüzde dünyasında kişinin antioksidan alımını artırmak optimum sağlık için vazgeçilmez bir unsurdur. Bunun temel nedeni vücudun antioksidan üretimine ayak uyduramamasıdır. Bu antioksidanların önemli kısmı; vitaminler, mineraller, fitokimyasallar ve enzimler şeklinde günlük diyetten kazanılmaktadır (36).

Kişi antioksidan alımını artırabilirse ilaç toksisiteleri, duygu durum bozuklukları, göz sorunları, kalp sorunları, hafıza sorunları ve bağışıklık sistemi sorunlarına karşı vücut için ek koruma sağlayarak yardımcı olabilir. Oksidatif durumun dengesini korumak için bitkiler ve hayvanlar dahil olmak üzere yiyeceklerde bulunan antioksidanlar tarafından üretilen GSH, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler antioksidanların karmaşık sistemlerini

düzenlemektedirler (38). Ayrıca, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunan GSH, genellikle ROS tarafından indüklenen lipid peroksitler (LPO), peroksitler, serbest radikaller ve ağır metaller dahil olmak üzere hücre hasarını önleyebilme anlamında önemli bir antioksidandır. Glutatyonun ROS temizleme yeteneği hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yollarla olabilir. Glutatyonda bulunan serbest tiyol grubu, enzimatik olmayan antioksidan aktivitesinden sorumludur. Buna ek olarak oksidanların detoksifikasyonu, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon-S-transferazı (GST) içeren çeşitli enzimatik reaksiyonlar kullanılarak da mümkündür. Glutatyon vücutta L-glutamik asit, L-sistein ve glisin gibi amino asitlerden sentezlenebilir. Glutatyon, glutamat yan zincirinin karboksil fonksiyonel grubunu ve sisteinin amino fonksiyonel grubunu içeren gama peptid bağlantısına sahip bir tripeptittir. Glisinin amino fonksiyonel grubu, sistein kalıntısının serbest karboksil grubuna normal bir peptid bağı oluşturur. Sistein biriminin serbest sülfhidril grubu proton vericisi olarak görev alır ve GSH'ın bir antioksidan işlevi görmesini sağlar. Sülfhidril grubunda bulunan kükürt atomu boş bir 3 boyutlu yörünge içerir ve düşük oksidasyon durumunda bulunur ve enzim olmadan bile oksidasyona aşırı duyarlı hale gelmesine olanak sağlamaktadır (39–42).

3.4.Apoptozisin Biyolojik Süreçlerdeki Rolü

Apoptozis kelimesi Yunanca'da ağaçtan düşen yapraklardaki gibi "düşme" anlamına gelen "apoptoz" olarak adlandırılmıştır (43).

Apoptozis kelimesi ilk kez Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 tarihli bir makalede morfolojik açıdan farklı bir hücre ölümü türünü tanımlamak için

kullanılmıştır (44). Apoptozis, hücrenin büyümesinin ve bölünmesinin durduğu, bunun yerine hücre içeriğinin hücre dışı ortama dökülmeden kontrollü şekilde hücre ölümüyle sonuçlanan bir sürece girdiği durumdur. Apoptozis aynı zamanda programlanmış hücre ölümü (hücre intiharı) olarak da adlandırılmaktadır. Apoptozis sürecinin başlaması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Başlatıcı kaspazlar ve uygulayıcı kaspazlar olmak üzere iki kaspaz kategorisi bulunmaktadır (45). Hücre hasarı tespit edildiğinde, başlatıcı kaspazlar (8. ve 9. kaspazlar) inaktif olan prokaspazları aktive eder ve bunlar akabinde uygulayıcı kaspazları (3. 6. ve 7. kaspazlar) etkinleştirir. Uygulayıcı kaspazların aktivasyonu, endonükleazların aktivasyonundan nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımına, proteinlerin çapraz bağlanmasına, ligandların fagositik hücrelere yönelik ekspresyonuna, hücrenin büzülmesine, apoptotik cisimlerin oluşumu ve DNA kırıklarına neden olan bir dizi olayı (43,46–50). Apoptozis, genel olarak hem mikroskop altında görsel olarak TUNEL yöntemi, Anneksin V-FITC boyama ile akış sitometrisi ve DNA fragmentasyon testleri dahil olmak üzere olmak üzere bir dizi moleküler biyoloji tekniğiyle programlanmamış hücre ölümü nekrozundan ayırt edilebilmektedir (51). Apoptoziste, ölü hücre içeriğini muhafaza eden apoptotik cisimler, çevreleyen hücreler tarafından fagositozlanabilir. Her ne kadar bu olay temelde hücre kültüründe gözlemlense, makrofajlar gibi in vivo hücreler genellikle parçalanmadan önce apoptotik hücreleri fagosit eder. Bu bozulan dokunun çevrelenmesiyle sonuçlanarak sonunda çevresindeki hücrelere ek hasar riskini azaltmaktadır (45).

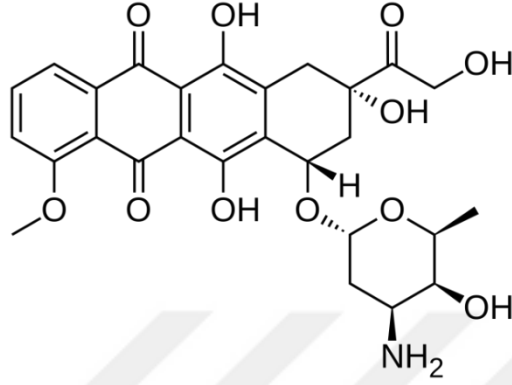
Apoptozis süreci, çok hücreli organizmalar içinde yüksek oranda bulunur ve genetik olarak kontrol edilir (52). Apoptozis, bir dizi hücre içi sinyal yolları ile

hücrede bir hasarı tespit ettiğinde hücrenin kendisi tarafından başlatılabilir ve bu içsel yolak olarak bilinen bir mekanizmadır. Apoptozise, alternatif olarak bağışıklık sisteminin bir hücresi ile apoptozisin dışsal yolağı olarak bilinen hasarlı bir hücre arasındaki etkileşimden kaynaklanabilir (53,54). Apoptozisin hem içsel hem de dışsal yolakları, çok hücreli organizmaların sağlıklı kalmasını sağlamak için sinerjik olarak çalışır ve böylelikle kusurlu hücreler vücutta atılmış olur. Apoptozisin regüle edilmesindeki başarısızlık pek çok hastalıkta ortaya çıkan patolojilere neden olur. Örneğin kaspazların aktivasyonu ile başlatıldığı görülen nöronal ölümün görüldüğü Alzheimer gibi dejeneratif hastalıklarda anahtar bir enzimler grubu apoptozis sürecinde yer alır (43,55). Çok az miktarda apoptozis ise kanserde görüldüğü üzere hücrelerin kontrolsüz şekilde büyümesine ve bölünmesine neden olabilir hatta kanser tedavilerinde görülen kemoterapötikler kanserli olmayan doku hücrelerinde apoptozisi arttırarak doku ve organ hasarına neden olabilmektedir.

3.5. Adriamisin

Doksorubisin olarakta bilinen adriamisin (ADR) (Şekil 6), kemik tümörleri, akut lösemi, lenfomalar, mide, meme ve yumurtalık kanserleri gibi kanser tedavisinde kullanılan geniş spektrumlu, antrasiklin grubunda yer alan bir antibiyotiktir (56,57). Antrasiklinler kansere karşı en etkili kemoterapötikler arasındadır (46). Maalesef bu oldukça etkili antikanser ilacının klinik kullanımı, toksisiteye sebep olmasından dolayı kullanımını sınırlandırmaktadır. ADR uygulamasının, bazıları kardiyomiyopati, dispne, egzersiz intoleransı, hepatotoksisite, ve nefropati gelişimini içeren doza bağlı, geri dönüşümsüz yan etkileri ile de sonuçlanmaktadır (58). Bu antrasiklinler, bir hidroksi antrakınon

aglikonuna bağlı aminosugar daunosaminden oluşan glikozit ilaçlardandır. Bu ilaçlar tümörleri; DNA-interkalasyonuna, oksidatif stresin oluşumuna ve topoizomerez II zehirlenmesi gibi çoklu mekanizmalarla etkilemektedirler (46).



şekil 5: Adriamisinin kimyasal formülü (46).

Sternberg tarafından 1970 yılında böbrek hasarına neden olan ilk antrasiklin çalışmaları yayınlanmıştır. Adriamisin'in neden olduğu böbrek hasarının ilk tanımı ise 1976'da sıçanlarda ve 1998'de farelerde gösterilmiştir. 1977 yılında Burke ve arkadaşları tarafından ADR uygulamasından sonra böbrek yetmezliği gelişen 78 yaşındaki bir erkek olgusunu tanımlamışlardır. Buda hastalarda böbrek fonksiyonunun yakından izlenmesi gerekliliğini ve ilk olarak ADR tedavisinin böbrek yetmezliği ile ilişkili olduğunu gösteren bir vaka çalışması olarak göstermişlerdir (59). İnsanlarda ve hayvanlarda bazı küçük farklılıklar gösteren ayrıntılı farmakokinetik çalışmalar da yapılmıştır. İnsanlarda Adriamisin hızlı plazma klerensi geçirir ve önemli miktarda doku bağlanması oluşurmaktadır. Uygulanan dozun yaklaşık% 4-5'inin idrarla atılımı 5 gün içinde gerçekleşmektedir. Biliyer atılım 7 gün içinde uygulanan dozun% 40-50'sini oluşurmaktadır. Sıçanlarda ve farelerde ise Adriamisinin intravenöz uygulamasından sonra

plazmadan hızla temizlenir, dokuda birikerek yavaş yavaş idrar ve safrayla birlikte atılmaktadır. Adriamisin önemli ölçüde metabolize olmaz. Adriamisin esas olarak böbrekte birikir (özellikle daunorubisin ile karşılaştırıldığında), aynı zamanda karaciğer, kalp ve ince bağırsakta da bulunarak ağırlıklı olarak ta karaciğer tarafından metabolize edilmektedir. Bu muhtemelen daunorubisin ile karşılaştırıldığında daha büyük nefrotoksisite ve daha geniş ADR indeksine neden olmaktadır (59). Adriamisin kaynaklı tümör lizisi ve böbrekler içinde toplanması, potasyum, fosfat ve ürik asidin böbrek tübüllerine birikmesinin yanı sıra, glomerüller içinde fibrin trombusünün birikmesine neden olmaktadır. Bu da böbrek fonksiyonunu bozarak hastalarda bakım diyalizine ihtiyaç duyulmasına neden olabilir (60).

Hasta popülasyonundaki bu bulgulara ek olarak, Doksorubisinin nefropatisi olarak da bilinen ADR nefropatisi deney hayvanlarında da böbrek yetmezliğine neden olduğu iyi bilinmektedir. Adriamisin tedavisinde böbrek hasarının hızlı ortaya çıkması (günler içinde) nedeniyle yaygın olarak kronik böbrek hastalığının (KBH) kemirgen modeli olarak kullanılmaktadır. Spesifik olarak, çalışmalar ADR'in böbrekler üzerinde doğrudan toksisiteyi indüklediğini ve bunun sonucunda da glomerulus, tubulointerstisyel inflamasyon ve fibroz, podosit efüzyonu, artmış serum kreatinin, azalmış kreatinin klirensi, azalmış serum albümin, dislipidemi ve proteinüri olduğunu göstermektedir (60).

Adriamisin, glomerüler bazal membranı ve epitelyal hücre membran bariyerini yok eden hücre zarının lipit peroksidasyonuna neden olduğundan, çok miktarda proteinüri ile sonuçlanan nefrin ve diğer moleküllerin sentezini engellemektedir. Bu modelde de böbrek hasarının kronik ilerlemesini

göstermektedir. İlerleyici böbrek hasarının patolojik özellikleri arasında; geniş glomerüler lezyon, tübüler dilatasyon ve interstisyel fibroz sayılabilir. Adriamisin, kan dolaşımına girdikten sonra böbreğin doğal hücrelerini doğrudan yok edebilir. Bu da iltihaplanmayı indükleyerek akut böbrek hasarı ve son aşamasında da böbrek hastalığının sürekli ilerlemesine yol açabilir. P38 mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK), ADR nefropati (AN) inflamasyonunun oluşumunda önemli bir rol oynar. Aktif p38 MAPK, pro-enflamatuar sitokinlerin tümör nekroz faktörü alfa ($TNF-\alpha$) ve interleukin 1 beta ($IL-1\beta$) salgılanmasını ve üretimini indükleyebilirken, $TNF-\alpha$ ve $IL-1\beta$ otokrin ve parakrin yoluyla p38 MAPK aktivitesini artırabilir. Bu da AN inflamatuvar yanıtı artırarak glomerüler hasarı artırmaktadır. Sitotoksositeyle glomerüler filtrasyon bariyerinin imhası sırasında ADR tarafından aktive edilen makrofajlar, monositler ve mezenşimal hücreler ayrıca $TNF-\alpha$ ve $IL-1\beta$ 'yi indükleyebilir. Bu da epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) ve hücre dışı matrisin (ECM) üretimini teşvik ederek böbrek yapısını ve işlevini değiştiren böbrek fibrozunun (RF) ilerlemesine neden olabileceğini söylemişlerdir (61).

Risk faktörlerini düzeltmek, daha az toksik türevler geliştirmek ve daha önce subklinik toksisiteyi saptamak için çalışmalar yapılmış olsa da, şu anda antrasikline bağlı sitotoksiteyi önlemek için henüz bir alternatif bulunamamıştır. Bu nedenle, önleyici stratejiler üretmek için ADR kaynaklı patolojinin moleküler bazında daha fazla ilerlemeye ihtiyaç duyulmaktadır.

3.5.1. Adriamisinin Enerji Metabolizmasındaki Rolü

Mitokondrinin birincil işlevi, hücrelere enerji sağlanması için oksidatif fosforilasyondur (62). Doksorubisin, mitokondriyal membrana karşı yüksek bir afiniteye sahip olması mitokondriyi hassaslaştırarak azalmış ATPase aktivitesiyle hücrede enerji bozukluğuna ve ultrastrüktürel hasara neden olmaktadır (63).

Böbrek, mitokondri açısından zengin, yüksek oranda enerji ihtiyacı olan bir organdır. Kronik böbrek hastalığı patogenezinde mitokondriyal disfonksiyonuna neden olmaktadır (64). Ayrıca podosit yapısının korunması ve fonksiyonu için de yüksek bir ATP seviyesi gerekli olduğundan mitokondriyal disfonksiyonun böbreklerde podosit hasarına da neden olmaktadır (62).

Bununla birlikte, böbrekte mitokondriyal disfonksiyonun altında yatan moleküler mekanizmalar ve böbrek fonksiyonu üzerindeki etkisinin anlaşılması güçtür. ROS esas olarak mitokondri tarafından üretilir ve hücre sinyali ve homeostazda önemli roller oynamaktadır. ROS'un, esas olarak mitokondriden (ROS) kaynaklı böbrek hasarında önemli bir rol oynamaktadır. H_2O_2 gibi ROS ana bileşenleri proteinüriye ve glomerular bozukluklara da neden olabilir. Ayrıca CAT, H_2O_2 'i suya (H_2O) ve oksijene (O_2) parçalar. Bu nedenle CAT enzimidaki eksiklikte oksidatif strese neden olabilmektedir. Bu eksiklikten kaynaklı böbreklerde hasara neden olarak proteinüri ve tubulointerstisyel fibroza neden olabilmektedir. Yapılan bir araştırmada, Akatalasemik farelerde adriamisin nefropatiye duyarlılık göstererek artmış albüminüri ve glomerüloskleroz oluşumunu göstermişlerdir (64).

Li ve ark. yaptıkları araştırmalarında; doksorubisinin ile indüklenen sıçanlarda, insan nefrotik sendromun klinik bulgularına benzerlik göstererek glomerüler kılcal geçirgenlikteki artışa neden olduğunu ve bunu takiben proteinüri, hipoproteinemi ve hiperlipidemi ile karakterize edilen, ADR'nin sıçanlarda böbrek hasarına neden olabileceğini bildirilmişlerdir (65). Buna ek olarak başka bir araştırmada da glomerüler bariyerin önemli bir yük yoğunluğu kaybına ve boyut seçiciliğine adriamisin sebep olmaktadır. Glomerüler endotel yüzey tabakasının kalınlığı (örn.veya glikokaliks) açısından da adriamisin ile tedavi edilen hayvanlarda normal gruptaki hayvanlara göre artışın sadece % 20 olduğunu söylemişlerdir. ADR, proteoglikan sentezini aşağı regüle ederek glomerüler glikokaliksi incelterek glomerüler yük ve boyut seçiciliğini az da olsa değiştirebilir (66).

3.5.2. Adriamisin ve Apoptozis

Apoptozis, ağaç yapraklarının sararması veya çiçek yapraklarının kuruyup dökülmesiyle ilişkilendirilmesiyle “dökülme” olarak tanımlanmaktadır. Programlanmış hücre ölümü veya apoptozis hücrenin büzüşmesiyle beraber kromatin iplikçikler yoğunlaşır ve bunu takiben DNA kırıkları oluşmasını takiben apoptotik cisim oluşumuyla ortaya çıkan kritik hücresel bir süreçtir. Apoptozis, DNA, endoplazmik retikulum, mitokondri ve diğeri hücre organellerinin ve membran bütünlüğünü bozması diğeri normal hücreler için kaynak enerjiyi ayırmak ve komşu hücrelerin ölüm sinyallerini önlemek için apoptozisi tetiklemektedir. Apoptozis, sık sık dışsal ölüm reseptörü ve intrinsik mitokondriyal apoptoz yollarında çok sayıda sinyalleme kaskadı içeren sıkı bir şekilde düzenlenmiş süreçtir. Genellikle apoptozisi hücrelerin oksidatif stres, iyonlaştırıcı radyasyon,

kemoterapi ilaçları, hipoksi ve yüksek sıcaklık gibi stres koşullarıyla karşı karşıya gelmesiyle oluşmaktadır. Apoptozis, içsel (intrinsik) veya dışsal (ekstrinsik) yollardaki bu uyarı tipine bağlı olarak oluşabilir (67).

ADR nin hücrelerdeki ilk hedefi bölünme safhasındaki DNA yı denatüre etmektir. Ayrıca ADR, DNA hasarı onarımını da zayıflatarak DNA polimeraz, RNA polimeraz ve DNA topoizomeraz II gibi bazı nüklear proteinlerin aktivasyonunu inhibe eder ve DNA ipliklerinden birini de kırarak G2/M fazındaki hücre döngüsünü bloke ederek DNA hasarına yol açmaktadır (68,69).

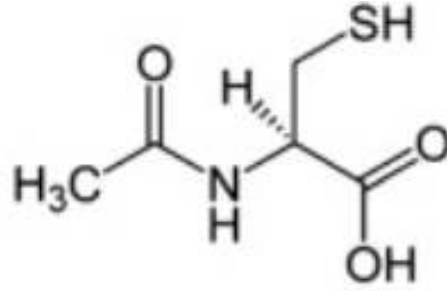
Apoptoz bileşenleri, belirleyicileri ve apoptoz mekanizmalarını; TNF, Fas ligandı (FasL) reseptörleri, Fas reseptörü ya da apoptoz antijen-1 (APO-1) olarak adlandırılan CD95, TNF- a reseptörü (TNFR), Bcl-2 ailesi, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), fas adaptör proteini (FADD), ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC=ölüm başlatan sinyalleme yapısı), FLIP, kaspazlar, antiapoptotik ve proapoptotik proteinleri oluşturmaktadır (70–74).

3.6. N- Asetil sistein

N-asetil sistein (NAS) (Şekil 7); hücreyi koruyucu etkisi olan bir antioksidandır. Mukolitik bir ajan olan NAS antioksidan özelliğini glutatyon seviyelerini düzenleme, serbest oksijen radikallerini temizleme, nötrofil aktivitesini ve TNF üretimini baskılama yoluyla göstermektedir. Ayrıca NAS'ın, hücre içi protein aktivitelerini düzenleyerek apoptozisi engellediği bildirilmiştir (75).

N-asetil sistein klinik araştırmalarda; diyabete bağlı meydana gelen hipertansiyonda, kronik bronşitte, alkole bağlı olmayan steatohepatitte, tekrarlanan gebelik kayıplarında, erkek infertilitesinde, polikistik over sendromunda, diyabetik

retinopatide, yaşa bağlı maküler dejenerasyon ve katarakt gibi patofizyolojilerde faydaları belirtilmiştir. NAS ayrıca otizm, bipolar bozukluk, parkinson, şizofreni ve davranış bozukluğu gibi psikiyatrik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde tamamlayıcı olarak kullanılmaktadır (76). (Şekil 10).



Şekil 6: N-asetilsisteinin kimyasal formülü (77).

3.7. Speksin

Speksin (SPX), Markov modelleme (78) kullanılarak tanımlanan 14 amino asit uzunluğunda yeni tanımlanmış bir peptittir. Speksin beyin, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, tiroid, adrenal bez, testis, yumurtalık, dalak, pankreas, iskelet kası, yağ dokusu, mide ve gastrointestinal sistem yolunun farklı kısımlarını içeren merkezi ve periferik dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedir (73). Speksin, sistemik dolaşımda tespit edilebilir ve nöroendokrin sinyal olarak işlev görebilir.

Biyolojik aktivitesi Walewski ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (79). Obezlerde, zayıf yetişkinlere kıyasla anlamlı olarak daha düşük SPX düzeyleri bulunmuştur ve doyumluk hissine neden olan bir molekül olduğu düşünülmektedir (79). Speksin ayrıca uzun zincirli yağ asitlerinin adiposit içerisine alımını azaltmaktadır (79). Ek olarak, diyetle indüklenen obeziteye sahip kemirgenlere

SPX uygulanması sonucu kalori alımı azalıp, hareket kabiliyetini artırarak kilo kaybı olduğu görülmüştür (79). Yağ dokusu üzerinde yapılan in vitro çalışmalar SPX geninin obezlerde obez olmayanlara göre daha az eksprese olduğu gösterilmiştir (79). Speksin'in etki mekanizması bilinmemekle birlikte adrenokortikal hücre çoğalmasının düzenlenmesine doğrudan dahil olduğunu gösterilmiş ve pankreastan da salgılandığı ispatlanmıştır (80).

Balık ve memelilerde yapılan çalışmalarda speksinin beyin, kalp, akciğer, karaciğer, kas, adrenal bez, yağ doku, böbrek, over, testis, pankreas, mide ve gastrointestinal traktın değişik kısımlarından eksprese edildiği görülmüştür (79). Speksin'in bu kadar farklı dokuda eksprese olması çeşitli fizyolojik süreçlerle ilişkili olduğunun göstergesidir (81). Sonmez ve ark. (82) insanlardaki prepro NPQ/SPX mRNA'sını Northern Blot analizi ile araştırmış ve SPX'in yüksek ekspresyonlarından birinin böbreklerde olduğu saptanmış, ayrıca su ve tuz metabolizmasında muhtemel rolü olduğu ifade edilmiştir. Wang ve ark. nın (83) yaptığı çalışmada speksinin; Tip 2 diyabet, obezite, yağlı karaciğer hastalığı, kabızlık, anksiyete ve depresyon dâhil olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda speksin; obezite ve enerji metabolizmasında potansiyel bir düzenleyici faktör olarak bulunmuştur. Ratlarda yapılan deneyler sonucunda speksinin kalp hızında düşme, idrar çıkış hızında düşme, ortalama arteriyel basınçta artma, üriner sodyum ekskresyonunda artma ve antinosiseptif etkileri olduğu görülmüştür (73,84) Rucinski ve ark. (80) sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada speksinin adrenal kortekste hormon salınımını arttırdığını göstermiştir. Liu ve ark. (85) ise balıklar üzerinde yaptıkları çalışmada speksinin l uteinleştirici hormon (LH) salınımını azalttığını göstermiştir. Bu

alışmalar bize speksinin organizmadaki diğ er endokrin organları etkileyebileceğini d üş nd rmektedir.

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucu kas, retina, sinir hücreleri, böbrek, mide ve barsaklar gibi çok çeşitli dokularda SPX immünreaktivitesi tespit edilmiştir. Basit ve çok katlı epiteldeki SPX immünreaktivitesi ise diğ er yapılara kıyasla en yüksek seviyede g r lm ştir. Bu da sekresyon, transepitelyal taşıma, poliferasyon, hücre farklılaşması, hücre ölümü ve epitelial hücre yenilenmesinde SPX'in rolü olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmada, speksinin adrenokortikal hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde de etkili olduğu gösterilmiştir (81). Ayrıca yapılan bu araştırmada pozitif immünreaktivite Henle halkasının epitelinde ve distal tübüllerde g zenmiştir.

3.8. Çalışmanın Amacı

Klinikte tek başına ve kombine halde diğ er antineoplastik ajanlarla sıklıkla kullanılan ADR enerji metabolizmasında, serbest radikal oluşumunu ve apoptozisi arttırarak böbrek hasarına neden olmaktadır. NAS, mukolitik bir ajan olup L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun  n maddesi olan ve etkili bir antioksidan olan glutatyon oluşumunda rol oynayan ve serbest oksijen radikalleri plazma düzeylerini düzenleyici olarak rol oyanamaktadır. Ayrıca klinikte sık kullanılan kemoterapatik ajan olan ADR'ye bağlı nefrotosisitenin patogenizinde oluşum mekanizmaları içinde speksin peptidinin olabileceği ve olası speksin değişimlerinin ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu  alışmada ADR uygulanan sıçanların böbrek dokularında SPX immünreaktivitesi  zerine NAS'ın etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.04.2020 tarih ve 2020/5 sayılı kararı gereğince etik yönden uygun bulunmuştur.

Çalışmanın deneysel kısmı Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) ile Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışmanın bütçesi TF. 21. 11. nolu proje kapsamında Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından karşılandı.

4.1. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri ve Barındırılmaları

Çalışmada, FÜDAM'dan alınan 28 adet 8-10 haftalık Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. 22-25°C oda ısısında 12 saat aydınlık (07.00-19.00) ve 12 saat karanlık (19.00-07.00) bir ortamda bakıldı. Beslenmelerinde pelet sıçan yemi kullanılarak ad-libitum olarak su ve besin alımı sağlandı.

4.2. Deney Grupları ve Uygulamalar

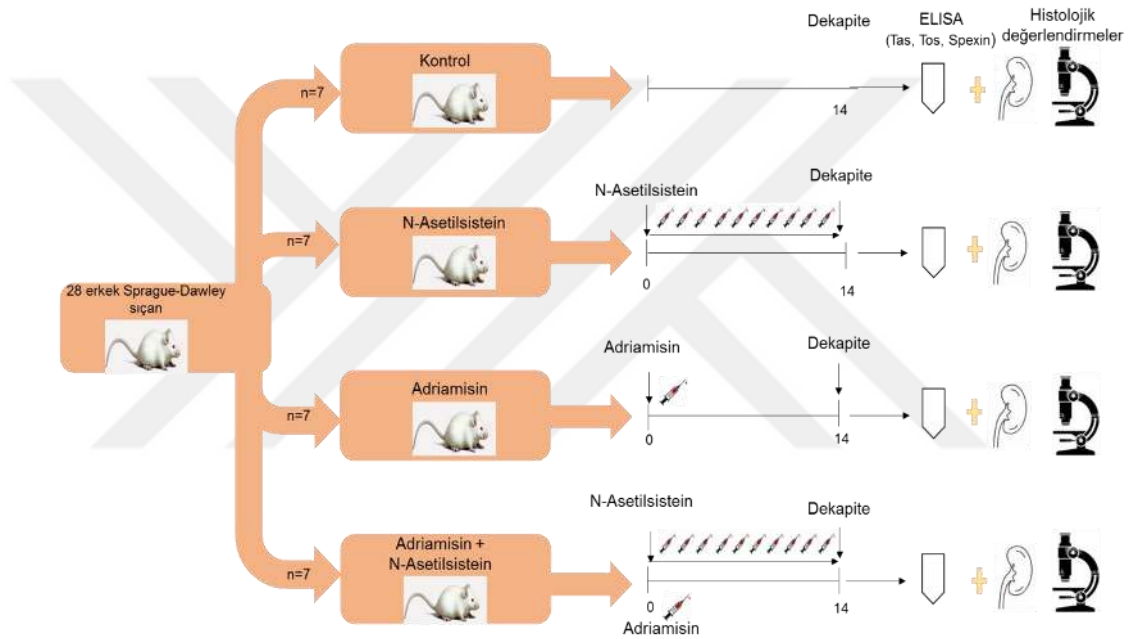
Çalışmada kullanılan sıçanlar, her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol grubu); Bu gruptaki sıçanlara deney süresi olan 14 gün boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı.

Grup II (N-asetil sistein grubu-NAS); Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal (i.p.) 150 mg/kg/gün dozunda NAS (Asist, Hüsnü Arsan İlaçları A.Ş.,Türkiye) 14 gün boyunca uygulandı.

Grup III (Adriamisin grubu-ADR): Bu gruptaki sıçanlara deneyin 1. günü i.p 15 mg/kg dozunda ADR (Adrimisin, Saba İlaçları A.Ş., Türkiye) tek doz uygulandı.

Grup IV: (Adriamisin + N-Asetilsistein grubu-ADR+NAS); Bu gruptaki sıçanlara deneyin 1. günü i.p tek doz 15 mg/kg ADR uygulandıktan sonra 14 gün boyunca 150 mg/kg/gün dozunda NAS i.p. uygulandı.



Şekil 7: Çalışmada uygulanacak deneysel program.

4.3. Deneyin Sonlandırılması ve Doku Örneklerinin Alınması

Deney sonunda tüm gruptaki sıçanlara xylazine (10 mg/kg) ve ketamine (75 mg/kg) anestezi altında intrakardiak olarak kan alındıktan sonra dekapitasyon yöntemi ile çalışma sonlandırıldı. Alınan kanlar 4.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek elde edilen serum ve alınan böbrek doku örnekleri -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı. Sıçanların serum ve doku örneklerinden ELISA metoduyla

TAS, TOS ve SPX miktarlarına bakıldı. Bununla birlikte histolojik çalışma için alınan böbrek dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunun içine konuldu.

4.4. Histolojik Değerlendirmeler

Böbrek dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda yaklaşık olarak 72 saatlik fiksasyon işleminden sonra doku takip kasetlerine alınarak ve musluk suyu altında gece boyu yıkanarak fiksatiften arındırıldı. Yıkanan dokular dereceli artan etanol (%70-80-90-96-100) serilerinden doku takip protokolüne uygun şekilde geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine gömüldü (Tablo 2). Sonra rodajlı ve polilizinli lamlara hazırlanan parafin bloklardan mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığındaki kesitler alındı. Alınan kesitler rutin hematoksil-eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda (Leica DM500) incelenip ve fotoğraflandı (DFC295; Leica, Wetzlar, Germany).

Tablo 2: Histolojik takip serisi prosedürü

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	Gece boyu +4°C'de
2	% 80 Alkol	1 saat
3	% 90 Alkol	1 saat
4	% 96 Alkol I	1 saat
5	% 96 Alkol II	1 saat
6	% 100 Alkol I	1 saat
7	% 100 Alkol II	1 saat
8	Xylol I	1 saat
9	Xylol II	1 saat
10	Sert parafin	Etüvde gece boyu
11	Gömme	

4.5. İmmünohistokimyasal Çalışma

Böbrek dokusunda SPX immünreaktivitelerinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Polilizinli lamlara, parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli etanol serilerinden geçirildi. PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, ABD) ile preparatlar yıkandı. Preparatlar, sitrat tamponunda (pH:6) mikrodalga fırında (700W) 15 dakika kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan preparatlardaki kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için kesitlere H₂O₂ (Hydrogen Peroxide Block, TA-125-HP, Thermo Scientific, England) ile muamele edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan preparatlara Ultra V Block (TA-125-UB, Thermo Scientific, England) solüsyonu damlatıldı. Daha sonra preparatlar SPX primer antikoru (A04088-1, Boster Biological Technology, Pleasanton, CA, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS ile yıkanan preparatlara anti polivalent sekonder antikor (TP-060-BN, Thermo Scientific, England) damlatılarak 30 dakika boyunca bekletildi. PBS ile yıkanan dokulara karanlık ve nemli ortamda 30 dk boyunca Streptavidin Peroksidaz (HRP) (TP-125-HR, Thermo Scientific, England) enzimi uygulamasını takiben PBS ile yıkanan dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen solüsyonu (TA-125-HA, Thermo Scientific, England) uygulandı. Işık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra reaksiyon eş zamanlı olarak sonlandırıldı. Mayer's hematoxilen ile zıt boyama işleminden sonra preparatlar su bazlı kapatma solüsyonu (TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (DM 500)

altında değerlendirilerek fotoğraflandı (DFC295; Leica, Wetzlar, Germany). İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100) ve Şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: Şiddetli) esas alınarak histoskor hesaplandı (Histoskor = şiddet x yaygınlık).

4.6. TUNEL Çalışması

Böbrek dokusundaki apoptotik hücrelerin belirlenmesi amacıyla TUNEL yöntemi uygulandı.

In Situ Apoptozis tespit kiti (Chemicon, catno: S7101, USA) kullanıldı ve TUNEL boyama prosedürü üretici firmanın yönlendirmeleri doğrultusunda uygulandı. Böbrek dokusunda TUNEL pozitif (apoptotik) hücrelerin belirlenmesi için parafin bloklardan polilizinli lamlara alınan 5 µm'lik kesitler 58 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi ve ardından ksilol ile deparafinizasyon ve şeffaflaştırma işleminden sonra dokular azalan dereceli etanol serilerinden geçirildi (sırasıyla %100, %100, %96, %90, %70) geçirildikten sonra 3x5 dk PBS'de yıkama yapıldı. Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildikten sonra bu kesitler 15 dakika oda ısısında proteinaz K solüsyonu uygulandı. Ardından PBS ile yıkanan kesitlere (3x5 dk) Equilibration tampon solüsyonu ile 6 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitler 37 °C'de çalışma solüsyonunda (% 77 µl Reaction Buffer + % 33 TdT Enzyme)) 1 saat bekletildi ve ardından durdurma tamponuyla oda ısısında 10 dakika bekletildi. PBS'de yıkanan (3x5 dk) kesitlere oda ısısında 30 dakika anti-digoksinin-peroksidaz konjugatı uygulandı ve PBS (3x5 dk) ile yıkama yapıldı. 3,3'Diaminobenzidine (DAB) kromojen solüsyonu uygulamasından sonra PBS

(3x5 dk) ve distile su (5 dk) uygulanarak yıkama yapıldı. Kesitler, Methyl green ile zıt boyama yapıldıktan sonra distile ile yıkanıp dereceli etanol serilerinden geçirililip ksilole alındı. Son aşama olarak kapatma medyumu ile kapatıldı.

Boyanan preparatlar ışık mikroskobunda (Leica DM500) mikroskop değerlendirilerek fotoğraflandı (DFC295; Leica, Wetzlar, Germany). Değerlendirmede, Methyl green ile yeşile boyanmış çekirdekler normal, kahverengi çekirdek boyaması gösteren hücreler ise apoptotik hücreler olarak kabul edildi. Her bir gruba ait kesitlerde x10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, toplam 500 hücre sayıldı ve apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile apoptotik indeks (AI) hesaplandı.

4.7. Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) Analizler

Serum ve böbrek doku örneklerinde TAS, TOS ve SPX (sırasıyla, (AD3283Ra, AndyGene, TX75081, USA; AD3282Ra, AndyGene TX75081, USA; Lot:2022105, Shanghai Coon Biotech, Shanghai, China) düzeylerinin tespiti için ELISA yöntemi ile üretici firmanın prosedürüne uygun biçimde yapıldı.

4.8. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde SPSS 22.0 paket program kullanıldı. Sayısal veriler median (minimum – maksimum) olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığını incelemek için shapiro-wilk testi kullanıldı. İki'den fazla grup arasında genel karşılaştırmada Kruskal Wallis testi kullanıldı. İkili gruplar arasındaki karşılaştırmada Kruskal Wallis'ten sonra post-hoc Dunn testi kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Biyokimyasal Bulgular

5.1.1. Serum ve Böbrek Dokusu Total Oksidan Status (TOS) Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokusu TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NAS (sırasıyla; $p=0.474$; $p=0.404$) grubunda TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmezken, ADR grubunda TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi (sırasıyla; $p=0.001$; $p=0.032$). ADR grubu ile karşılaştırıldığında ise ADR+NAS grubunda TOS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla; $p=0.009$; $p=0.004$). Tablo 3.

5.1.2. Serum ve Böbrek Dokusu Total Antioksidan Status (TAS) Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokusu TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NAS (sırasıyla; $p=0.905$; $p=0.706$) grubunda TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmezken, ADR grubunda TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlendi (sırasıyla; $p=0.006$; $p=0.002$). ADR grubu ile karşılaştırıldığında ise ADR+NAS grubunda TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi (sırasıyla; $p=0.010$; $p=0.010$). Tablo 3.

Tablo 3. Serum ve böbrek dokusu TOS ve TAS düzeyleri

	TOS (pg/mL)		TAS (U/mL)	
	Median (min-max)		Median (min-max)	
	Serum	Böbrek Dokusu	Serum	Böbrek Dokusu
KONTROL	51,15(45,62-56,38)	59,07(48,56-68,52)	5,35(4,03-7,30)	5,34(4,41-6,92)
NAS	55,12(39,69-61,25) ^b	55,00(38,96-62,10) ^b	5,53(4,58-6,81) ^b	5,00(4,35-7,85) ^b
ADR	118,85(117,35-123,67) ^a	120,32(118,45-122,45) ^a	0,98(0,35-1,32) ^a	0,74(0,45-1,21) ^a
ADR+NAS	56,80(48,65-65,23) ^b	56,07(42,56-68,78) ^b	5,23(4,35-6,92) ^b	4,80(4,09-6,58) ^b
p*	0.004	0.004	0.005	0.004

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05)

* Kruskal Wallis

5.1.3. Serum ve Böbrek Dokusu Speksin Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum ve böbrek dokusu SPX düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NAS (sırasıyla; p=0.633; p=0.923) grubunda SPX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmezken, ADR grubunda SPX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi (sırasıyla; p=0.023; p=0.009). ADR grubu ile karşılaştırıldığında ise ADR+NAS grubunda SPX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi (sırasıyla; p=0.002; p=0.005) Tablo 4.

Tablo 4. Serum ve böbrek dokusu speksin düzeyleri

	Speksin (pg/mL)	
	Median (min-max)	
	Serum	Böbrek Dokusu
KONTROL	478,27(451,48-598,65)	447,70(387,44-474,07)
NAS	461,19(419,46-490,08) ^b	443,00(381,79-475,96) ^b
ADR	1745,18(1598,63-2154,02) ^a	1548,62(1114,25-1993,12) ^a
ADR+NAS	449,39(365,23-574,83) ^b	443,47(391,21-494,79) ^b
p*	0.005	0.006

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05)

* Kruskal Wallis

5.2. Histolojik Bulgular

Hematoksilen-eosin ve masson trikrom ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; tüm gruptaki böbrek dokuları; ödem (kahverengi yıldız), hiyalin kast oluşumu (çentikli siyah ok), tübüler dilatasyon (siyah yıldız), fibrozis (kırmızı yıldız), tübüler vakuolizasyon (siyah ok), ve eritrosit ekstrasvazasyonu (kırmızı ok), açısından incelenip her bir hayvan için histopatolojik değerlendirme skoru oluşturularak (Tablo 5) istatistiksel analizleri yapıldı (Tablo 6).

Histopatolojik toplam değerlendirme skoru (Tablo 7) sonrası yapılan istatistiksel analiz sonucu;

Kontrol (Şekil 8, 9) ve NAS (Şekil 10, 11) gruplarına ait böbrek dokuları normal olarak değerlendirildi ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p=1.000$).

Kontrol grubuyla kıyaslandığında ADR (Şekil 12,13,14,15) grubunda histopatolojik toplam değerlendirme skoru istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.001$). ADR grubu ile kıyaslandığında ise ADR+NAS (Şekil 16,17) grubunda histopatolojik değerlendirme skorunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.001$).

Tablo 5. Histopatolojik değerlendirme

	Kontrol				NAS				ADR				ADR+NAS			
* 1-2-3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Ödem	5	2			6	1				2	1	4	4	2	1	
Hiyalin kast oluşumu	7				7						2	5	5	2		
Tübüler dilatasyon	7				7					3	2	2	6	1		
Fibrozis	7				7					1	5	1	6	1		
Tübüler vakuolizasyon	7				7						2	5	5	2		
Eritrosit ekstrasvazasyonu	6	1			5	2					1	6	5	2		

*(0): yok, *(1): hafif, *(2): orta, *(3): şiddetli

Tablo 6. Histopatolojik değerlendirme skoru

	Ödem	Hiyalin kast oluşumu	Tübüler dilatasyon	Fibrozis	Tübüler vakuolizasyon	Eritrosit ekstrasvazasyonu
KONTROL	0,00(0,00-1,00)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-0,00)	0,00(0,00-1,00)
NAS	0,00(0,00-1,00) ^b	0,00(0,00-0,00) ^b	0,00(0,00-0,00) ^b	0,00(0,00-0,00) ^b	0,00(0,00-0,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b
ADR	3,00(1,00-3,00) ^a	3,00(2,00-3,00) ^a	2,00(1,00-3,00) ^a	2,00(1,00-3,00) ^a	3,00(2,00-3,00) ^a	3,00(2,00-3,00) ^a
ADR+NAS	0,00(0,00-2,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b	0,00(0,00-1,00) ^b
p*	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05)

* Kruskal Wallis

Tablo 7. Histopatolojik toplam değerlendirme skoru

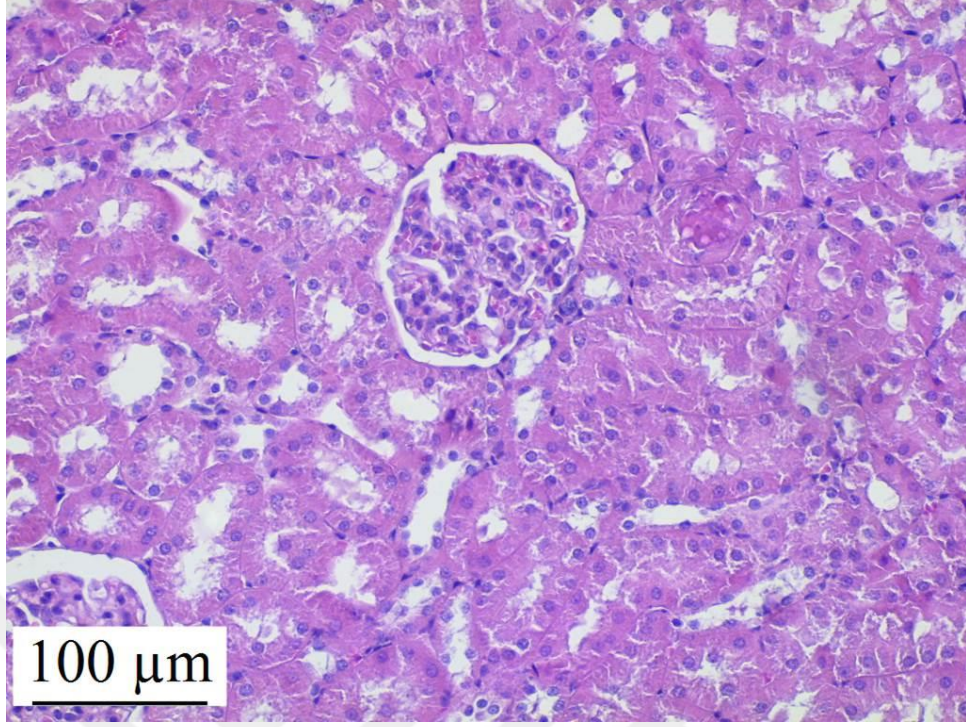
	Histopatolojik toplam değerlendirme skoru
KONTROL	0,00(0,00-2,00)
NAS	0,00(0,00-2,00) ^b
ADR	12,00(10,00-16,00) ^a
ADR+NAS	0,00(0,00-5,00) ^b

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

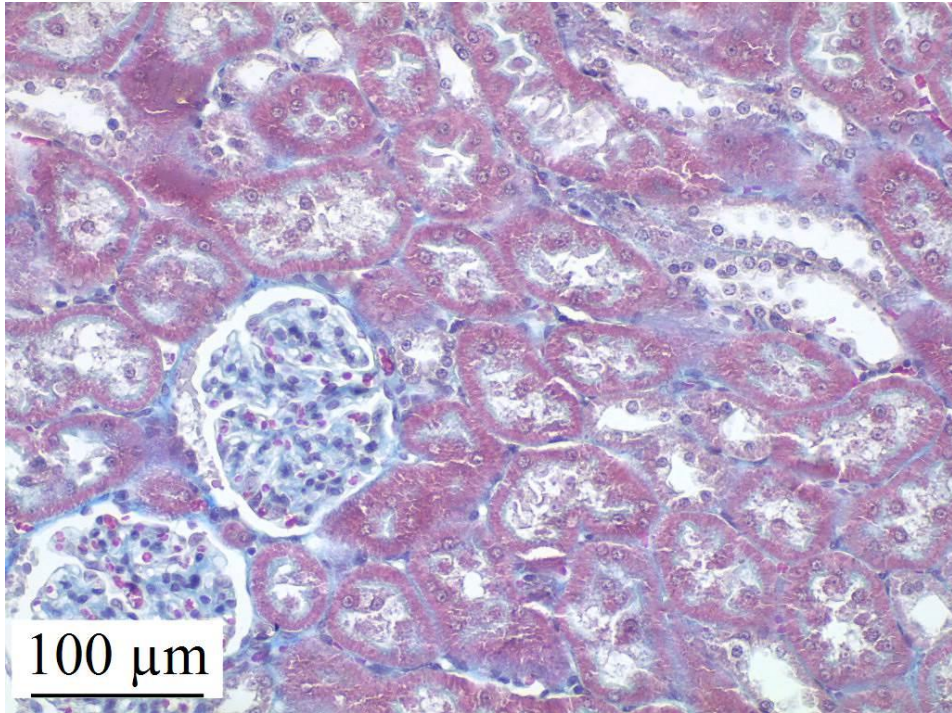
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, (p<0.05)

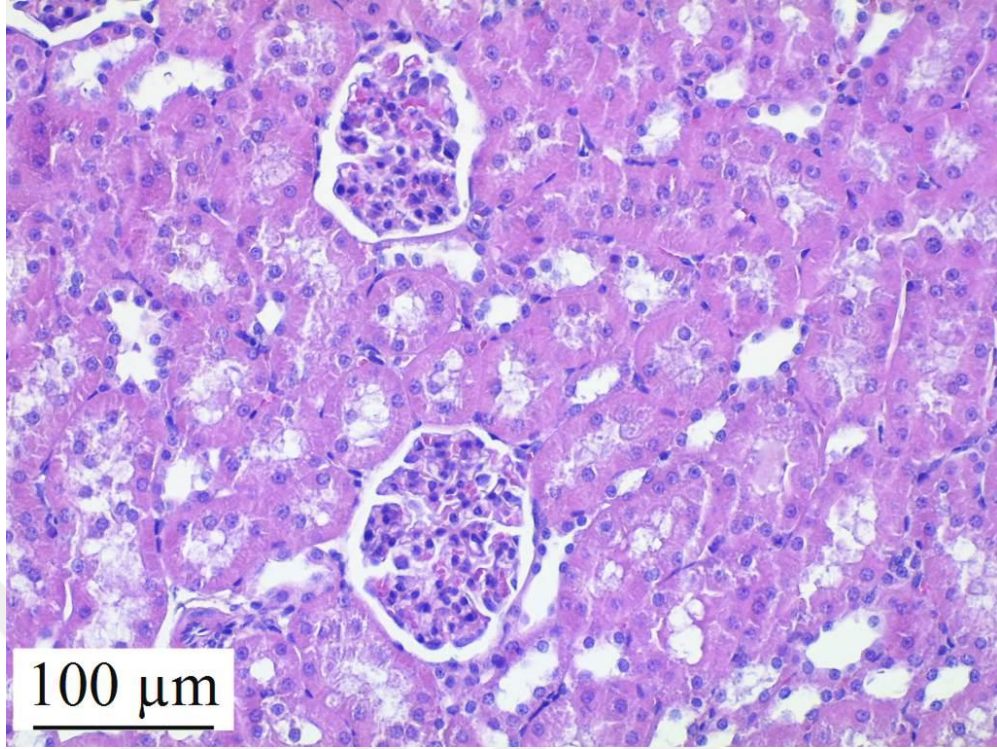
* Kruskal Wallis



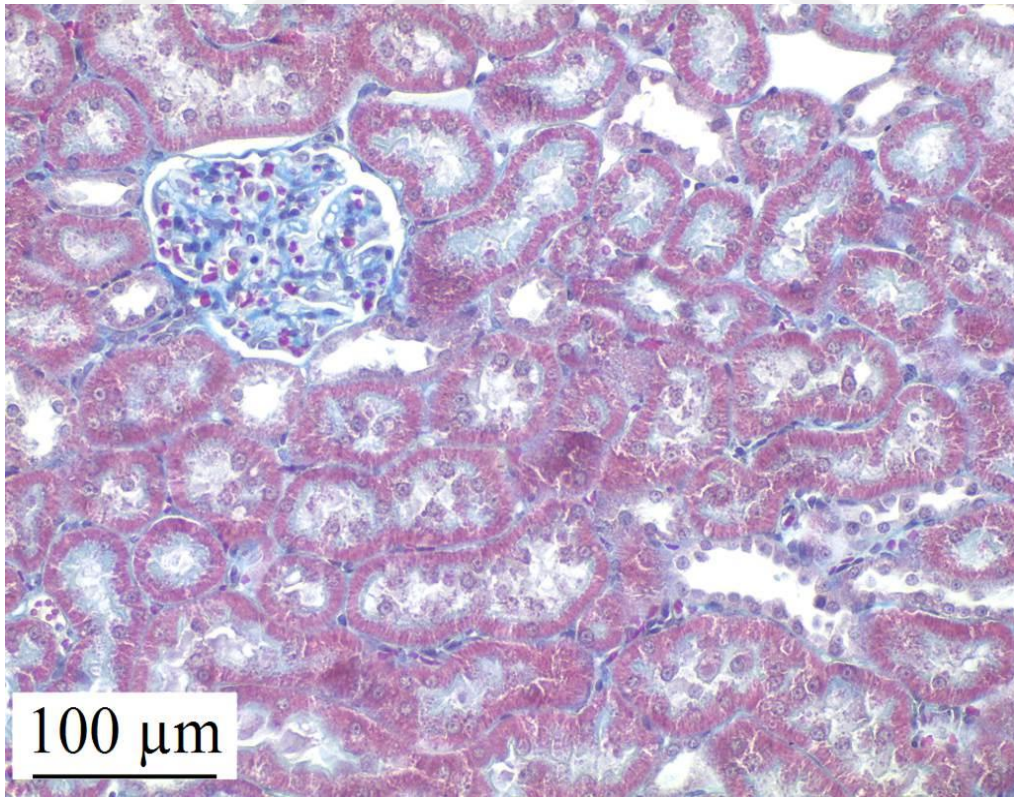
Şekil 8: Kontrol grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, H&E.



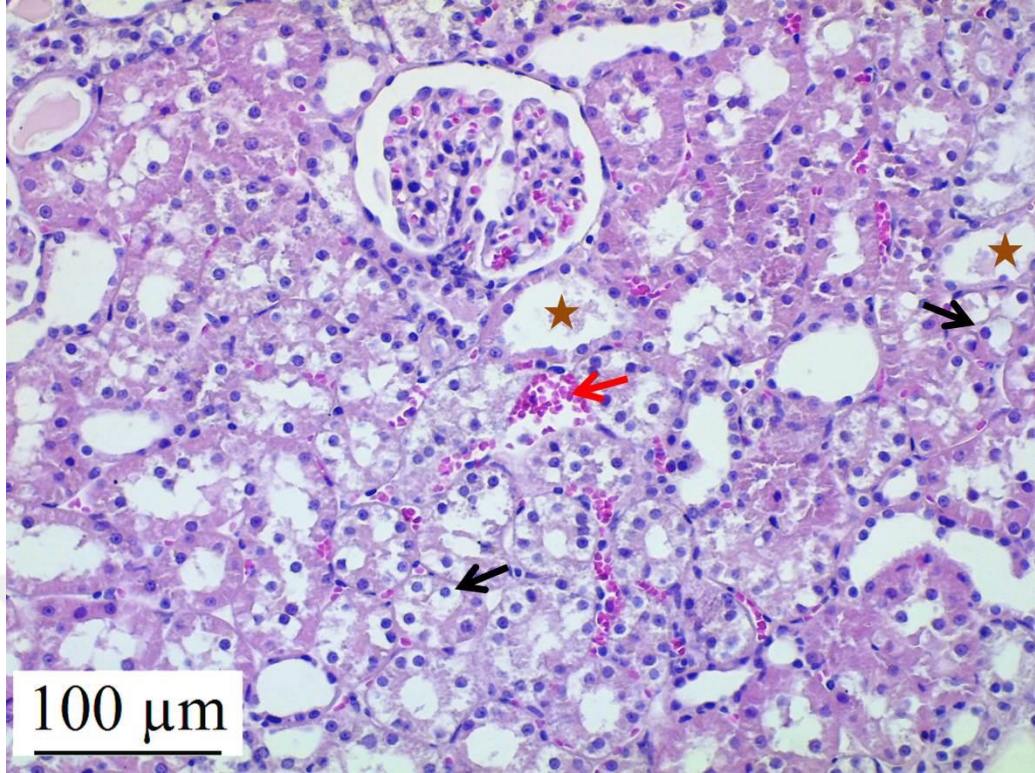
Şekil 9: Kontrol grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, Masson trikrom.



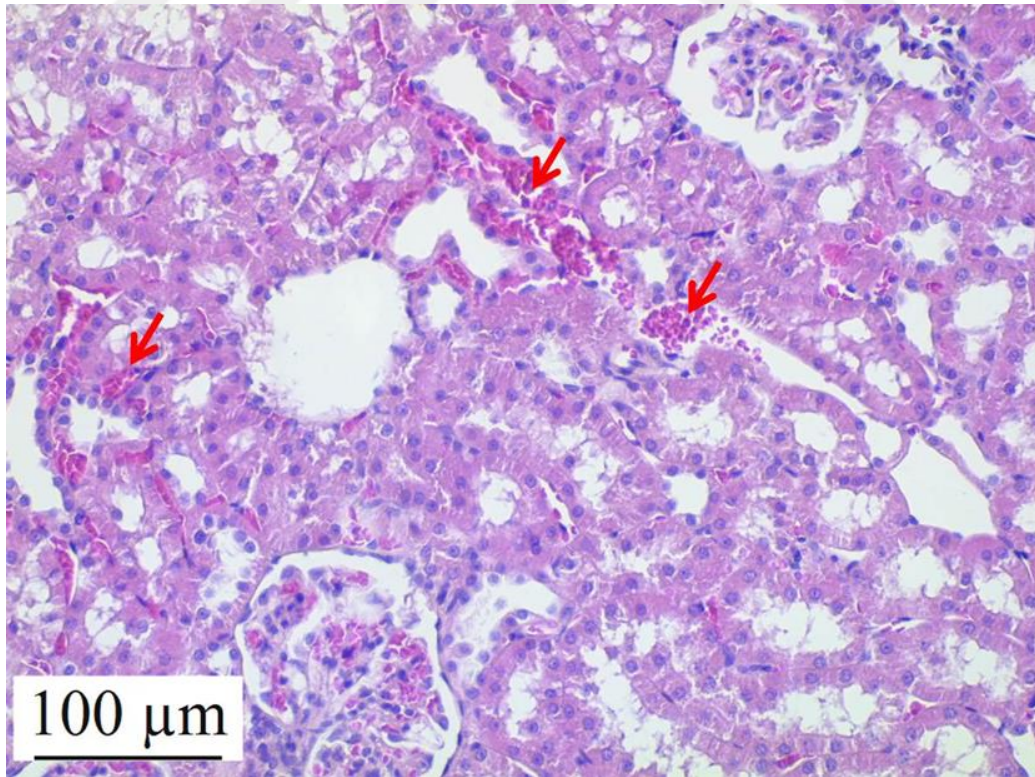
Şekil 10: NAS grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, H&E.



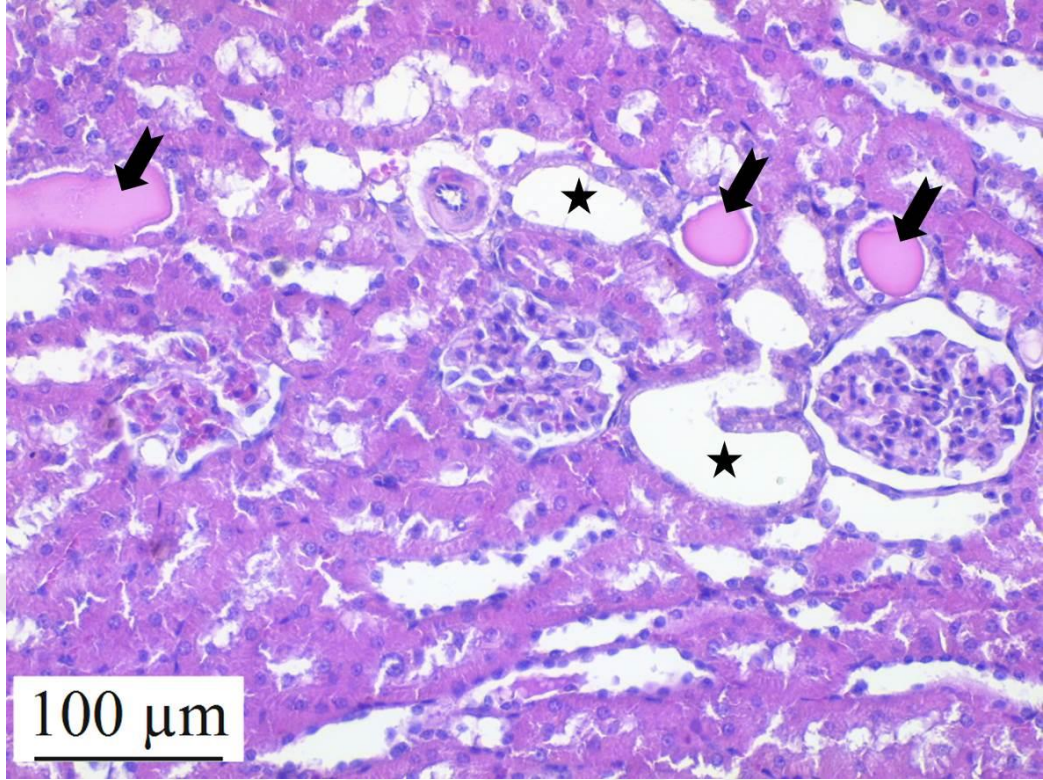
Şekil 11: NAS grubuna ait normal histolojik görünümlü böbrek dokusu, Masson trikrom.



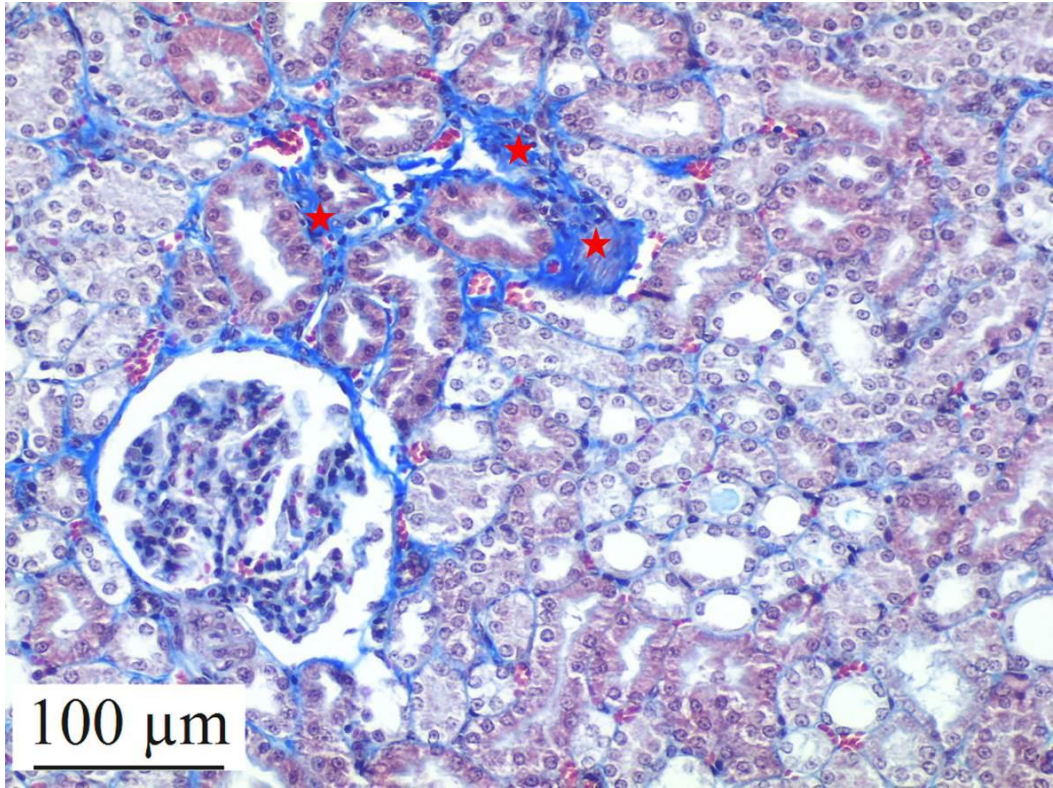
Şekil 12: ADR grubuna ait böbrek dokusu. Eritrosit ekstrasvazasyonu (kırmızı ok), tübüler vakuolizasyon (siyah ok), ödem (kahverengi yıldız), H&E.



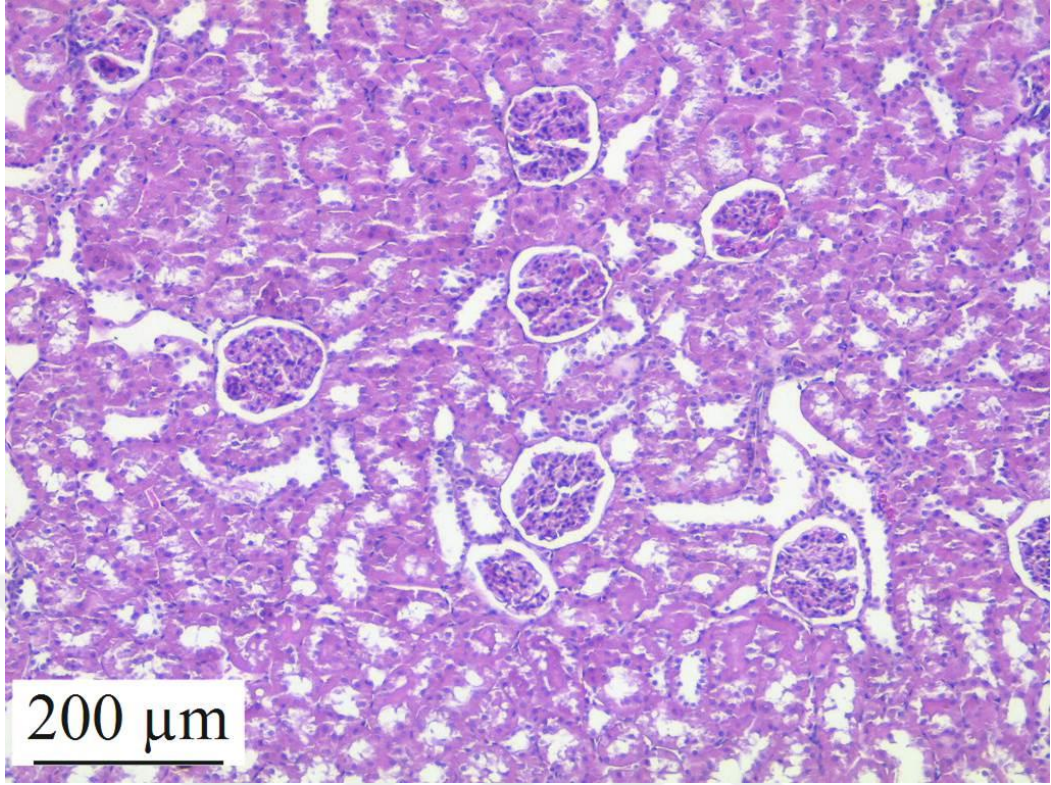
Şekil 13: ADR grubuna ait böbrek dokusu. Eritrosit ekstrasvazasyonu (kırmızı ok), H&E.



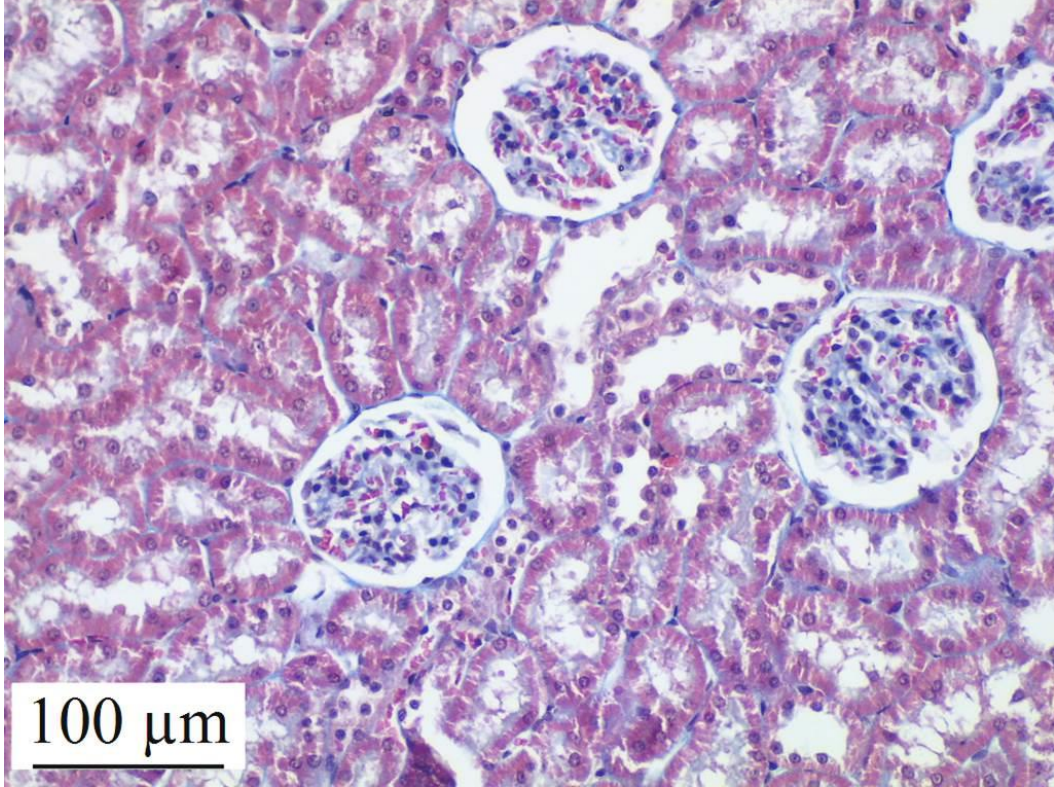
Şekil 14: ADR grubuna ait böbrek dokusu. Tübüler dilatasyon (siyah yıldız), hiyalin kast oluşumu (çentikli siyah ok), H&E.



Şekil 15: ADR grubuna ait böbrek dokusu. Fibrozis (kırmızı yıldız), Masson trikrom.



Şekil 16: ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusu. H&E.



Şekil 17: ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusu. Masson trikrom.

5.3. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği böbrek dokusunda tübüler hücrelerde (siyah ok) gözlemlendi.

Kontrol grubu (Şekil 18) ile karşılaştırıldığında NAS (Şekil 19) ($p=0.706$) grubunda TUNEL pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmezken, ADR grubunda (Şekil 20) TUNEL pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p=0.001$). ADR grubu ile karşılaştırıldığında ise ADR+NAS grubunda (Şekil 21) TUNEL pozitifliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0.006$). Tablo 8.

Tablo 8. Apoptotik İndeks (%)

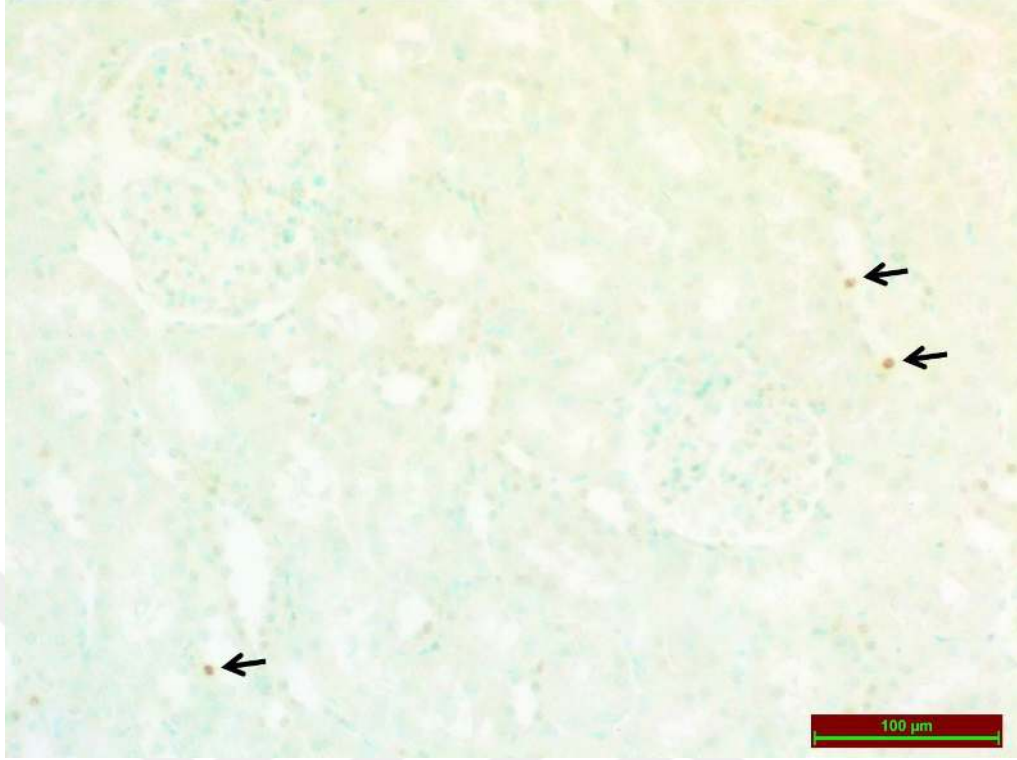
	Apoptotik İndeks (%) Median (min-max)
KONTROL	1,50(1,00-3,00)
NAS	2,00(1,00-4,00) ^b
ADR	13,50(9,00-17,00) ^a
ADR+NAS	2,00(1,00-4,00) ^b
p*	0.003

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

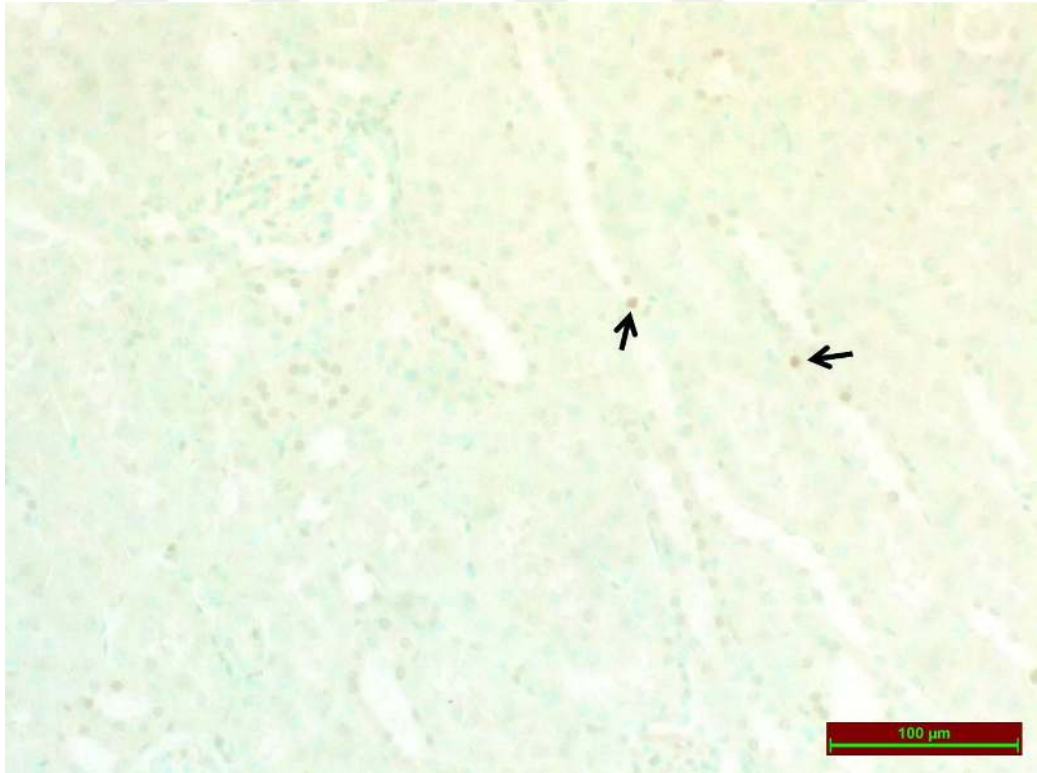
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$)

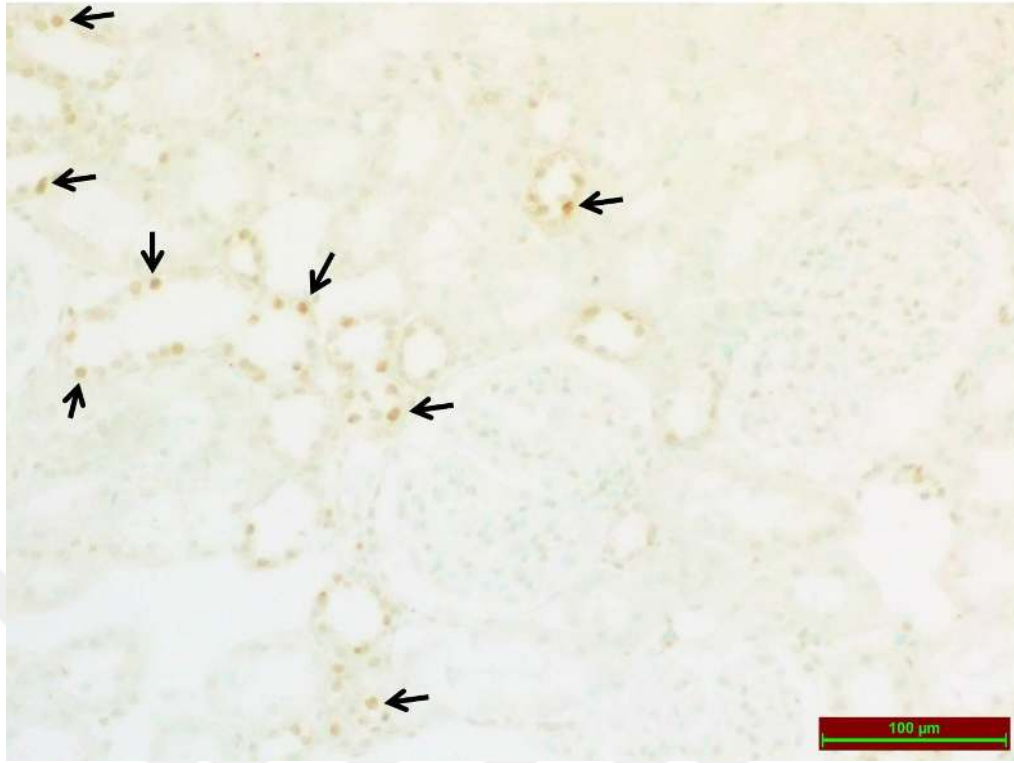
* Kruskal Wallis



Şekil 18: Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)



Şekil 19: NAS grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)



Şekil 20: ADR grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)



Şekil 21: ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (siyah ok)

5.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

SPX immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; SPX immünreaktivitesi böbrek dokusunda tübüler hücrelerde (siyah ok) gözlendi.

Kontrol grubu (Şekil 22) ile karşılaştırıldığında NAS (Şekil 23) grubunda fark izlenmezken ($p=0,75$), ADR grubunda (Şekil 24) SPX immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ($p=0.004$), ADR grubu ile karşılaştırıldığında ise ADR+NAS grubunda (Şekil 25) SPX immünreaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi ($p=0.004$). Tablo 9.

Tablo 9. Speksin immünreaktivitesi histoskoru

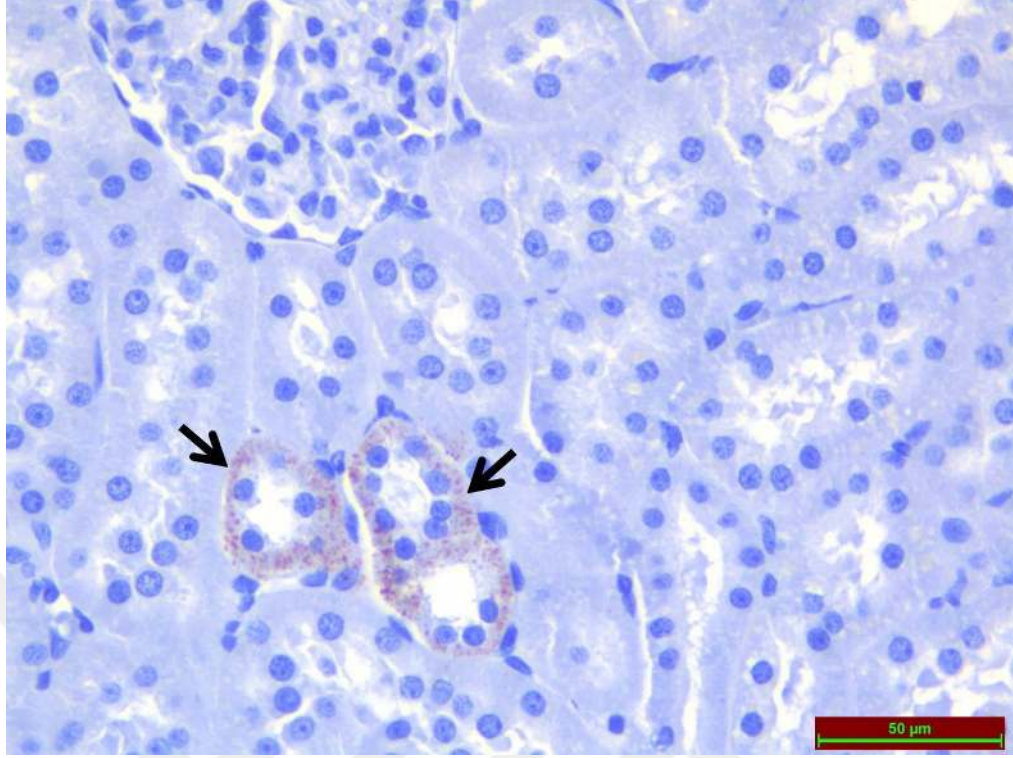
	Tübül
KONTROL	0,40(0,30-0,60)
NAS	0,37(0,20-0,60) ^b
ADR	1,20(0,90-1,80) ^a
ADR+NAS	0,45(0,20-0,60) ^b
p*	0.003

Değerler median, min-max olarak verilmiştir.

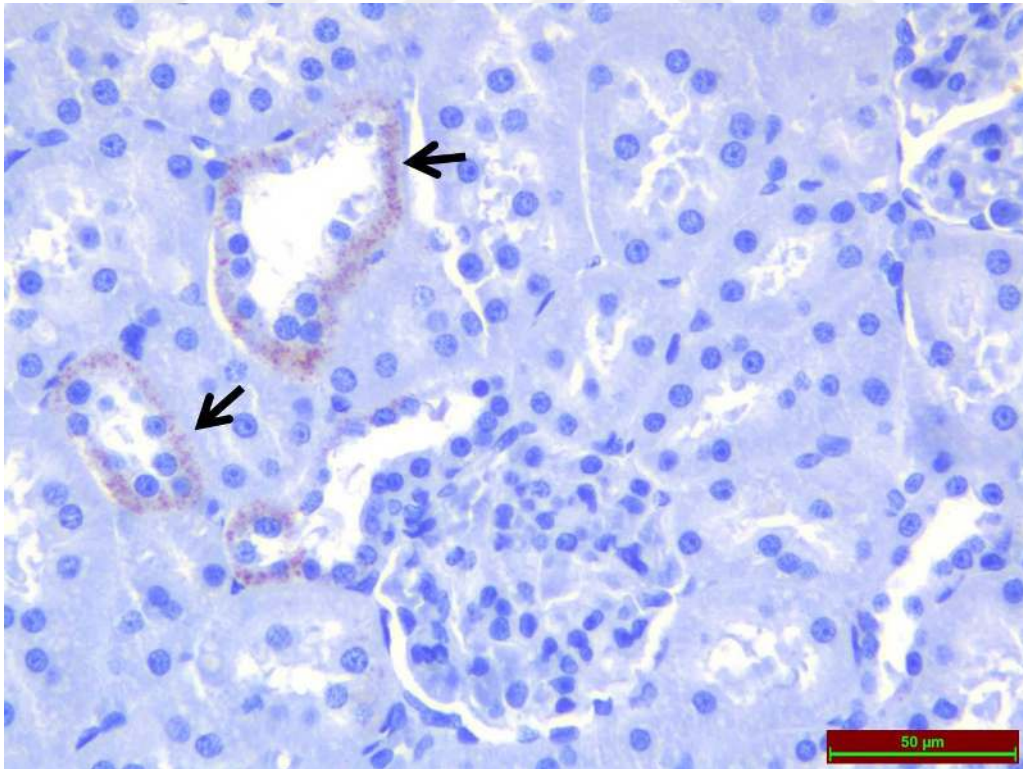
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b ADR grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$)

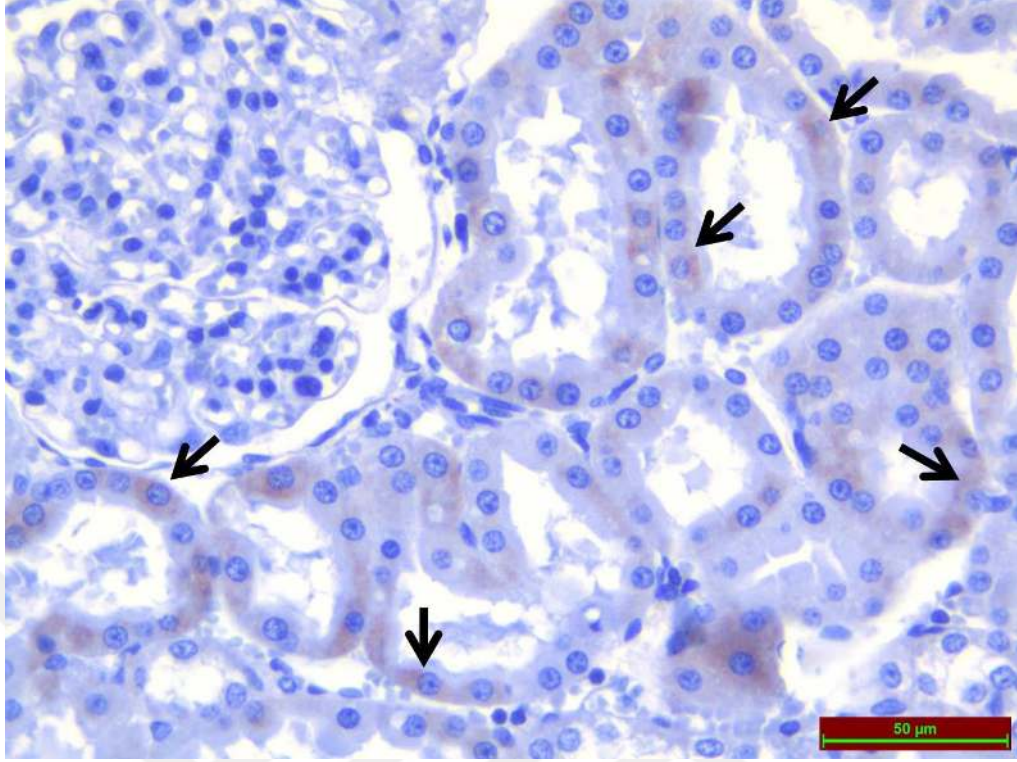
* Kruskal Wallis



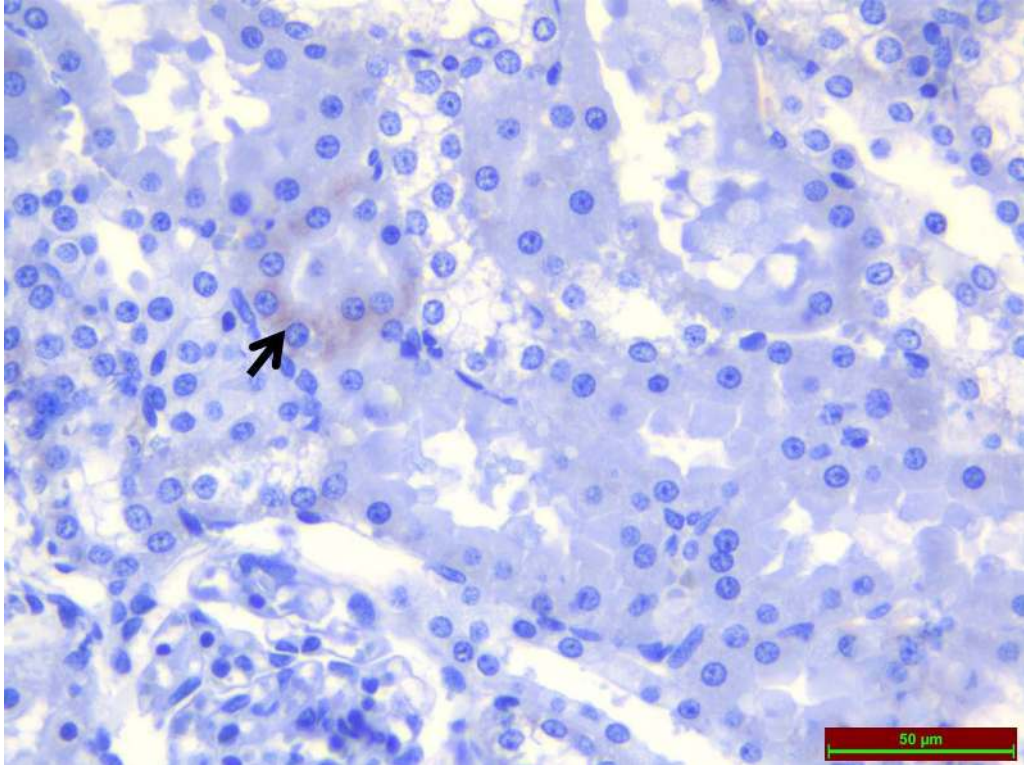
Şekil 22: Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok)



Şekil 23: NAS grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok)



Şekil 24: ADR grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok)



Şekil 25: ADR+NAS grubuna ait böbrek dokusunda Spexin immünreaktivitesi (siyah ok)

6. TARTIŞMA

Antrasiklin grubu güçlü bir ilaç olan adriamisin (ADR), hematolojik malignite, over kanseri, meme kanseri ve testis kanseri gibi farklı tipteki (86) solid tümörlere karşı önemli sitotoksik etkiye sahiptir (86). Ancak terapötik kullanımını sınırlayan böbrek dahil (87) farklı organlar üzerinde birçok toksik veya yan etki gösterdiği bilinmektedir. (88–90).

İlaça bağlı böbrek hasarı, kemoterapötik ajanların kullanımıyla ilişkili önemli bir endişe kaynağıdır. Oksidatif stres ve apoptozis ADR kaynaklı böbrek hasarının altında yatan mekanizmalardır (91,92). Oksidatif stres kaynaklı böbrek hasarı hücrel düzeyde indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) (93) gibi antioksidan enzim mekanizmaları aracılığıyla azaltılmaktadır. (94,95) Süperoksit radikali (O_2^-), SOD enzimi ile hidrojen peroksit (H_2O_2), H_2O_2 ise CAT ile H_2O ve O_2 'ye, glutatyon peroksidaz (GPx) enzimi ile H_2O 'ya dönüştürülür. Bu da reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruyucu bir rol oynamaktadır. Bu tür enzimlerin aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak da total antioksidan kapasitede azalma olmaktadır (92,96,97). Yapılan çalışmalar, total antioksidan ve oksidan dengenin bozulması ADR kaynaklı nefrotoksisitenin gelişmesini ve ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmalar, ADR verilen grupta kontrol grubuna kıyasla malondialdehid (MDA) düzeyinde önemli bir artış olmakla birlikte, CAT aktivitesinde , total antioksidan seviyelerinde (TAS) ve GSH seviyelerinde önemli ölçüde azalma olduğu bildirilmiştir (92,93) Ayrıca DNA hasarının da ADR'nin olumsuz etki mekanizmalarından biri olduğu belirtilmiştir. (98,99)

N-asetil sistein (NAS); serbest radikalleri temizlediği, lipid peroksidasyonunu (LPO) inhibe ettiği, GSH tükenmesini önlediği bilinen tiyolik bir amino asittir (100, 101). Ayrıca metal şelasyon aktivitesi ile pro-oksidan/antioksidan dengesindeki bozulmayı düzenleyebildiği ya da düzeltebildiği bilinmektedir (102). Bunun yanısıra NAS'ın, inflamasyonu ve oksidatif stresi azaltma yeteneği sayesinde nefrotoksisteye karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (103,104).

Nöropeptid Q (NPQ) olarak da adlandırılan spexin (SPX), yeni bir endojen nöropeptiddir. SPX'in beslenme davranışı, gastrointestinal motilite, obezite, diyabet, enerji metabolizması, tuz/su dengesi ve kardiyovasküler/renal fonksiyonlar gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları düzenleyici rolleri bulunmaktadır (79,105,106). Sitoplazmik SPX immünoreaktivitesi; deride, akciğerde, midede, ince bağırsakta, kolonda, karaciğerde, pankreas adacıklarında, tiroide, adrenal bezde ve böbrekte tespit edilmiştir (107). SPX'in, obezite kaynaklı böbrek fonksiyon bozukluğunda renal oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (108).

Akın ve arkadaşlarının ADR toksisitesi ile ilgili yaptıkları bir araştırmada, karaciğer dokusunda ELISA yöntemiyle TAS ve total oksidan seviyelerine (TOS) bakılmıştır. ADR grubunda TOS değerleri yükselirken, TAS değerleri ise azalmıştır (109). ADR uygulaması başka bir araştırmada ise benzer şekilde testis dokusunda TOS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırırken TAS değerlerini ise azalttığı tespit edilmiştir (110). Ayrıca yakın zamanda sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, ADR uygulamasının serumları ve böbrek dokularında TOS değerini arttırırken TAS değerini ise azalttığı rapor edilmiştir (94). Bizim çalışmamızda da ADR uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla hem böbrek dokusu hem de serum TAS değerlerinde azalma, TOS değerlerinde ise artış görüldü. Bu durum çalışmamızda ADR kaynaklı oksidatif hasarın meydana geldiğini destekler niteliktedir. Bu bulgular önceki çalışmalarda ADR'nin ROS üretimini artırdığı; böbrek, kalp, beyin, karaciğer, testis ve mesanede antioksidan sistemi zayıflattığı yönündeki sonuçlarla örtüşmektedir. Öte yandan, antioksidan savunma mekanizmalarının uyarılması, ROS'un biyolojik etkisini azaltabilmektedir (99). Bundan dolayı ADR'nin neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesi için anti-kanser özelliklerine sahip antioksidan veya anti-inflamatuar karakterdeki maddeler üzerindeki çalışmalar devam etmektedir (100).

Böbrekler, yüksek derecede vaskülarize organlar olduklarından kanda bulunan herhangi bir toksik maddeden etkilenme olasılıkları yüksektir ve bu nedenle oksidatif hasara oldukça duyarlıdırlar. Oksidatif hasar durumunda ise böbrek dokusunun çeşitli histopatolojik değişikliklere uğradığı bilinmektedir (111–113). Yapılan çalışmalarda, ADR uygulaması sonucu renal korpüskülün genişlediği, renal tübüllerin tahrip olduğu, tübüllerin epitel hücrelerinin döküldüğü

ve tübül hücrelerinin sitoplazmasında kistik yapıların oluştuğu bildirilmiştir (62,114,115). Bir başka araştırmada ise ADR uygulamasının böbrek tübüler ve glomerüler yapılarında doğrudan hasara yol açtığı; akut tübüler nekroz ve glomerüler konjesyona, tübüler dejenerasyona, fırçamsı kenar kaybına, hemorajiye, nekrotik hücrelerin proksimal ve distal tübüllerden ayrılmasına, tübüler vakuolizasyona, piknoza, intertübüler kanamaya, glomerüler tıkanıklığa ve hiyalin kastların oluşmasına neden olduğu rapor edilmiştir (116). Yapılan çalışmalar ile uyumlu şekilde bu çalışmada ADR maruziyetinin böbrek dokusunda; ödem, hiyalin kast oluşumu, tübüler dilatasyon, fibrozis, tübüler vakuolizasyon ve eritrosit ekstrasvazasyonu gibi histopatolojik değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir.

ADR kaynaklı toksisitesinin patolojik temellerinin oksidatif stres ve apoptozis olduğu daha önce belirtilmiştir (117). Böbrek dokusunda, ADR grubunun tübüler epitel hücrelerinde TUNEL metoduyla yaygın apoptoz bulguları da başka bir çalışmada bildirilmiştir (118). Literatür ile uyumlu bir biçimde bu çalışmada ise ADR grubunun böbrek dokusunda TUNEL metodu ile apoptotik hasara yol açtığı tespit edildi.

N-asetil sistein tedavisi anti-oksidan savunma sistemi, ROS'un toksik etkisine karşı koruma sağlamak için öncelikle katalaz, GPx ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimler aracılığıyla olmaktadır (119). Birkaç çalışma NAS'ın vankomisin, gentamisin, siklofosamid, lityum, sisplatin ve kontrast madde gibi çeşitli ajanların bir sonucu olarak yükselmiş ROS'un neden olduğu nefrotoksisitenin etkilerini azalttığını öne sürmüşlerdir (120,121).

Yapılan çalışmalarla 150 mg/kg dozundaki ADR uygulamasının sonrasında verilen (122) NAS'ın serbest radikalleri uzaklaştırarak, ADR'ye bağlanarak ve biyoyararlanımını azaltarak, endojen antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek ve ADR'nin neden olduğu zararlı etkilerin çoğunu azalttığını bildirmişlerdir (120,123). Çalışmamızda ADR grubuna göre ADR-NAS grubunda hem böbrek dokusunda hem de serumda TOS değerlerinin azalıp, TAS değerlerinin artmasını NAS'ın antioksidan etkisi ile ilişkilendirmekteyiz. Yalçın' nın yaptığı çalışmada bu verileri destekler biçimde NAS'ın oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği bildirmiştir (124). Yapılan bir başka böbrek hasarı çalışmasında da NAS

tedavisinin serum örneklerinde istatistiksel olarak TOS seviyelerini azaltarak TAS seviyelerini artırdığını belirtmiştir (125).

Bir çalışmada ise 7, 14, 21 ve 28. günlerde dört hafta boyunca haftada bir 4 mg/kg dozundaki ADR (ip) uygulamasının beyin toksisitesine neden olduğunu ve NAS'ın 100 mg/kg dozundaki uygulanmasının ADR uygulamasının neden olduğu inflamasyon ve oksidatif strese karşı koruma sağlayabildiğini bildirmiştir (120). Yapılan başka bir araştırmada fenintrithinon toksisitesine (FNT) karşı 28 gün boyunca 200mg/kg dozunda oral gavaj ile verilen NAS tedavisi sonucunda FNT-NAS ile tedavi edilen sıçanların böbrek dokusunda; kast oluşumu, epitel hücre vakuolizasyonları, hafif peritübüler kanamalar, tübüler dilatasyon ve interstisyel kapillerlerin vasküler konjesyonunda normal histolojik tabloya gelmese de belirtilen hasarlarda renal parankimde önemli bir iyileşme olduğunu söylemiştir (121). Ayrıca başka bir araştırmada da ışık mikroskopi incelenmesinde böbrek dokusunda, diyabetes mellitus (DM) grubuna kıyasla DM + NAS grubunda önemli ölçüde azalmış tübül genişlemesi ve glomerüler atrofi de gerileme olduğunu bildirmiştir (124). Çalışmamızda da ADR grubu ile kıyaslandığında ise ADR+NAS grubunda histopatolojik ve TUNEL bulgularında anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Ayrıca ADR grubuna göre bu durum ADR ile oluşan böbrek hasarına karşı uygulanan NAS'ın oksidatif stresi azaltarak dokuda koruyucu etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır.

Böbrekler, enerji ve lipid metabolizmasında önemli rol oynaması ve birçok fonksiyonel görevleri yerine getirmesi ve hasarlanmasında birçok mekanizmanın etkili olması böbrek üzerinde multidisipliner çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Başta tip II diyabet, metabolik sendrom, hipertansiyon gibi hastalıkların patofizyolojisinde değişikliğe uğradığı bilinen adipokinlerin çeşitli inflamatuvar ajanların etkinliklerinde de rol oynadığı bilinmektedir. İnflamatuvar ajanların etkinliklerinde sebep oldukları değişikliklerin de böbrek gibi birçok dokuda patofizyolojik süreçleri uyarabileceği düşünülmektedir (126).

Çeşitli patofizyolojik ve histopatolojik durumlarda SPX immünreaktivitesinin ve serum/doku SPX düzeylerinin nasıl değiştiğine dair literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (81,129). Son zamanlarda yapılan

alışmalar SPX seviyelerinin inflamatuvar süreci etkilediğini göstermektedir. SPX tedavisinin, sitokin ve kemokin düzeylerini sınırlayarak kronik böbrek yetmezliğinde inflamatuvar yanıtı ortaya çıkardığını göstermişlerdir. Bu bulgular, bu peptitidin çoğunlukla lökositlerin sitokin ekspresyonunun ilk savunmasına karşı anti-inflamatuvar yanıtı etkilediğini göstermişlerdir (130). Başka bir çalışmada, SPX, obezitenin neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğuunda, renal oksidatif stresi ve inflamasyonu iyileştirdiğini belirtmişlerdir (108). Ek olarak, son araştırmalar bu hormonun iltihaplanma sürecini etkilediğini bildirmiştir, ancak bu yönü hala daha az netlik göstermektedir (131).

Yüksek yağ/fruktoz diyeti ile yapılan dört haftalık yapılan bir araştırmada SPX tedavisinin azalan GSH düzeyini ve histopatolojik bulgularını belirgin şekilde düzelttiğini belirtmiştir (108). SPX'in yakın zamanda galanın (Gal) ve kisspeptin (Kiss) ile birlikte ilişkilendirilmesi ve Gal/Kiss peptid ailesinin bir yesi olarak sınıflandırılması önerilmiştir (132). Spexin, galanın reseptörü tip 2 (GALR2) ve 3' (GALR3) hedef hücrelerde aktive etmektedir (132). Böylece bu peptit, beslenme, enerji dengesi, lipid depolama, arteriyel kan basıncı, tuzlu su dengesi ve kardiyorenal tepkiler gibi birçok fizyolojik işlevi modüle etmektedir (73,79,84). Adenin hemislfat ile oluşturan kronik böbrek hasarı ile ilgili bir araştırmada SPX tedavi olarak verilmiştir. Bu çalışmada biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri göreceli olarak azalttığını söylemiştir (133).

Bizim alışmamızda literatüre dayanılarak ADR'nin enerji metabolizması ve dolayısıyla lipid metabolizması üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği ve bundan dolayı böbreklerde meydana gelen hasara bağlı antioksidan etkisi olduğu bilinen SPX immünreaktivitesinin kompensatuvar olarak artabileceğini ve tedavi olarak verilen NAS 'ın böbrek hasarını önleyerek SPX salınımını düşürdüğünü düşünmekteyiz.

Speksin; organizma üzerindeki etkilerini pek çok reseptör üzerinden yapmakta ve organdan organa değişen farklı cevaplar oluşturmaktadır. Örneğin GALR2'reseptörleri, SPX'in yüksek yağ/yüksek fruktoz diyetinin neden olduğu böbrek fonksiyon bozukluğu üzerindeki koruyucu etkilerine aracılık ederken C/ebp-β reseptörleri, SPX aktivasyonlu endoplazmik retikulum stresinin

uyarılmasına aracılık eder (127–129). Yine MAPK; SPX'in insülin, glukoz ve CRF (kortikotropin releasing faktör) tarafından düzenlenmesinde rol oynamakta olup intraperitoneal insülin enjeksiyonları MAPK 3/6, p38 ve fosfoinositid 3-kinaz/protein kinaz B'ye bağlı olarak hipotalamusta Spx'i yükseltirken aksine aynı reseptörler üzerinden midede Spx 'i azaltmaktadır (130,131). Bilindiği gibi mitojenle aktive olan MAPK'ler; inflamasyon, apoptoz, proliferasyon ve otofaji üzerine etkili yolaklardır (132–134). Bu çalışmada ise ADR grubu böbrek dokularında SPX ekspresyonu artmıştı ve bu artış, organizmanın hasara karşı defansif etkisi olarak değerlendirildi. Ancak bunun kesin bir sonuç olduğu söylenemez. Çünkü ADR/ SPX ilişkisine dair literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebeple konu ile ilgili, daha geniş serilerde yapılacak çalışmalar ADR/SPX arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta daha yol gösterici olacaktır.

Bununla birlikte SPX ile yapılan çalışmalarda antioksidan etkisinin olduğu gösterilmiştir. ADR uygulamasının oluşturduğu oksidatif hasara karşı SPX seviyesinin böbrek dokusunda artarak oksidatif hasarı azaltmaya yönelik aktivasyon olabileceği düşünülebilir.

Sonuç olarak;

Adriamisin uygulamasının TOS, apoptozis ve Speksin seviyelerini arttırdığı,

Tedavi olarak verilen NAS ın TOS, apoptozis ve Speksin seviyelerini azalttığı,

Speksinin ADR ye bağlı oluşabilen böbrek hasarının patogenezinde rolünün olabileceği,

Gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla, ADR ye bağlı oluşabilen böbrek hasarı ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, böbrek hasarının oluşumunu önlemek ve/veya tedavi etmek amacıyla Speksin ile ilişkili tedavi yaklaşımları da denenebileceği kanaatine varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Sutherland MR. Introduction to a special issue on kidney development and disease. *Anat Rec.* 2020;303(10):2507–10.
2. Karabekir NÇ. Sağlık bilimlerine yönelik anatomi. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri; 2019. 155–158 p.
3. Arıncı, K., Elhan A. Üriner System. Cilt 1. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevleri; 2001.
4. Erken E AS. Böbrek Fizyopatolojisi. In: Arınsoy T, Güngör Ö KÇ, editor. *Reaktif*; 2017. p. 147–58.
5. Wood D, Greenwell T. Surgical anatomy of the kidney and ureters. *Surg.* 2010;28(7):314–6. Doi:10.1016/j.mpsur.2010.04.009
6. Ahmet Ç. Anatomi. Bursa: Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayınları; 1994. 436–442. p.
7. Arıncı K EA. Anatomi. In: 5th ed. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2014. p. 311–6.
8. Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: Juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol.* 2017;30(2):125–33.
9. Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi. Dalçık, H., Yıldırım M, editor. Nobel Tıp Kitapevleri; 2009. 244–256. p.
10. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. 1st ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2017.
11. Carlson BM. Human Embryology and Developmental Biology. Fifth. Elsevier Saunders; 2014.
12. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer P., Francis-West. PH. Larsen's Human Embryology. FIFTH. Elsevier; 2015.
13. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before We are born Essentials of Embryology and Birth Defects. Ninth. Elsevier; 2015.
14. Reidy KJ, Rosenblum, D. N. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol.* 2009;29(4):321–37.
15. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. 13th ed. Ankara: Palme Yayınevi; 2020.
16. Micu C, Micu B, Schmidt A, Miu N. Anatomy and ontogeny of kidney development. *Int J Bioflux Soc.* 2010;5(1):34–9.
17. Ross, M.H., Pawlina W. Histoloji Konu anlatımı ve Atlas. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2014.
18. Gartner L. Textbook of histology. FOURTH. Elsevier; 2017.
19. Eşrefoğlu M. Histoloji Atlası. 1st ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2018.
20. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2nd ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2016.
21. Ross MH, Pawlina W. Histology: A TEXT AND ATLAS. Seventh. 2016.
22. Eroschenko VP. DiFiore Histoloji Atlası. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2013.
23. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. İstanbul: Palme Yayıncılık; 2020.
24. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 3rd ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitapevleri; 2021.

25. Tanyolaç A. Özel Histoloji. Ankara: Yorum Basım Yay San ęti,; 1999. 121-130. p.
26. Luiz Carlos, J. Carneiro. TEMEL Histoloji text and atlas. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009.
27. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 3rd ed. Elsevier; 2006.
28. Ahmet G, B A, N L, N Ö, N G, Z Ö, et al. Veteriner Özel Histoloji. 1st ed. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2008.
29. Solakoğlu S. Junqueira Temel Histoloji. 14th ed. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2019.
30. Köylü H. Klinik Anlatımlı Tıbbi Fizyoloji. 2nd ed. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2016.
31. Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. 13th ed. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri; 2017.
32. Sequeira Lopez MLS, Gomez RA. Development of the renal arterioles. J Am Soc Nephrol. 2011;22(12):2156–65.
33. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The glomerulus: The sphere of influence. Clin J Am Soc Nephrol. 2014;9(8):1461–9.
34. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacogn Rev. 2010;4(8):118–26.
35. Aslankoç R, Demirci D, İnan Ü, Yıldız M, Öztürk A, Çetin M, et al. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). SDÜ Tıp Fakültesi Derg. 2020;26(3):362–9.
36. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Vol. 94, Archives of Toxicology. 2020. 651–715 p.
37. Dogru A. Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres Active Oxygen Species and Oxidative Stress in Plants Giriş Diğer aerobik organizmalar gibi bitkiler de etkili bir şekilde enerji üretebilmek için. 2020;3(2):205–26.
38. Mitra AK. Antioxidants: A Masterpiece of Mother Nature to Prevent Illness. J Chem Rev. 2020;2(4):243–56. Doi: http://www.jchemrev.com/article_112730.html
39. Sinee W, Siriwan T, Phanupong P, Praavit A. Glutathione and its antiaging and antimelanogenic effects. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2017;147–53.
40. Sedlak TW, Paul BD, Parker GM, Hester LD, Snowman AM, Taniguchi Y, et al. The glutathione cycle shapes synaptic glutamate activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(7):2701–6.
41. Banerjee S, Ecavade A, Rao AR. Modulatory influence of sandalwood oil on mouse hepatic glutathione S-transferase activity and acid soluble sulphhydryl level. Cancer Lett. 1993;68(2–3):105–9.
42. Shahidi F, Zhong Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. Eur J Lipid Sci Technol. 2010;112(9):930–40.
43. Tomatır, Gaye A. Apoptoz : Programlı Hücre Ölümü. 2003;499–508.
44. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4):239–57.

45. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
46. Martins-Teixeira MB, Carvalho I. Antitumour Anthracyclines: Progress and Perspectives. *ChemMedChem.* 2020;15(11):933–48.
47. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: A basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds.* 2005;4(3):138–44.
48. Cohen JJ. Programmed Cell Death in the Immune System. *Adv Immunol.* 1991;50(C):55–85.
49. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194–206.
50. Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nat Rev Immunol.* 2014 Mar 31;14(3):166–80. Doi: <http://www.nature.com/articles/nri3607>
51. Wetzel BW, D.R. G. Detection of apoptosis by annexin V labeling. In: *Methods In Enzymology.* 2000. p. 15–8.
52. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2405–19.
53. Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(7):395–417. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0341-y>
54. Oppenheim RW, Flavell RA, Vinsant S, Prevette D, Kuan CY, Rakic P. Programmed cell death of developing mammalian neurons after genetic deletion of caspases. *J Neurosci.* 2001;21(13):4752–60.
55. Dickson DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: Cause or effect? *J Clin Invest.* 2004;114(1):23–7.
56. Lu P. Monitoring cardiac function in patients receiving doxorubicin. *Semin Nucl Med.* 2005;35(3 SPEC. ISS.):197–201.
57. Allen BD, Apodaca LA, Syage AR, Markarian M, Baddour AAD, Minasyan H, et al. Attenuation of neuroinflammation reverses Adriamycin-induced cognitive impairments. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):1–15.
58. Ashley J. Smuder. Exercise stimulates beneficial adaptations to diminish doxorubicin-induced cellular toxicity. *Ayan.* 2019;8(5):55.
59. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology.* 2011;16(1):30–8.
60. Smuder AJ. Exercise stimulates beneficial adaptations to diminish doxorubicin-induced cellular toxicity. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2019;317(5):R662–72.
61. Gou W, Ma T, Wu Q, Lei Q, Zhang P. Ursolic Acid Attenuates Renal Injury Induced by Adriamycin in Mice. *Yangtze Med.* 2019;03(04):261–70.
62. Xie K, Zhu M, Xiang P, Chen X, Kasimumali A, Lu R, et al. Protein Kinase A/CREB Signaling Prevents Adriamycin-Induced Podocyte Apoptosis via Upregulation of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Mol Cell Biol.* 2018;38(1).

63. Zakaria N, Khalil SR, Awad A, Khairy GM. Quercetin Reverses Altered Energy Metabolism in the Heart of Rats Receiving Adriamycin Chemotherapy. *Cardiovasc Toxicol*. 2018;18(2):109–19.
64. Han P, Yuan C, Wang Y, Wang M, Weng W, Zhan H, et al. Niclosamide ethanolamine protects kidney in adriamycin nephropathy by regulating mitochondrial redox balance. *Am J Transl Res*. 2019;11(2):855–64.
65. Li A, Zhang W, Zhang L, Liu Y, Li K, Du G, et al. Elucidating the time-dependent changes in the urinary metabolome under doxorubicin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett*. 2020;319:204–12.
66. Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):114–22.
67. Yalçın T, Kaya S, Boydak M. Sağlık bilimleri alanında araştırma ve değerlendirmeler. *Gece Akademi*; 2019. 311–320 p.
68. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(7–8):717–24.
69. Wu J, Xiao S, Yuan M, Li Q, Xiao G, Wu W, et al. PARP inhibitor re-sensitizes Adriamycin resistant leukemia cells through DNA damage and apoptosis. *Mol Med Rep*. 2019;19(1):75–84.
70. Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity: Overview of the Roles of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
71. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):36–41.
72. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6(2):99–104.
73. Lv SY, Zhou YC, Zhang XM, Chen WD, Wang YD. Emerging roles of NPQ/Spexin in physiology and pathology. *Front Pharmacol*. 2019;10(MAY).
74. Lv X, Yu X, Wang Y, Wang F, Li H, Wang Y, et al. Berberine Inhibits Doxorubicin-Triggered Cardiomyocyte Apoptosis via Attenuating Mitochondrial Dysfunction and Increasing Bcl-2 Expression. *PLoS One*. 2012;7(10).
75. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Kulaputana O, Klaikeaw N. N-acetylcysteine attenuates oxidative stress and liver pathology in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*. 2007;13(38):5127–32.
76. Šalamon Š, Kramar B, Marolt TP, Poljšak B, Milisav I. Medical and dietary uses of n-acetylcysteine. *Antioxidants*. 2019;8(5):1–16.
77. Lasram MM, Dhouib IB, Annabi A, El Fazaa S, Gharbi N. A review on the possible molecular mechanism of action of N-acetylcysteine against insulin resistance and type-2 diabetes development. *Clin Biochem*. 2014;48(16–17):1200–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.04.017>

78. Mirabeau O, Perlas E, Severini C, Audero E, Gascuel O, Possenti R, et al. Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. *Genome Res.* 2007;17(3):320–7.
79. Walewski JL, Ge F, Lobdell IV H, Levin N, Schwartz GJ, Vasselli JR, et al. Spexin is a novel human peptide that reduces adipocyte uptake of long chain fatty acids and causes weight loss in rodents with diet-induced obesity. *Obesity.* 2014;22(7):1643–52.
80. Rucinski M, Porzionato A, Ziolkowska A, Szyszka M, Macchi V, De Caro R, et al. Expression of the spexin gene in the rat adrenal gland and evidences suggesting that spexin inhibits adrenocortical cell proliferation. *Peptides.* 2010;31(4):676–82. Doi: [http:// dx. doi. org/10.1016/j.peptides.2009.12.025](http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.12.025)
81. Porzionato A, Rucinski M, Macchi V, Stecco C, Malendowicz LK, De Caro R. Spexin expression in normal rat tissues. *J Histochem Cytochem.* 2010;58(9):825–37.
82. Sonmez K, Zaveri NT, Kerman IA, Burke S, Neal CR, Xie X, et al. Evolutionary sequence modeling for discovery of peptide hormones. *PLoS Comput Biol.* 2009;5(1).
83. Wang X wan, Tian R min, Yang Y qi, Wang K, Li E nian, Han X dong, et al. Tripterygium glycoside fraction n2 ameliorates adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats by suppressing apoptosis. *J Ethnopharmacol.* 2020;257(January):112789. Doi :<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112789>
84. Toll L, Khroyan T V., Sonmez K, Ozawa A, Lindberg I, McLaughlin JP, et al. Peptides derived from the prohormone proNPQ/spexin are potent central modulators of cardiovascular and renal function and nociception. *FASEB J.* 2012;26(2):947–54.
85. Liu Y, Sun L, Zheng L, Su M, Liu H, Wei Y, et al. Spexin protects cardiomyocytes from hypoxia-induced metabolic and mitochondrial dysfunction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020;393(1):25–33.
86. Karna KK, Choi BR, You JH, Shin YS, Soni KK, Cui WS, et al. Cross-talk between ER stress and mitochondrial pathway mediated adriamycin-induced testicular toxicity and DA-9401 modulate adriamycin-induced apoptosis in Sprague-Dawley rats. *Cancer Cell Int.* 2019;19(1):1–11. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0805-2>
87. Molehin OR, Adeyanju AA, Adefegha SA, Oyeyemi AO, Idowu KA. Protective mechanisms of protocatechuic acid against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rat model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2019;30(4):1–10.
88. Nasr AY. The impact of aged garlic extract on adriamycin-induced testicular changes in adult male Wistar rats. *Acta Histochem.* 2017;119(6):648–62. Doi: [http://dx.doi. org/10.1016/j.acthis.2017.07.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.006)
89. Ateşşahin A, ürk GT, Karahan I, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Bulmuş Ö. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril.* 2006;85(SUPPL. 1):1216–22.
90. Armstrong J, Dass CR. Doxorubicin Action on Mitochondria: Relevance to Osteosarcoma Therapy? *Curr Drug Targets.* 2018;19(5):432–8. Doi: [http://www. eurekaselect. com/130412/article](http://www.eurekaselect.com/130412/article)

91. Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojima M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. *Life Sci.* 2005;76(13):1439–53.
92. Sahyon HA, Al-Harbi SA. Chemoprotective role of an extract of the heart of the Phoenix dactylifera tree on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity by regulating apoptosis, oxidative stress and PD-1 suppression . Vol. 135, *Food and Chemical Toxicology*. Elsevier Ltd; 2020. 111045 p. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111045>
93. Hussain MA, Abogresha NM, Abdelkader G, Hassan R, Abdelaziz EZ, Greish SM. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Crocin Ameliorate Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2021;2021:7–9.
94. Koc S, Aktas A, Sahin B, Ozkaraca M. Protective Effect of Melatonin and Mycophenolate Mofetil Against Nephrotoxicity Induced by Tacrolimus in Wistar Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2022;28(1):67–74.
95. Jambhulkar S, Deshiredy S, Jestadi DB, Periyasamy L. Quercetin Attenuating Doxorubicin Induced Hepatic , Cardiac and Renal Toxicity in Male Albino Wistar Rats. *Am J Phytomedicine Clin Ther.* 2014;2 (8)::985-1004.
96. Berthiaume JM, Wallace KB. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(1):15–25.
97. Nagai K, Fukuno S, Otani K, Nagamine Y, Omotani S, Hatsuda Y, et al. Prevention of Doxorubicin-Induced Renal Toxicity by Theanine in Rats. *Pharmacology.* 2018;101(3–4):219–24.
98. Carvalho C, Santos R, Cardoso S, Correia S, Oliveira P, Santos M, et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr Med Chem.* 2009;16(25):3267–85.
99. Alshabanah OA, Hafez MM, Al-Harbi MM, Hassan ZK, Al Rejaie SS, Asiri YA, et al. Doxorubicin toxicity can be ameliorated during antioxidant L-carnitine supplementation. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(6):428–33.
100. Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj .* 2013;1830(8):4117–29. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.016>.
101. Abdel-Wahab WM, Moussa FI. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine against cisplatin-induced toxicity in rat brain by modulation of oxidative stress and inflammation. *Drug Des Devel Ther.* 2019;13:1155–62.
102. Giampreti A, Lonati D, Ragghianti B, Ronchi A, Petrolini VM, Vecchio S, et al. N-Acetyl-Cysteine as Effective and Safe Chelating Agent in Metal-on-Metal Hip-Implanted Patients: Two Cases. *Case Rep Orthop.* 2016;2016:1–7.

103. Bhatti J, Nascimento B, Akhtar U, Rhind SG, Tien H, Nathens A, et al. Systematic review of human and animal studies examining the efficacy and safety of N-acetylcysteine (NAC) and N-Acetylcysteine Amide (NACA) in traumatic brain injury: Impact on neurofunctional outcome and biomarkers of oxidative stress and inflammation. *Front Neurol.* 2018;8(JAN).
104. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov A V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: Mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.* 2014;4(2):108–22.
105. Sorrentino D, Robinson RB, Kiang CL, Berk PD. At physiologic albumin/oleate concentrations oleate uptake by isolated hepatocytes, cardiac myocytes, and adipocytes is a saturable function of the unbound oleate concentration. Uptake kinetics are consistent with the conventional theory. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1325–33.
106. Spector AA, Fletcher JE, Ashbrook JD. Analysis of Long-Chain Free Fatty Acid Binding to Bovine Serum Albumin by Determination of Stepwise Equilibrium Constants. *Biochemistry.* 1971;10(17):3229–32.
107. Gu L, Ma Y, Gu M, Zhang Y, Yan S, Li N, et al. Spexin peptide is expressed in human endocrine and epithelial tissues and reduced after glucose load in type 2 diabetes. *Peptides.* 2015;71:232–9.
108. El-Saka MH, Abo El Gheit RE, El Saadany A, Alghazaly GM, Marea KE, Madi NM. Effect of spexin on renal dysfunction in experimentally obese rats: potential mitigating mechanisms via galanin receptor-2. *Arch Physiol Biochem.* 2021;0(0):1–10. Doi: <https://doi.org/10.1080/13813455.2021.1887265>
109. Akin AT, Öztürk E, Kaymak E, Karabulut D, Yakan B. Therapeutic effects of thymoquinone in doxorubicin-induced hepatotoxicity via oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2021;50(6):908–17.
110. Öztürk E, Kaymak E, Akin AT, Karabulut D, Ünsal HM, Yakan B. Thymoquinone is a protective agent that reduces the negative effects of doxorubicin in rat testis. *Hum Exp Toxicol.* 2020;39(10):1364–73.
111. Gurel A, Atli H, Kaya N, Onalan E, Kuloglu T, Aygen B. Effects of vitamin D on kidney histology and trpv1 channels in doxorubicin-induced nephropathy. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(8):13548–55.
112. Owumi SE, Lewu DO, Arunsi UO, Oyelere AK. Luteolin attenuates doxorubicin-induced derangements of liver and kidney by reducing oxidative and inflammatory stress to suppress apoptosis. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40(10):1656–72.
113. Altinoz E, Oner Z, Elbe H, Uremis N, Uremis M. Linalool exhibits therapeutic and protective effects in a rat model of doxorubicin-induced kidney injury by modulating oxidative stress. *Drug Chem Toxicol.* 2021;0(0):1–7. Doi: <https://doi.org/10.1080/01480545.2021.1894751>.
114. Öz E, İlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem.* 2006;286(1–2):11–5.

115. Mansouri E, Assarehzadegan MA, Nejad-Dehbashi F, Kooti W. Effects of Pravastatin in adriamycin-induced nephropathy in rats. *Iran J Pharm Res.* 2018;17(4):1413–9.
116. Amarasiri SS, Attanayake AP, Arawawala LDAM, Jayatilaka KAPW, Mudduwa LKB. Protective effects of three selected standardized medicinal plant extracts used in Sri Lankan traditional medicine in adriamycin induced nephrotoxic Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2020;259:1–49.
117. Horenstein MS, Vander Heide RS, L'Ecuyer TJ. Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1–2):436–44.
118. Altınkaynak Y, Kural B, Akcan BA, Bodur A, Özer S, Yuluğ E, et al. Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;108(September):1524–34.
119. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13(1):76–86.
120. Mohammed WI, Radwan RA, Elsayed HM. Prophylactic and Ameliorative Effect of N-Acetylcysteine on Doxorubicin-Induced Neurotoxicity in Wister Rats. *Egypt J Basic Clin Pharmacol.* 2019;9:1–13.
121. Galal AAA, Ramadan RA, Metwally MMM, El-Sheikh SMA. Protective effect of N-acetylcysteine on fenitrothion-induced toxicity: The antioxidant status and metabolizing enzymes expression in rats. *Ecotoxicol Environ Saf [Internet].* 2019;171(September 2018):502–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.004>
122. Yao H, Cai ZY, Sheng ZX. NAC attenuates adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats through regulating TLR4 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(8):1938–43.
123. Kitamura Y, Ushio S, Sumiyoshi Y, Wada Y, Miyazaki I, Asanuma M, et al. N-Acetylcysteine Attenuates the Anxiety-Like Behavior and Spatial Cognition Impairment Induced by Doxorubicin and Cyclophosphamide Combination Treatment in Rats. *Pharmacology.* 2021;106(5–6):286–93.
124. Yalçın A, Gürel A. Effects of N-acetylcysteine on kidney tissue, matrix metalloproteinase-2, irisin and oxidative stress in a diabetes mellitus model. *Biotech Histochem.* 2021;96(8):616–22. Doi: <https://doi.org/10.1080/10520295.2021.1883738>
125. KARABAĞ F, Özkan E. Paresetamol idüklü nefrotoksisite modelinde Borun antioksidan kapasite ve eser element seviyeleri üzerine etksi. *Vet Hekimler Derneği Derg.* 2020;91(1):25–35.
126. Gehrke N, Biedenbach J, Huber Y, Straub BK, Galle PR, Simon P, et al. Voluntary exercise in mice fed an obesogenic diet alters the hepatic immune phenotype and improves metabolic parameters – an animal model of life style intervention in NAFLD. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–13.

127. Reyes-Alcaraz A, Lee YN, Son GH, Kim NH, Kim DK, Yun S, et al. Development of spexin-based human galanin receptor type II-specific agonists with increased stability in serum and anxiolytic effect in mice. *Sci Rep.* 2016;6:1–10. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21453>.
128. Yun S, Reyes-Alcaraz A, Lee YN, Yong HJ, Choi J, Ham BJ, et al. Spexin-based galanin receptor type 2 agonist for comorbid mood disorders and abnormal body weight. *Front Neurosci.* 2019;13(APR):1–11.
129. Chiribau C-B, Gaccioli F, Huang CC, Yuan CL, Hatzoglou M. Molecular Symbiosis of CHOP and C/EBP β Isoform LIP Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2010;30(14):3722–31.
130. Chen Y, He M, Lei MML, Ko WKW, Lin C, Bian Z, et al. Mouse Spexin: (III) Differential Regulation by Glucose and Insulin in Glandular Stomach and Functional Implication in Feeding Control. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12(May):1–17.
131. Ma A, Bai J, He M, Wong AOL. Spexin as a neuroendocrine signal with emerging functions. *Gen Comp Endocrinol.* 2018;265:90–6. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.015>
132. Chai W, Liu Z. p38 mitogen-activated protein kinase mediates palmitate-induced apoptosis but not inhibitor of nuclear factor- κ B degradation in human coronary artery endothelial cells. *Endocrinology.* 2007;148(4):1622–8.
133. Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct.* 2015;35(6):600–4.
134. Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signalling: A potential autophagy regulation pathway. *Biosci Rep.* 2015;35(3):1–10.