

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ELABELA HORMONUNUN SIÇAN BÖBREK
HASARINDAKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sezgin ÇETİN

2019

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Dr. Öğr. Üyesi Aşkın ŞEN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Dr. Öğr. Üyesi Aşkın ŞEN



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.

Sezgin ÇETİN

Tarih: 21.08.2019

İmza:

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Aşkın ŞEN

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

ELAZIĞ

İTHAF SAYFASI

Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aşkın ŞEN'e ve tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı araştırmacısı Sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, Tezimin deneysel kısmında laboratuvarlarının kapılarını açarak destek olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz ŞEN'e, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a, Tezimin gerçekleştirilmesinde değerli emeği bulunan, bütün aşamalarında benden yardımını ve sabrını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Ahmet TEKTEMUR ve Sayın Arş. Gör. İlay BURAN'a, Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Halit ELYAS'a, Tezime sağladığı finansmandan dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne ve Deneyleerde kullandığım ratları sağlayan ve deneylerimde yardımcı olan Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi (FÜDAM)'ne Son olarak eğitim hayatım boyunca en büyük destekçim olan ve her zaman yanımda olan Sevgili Aileme, Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
İTHAF SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1.GİRİŞ	1
1.1. Böbrekler	3
1.1.1.Böbreğin Anatomik Yapısı ve Yerleşimi	3
1.1.2. Böbreğin İç Yapısı	4
1.1.3.Nefron Yapısı	5
1.1.4.Böbreğin Kan Dolaşımı	8
1.1.5. Böbreğin Fonksiyonları	10
1.1.5.1. İdrar Oluşumu	10
A-Filtrasyon	10
B-Geri Emilim (Reabsorbsiyon)	11
C-Salgılama (Sekresyon)	12
1.1.6.Böbrek Hastalıkları	12
1.1.6.1. Akut Böbrek Yetmezliği	12
1.1.6.2. Kronik Böbrek Yetmezliği	14
1.2. Doksorubisin	15

1.2.1. Dokсорubisin Yapısı	15
1.2.2. Dokсорubisin Etki Mekanizması	16
A- Deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma	16
B- DNA ve RNA polimerazların inhibisyonu	16
C- Hücre membranı üzerine etkileri	16
D- Serbest radikal oluşturma	16
1.2.3. Dokсорubisin Farmakokinetiği	17
1.2.4. Dokсорubisinin Yan Etkileri	18
1.2.4.1. Genel Yan Etkiler	18
1.2.5 Dokсорubisine Bağlı Nefrotoksisite	20
1.2.6. Deneysel Model Olarak Dokсорubisin ile Oluşturulan Akut Böbrek Hasarı	23
1.3. Apelin	24
1.3.1. Apelin Reseptörü	26
1.3.2. APJ'nin Lokalizasyonu	27
1.3.3. Apelinin Sıvı Elektrolit Dengesi Üzerine Etkileri	28
1.4. Elabela / Apela / TODDLER	28
1.4.1. Apelin ve Elabela'nın Uyardığı Sinyaller	31
1.4.1.1. Gαi/o	32
1.4.1.2. Gαq/11	32
1.4.1.3. β-arrestin	33
1.4.2. Elabela Sinyalizasyonu	33
1.4.3. Vücut Sıvı Dengesinin Düzenlenmesinde Elabela/Apelin'in Roller	34
2. GEREÇ ve YÖNTEM	36
2.1. Çalışma Gruplarının Tanımı	36
2.1.1. Kontrol grubu (n=7) (K)	36
2.1.2. Elabela-21 grubu (n=7) (Ela-21)	36

2.1.3. Dokсорubisin grubu (n=7) (Dox)	36
2.1.4. Dokсорubisin+Elabela-21 grubu (n=7) (Dox+Ela-21)	37
2.3.Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri	37
2.3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler ve Kimyasallar	37
2.4. Moleküler Genetik Analizler	38
2.4.1 Kantitatif Real time PCR	39
2.4.1.1 RNA izolasyonu	39
2.4.1.1.1. Tri Reagent ile RNA İzolasyonu	39
2.4.1.1.2.RNA Ölçümü	40
2.4.1.2. Komplementer DNA Sentezi	40
2.4.1.3. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu	42
2.5.İmmünohistokimyasal Boyamalar	43
2.5.1. Hematoksilen - Eozin Boyaması	44
2.5.2. İmmünohistokimyasal Analizler	45
2.6.Eliza Analizleri	46
2.6.1. Eliza Testi	47
2.6.1.1 Eliza Prosedürü	48
2.7.İstatistik Analizler	48
3. BULGULAR	49
3.1. Sıçan Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	49
3.2. Elisa Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	49
3.2.1. Serum elisa verilerinin değerlendirilmesi	49
3.3.Biyokimya verilerinin değerlendirilmesi	51
3.4. qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi	53
3.6. Renal Histopatolojik Bulgular	54
3.6.1. Hematoksilen eosin boyama verilerinin değerlendirilmesi	54

3.6.2. İmmünreaktivite verilerinin değlerlendirilmesi	57
4. TARTIŞMA	58
SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Doksorubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri	19
Tablo 2. cDNA karışım miktarı	41
Tablo 3. cDNA sentezi PCR program	41
Tablo 4. Börek dokusunda qRT-PCR ile çalışılan sıçan spesifik genlere ait primerler	42
Tablo 5. qRT-PCR için kullanılan bileşikler	43
Tablo 6. RT-PCR program	43
Tablo 7. Histolojik Takip Basamakları	44
Tablo 8. Deney gruplarında deneyin ilk gün ve son gün ağırlık ölçümleri	49
Tablo 9. Serum Elisa sonuçları	51
Tablo 10. Biyokimyasal parametreler	53
Tablo 11. Böbrek Dokusunda mRNA Kat Değişimi	54
Tablo 12. Gruplarda glomerulosklerozis vet renal tübüler hasarın ciddiyetinin karşılaştırılması.	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Böbrek iç yapısı	5
Şekil 2. Nefron yapısı	8
Şekil 3. Böbrek damar yapısı ve kan akışı	9
Şekil 4. Doksorubisin kimyasal yapısı	15
Şekil 5. Farklı Apelin ve Elabela formlarının amino asit dizileri..	31
Şekil 6. Elabela/Apelin ve APJ etkileşimi.	34
Şekil 7. Böbrek dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.	54
Şekil 8. Böbrek dokularından elde edilen kesitlere yapılan Hematoksilen&Eosin boyama görüntüleri.	55
Şekil 9. Böbrek dokularından elde edilen kesitlere yapılan immün boyama görüntüleri	57

KISALTMALAR

ABH	:	Akut böbrek hastalığı
ABY	:	Akut böbrek yetmezliği
AC	:	Adenilsiklaz
ADH	:	Antidiüretik hormonu
Akt	:	Protein kinaz B
Ang II	:	Angiotensin II
APJ –AR	:	Apelin reseptörünü
ATI	:	Angiotensin II tip I
AVP	:	Hipotalamus arjinin-vasopressin
BEA	:	2-bromoetilamin hidrobromid
BH	:	Black hooded
BUN	:	Kan üre azotu
Ca	:	Kalsium
cAMP	:	Siklik adenosin monofosfat
CD	:	Dawley
cDNA	:	Komplementer DNA
Cl	:	Klor
Cr	:	Kreatinin
CRF	:	Kronik böbrek yetmezliği
CSP	:	Sisplatin
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
Dox –DXR	:	Doksorubisin
ED7	:	Monoklonal antikor
Ela	:	Elabela
Ela-21	:	Elabela-21
ENaC	:	Epitelyal sodyum kanalı
FN	:	Fibronektin
FÜDAM	:	Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
GEN	:	Gentamisin sülfat tuzu
GFH	:	Glomerül filtrasyon hızı

H&E	:	Hematoksilen- Eozin
HIV	:	İnsan immün yetmezlik virüsü
İ.P	:	İntraperitoneal
ICAM-1	:	Hücreler arası yapışma molekülü 1
IFTA	:	Proteinüri ile ilişkili interstisyel fibroz ve tübüler atrofi
IL-6	:	İnterlökin-6
İV	:	İntravenöz
K	:	Potasyum
KIM-1	:	Böbrek hasarı molekülü-1
LDH	:	Laktat dehidrojenaz
MDA	:	Malondialdehit
Na	:	Sodyum
NGAL	:	Nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin
NOS	:	Oksit sentaz
PAF	:	Trombosit aktive edici faktör
PAN	:	Puromisin aminonükleosid
PBS	:	Fosfat salin tamponu
PKC	:	Protein kinaz C
PVN	:	Paraventriküler çekirdek
PVR	:	Proglutamik asit
qRT-PCR	:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit
sCr	:	Serum kreatinin
SF	:	Serum fizyolojik
SH	:	Standart hata
SON	:	Supraoptik
SOR	:	Serbest oksijen radikalleri
TopoII	:	Topoizomeraz II
VEGF	:	Vasküler endotel büyüme faktörü
VKİ	:	Vena kava inferior

ÖZET

Böbrek hasarı uzun dönem kalıcı izler bırakan hala etyopatogenezi tam olarak bilinmeyen bir süreçtir. Böbrek fibrozisinde asıl hedef, sürecin yavaşlatılması durdurulması ve nihayetinde doku hasarının geriye döndürülmesidir. Bu süreçten sorumlu olan moleküllerin tanımlanması bu açıdan oldukça önemlidir. Son zamanlarda tanımlanmış ve renal sistemde sentezlendiği bilinen yeni bir hormon olan Elabela (Ela) (Ela-32, Ela-21, Ela-11) adlı proteinin bu yollarda görevli olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada sıçanlarda Doksorubisin (Dox) ile oluşturulacak böbrek fibrozis hasarında bu hormonun değişiminin ve muhtemel etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Toplam 28 adet wistar albino erkek sıçan; kontrol, Ela-21, Dox ve Dox+Ela-21 olmak üzere, her grupta 7 hayvan olacak şekilde ayrıldı. Kan ve böbrek dokularında Elabela, KIM-1, NGAL, IL-6, Smad3, Kollojen I ve III gen ifadelerinin belirlenmesi için qRT-PCR, ELİSA ve immünohistokimya analizleri kullanıldı.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; Ela-21 uygulamasının Dox grubunda artan serum IL-6, NGAL, Kim-1, MDA ve biyokimyasal parametreleri normalize ettiği histolojik olarak böbrek tübül ve glomerül hasarını azalttığı gösterilmiştir.

Mevcut çalışma, temel olarak Ela-21 peptidinin, Dox ile oluşturulan sıçan böbrek hasarı modelindeki etkilerinin moleküler, histolojik ve biyokimyasal olarak gösterildiği ilk çalışmadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, Ela'nın sıçan böbrek hasarının onarılması için potansiyel aday olabileceğini göstermektedir.

Çalışma verilerinden yola çıkılarak, Ela-21 peptidinin etkinliğinin başka sıçan böbrek hasar modellerinde çalışılarak, mevcut verilerin desteklenmesine ve

doğrulanmasına gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Fibrozis, Apela/Elabela/Toddler, böbrek hasarı,
Doksorubisin



ABSTRACT

(INVESTIGATION OF THE ROLE OF ELABELA HORMONE IN RAT KIDNEY INJURY)

Renal injury is a process that is still unknown for its etiopathogenesis, leaving long-term permanent marks. The main target in renal fibrosis is to slow down the process and ultimately restore tissue damage. The identification of molecules responsible for this process is very important in this respect. It is thought that the protein named Elabela (Ela), which is a recently described hormone known to be synthesized in the renal system, may be involved in these pathways. The aim of this study was to evaluate the change and the possible effect of this hormone in Doxorubicin (Dox) induced renal fibrosis damage in rats.

A total of 28 male wistar albino rats were divided into 7 animals in each group that consists of control, Ela-21, Dox and Dox + Ela-21. For the determination of Elabela, KIM-1, NGAL, IL-6, Smad3, Collagen I and III gene expressions in blood and kidney tissues were used qRT-PCR, ELISA and immunohistochemistry analyzes.

Compared with the control group, Ela-21 practise was shown to normalize increased serum IL-6, NGAL, Kim-1, MDA and biochemical parameters and histologically reduce renal tubule and glomerular damage in the Dox group.

The current study is the first to demonstrate the protective effects of Ela-21 peptide in rat Dox-induced renal injury model as molecularly, histologically and biochemically. These data indicate that Ela may be a potential candidate for the rehabilitation of rat kidney injury. Based on the study data, there is a need to

support or confirm data by studying the efficacy of Ela-21 peptide in another rat kidney injury models.

Keywords: Fibrosis, Apela/Elabela/Toddler, kidney injury, Doxorubicin



1.GİRİŞ

Böbrekler; kanı süzen ve kan dolaşımındaki zararlı maddelerin, fazla suyun, bazı minerallerin ve ürenin idrar aracılığıyla vücuttan dışarı atılmasını sağlayan organlardır. Temel görevi idrar oluşmasını sağlamaktır. Bu sayede vücut sıvı ve elektrolit içeriklerinin normal sınırlar içerisinde kalmasını ve zararlı olan maddelerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Böbreğin en sık rastlanılan hastalıkları böbrek iltihabı, böbrek taşı, nefrit, böbrek yetmezliği, üremi, diyabet ve yüksek tansiyona bağlı hipertansif nefroskleroz gibi böbrek hastalıkları şeklindedir.

Böbrek hasarı, ciddi akut ve kronik hasarlar ile sonuçlanan kompleks bir patofizyolojik süreç olup; böbrek hasarında iskemi/reperfüzyon ve renal fibrozis olmak üzere iki temel patoloji gözlenmektedir. Nefron, böbreğin anatomik ve fonksiyonel en küçük birimi olup, bünyesindeki süzme işlemi sırasında, kan hücrelerinin ve proteinlerin idrara geçmesini engellemektedir. Sistemin çeşitli nedenlerle bozulması sonucu aşırı protein kaybedilmesi ile ortaya çıkan durum nefrotik sendrom olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla çocuklarda görülen yoğun proteinüri, ödem, hiperlipidemi ve hipoalbuminemi gibi bulgular; glomerüler filtrasyonda geçirgenlik artışına bağlı olarak gelişir. Nefrotik sendromda meydana gelen histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri incelemek, yeni tedavi yöntemleri bulmak ve ilaç tedavileri denemek amacıyla, çoğunlukla fare ve sıçan gibi deney hayvanlarında toksik ve immünolojik uyaranlarla deneysel hayvan nefrotik sendrom modelleri oluşturulmaktadır (1-5). Bu amaçla kullanılan toksik ajanlardan biri de doksorubisin (Dox, DXR, ticari

adıyla Adriamisin) kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaç olan antrasiklin türevi antibiyotiktir. Doksorubisin ile indüklenen epitelyal hücre hasarı sonucunda glomerülde kast oluşumu ve proteinüri görülmektedir. Doksurubisinin indüklediği renal toksisite; tübüler dilatasyon ve glomerüler vakuolizasyona neden olmaktadır. Son çalışmalarda, epitelyal hücre hasarı, glomerüler püskül (atrofi) - kapsül adezyonuyla karakterize glomerül hasar gösterilmiştir (6). Ayrıca doksorubisin nefropatisi renal fibrozis ve epitelyal sodyum kanalı (ENaC)-bağımlı volüm retansiyonuna da yol açar (7). Doksorubisin ile oluşturulan renal fibrozis, böbrek parankiminde ilerleyici zararlı bağ dokusu birikimi ile karakterize edilir. Bu da orjinal böbrek hasarına neden olan primer böbrek hastalığından bağımsız olarak böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olan zararlı bir süreç gibi görünmektedir (7).

Fare ve sıçan gibi deney hayvanlarında yapılan farklı çalışmalarda, Apelin'in vazodilatör olarak damarlarda ve pozitif inotropik olarak ise kalp üzerine etkisi olduğu gösterilmiştir (8, 9). Santral sinir sisteminden salınan Apelin'in, antidiüretik hormon ve başka araçlar yoluyla, böbreği ve çevre dokuları etkilediği bildirilmiştir (10, 11). Çalışmamızda ise, apelin reseptörünün yeni keşfedilmiş ligandı olan ELA (Elabela/Toddler/Apela) hormonunun sıçan akut böbrek hasarı modelleri üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

Elabela, kardiyovasküler ve renal sistem gelişimini ve fonksiyonunu düzenlemek için apelin reseptörünü (AR veya APJ) aktive eden, son zamanlarda tanımlanmış olan bir peptid hormondur (12, 13). Kodlanmış protein, zebrafish'teki (zebra balığı) kalp gelişimi için gereklidir ve PI3K/AKT yolağının aktivasyonu yoluyla insan embriyonik kök hücrelerinin kendini yenilemesini sağladığı

gösterilmiştir. Sıçan yetişkin böbrek dokusunda da Elabela geninin ifade edildiği belirlenmiştir. Ancak, böbreğin çeşitli hastalıklarında yeni tanımlanmış bu hormonun rolü tam olarak bilinmemektedir. İnsan ve fare hücre hatlarındaki deneyler, anjiyogeneizde vasküler tonusunun düzenlenmesinin yanısıra ilave rollerine işaret etmektedir. APJ'nin aktivasyonu; siklin adenozin mono fosfat (cAMP) baskılanması, protein kinaz B'nin (Akt) , ERK1/25 ve p70S6K6 fosforilasyonu, kalsiyum mobilizasyonu ve nitrik oksit sentaz (NOS) etkinliği gibi geniş bir biyokimyasal değişiklik spektrumuna neden olur (14-18). Elabela'nın böbrek hasarı üzerine iyileştici etkilerinin olup olmadığı bilinmemektedir. Bu bağlamda çalışmamızda hem fibrozis sonrası Elabela düzeyleri değerlendirilecek hem de Elabela hormonu uygulanarak muhtemel iyileştirici etkiler ortaya konmaya çalışılacaktır.

Böbrek hasarı oluşturulması için farmakolojik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (19). Çalışmamızda Elabela hormonu uygulanacaktır. Böbrek hasarı oluşturulduktan sonra Elabela uygulamasının, Elabela düzeylerinde değişime neden olup olmadığı belirlenerek, Elabela'nın böbrek hasarında bir belirteç olarak kullanılabilirliği ve patofizyolojideki önemi araştırılacaktır.

1.1. Böbrekler

1.1.1.Böbreğin Anatomik Yapısı ve Yerleşimi

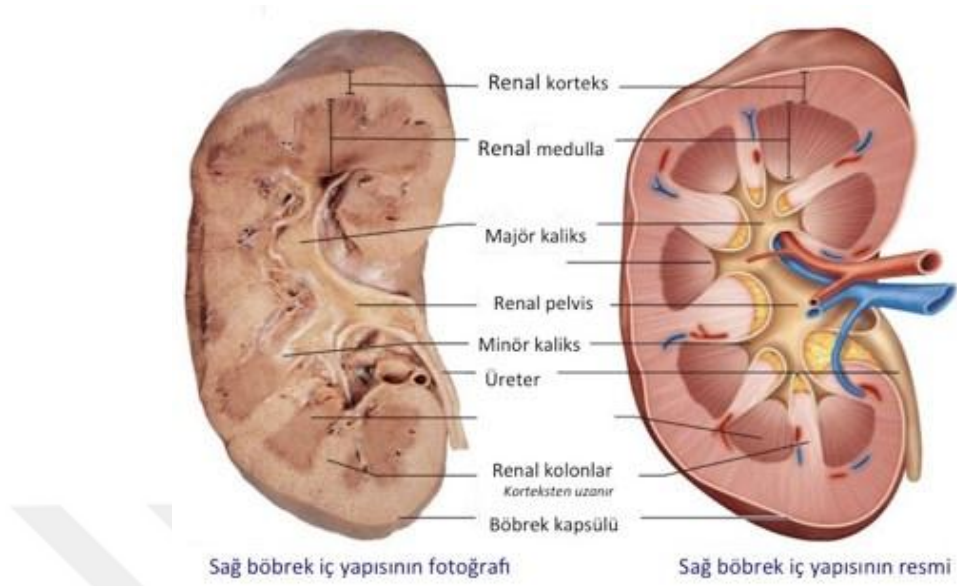
Yetişkin bir insanda ortalama ağırlığı 130-150 g olan böbrek, insan vücudunun en iyi korunmuş organlarından biridir. Yetişkin bir insandaki ortalama boyutları yaklaşık 12 cm uzunluk, 8 cm en ve 3 cm derinlik şeklindedir. Fasulye biçimli, kırmızı-kahverengi renkli, bir çift olarak bulunan böbrekler idrar

oluşumunda görevlidirler. Anatomik olarak omurganın her iki yanında retroperitoneal yerleşimlidirler. Sağ böbrek üstünde bulunan karaciğerin baskısından dolayı sol böbreğe göre biraz daha aşağı seviyede bulunmaktadır. Böbrek dokusu en dıştan kalın ve dayanıklı bir zar olan böbrek kapsülü ile sarılıdır. Ek olarak, böbrekleri travmalardan koruyan retroperitoneal yağ dokusu ile çevrilidir. Her bir böbreğin orta kısmında hilum bulunur. Hilum bölgesinde renal arter, lenfatikler ve sinirler giriş yaparken, renal ven ve üreter çıkış yapar. Böbrekler, içyapıları koruyan güçlü ve lifli bir kapsül ile çevrilidir.

Sağ böbrek; üstte sürrenal, önde karaciğer, hilum dolaylarında duodenum, vena kava inferior (VKİ) ve altta çıkan kolon ve ince bağırsak ile komşu durumdadır. Sol böbrek ise üstte sürrenal, dalak, damarlar ve mide ile hilum dolaylarında pankreas kuyruğu, ön üstte jejunum ve inen kolonla komşudur (20). Önünde psoas kası ve arkada diyafram yaprakları üzerine yerleşmiş durumdadırlar.

1.1.2. Böbreğin İç Yapısı

Böbrekler dikey kesildiğinde dış tarafta korteks, orta tarafta medulla ve iç tarafında ise kaliksler ile pelvis görülmektedir. Böbrek medullasında böbrek piramidleri olarak da adlandırılan koni biçimli ortalama 10 adet doku kitlesi mevcuttur. Piramitlerin taban kısmı medulla ve korteks arasındaki sınırdan başlayıp, huni biçimdeki üst kısmının sonunda oluşan böbrek pelvisine yönelen papillada sonlanır. Pelvis dış hattı major kaliks denen açık yanlarda aşağı doğru uzanır ve papillalarda tübüllerden idrar toplayan minor kalikslere ayrılır. Pelvis, kaliks ve üreterlerin duvarları; idrarın boşaltılınca kadar depolandığı mesaneye doğru yol almasını sağlayan kasılabilir yapılar içerir.



Şekil 1. Böbrek iç yapısı (181)

1.1.3.Nefron Yapısı

Böbrekler nefron olarak adlandırılan ve böbreğin fonksiyonel en küçük birimi olarak bilinen yapılardan oluşmaktadır. Yaklaşık olarak her böbrekte 1 milyon adet nefron bulunur. Süperfişiyal, midkortikal ve jugstaglomerüler nefronlar olmak üzere üç tip nefron vardır. Nefron, Bowman kapsül içerisine yerleşmiş olup, kapiller damarların çevrelediği tübüllerden ve glomerül yumaktan meydana gelir. Nefronların ortalama % 82'si korteksin orta ve dış katmanlarında bulunur. Bu nefronların henle kulpu daha kısadır. Nefronların yaklaşık % 18'i ise korteks-medulla birleşim yerinde bulunur. Bu nefronlar, jugstamedüller nefronlar olarak adlandırılır ve bu nefronların, henle kulpları daha uzundur.

Nefronlar 5 bölümden oluşur:

1- Glomerül: Renal tübülün genişletilmiş sınır kısmı olan Bowman kapsülü ile çevrili kapiller topaklardır. Kapiller yumak ve mezangium, podosit

denen epitelyal hücrelerce sarılmıştır. Bowman kapsülünün katları arasında yer alan ve tübüler alana açılan bölge ise, idrar boşluğu veya Bowman boşluğudur. Vasküler kutbun zıt yönünde, Bowman kapsülü tübülün ilk kısmına açılır. Kapillerler glomerüler mezangium denilen bir sap ile bir arada tutulur. İdrar oluşumu ultrafiltrasyon süreci ile glomerüler filtrasyon bariyerinde başlar. Glomerüler filtrasyon bariyeri üç tabakadan oluşur; fenestrasyonlu endotel, glomerüler bazal membran ve podosit olarak bilinen epitel hücreleri (21, 22).

Nükleusları mezangiyuma bitişik olan endotel hücreleri, büyük moleküllerin geçişine karşı önemli bir engel oluşturmazlar. Endotel yüzeyi polianyonik glikoproteinler nedeniyle negatif yüklüdür.

Orta tabakayı oluşturan glomerüler bazal membranın kollagen ve glikoprotein elemanlarından oluştuğu gösterilmiştir.

İki tip epitelyal hücre vardır. Biri glomerüler filtrasyon bariyerinin dış tabakasını oluşturan visseral epitelyum hücreleri podosit denilen ayaklı uzantılarla bazal membrana dayanırlar. Albümin gibi negatif yüklü makromolekülleri iterek filtrasyona engel olurlar (23). Diğer pariyetal epitel hücresi olup Bowman kapsülünün dış kısmındadır. Bowman kapsülü denince de bu tabaka anlaşılır ve proksimal tübülüs hücresi ile devam eder.

Mezangiyumda fagositik yeteneği olan ve olmayan iki tip hücre bulunur. Mezangial hücreler gövdelerinden glomerüler bazal membrana doğru uzanan çok sayıda uzantıları bulunan ve yoğun mikrofilament bantlar içeren hücrelerdir (24). Fagositik olmayan hücreler çoğunlukta olup düz kas hücreleri gibi davranır ve özellikle anjiotensin-2 veya vazopressin etkisi ile kontraksiyon yaparlar. Kontraksiyon ile filtrasyon yüzeyini değiştirerek glomerüler kan akımının ve

filtrasyonun ayarlanmasında önemli rol oynarlar. Ayrıca çeşitli tipte kollagen sentezlerler. İkinci tip mezangiyum hücreler ise fagositer fonksiyona sahip makrofajlardır (25).

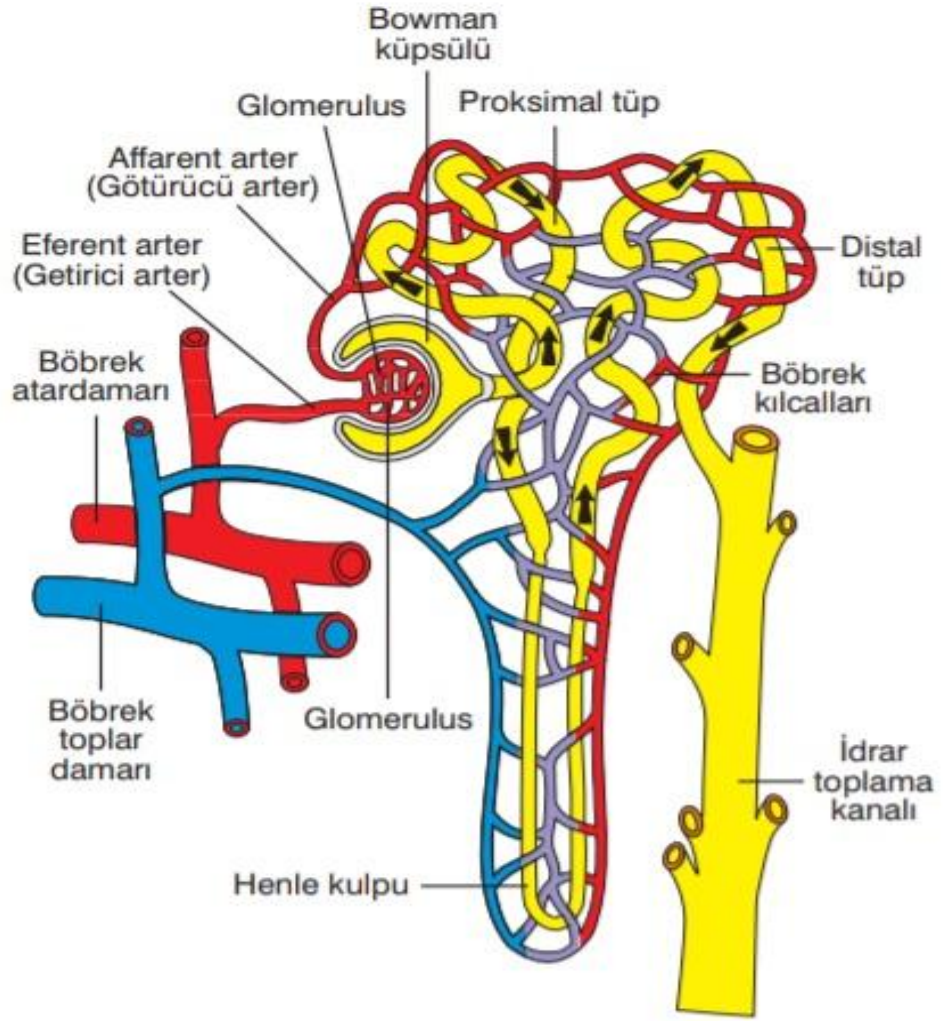
2- Proksimal Tübül: Korteks yerleşimlidir.

3- Henle Lupu: Kortikomedüller birleşim yerine yerleşimlidir.

4- Distal Tübül: Korteks içindedir.

5- Toplayıcı Kanal: İki ya da ikiden fazla distal tübülden oluşur.

Kortikal nefronların glomerülleri korteksin dış kısmındadır. Sadece Henle kıvrımı dış medullaya kadar iner. Efferent arteriolü tübüller etrafında peritübüler kapiller ağ oluşturur. Jukstamedüller nefronların glomerülleri korteks ile medulla arasındadır. Henle kıvrımı medullanın derinliklerine kadar iner. Efferent arteriolü Henle kıvrımı ile yan yana seyreden ve medullanın derinliklerine kadar inen farklı bir kapiller ağ oluşturur. Bu organizasyon idrarın yoğunlaştırılmasında önemlidir (26).



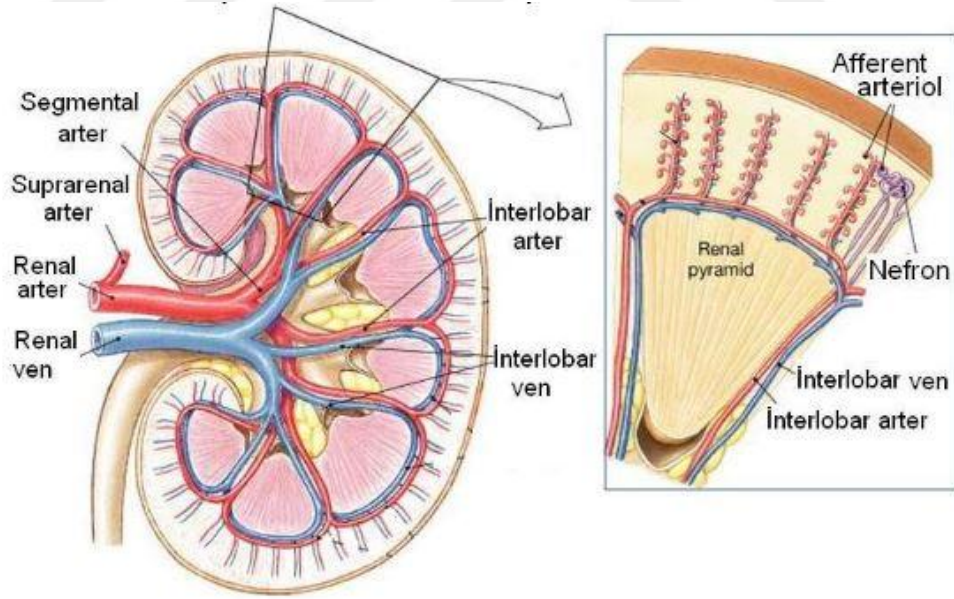
Şekil 2. Nefron yapısı (27)

1.1.4.Böbreğin Kan Dolaşımı

Böbrekler, birinci lomber vertebra hizasında aortadan çıkan tek arterle kanlanır. Renal arter çoğunlukla anterior ve posterior olarak iki dala ayrılır ve bu dallar da daha sonra üst, orta ve alt lobar dallara ayrılmaktadır.

Böbrek kan akımı, normal olarak kalp atımının %20-25'i kadardır. Yaklaşık dakikada 1.2 lt'dir (28-30). Böbrek arteri parankime girince interlobar arter ismini alır, medüller piramidlerin kenarlarından kortekse doğru ilerleyerek

piramidlerin tabanındaki arkuat arterler ile devam ederler. Arkuat arterlerden dik olarak çıkan interlobüler arterler korteks içinde perifere doğru ilerler. Bu arterden glomerüle giden afferent arterioller çıkar. Özelleşmiş kapiller yumak olan glomerülün kanı, vasküler polden çıkan afferent arteriol ile taşınır. Efferent arterioller hemen dallanarak korteksteki tübülüslerin çevresini saran peritübüler kapiller ağını oluşturur. Jukstamedüller glomerüllerin arteriollerinden çıkan kapiller vasa recta, medullanın derinliklerine doğru iner. Vasa rekta kapiller bir ağdır ve henle kulpunun aşağı kısımlarının çevresinde uzanır. Vasa rekta idrarın yoğunlaştırılmasında ve dilüe edilmesinde henle kulpu ile birlikte önemli bir işleve sahiptir. Peritübüler kapiller ağı, ven olarak böbrekteki diğer küçük venlerle birleşerek vena renalisi meydana getirir ve böbrekten çıkar.



Şekil 3. Böbrek damar yapısı ve kan akışı (28)

1.1.5. Böbreğin Fonksiyonları (31)

- 1- Vücut sıvı, elektrolit, asit ve baz dengesinin korunumu ve devamlılığı
- 2- Metabolik atık ürünleri olan ürik asit, üre, kreatinin uzaklaştırılması
- 3- İlaç, toksin ve zararlı metabolitlerinin detoksifikasyonu ve uzaklaştırılması
- 4- Vücut sıvı miktarı ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
- 5- Hormon üretimi ve metabolizmaya katkı: eritropoetin, renin, vitamin-D3 aktif formu gibi hormonların üretimi ve metabolizması
- 6- İnsülin, glukagon, parathormon ve büyüme hormonu gibi peptid hormonlarının yıkımı
- 7- Molekül ağırlığı küçük olan proteinlerin (Örneğin; β 2-Mikroglobulin) yıkımı
- 8- Glukoneogenez ve lipid metabolizması gibi metabolik etki

1.1.5.1. İdrar Oluşumu

Böbrekler kanı süzüp idrarı meydana getirir. İdrar üreterler yardımı ile mesanede toplanır, üretrayla dışarı atılır. İdrar, nitrojen içeren üre ve ürik asit metabolizma ürünlerini vücut dışına atar. Nitrojen atıklarının en önemli kaynağı protein ve pürin bazlarıdır. Pürin bazlarının yıkım ürünü ürik asit, proteinlerin parçalanmasıyla oluşan ürün ise amonyaktır. Amonyak, hücreler için oldukça toksik bir madde olduğundan karaciğerde üreye dönüştürülür ve böbrek tarafından atılır (32).

İdrar oluşumu 3 aşamada oluşmaktadır:

A-Filtrasyon: Afferent arteriol ile glomerüler kapiller yumağa ulaşan kan proteinleri ve hücreleri dışındaki bütün elemanlar Bowman kapsülüne süzülür ve içeriği proteinler dışında plazmanın yapısı ile eş değer sayılabilir. Birim zamanda süzülen plazma miktarı Glomerül filtrasyon hızı (GFH) olarak tanımlanır

(ortalama değer 120-130 ml/dk). Böbrekler normalde dakikada 120-130 ml arası yani günde 180 litre plazmayı filtre eder. Böbreklerde filtre edilen plazma miktarı 180 litre gibi yüksekken, bir gün içinde çıkarılan idrar ortalama 1,25 litre kadardır. Glomerüler filtrasyon hızı çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Glomerüller kapiller içindeki kanın hidrostatik basıncının azalması filtrasyonu azaltır, yükselmesi ise artırmaktadır. Kapillerdeki hidrostatik basınç, afferent arteriol daralmasında, böbreğe gelen kan miktarının azalması sonucu (arteriyel kan basıncının düşmesi ve kan kayıpları gibi koşullarda) düşer. Buna karşı efferent arteriol daralması basıncı yükseltmektedir. Glomerül kapillerindeki geçirgenlik artışları glomerüler filtrasyon hızını (GFH) artırır. Bowman kapsül içindeki sıvı basıncının artması durumunda filtrasyon azalır.

B-Geri Emilim (Reabsorbsiyon): Filtratın içinde olan su ve maddeler basit diffüzyon ve aktif taşınma ile önce tübülüs hücrelerine, buradan da kana geri emilirler. Maddelerin geri emilimleri organizmanın gereksinimi doğrultusunda düzenlenmektedir. Geri emilimin 10 da 9'u proksimal tübülüs alanında yapılmaktadır. T b l slerde geri emilemeyen madde miktarının artması suyun geri emilimini azaltarak di reze (idrara atımı) neden olur (32).

Kanın glukoz konsantrasyonu normal olduğunda, glomerüllerden süzülen glukozun tamamı proksimal tübül bölgesinde aktif taşıma ile yeniden emilir ve idrarda glukoz salınmaz. Kan glukoz konsantrasyonu normalden yüksek olduğunda, fazla glukoz tekrar emilemez ve idrar ile glukoz atılır. Tübül sıvısında kalan ve tekrar emilemeyen aşırı glukoz, suyu beraberinde sürükleyerek ozmotik kuvvete neden olur ve poliüri oluşur. Poliüri, belirli bir süre boyunca büyük miktarlarda idrarın üretimi ve bertarafıdır (32, 33).

C-Salgılama (Sekresyon): İdrar oluşurken, bazı maddeler tübüler epitel hücreleri tarafından doğrudan tübüllerin içine salgılanır. Penisilin, bu tür maddelere iyi bir örnektir. Bazı maddeler hem glomerüler filtrasyon hem de atılım yoluyla idrara çıkar. Bu tür maddelerin en iyi örneği kreatinindir (32, 33).

1.1.6.Böbrek Hastalıkları

1.1.6.1. Akut Böbrek Yetmezliği

Akut böbrek yetmezliği (ABY) ani ve hızlı böbrek fonksiyonları kaybı ile karakterize bir sendromdur. Bu bozulma sonucu nitrojen artık ürünleri olan üre (BUN) ve kreatinin (Cr) kanda ve idrarda birikmektedir. Günümüzde ABY patofizyolojisine bağlı olarak prerenal, renal (intrinsik) ve postrenal olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Prerenal ABY, ABY'nin yaklaşık % 57'lik oranla en sık görülen çeşididir. Renal perfüzyon bozukluğu neticesinde gelişen ve böbrek parankim bütünlüğünün korunduğu bir durumdur. Renal (intrinsik) ABY, bütün olguların yaklaşık % 37'sinde görülmektedir. Nefrotoksik veya iskemik vakalar sonucunda oluşan akut tübüler nekroz, intrinsik renal ABY'lerin % 91 ve daha fazlasını oluşturur. Postrenal ABY, üriner traktının akut tıkanmasının beraber görüldüğü hastalıklar sonucu gelişir ve tüm ABY olgularında yaklaşık % 5 ve daha azında görülmektedir (34).

Böbreklerin, ilaca bağlı toksisitenin birincil hedefi olduğu bilinmektedir. Kan üre azotu (BUN) ve serum kreatinin (sCr) temel olarak klinik ve preklinik olarak böbrek hasarını izlemek için uzun süredir kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemin duyarlılık eksikliği, böbrek hasarını böbrek epitel kitlesinin % 70 ile % 80'i kaybolana kadar açıklayamamakta ve bu büyük bir sorun teşkil

etmektedir. Böbrekteki yaralanma bölgesine bağı olarak böbrek hasarını izlemek amacıyla uygun bir takım belirteçler mevcuttur. Bu biyobelirteçler örnekler olarak KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1), NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), IL-6 (Interleukine-6), Ürik asit, kolesterol, Na (Sodium), Cl (Chlor), K (Potassium) ve Ca (Calsium) verilebilir. Bu belirteçler ve Akut böbrek hasarın (ABH) da değışimleri aşağıda detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda idrar ve plazmada NGAL düzeylerinin yükselmesinin ABH'nın tanınmasında çok önemli bir belirteç olduğu bildirilmiştir (35). NGAL böbrekte iskemik hasar sonrası düzeyi en fazla artan moleküllerdendir. NGAL düzeylerinin hayvan iskemik ve nefrotoksik ABH modellerinde böbrek tübül hücrelerinde, plazmada ve idrarda arttığı gösterilmiştir (33-39).

KIM-1 bir immünoglobulin ve müsin alanı içeren tip 1 trans-membran proteindir. KIM-1 ekspresyonunun, iskemik sıçan böbreğinde proksimal tübül içinde belirgin bir şekilde arttığı belirlenmiştir. KIM-1'in insan akut böbrek yetmezliğinde bir biyobelirteç olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır (40).

Sitokin ailesinin bir üyesi olan interlökinler, vücudun travma ve enfeksiyona karşı immün ve metabolik tepkisinde rol oynayan makrofajlardan ve lenfositlerden salgılanan proteinlerdir. Bu seriden interlökin-6 (IL-6), konağın enfeksiyöz veya enflamatuvar bir uyarana karşı akut tepkisine katılan bir aracıdır. IL-6, akut faz proteinlerinin salgılanmasında da önemlidir. Yapılan çalışmalarda diyabetik nefropatide IL-6'nın arttığı tespit edilmiştir (41).

Yukarıda belirtilen onaylanmış biyobelirteçlere ek olarak, böbrek toksisitesinin izlenmesi için çok sayıda biyobelirteç rapor edilmiştir (42-46).

1.1.6.2. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği (CRF; Chronic renal failure), glomerüler filtrasyon değerindeki düşüşün bir sonucu olarak, böbreğin sıvı çözünen dengesinin ayarlanması ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma olarak tanımlanabilir. Kronik böbrek hastalığı dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaşamı tehdit eden önemli bir sağlık sorunudur. Böbrek yetmezliğine, en sık başta yüksek tansiyon, diyabet, obezite, 60 üzeri yaş, sigara alışkanlığı, tek böbrekli doğma ve ailesel böbrek hastalığı neden olabilmektedir.

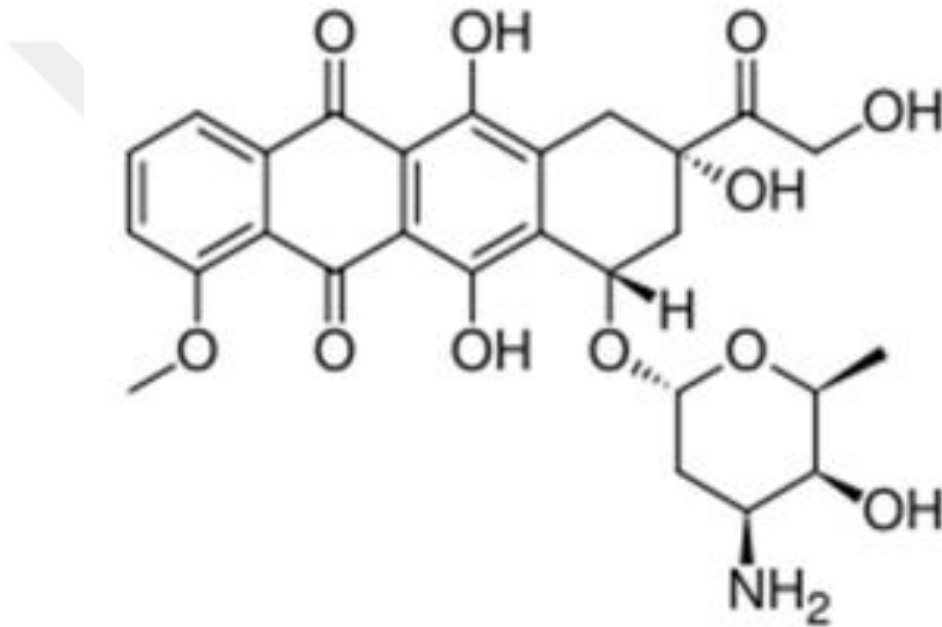
Glomerüler hücreler, monositler, makrofajlar, nötrofiller, trombositler, kompleman ve pıhtılaşma sistemi, sitokinler, büyüme faktörleri, trombosit aktive edici faktör (PAF), anjiyotensin II, endotelin, nitrik oksit (NO) ve serbest oksijen radikalleri (SOR) gibi arabulucuların böbrek hasarının gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. SOR, enerji üretimini ve böbrek hücrelerinin taşınma fonksiyonlarını bozabilir. Ayrıca morfolojik lezyonların oluşumundan ve proteinlere karşı glomerüler geçirgenliğin artmasından sorumludur. PAF, tromboksan, prostaglandin gibi vazoaktif lipidlerin salınımında rol oynadıkları da öne sürülmektedir (47,48).

Hayvan böbrek hasarı modellerinin indüklenmesi için genel olarak Puromisin aminonükleosid (PAN), gentamisin sülfat tuzu (GEN), sisplatin (CSP), 2-bromoetilamin hidrobromid (BEA) veya doksorubisin (Dox) kullanılır. Çalışmamızda sıçan akut böbrek hasarı modeli oluşturulması amacıyla doksorubisin kullanılmıştır.

1.2. Doksorubisin

1.2.1. Doksorubisin Yapısı

Doksorubisin, antrasiklin türevi kemoterapötik bir ilaçtır. Antrasiklinler, 1963’de bir mantar türü olan *Streptomyces peucetirus* variete *caesiu* kültüründen üretilmiştir (49,50). Molekül, tetrasiklik çekirdek ve aminoşekerden (daunosamin) oluşmaktadır.



Şekil 4. Doksorubisin kimyasal yapısı (51)

Tetrasiklik çekirdek ilaca kırmızı rengini vermektedir. Grubun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (51). Antrasiklinler, katı planer 4 halkalı yapı ve bunu tamamlayan D halkasında bir glukozidik subsittüsyonu ile A ve D halkalarında değişik yan grupları içerirler. Planer yapı, antrasiklinin DNA zinciri arasına interşelasyonunu sağlar ve bu interşelasyonun antrasiklinlerin DNA sentez inhibisyonundan sorumlu olduğu

ifade edilmektedir. C halkasındaki quinon, Fe⁺⁺ gibi metallerin varlığında oksidasyon/redüksiyon döngüsüne girerek oksijen ve/veya lipidlerde serbest radikaller oluşturur (52). Bu serbest radikallerin kardiyak toksisiteden sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile doksorubisin meydana gelir (Şekil 4). Doksorubisin, daunorubisin'in hidroksi türevi olan ve aynı kaynaktan elde edilen bir antrasiklin bileşiğidir. Fakat daunorubisin gibi bu ilaç da hücreler üzerindeki etkinliğini S (sentez) fazında gerçekleştirmektedir (53).

1.2.2. Doksorubisin Etki Mekanizması

Doksorubisin, hücrede 4 farklı şekilde etki göstermektedir (55, 56):

A- Deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma:

Antrasiklinler, DNA eşlenme basamağı olan DNA sarmalının çözülmesinde görev alan topoizomera II (TopoII) enzimine bağlanıp, onu inhibe ederek etkilerini gösterirler. TopoII DNA'ya bağlanır ve çift sarmal kırılması meydana getirerek sarmal gevşemesini sağlar (54). DNA topoizomera II+DNA+antrasiklin kompleksi DNA eşlenmesi ve RNA (ribonükleik asit) sentezini inhibe eder. DNA kırıklarına da neden olur (57). Sonuç olarak moleküle maruz kalan hücre DNA'sında kimyasal ve oksidatif hasar oluşur (63).

B- DNA ve RNA polimerazların inhibisyonu: DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını engelleyerek DNA eşlenmesini ve RNA sentezini bozar.

C- Hücre membranı üzerine etkileri: Hücre zarına bağlanarak zar fonksiyonunu bozar (58, 59).

D- Serbest radikal oluşturma: Mikrozomlardaki sitokrom P-450 redüktaz

enzimi ile reaksiyona girerek serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumuna ve apoptoza neden olur (60-62). Sıçanlarda Dox'a bağlı hepatotoksitite oluşturulduğunda antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (64). Antioksidan kullanımının ise karaciğer ve böbrekte Dox'un neden olduğu apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (65). Srdjenovic ve ark. Dox uyguladıkları sıçanların testis, akciğer ve böbrek dokularını incelediklerinde, antioksidan uygulama öncesi lipid peroksidasyon artışı ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklerin olduğunu, antioksidan uygulama sonrasında ise oksidatif hasarın gerilediği göstermiştir (66).

1.2.3. Doksorubisin Farmakokinetiği

İlk iki antrasiklin olan daunorubisin ve doksorubisin 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir. Asit ortamda stabil olmaması oral yolla kullanılmasını engeller. Doku hasarına neden olduğundan intramusküler ve subkutan kullanımı da mümkün değildir (58, 59, 67). Doksorubisin önemli oranda metabolizmaya katılmaz. Doksorubisin, daunorubisinle karşılaştırıldığında böbrekte birikir, ama aynı zamanda karaciğerde, kalpte ve incebağırsakta da bulunur (68). Bu durum doksorubisinin, daunorubisinle karşılaştırıldığında daha fazla nefrotoksisiteye ve daha geniş terapötik indekse sahip olmasını açıklamaktadır. Doksorubisin, gastrointestinal sistemden absorbe edilmez, yalnız parenteral uygulanır (69).

Doksorubisin intravenöz (İV) uygulanımdan sonra hızla parçalanır. Doksorubisinol ve daunorubisinol oluşur (70). Bunlar ana bileşikten daha az aktiftir. İntravenöz uygulamadan sonra kalp, karaciğer, dalak, miyokard gibi dokularda birikir ve plazmadan 5-10 kat daha yüksek konsantrasyona ulaşır. Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonuna sahiptir (71).

Dokulardaki birikim, karaciğerde hızlı metabolize edilmesine rağmen, dokulardan yavaş salıverildiğinden vücutta kalışı ve etkisi uzun sürelidir ve büyük kısmı safra içinde itrah edilir. Hidroliz sonucu vücutta kısmen serbest kalan aglikon kısmı etkinlik göstermez (53). Karaciğerde biyotransformasyona uğrar, safradan sekresyonla doksorubisinol ve daunorubisinol olarak atılır. Karaciğerde önce indirgenme gerçekleşir ve ardından karbonil kökü ayrılır. Esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesine rağmen, az bir miktarı da böbreklerden (% 3-10) ve dışkıyla (% 40-50) atılır. Böbreklerde ise önce karbonil kökü ayrılır, sonra indirgenme gerçekleşir (72). İlaç uygulaması yapıldıktan 1-2 gün sonra idrarın geçici bir süre için kırmızıya boyanmasına neden olur ancak bunun klinik önemi yoktur (69). Dışkıyla atılan kısmı değişmemiş ilaç biçimindedir. Bu nedenle karaciğer fonksiyon bozukluklarında veya karaciğer metastazının bulunduğu durumlarda primer tümörde eliminasyon yavaşlar. Karaciğer fonksiyon bozukluğu olanlarda doz ayarlaması gerekirken, böbrek yetmezliği olanlarda dikkatli kullanılmalıdır (73).

1.2.4. Doksorubisinin Yan Etkileri

1.2.4.1. Genel Yan Etkiler

Antineoplastik ilaçların pekçoğu, diğer alanlarda kullanılan ilaçlara göre fazla toksik ilaçlardır. Fakat bunların kanser gibi son derece ciddi ve halen önemli bir ölüm nedenini oluşturan durumlarda yararlı olmaları, bu sakıncaların önemini azaltır (53). Doksorubisinin klinikte daha önemli olan yan etkileri Tablo 1’de gösterilmiştir (56).

Tablo 1. Dokсорubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri

Yan etki	Patogenezi
Alopesi	Antibiyotik etki
Kemik iliği supresyonu	Antibiyotik etki
Mukozit	Antibiyotik etki
Ekstravazasyon	Lokal toksisite
Radyosensitizasyon	En çok etkilenen organ kalptir. 200 rad üzeri radyasyonda toksisiteye hızla gelişir
Nefrotoksisite	Serbest radikal aracılı hasar
Kardiyotoksisite	Birden çok mekanizma ile

Dokсорubisin verilen hastaların neredeyse tamamında alopesi (saç dökülmesi) görülür ve uygulama bitiminden 2-3 ay sonra normale döner. Çok hızlı verildiği takdirde yüzde flushing (lekelenme) ortaya çıkar. Fotosensitiviteye neden olabilir. Tırnak yatağında hiperpigmentasyon veya bantlaşma meydana gelebilir (69). Dokсорubisinin kemik iliği supresyonudur. En sık doz ayarlanmasına neden olan yan etkisi lökopeni, uygulamanın 2. haftasında ortaya çıkar ve 4. haftanın sonlarında hücreler yükselir. Toksik etkisi ilacın dozuna ve kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlı olarak değişir (74). Trombositopeni ve anemi de görülebilir (75,76).

İlaç bir kaç gün süreyle verildiğinde mukozit riski artar. Genellikle uygulamanın 2. haftasında meydana gelir ve 3-7 gün içinde geriler (74). Ateş, döküntü ve ürtikere neden olabilir. Nadiren anafilaksi meydana gelebilir (69). Dokсорubisine bağlı hipersensitivite reaksiyonlarının sıklığı % 3-21 arasında

bildirilmiştir (77).

Doksorubisin uygulaması gonadları baskılayarak; oligospermi, azospermi veya amenoreye neden olabilir (69). Gastrointestinal sistemde bulantı, anoreksiye ve ishale neden olabilir, kolonda ülserasyonlar ve nekroz ortaya çıkabilir (69).

Doksorubisinin damar dışına kaçıışı ciddi ve geri dönüşümsüz doku hasarına sebep olur (78). Ekstravazasyon olarak adlandırılan bu durum; yanma, ağrı ve lokalize inflamasyondan tam kat nekroz ve ülserasyon gibi ciddi hasara kadar değişen şiddette bulgulara neden olabilir (79). Doksorubisine bağlı toksisite patogenezinde; serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma rol oynamaktadır (80, 81). Patogeneizde sorumlu olan serbest radikaller O^{2-} , OH^- ve nitrik oksittir. malondialdehit (MDA) gibi serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünlerinin de patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (81, 82). Antrasiklinlerdeki kinon ve hidrokinon grupları, peroksitleri ve serbest radikalleri aktif edecek potansiyele sahiptir (83).

1.2.5 Doksorubisine Bağlı Nefrotoksisite

Nefrotoksisite; hem toksik kimyasal maddeler hem de tedavi amacıyla kullanılan bazı ilaçların, böbrekler üzerine zehirli etkisi olarak tanımlanır. Doksorubisin kaynaklı böbrek hasarının moleküler mekanizmasını inceleyen farklı çalışmalar mevcuttur. Doksorubisin, glomerüler ATP'az aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Doksorubisinin bu etkisi, su geçirgenliğinde görülen azalma ile ilişkilidir ki bu azalma, sülfidril vericisi N-asetilsistein tarafından tersine çevrilen bir etkidir. Ayrıca Dox verildikten sonra, karaciğer, böbrek ve kalpteki glutatyon düzeyleri azalmış ve lipid peroksit düzeyleri artmıştır (84). Dox'un, miyelotoksisite (85) hepatotoksisite (86) ve kardiyomiyopati (87) gibi

diğer organlara olan etkisi, potansiyel olarak Dox kaynaklı nefropatiye de katkıda bulunmaktadır. Nefropati, mikrovasküler bir komplikasyondur, böbrek yetmezliği ile sonuçlanır.

Jeansson ve ark. (88) yaptıkları çalışmada; Dox'un, glomerüler bariyerin, özellikle boyut ve yük seçiciliğinin kaybına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Dox'a maruz bırakılan hayvanların, glomerüler endotelyal yüzey tabakası veya glikokaliks kaybı olduğu ve glikokaliksin normalin yalnızca % 20'si kadar kaldığı saptanmıştır. Aynı zamanda glomerülden izole edilen çeşitli proteoglikanların azalmış olduğu gözlenmiştir. Dox'un, proteoglikan sentezini azaltarak glomerüler glikokaliksin kalınlığını ve glomerüler seçiciliği değiştirdiği belirtilmiştir. Bu bulguların proteinürik (idrara anormal miktarda protein atılımı) renal hastalıkların patogenezinde glomerüler endotelin rolünü desteklediği ifade edilmiştir. Dox, glomerüler endotelyum incilmesi ve podositlerin yok olması ile plazma proteinlerinin süzülmesini engelleyerek boyut ve yük özellikli bariyerlerin kaybına neden olmaktadır. Bu değişiklikler Dox enjeksiyonundan sonra en erken 1-2 hafta içerisinde görülür ve 4 haftaya kadar da şiddetlenmektedir. Sıçanlarda serum kreatininindeki artış, kreatinin atılımındaki düşüş, azalan serum albümini, dislipidemi ve idrarla atılan protein miktarının artması şeklinde gözlemlenen renal fonksiyonlardaki azalma, kronik böbrek hastalığı ve nefrotik sendromla tutarlıdır.

Erkek sıçanlar, Dox'un indüklediği nefropatiye, dişi sıçanlardan daha duyarlıdır. Sham operasyonu geçiren sıçanlarla karşılaştırıldığında, kastrasyon yapılan erkek sıçanların daha az duyarlı olması, Dox'un indüklediği renal hasarın patogenezinin cinsiyet hormonlarının katkıda bulunduğunu göstermektedir. Renal hasar modeli olarak Dox nefropatisi kullanılacaksa, deneyin dizayn edilmesinde

cinsiyet seçimi önemli bir faktördür, çünkü renal hasar şiddetinde cinsiyete bağlı olarak farklılık oluşmaktadır (89).

Wang ve ark. (90) erkek farelerde oluşturduğu Dox nefropatisinde aşıkâr proteinüri 5. günde görülmüştür ve çalışma boyunca oldukça yüksek olarak kalmıştır. Birinci ve ikinci haftada tübüler hücrelerde reabsorbsiyon damlacığında artış olmuştur ve iki hafta sonra çeşitli intraluminal kastlar oluşmuştur. Dört ile altı haftada glomerüler vakuolizasyon ve orta derecede fokal segmental skleroz belirginleşmiştir. Orta derecede interstisyel genişleme ve şiddetli inflamasyonla birlikte fokal ve tam global glomerüler skleroz yaygınlaşmıştır. İkinci haftada interstisyum ve glomerülün her ikisinde de öncül makrofaj infiltrasyonu belirginleşmiştir ve bunu CD4+ (cluster of differentiation 4) ve CD8+ (cluster of differentiation 8) T hücrelerinin her ikisinin, interstisyumda birikmesi izlenmiştir. Glomerülde ise birikme olmamıştır.

Dox uygulandıktan sonra böbrek korteks ve medullasında CD4⁺ ve CD8⁺ hücre miktarının artıyor olması, renal hasar oluşumunda bu hücrelerin doğrudan rolü olduğunu düşündürür (91). Wang ve ark., (92, 93) makrofaj integrin CD11b/CD18'e karşı direkt monoklonal antikorunu (ED7), Dox'tan önce uyguladıklarında makrofajlarda deplesyon oluştuğu ve DOX'a bağlı olarak sıçanlarda oluşturulan nefrozisde yapısal ve fonksiyonel hasarın azaldığı tespit edilmiştir. ED7 antikor, Dox nefrozisinde dolaşımdaki ve renal korteksdeki makrofajları kısmen azaltmaktadır. Bu da ED7 pozitif makrofajların Dox nefrozisinde önemli rolü olduğunu düşündürmüştür. Dox, böbrekte direkt toksik etkiyle glomerüler hasara, tübüler dilatasyona, atrofiye ve renal fibrosizye neden olur. Glomerüler endotel hücreleri, bazal membran ve podositlerin yer aldığı

glomerüler filtrasyon bariyerinde değişikliklere neden olur. Glomerüler hücrelerde proteoglikan ve glukozaminoglikan sentezinde azalma sonucu glikokaliks kalınlığı azalır, glomerüler endotel hücre porlarının çapı artar, glomerüler seçicilik azalır, podosit hücrelerinde füzyon meydana gelir (83). Dox'un indüklediği glomerülopatide epitelyal hücre hasarı ve proteinüri görölmektedir. Ayrıca Dox'un indüklediği renal toksisite; kast formasyonu, glomerüler vakuolizasyonu ve tübüler dilatasyonu içermektedir. Kapiller loop'un segmental oklüzyonu ve epitelyal hücre hasarı, glomerüler tuft-kapsül adezyonuyla karakterize glomerül hasarı gösterilmiştir (94,95).

Dox nefropatisi, insan fokal segmental glomeruloskleroza benzer oluşturulan kemirgen modelinde, glomerül filtrasyon hızında azalma, proteinüri, glomerül filtrasyon bariyerinde değişimle ilişkili glomeruloskleroza ve tübülointerstisyel fibrozis ile karakterizedir (96). Sıçanlarda, Dox'un indüklediği nefrozis patogenezinde, renal Angiotensin II (Ang II) [muhtemelen Angiotensin II tip I (ATI) reseptör aracılığıyla], Hücreler Arası Yapışma Molekülü 1 (ICAM-1), monosit/makrofaj infiltrasyonu, oksidatif stres ve proteinüri gibi önemli proinflatuar etkiler rol oynamaktadır (97).

1.2.6. Deneysel Model Olarak Doksorubisin ile Oluşturulan Akut

Böbrek Hasarı

Doksorubisin kaynaklı glomerüler ve interstisyel fibrozis modeli fareler üzerinde ilk olarak Wang ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Çalışmalarda farelere doksorubisin İ.V. olarak 10-11 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Uygulamada 1., 2., 4. ve 6. hafta sonundaki etkiler incelenmiştir (98). Antineoplastik bir ajan olan Dox, 4-6 hafta içerisinde hafif derecede renal yetmezlikle birlikte giden nefrotik

sendrom tablosuna neden olmaktadır (99-102). Deneysel akut böbrek hasarı modeli olarak Dox nefropatisi birkaç güçlü yöne sahiptir. Öncelikle, böbrek hasarı için oldukça elverişli bir modeldir. Doku hasarının şiddetli olduğu durumlarda bile düşük oranda mortalite (< %5) görülmektedir. İlacın uygulandığı ilk bir kaç gün içerisinde böbrek hasarı başladığından, hasarın oluşma zamanı ve şiddeti önceden tahmin edilebilir. Bu açıdan böbrek hasarının daha kötüye gitmesine neden olacak ya da bundan korunmayı sağlayacak müdahalelerin denenmesi açısından faydalıdır. Hasarın yapısal ve fonksiyonel özellikleri insanlarda görülen kronik proteinürik renal hastalıkla benzerlik gösterir. Sıçanlar ve fareler kısa üreme dönemleri, kolay (ve ucuz) yoldan elde edilebilen denekler olmaları ve genetik manipülasyona uyumluluklarıyla Dox ile indüklenen akut böbrek hasarı için uygun deney hayvanlarıdır (103).

Doksorubisin nefropatisinin deneysel model olarak kullanılmasının bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Dox, dar bir terapötik indekse sahiptir, bu sebeple optimum dozdan daha az verilmesi renal hasarın oluşmamasına ya da daha fazla verilmesi ölümle sonuçlanan toksisiteye yol açabilmektedir. Tutarlı ve kolay üretilen bir model olmasına rağmen, ilaca verilen cevapta bazı bireysel değişiklikler aynı tür kemiricilerde dahi oluşabilmektedir (104).

1.3.Apelin

Adipositler ve adipositler arasında bulunan bağ dokusu hücrelerinden salgılanan proteinlerin (adipokinler) otokrin, parakrin ve endokrin etkileri olduğu tespit edilmiştir (105). 1998 yılında Tatemoto ve ark. tarafından sığır mide özsuysundan izole edilen apelin, adipoz doku ailesinin yeni bir üyesi olarak

tanımlanmıştır (106). Apelin, kendisinden daha önce 1993 yılında tanımlanmış olan G-protein kenetli (APJ) reseptörünün endojen bir ligandıdır ve etkilerini APJ'ye bağlanarak ortaya koymaktadır (106, 111). Yapılan çalışmalar; apelinin kardiyovasküler fonksiyonlar (107), ön hipofiz fonksiyonları ve sıvı homeostazisinin düzenlenmesi üzerinde rolünün olduğu (108), ayrıca apoptozun baskılanmasında görev aldığı (109) ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunda da bir koreseptör olarak işlev gördüğünü (110) ortaya koymuştur.

İnsanda Xq25-26.1 üzerinde lokalize olan apelin geni (112), 77 amino asitlik bir preproapelin kodlar ve bu preproapelin farklı kısımlarından parçalanarak apelin-10, apelin-11, apelin-12, apelin-13, apelin-15, apelin-17, apelin-19 ve apelin-36 olarak adlandırılan farklı büyüklüklere sahip fragment formlarını oluşturur (Şekil 5). Apelin reseptörün aktivasyonunu sağlayan apelin formları, karboksil (C) ucunda en az 12 karbonluk rezidü içerir (113-115). Apelinin biyolojik aktivitesi ve reseptöre bağlanmasında preproapelinin C ucu büyük önem taşımaktadır. Karboksil ucunda 12 karbon içeren amino asit formu, aktif olan en kısa sıradır. Bundan daha kısa peptidler (apelin-11, apelin-10) ise inaktiftir (106, 115). Apelin formlarının N-terminal ucu (N) kısmı ise, peptidin reseptöre bağlanmasında anahtar rol oynamaktadır (106). Apelin, etkilerini, fragmentlerine bağlı olarak farklı şekillerde gösterebilmektedir. 13 ve 17 amino asitten oluşan apelinin, 36 amino asit içeren apelin formundan daha güçlü bir biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (106). Apelin-13, N-uç piroglutamat rezidülerine sahip olduğu için biyolojik aktivitesi diğer apelin formlarına oranla daha yüksektir. Apelin-13'ün apelin-17'den 8 kat, apelin-36'dan ise 60 kat daha etkin olduğu ileri sürülmektedir (106). Apelin-13'ün yüksek

biyolojik aktiviteye sahip olması nedeniyle arařtırmalar apelinin bu formu üzerine yoğunlařmıřtır. Her ne kadar biyolojik olarak en aktif form apelin-13 olarak kabul edilmiř olsa da, apelin-36'nın APJ'ye baėlanma affinitesinin apelin-13'ten çok daha yksek olduėu gsterilmiřtir (116). Plazmada bulunan asıl apelin formlarının apelin-13, apelin-17 ve apelin-36 (apelin-13'e gbre daha az oranda) olduėu dűřnűlmektedir (111). Peptidin insanlardaki plazma seviyesinin 89.8 ± 5.3 pg/ml (117), dolařımdaki yarılanma ۆmrűnűn ise yaklařık 8 dakikada olduėu bildirilmiřtir (118). Ancak, apelinin plazmadaki konsantrasyonu diėer dokulara gbre oldukca azdır. Bu da apelinin dolařımda bir endokrin faktör olmasının yanında, nörotransmitter olarak da parakrin bir etkiye sahip olabileceėini dűřündürmektedir (116).

1.3.1. Apelin Reseptörü

O'Dowd ve ark. tarafından 1993 yılında Anjiyotensin II tip I reseptör geniyile %31 dizi benzerliėine sahip bir gen tanımlandı (119). Bu gen, ilk APJ olarak isimlendirildi ve 1998 yılında Tatamoto ve ark. tarafından endojen ligandı tanımlanıncaya kadar orfan reseptör olarak anıldı (106). 380 amino asitten meydana gelen APJ, yedi transmembran bölgeden oluřan G protein kenetli reseptör ailesindendir (119). Apelinin, APJ ifade eden hücrelerde fosfokolinle indűklenmiř siklik adenzin monofosfat (cAMP) yapımını, inhibitör G proteinlerine baėlanarak inhibe ettiėi gsterilmiřtir (120). Pitkin ve ark. fare ve sıçanlardaki apelin reseptörűnűn 377 amino asitten oluřtuėu ve insanlardaki APJ'nin amino asit dizilimiyle büyük benzerlik gösterdiėini rapor etmiřlerdir (122). Birçok canlı türűnde ve vűcut dokusunda apelin reseptörűnűn geniř daėılım gstermesi, apelinin vűcutta birçok fizyolojik mekanizmada rol

oynayabileceğini düşündürmektedir.

1.3.2. APJ'nin Lokalizasyonu

İnsan, sıçan ve fareler üzerinde yapılan deneysel çalışmalarla apelin ve APJ'nin varlığı birçok dokuda gösterilmiştir. İnsan ve ratlarda Apelin ve APJ mRNA'larının serebellum, damar endoteli, kalp, akciğer ve böbrek gibi dokularda yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir (106, 115, 116, 123). Sıçanların böbrek, hipofiz bezi, over dokusu ve iskelet kaslarında APJ mRNA'sının düşük seviyede olduğu belirlenmiştir (110). Foldes ve ark. insanda apelinin periferik lokalizasyonunun en fazla mide epitel hücreleri ve miyokarda olduğunu ortaya koymuşlardır (117). APJ'nin ratlarda periferik dokular haricinde hipokampus, serebellum, striatum ve hipotalamusta da varlığı belirlenmiştir (108, 121). Hipotalamusta apelin immünoreaktif nöronların yoğun olarak bulunduğu (125) ve özellikle de supraoptik (SON) ve paraventriküler çekirdekte (PVN) apelin ve APJ ekspresyonunun ratlarda çok daha belirgin olduğu gösterilmiştir (125, 126). Apelin, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) (126) gibi bir vasküler kemoatraktan (kimyasal çekici madde) molekül olarak hareket eder ve tümörlerin ilerlemesinde anjiyogenezi uyarır (121, 122, 124). VEGF'nin sinyalizasyon ile aktivasyonu, büyümekte olan tümör için yeni damar oluşumunu uyarır (116). APJ'nin ligandlarından birisi olan Apelin'in APJ'ye dokularda yaygın olarak bağlanması; kardiyovasküler gelişim ve fonksiyonu (116, 117), kan basıncı (118, 119), sıvı dengesi (120), anjiyogenez (121) ve üreme gibi birçok fizyolojik işlemin düzenlenmesinde yer aldığının göstergeleridir.

1.3.3. Apelinin Sıvı Elektrolit Dengesi Üzerine Etkileri

Hipotalamusun SON ve PVN nöronlarının sıvı dengesinin düzenlenmesinde önemli roller üstlendikleri bilinmektedir (122). Merkezi sinir sisteminde salıverilen apelin, antidiüretik hormonu (ADH) ve başka araçlar yoluyla da çevre dokuları ve böbreği etkilemektedir (127, 128). Raux ve ark. yaptığı çalışmada susuz bırakılan farelerde intraserebroventriküler (icv) apelin-13 uygulamasının su alımında artışa neden olduğu ve böylece apelin-13'ün sıvı dengesini düzenleyici bir fonksiyonunun olabileceğini ileri sürmüşlerdir (108). Sıçanlarda intraperitoneal (ip) ve icv apelin-13 enjeksiyonunun su tüketimini arttırdığı bildirilmiştir (123, 129). Tobin ve ark. tarafından hipotalamik SON içine mikrodializ yöntemiyle apelin-13 uygulamasının ADH nöronlarının elektrofizyolojik aktivitesini uyardığı ve somatodendritik ADH salıverilmesini uyardığı gösterilmiştir (130). Bu bulgular, apelinin su tüketimini arttırdığını ortaya koymakta ancak mekanizmalar hakkında detaylı bilgi vermemektedir.

1.4. Elabela / Apela / TODDLER

Apelin ilk olarak APJ'nin tek ligandı olarak tanımlanmasına rağmen, yapılan çalışmalar, APJ'nin fonksiyonel farklılıklar gösterdiğini göstermiştir. Buna dayanarak, APJ'nin başka bir ligandının olabileceği hipotezi ortaya konulmuştur. Reversade ve grubu, Elabela olarak adlandırılan yeni bir peptit tanımlamışlardır. Bundan birkaç ay sonra ikinci bir grup, aynı dizilere sahip bir peptidi tanımlamış ve Toddler olarak adlandırmıştır. Son zamanlarda HUGO Gen Nomenklatör Komitesi, Elabela'yı kodlayan geni Apela olarak yeniden adlandırmıştır. İnsanda, Elabela'yı kodlayan bu gen, 4q32.3 üzerinde lokalize

olup üç adet ekzon içerir. Omurgalılarda Elabela geni, 54 amino asitlik bilgi içeren mRNA kodlar. mRNA'daki bilgiye göre sentezlenen polipeptit, yüksek oranda korunmuş olup, en uçtaki son 13 amino asitlik kalıntı, tüm omurgalı türlerinde aynıdır. Sentezlenen proteinin C-uç bölgesi de yüksek oranda korunmuştur. Polipeptit 32 amino asitlik bir olgun peptide kesilmektedir. Bu polipeptit, Elabela-32 olarak adlandırılmaktadır. Elabela-32'deki N-uç Gln kalıntısı apelin-13'e benzer şekilde bir proglutamik asit (pyr) kalıntısıyla yer değiştirir. Elabela-32, Elabela-21 veya Elabela-11 gibi birkaç fragment meydana getirebilir. Elabela mRNA'sı geç blastula ve gastrula aşamaları boyunca yüksek oranda ifade edilir. Yetişkinlik döneminde ise prostat ve böbrek dokularında sentezlendiği bulunmuştur. Elabela'nın özellikle yetişkin böbreğinde renal distal toplama tüplerinde yüksek oranda sentezlendiği gösterilmiştir. Yetişkinlik döneminde kardiyovasküler sistem ve akciğerlerde düşük düzeylerde düşük düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Elabela ifadesinin, arterlerde venlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Elabela'nın sağlıklı insan plazmasındaki konsantrasyonu $0.03 \pm \text{nmol/L}$ 'dir. Diğer kısa peptitlere benzer şekilde, Elabelanın plazmadaki yarı ömrünün birkaç dakika olduğu saptanmıştır.

Son zamanlarda Apelin ve Elabela'nın her ikisinin de APJ reseptörü yoluyla benzer fonksiyonlar gösterdikleri belirlenmiştir. Elabela ve APJ, erken kardiyovasküler gelişim için temel sinyal yolağı olup gaströlasyondan önce endotel hücrelerde ifade edilirler. Aksine Apelin, gaströlasyonun ortasına kadar ifade edilmez. Apelin nakavt fareler anlamlı bir konjenital kardiyak displazi fenotipi göstermezler. Ancak APJ nakavt fareler, bu fenotipi gösterirler. Bununla birlikte Elabela geninin yokluğunda kardiyak morfogeneziste defektler meydana

geldiği ve bir rudimenter kalp veya kalbin olmadığı embriyoların oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Sürpriz bir şekilde bu fenotip, Apelin reseptör nakavt farelerin fenotipik kopyasıdır. Elabela aynı zamanda insan embryonik kök hücrelerinde de sentezlenmektedir. Ancak bu hücreler, APJ reseptörünü sentezlemezler. Bu bulgu APJ'nin, Elabela'nın tek reseptörü olmadığının göstergesidir

Elabela'nın merkezi sinir sisteminde; beyin, korteks, serebellum ve tibial sinirde, kas dokusunda; kalp, arter kasları ve iskelet kasında, internal olarak ise ince bağırsak, kolon, yağ dokusu adipositleri, böbrek, karaciğer, akciğer, mide, dalak, zafakus ve mesanede, sekretuar olarak pankreas, tiroit, tükrük bezi, pituiter, meme ve deride, üreme organlarında ise ovaryum, terus ve testiste ifade olduğu belirlenmiştir. Elabela'nın böbrek, meme, deri ve tükrük bezinde yüksek düzeyde ifade olduğu; beyin, ince bağırsak, kolon, yağ dokusu, karaciğer, akciğer, mide, pankreas, tiroit ve adrenal bezlerde daha düşük düzeylerde ifade olduğu belirlenmiştir (12,131,148,178).

tiplerinde pek çok hücreler arası sinyal yolağını uyarabilir. Trimerik G proteinler α , β ve γ olarak adlandırılır. $G\alpha$ alt birimlerinden en iyi tanımlanmış olanları $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/o}$, $G_{\alpha q/11}$ ve $G_{\alpha 12/13}$ 'tür. Örneğin; $G_{\alpha s}$, adenilsiklazı (AC) aktive edebilir, siklik AMP üretilir ve protein kinazın aktivasyonu indüklenir. $G_{\alpha i/o}$ ise bunun tam tersi etkilere sahiptir. $G_{\alpha q/11}$, fosfolipaz c, β aktivasyonu ve artmış hücreler arası kalsiyum ile ilişkilidir. $G_{\alpha 12/13}$ alt tipleri, aktin iskeleti düzenleyen küçük GTPazların Rho ailesini düzenler.

1.4.1.1. $G_{\alpha i/o}$

Bu alt ünite, pertussis toksin duyarlı bir G proteini olup tercihen APJ'ye bağlanır. $G_{\alpha i/o}$; ERK aktivasyonu, AKT sinyalizasyonu protein kinaz A'nın inaktivasyonu yoluyla siklik AMP üretiminin azalmasını içeren sinyal yolaklarında aracıdır. $G_{\alpha i/o}$ 'nun ilişkili olduğu β ve γ alt birimleri ise fosfolipaz c β , potasyum kanalları, adenil siklaz ve fosfoinozitol 3 kinaz ile doğrudan etkileşirler. Bu alt üniteler aynı zamanda ERK aktivasyonunu uyaran küçük bir GTPaz olan Ras'ı dolaylı olarak uyarır (131).

1.4.1.2. $G_{\alpha q/11}$

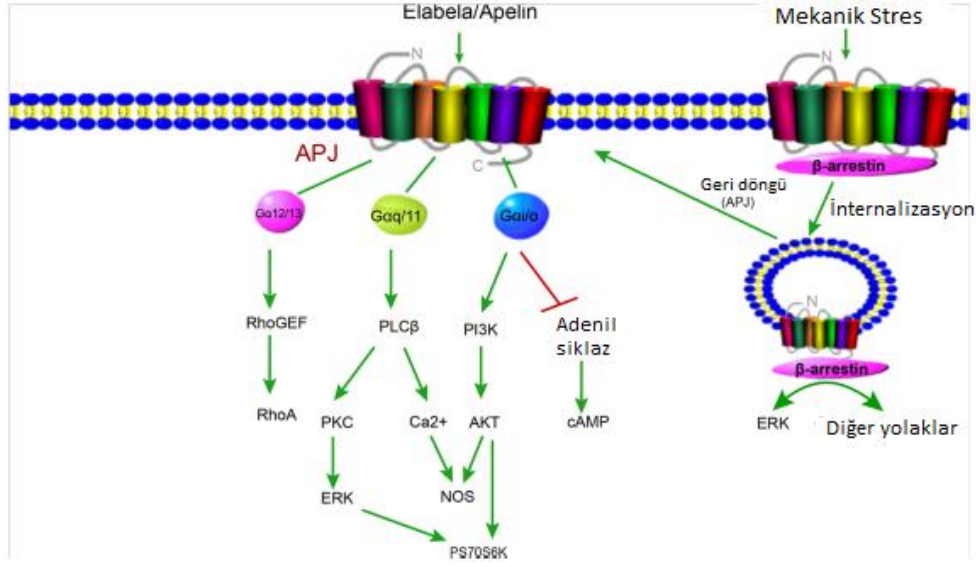
Diğer bir pertussis toksin duyarsız G protein olan $G_{\alpha q/11}$, APJ'ye bağlanır. Kardiyomiyositlerde Apelin'in APJ bağımlı inotrofik etkisinde $G_{\alpha q/11}$ aracılı PLC β -PKC yolağı görev yapar. APJ ile $G_{\alpha q/11}$ 'in birlikteliğinin, Na-H ve Na-Ca değiştiricilerini uyardığı ve bu uyarının Apelin'in sıçan kalbindeki inotrofik etkilerini uyardığı gösterilmiştir (131).

1.4.1.3. β -arrestin

Apelin, APJ klatrin bağımlı endositozda APJ reseptörünün hücre içerisine alınmasında ve β -arrestinin sitoplazmik birleşimini ve toplanmasını uyarır. Mekanik uyarılar tarafından APJ'nin aktivasyonu, kardiyomiyosit hücre büyüklüğünü artırır ve hipertrofi ilişkili moleküler belirteçleri uyarır. APJ'nin gerilme yoluyla aktivasyonu sadece β -arrestin yolağıyla bağlantılıdır.

1.4.2. Elabela Sinyalizasyonu

Elabela'nın C-terminal kalıntıları, sinyalizasyon ve bağlanmada önemlidir. N-terminal kısmı mutasyona uğramış olan Elabela'nın, yabanıl tip Elabela ile benzer bağlanma afinitelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, Elabela'nın N-terminal ucunun, reseptöre bağlanma yeteneğine sahip olduğunu, ancak sinyalizasyon için kritik bir faktör olmadığını göstermektedir (131). Elabela'nın tamamına yakın daha uzun N uç dizilerinin, β -arrestin sinyal yolağını uyarmada daha etkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin; Elabela-32, Elabela-21 ve Elabela-14'ün Elabela-11'e göre β -arrestini daha yüksek oranda aktive ettikleri gösterilmiştir. Elabela'nın ERK1/2 fosforilasyonunu uyarma yeteneği, Apelin'den iki kat daha güçlüdür (131).



Şekil 6. Elabela/Apelin ve APJ etkileşimi. Elabela/Apelin, APJ'yi aktive edebilir ve çeşitli hücre içi sinyal yollarını uyarabilir. APJ'nin aşağı akış etkisi, farklı Gα alt birimlerinden (Gαi/o, Gαq/11 ve Gα12/13) etkilenir. Gαi/o PI3K/AKT sinyal yollarını aktive edebilir ve hem adenil siklaz (AC) aktivitesini hem de cAMP üretimini inhibe edebilir. Gαq/11 hücre içi Ca²⁺ ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonunu artırabilir. β-arrestin, Kardiyopulmoner Resüsitasyonu (CPR) geri dönüşümünü başlatabilir. Yeşil ok uçları aktivasyonu ve kırmızı blokluklar inhibisyonu gösterir (131).

1.4.3. Vücut Sıvı Dengesinin Düzenlenmesinde Elabelanın ve Apelinin

Rolleri

Daha önce yapılan çalışmalar, Elabela ve Apelin'in merkezi sinir sisteminde çeşitli mekanizmalar yoluyla vücut sıvılarını dengeleyebildiğini göstermiştir (131). APJ nakavt fareler anormal sıvı dengesine sahiptir. Farklı Apelinlerin vücut sıvı dengesini korunmasında farklı özellikler sergiledikleri bulunmuştur. Apelin-13'ün intraventriküler enjeksiyonunun, sıçanlarda su alımını azalttığı rapor edilmiştir. Benzer bir fenomen farelerde de gösterilmiştir. Apelin'in intraperitoneal enjeksiyonunun su alımını artırdığı, bununla beraber farelerde Apelin-17'nin intraserebroventriküler alımının arginin vasopressin (AVP)

salınımını baskıladığı ve diüretik bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Sıçanlarda Apelin-17'nin benzer şekilde alımının diürezise yol açtığı gösterilmiştir. Elabela da benzer şekilde yetişkin sıçanlarda diürezisi ve su alımını artırarak sıvı dengesini etkilemektedir. Diğer bir çalışmada intraserebroventriküler Elabela enjeksiyonunun, AVP'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise Elabela'nın kan AVP'sini değiştirmeksizin deneysel sepsis boyunca sıvı dengesini uyarabildiği gösterilmiştir. Hem Apelin hem de Elabela diüretik olarak rol oynayabilir. Her ikisi de vazopressini inhibe ederek vücut sıvı dengesini etkilerler. Böylece diürezise neden olurlar. Bununla beraber, böbrekte Elabela ifadesi Apelin'den yaklaşık olarak 10 kat daha fazladır. Elabela'nın yüksek ifade düzeyleri, yetişkin böbreğinin renal distal koleksiyon tüplerinde görülmektedir. İlaveten Elabela'nın intravenöz enjeksiyonu üriner ozmolarite ve elektrolit atılımını (Na-K) anlamlı olarak azaltmaktadır. Elabela'nın diürezis ve su alımını düzenlemedeki potansiyeli, Apelin'den beş kat daha fazladır. Bu veriler Elabela'nın, sıvı dengesinin düzenlenmesinde ve böbrek fonksiyonlarında kritik bir role sahip olduğunu işaret etmektedir (131). Bu bilgiler doğrultusunda böbrekte yüksek düzeyde ifade olan Elabela-21 peptidinin Dox ile oluşturulan sıçan akut böbrek hastalığında (ABH) koruyucu etkilerinin olabileceği ifade edilmektedir.

Mevcut çalışmada sıçan akut böbrek hasarı modelinde Elabela'nın rolünün araştırılması ve intraperitoneal Elabela-21 peptid enjeksiyonunun muhtemel etkilerinin moleküler, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2.GEREÇ ve YÖNTEM

2.1.Çalışma Gruplarının Tanımı

Çalışmada denek olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen 10 haftalık 230-250 gr wistar albino ırkı, toplam 28 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar yaklaşık 23°C ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ortamda, su ve yemleri verilerek, üst kısmı ızgaralı polikarbonat (50cm×30cm×20cm) koloni kafeslerinde yaşatıldı.

Çalışma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığının 05.05.2017 tarihli, 9. toplantı ve 111 no'lu onayı alındıktan sonra başlatıldı. Deney grupları ve uygulamaları aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır. Çalışmada her grupta 7 sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturuldu.

Çalışmanın bu kısmında wistar albino sıçanlar böbrek hasarı oluşturulması için kullanıldı. Çalışmada farmakolojik bir ajan olan doksorubisin ile böbrek hasarı oluşturuldu. Deney toplam 14 gün sürmektedir.

2.1.1. Kontrol grubu (n=7) (K): Normal şartlarda büyütülen sıçanlar kullanıldı. Çalışma boyunca intraperitoneal olarak serum fizyolojik (SF) verildi.

2.1.2. Elabela-21 grubu (n=7) (Ela-21): Bu gruptaki hayvanlara 6. güne kadar 1.0 ml/kg/gün SF uygulanıp, ardından 7-14. gün arası 39 mcg/kg/gün elabela-21 (İ.p.) uygulandı.

2.1.3. Doksorubisin grubu (n=7) (Dox): İlk gün 10 mg/kg tek doz doksorubisin ip enjeksiyon yapıldı. Deney 14 gün içerisinde tamamlandı. Bu gruplardaki sıçanlar, 14. günde giyotinle dekapite edilip, çalışma sonlandırıldı.

Dekapitasyon sonrası batin açılarak böbrekler çıkartıldı. İmmünohistokimyasal analizler için böbrek korteks ve medulla doku örnekleri %10 nötral tamponlu formaline alındı. Moleküler genetik analizleri için alınan böbrek dokuları, sıvı azotta dondurularak, kullanılıncaya kadar -80°C’de muhafaza edildi.

2.1.4. Doksorubisin+Elabela-21 grubu (n=7) (Dox+Ela-21): İlk gün 10 mg/kg tek doz doksorubisin ip enjeksiyon yapıldı. Ardından 7- 14. günler arası 39 mcg/kg/gün dozunda olmak üzere ip olarak Elabela-21 uygulandı (132).

Hayvan deneyleri hariç yapılacak diğer tüm analizler Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında yürütüldü.

2.3.Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri:

2.3.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler ve Kimyasallar

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukrayna
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centrifüğe Tube, Meksika
- Homojenizatör: Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, Katalog No: BBY24M, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNaseFree Glass Beads, Katalog No: GB05, ABD
- ELISA cihazı: Biotek, ELX800, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, İsviçre
- PCR ve Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog No: 3737.S.X, Biotix

Laboratory Media, İngiltere 37

- Plate Yapıştırıcı: Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, Katalog No: 4311971, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0,1 mL), Katalog No: 4346906, Singapur
- Termal Döngü Cihazı: Biometra, Almanya
- Real Time-PCR cihazı: Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma 3K30, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye
- Mastronano Spectrophotometer
- ELA-21 (Rat) Peptide: Phoenix Pharmaceuticals. Inc. Cat No: 007-26, A.B.D.
- Doxorubicin (hydrochloride): Cayman Chemical, Cat No:15007, A.B.D.
- Tri Reagent 200 ml, MRC, Bioshop, Katalog No: TR 118, Kanada
- MultiScribe™ Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Cat No:4311235
- The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit, Applied Biosystems, Katalog No: 4387406
- Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Cat No: 201443, Almanya
- RT² qPCR Primer Assay for Rat, Qiagen, Almanya

2.4. Moleküler Genetik Analizler

14 günlük deney süresi bitiminde hayvanlar dekapite edilerek böbrek

dokusu hızlıca alındı. Real Time PCR çalışmaları için alınan böbrekler sıvı azot içerisinde dondurularak kullanılıncaya kadar -80°C’de saklandı (133, 134).

2.4.1 Kantitatif Real time PCR

2.4.1.1 RNA izolasyonu:

Örnekler -80°C’den çıkartılarak oda sıcaklığına getirildikten sonra standart Tri Reagent izolasyon protokolü ile RNA izolasyonu yapıldı. Protokol detayları aşağıda verilmiştir. Örnekler trizole alındıktan sonra doku parçalayıcısı ile homojenize edildi ve RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktarı nanodrop cihazında ölçüldü.

2.4.1.1.1. Tri Reagent ile RNA İzolasyonu:

1. 30-40 mg doku alındı, ependorf tüplere konularak üzerlerine 500 µl Tri Reagent eklendi.
2. Homojenizasyon boncuklarından doku miktarı kadar eklendi.
3. Homojenizatörün 8. hız kademesinde 5 dk homojenize edildi.
4. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. Tüpler içindeki homojenizatör boncukları ile birlikte 12.000 x g’de 2 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısımlar yeni tüplere aktarıldı üzerine 100 µl kloroform eklenip yaklaşık 15 sn vortekslendi.
7. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi.
8. 12.000 x g’de 2-4°C’de 15 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj işleminden sonra 3 faza ayrılan sıvının en üst fazı başka tüpe alındı.
10. 250 µl izopropil alkol eklendi.
11. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.

12. 12.000 x g'de 2-4°C'de 10 dk santrifüj edildi.
13. Süpernatant kısım döküldü.
14. Pellet üzerine 500 µl % 75'lik etanol eklendi.
15. Vortekslendi ve 7500 x g'de 2-4°C'de 5 dk santrifüj edildi.
16. Süpernatant atıldı ve etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı.
17. Süpernatant atıldı ve tüpler bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek etanolün uçması sağlandı.
18. Kuruyan tüplerin üzerine dietilpirokarbonatlı (DEPC) su eklendi ve pipetaj yapıldı.
19. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

2.4.1.1.2. RNA Ölçümü:

RNA ölçümüne başlamadan önce kör olarak distile su okutulmasıyla cihaz kalibre edildi. Maestronano Spektrofotometre cihazının ölçüm alanına 2 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Her örnek okumasının ardından cihaz temizlenerek 1 dakika bekletildi. Komplementer DNA (cDNA) sentezinde eşit RNA miktarlarında çalışılabilmesi için okunan en düşük RNA değeri standart olarak alındı. Kontrol Grubu, Dox Grubu, Elabela Grubu, Dox + Ela Grubu olmak üzere toplamda 4 RNA havuzu oluşturuldu.

2.4.1.2. Komplementer DNA Sentezi

Reverse transkripsiyon için iki mikrogram RNA kullanıldı (final hacmi 20 µL). Amplifikasyon için cDNA elde edilip, genlere spesifik primerler kullanılarak ilgili gen bölgeleri çoğaltıldı.

RT-PCR'ı için kullanılacak cDNA'ların hazırlanmasında havuz yapılan RNA örnekleri kullanıldı. Bunun için her örnekten 5 µl RNA alındı. cDNA sentezi toplam 10 µl hacimde gerçekleştirildi (Tablo 2). Sentez için 5µl RNA örneği, 1 µl 5×RT random primer, 1 µl 10×RT buffer, 0,4 µl 25×dNTP mix, 2.1 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 2). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve en son sıcaklık 4°C olacak şekilde cihazda bekletildi(Tablo 3). Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 2. cDNA karışım miktarı (10µl'lik reaksiyon)

Bileşik	Hacim(ul)
10x RT tamponu	1.0
25x dNTP karışımı (100mM)	0.4
Reverse Transkriptaz (50U/ul)	0.5
10x RT Random Primer	1.0
Nükleaz içermeyen su	2,1
RNA örneği	5
Toplam reaksiyon	10

Tablo 3. cDNA sentezi PCR program

PCR	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Zaman	30 dk	120 dk	5 dk	∞

2.4.1.3. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile amplifiye edildi. Deneklerin Böbreklerinden Tablo 4'te verilen genlerin ifade düzeyleri incelendi. qRT-PCR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Tablo 4. Böbrek dokusunda qRT-PCR ile çalışılan sıçan genleri

Gen	Gen ile İlgili Primerin Katalog Numarası
Elabela/apela/toddler	AT02437631
Smad3	PPR06494A-200
Col1a1	PPR42922A-200
Col3a1	PPR43017A-200
Gapdh (housekeeping)	PPR06557B-200

Real Time-PCR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Plate kuyucuklarına cDNA örneklerinden 0,5 µl koyuldu. Her bir örnek için 1µl Eva Green Master Mix, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 0,5 µl primer hibridizasyon probu örnek sayısına göre bileşen miktarları hesaplanarak mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 4,5 µl pipet ile konularak plate'in üzeri optik filmle kapatıldı (Tablo 5). Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini plate spin cihazında 1 dakika süre ile santrifüj edildi.

Tablo 5. qRT-PCR için kullanılan bileşikler

Bileşikler	Hacim (ul) X
Cdna	0.5
Primer-prob	0.5
Green Master Mix	1
Nükleaz içermeyen su	3

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 6).

Tablo 6. RT-PCR program

RT-PCR	1. Adım	2. Adım	3.Adım	4. Adım
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C
Zaman	2 dk	10 dk	15sn	1 dk

2.5.İmmünohistokimyasal Boyamalar

Böbrek dokularında hematoxilen eosin boyaması ile böbrek hasarı değerlendirilmesi yapıldı. Elabela gen ifadesi immünohistokimyasal yöntemle değerlendirildi. İmmünohistokimya analizler özellikle qRT-PCR sonucuna göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar tespit edilen genler için yapıldı.

2.5.1. Hematoksilen - Eozin Boyaması

Böbrek dokuları bouin solüsyonunda fikse edildikten sonra sırasıyla artan dereceli etanol serilerinden geçirilerek yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip basamaklarından (Tablo 7) geçirilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra ksilolde parlatılıp parafine (P3558-1kg Sigma-Aldrich Paraplast Embedding Media, U.S.A) gömüldü. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler rodajlı ve polilizinli lamlara alındı. Rodajlı lamlara hazırlanan preparatlar Hematoksilen- Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Işık mikroskopunda (Olympus CH-BI45-T-S) değerlendirilip fotoğraflandı (Toupcam UCMOSO5100KPA).

Tablo 7. Histolojik Takip Basamakları

SIRA	İŞLEM	SÜRE
1	% 70 Alkol	Gece boyu
2	% 80 Alkol	1 saat
3	% 96 Alkol	1 saat
4	% 96 Alkol	1 saat
5	% 100 Alkol	1 saat
6	% 100 Alkol	1 saat
7	Ksilol I	1 saat
8	Ksilol II	1 saat
9	Sert Parafin (Etüvde)	Gece boyu
10	Gömme	

Renal morfolojinin değerlendirilmesi:

Glomerulosklerozis: El nahas ve ark. skrlama sisteminin modifikasyonuna göre tayin edildi (11, 27, 28).

Skor0: Normal glomerulus,

Skor1: Bazal membranda incelme,

Skor2: Orta ve ciddi hyaluronozis,

Skor3: Diffüz hyaluronozis,

Skor4: toplam küme tıkanıklığı ve çökmesi. Her bir hayvanın glomerular skoru 100 glomerulusun sayımıyla gerçekleştirildi.

Tubulointersitisyel hasar: Tubulointersitisyel değişimlerden etkilenen alanın yüzdesi şeklinde semikantitatif bir skala ile tayin edildi.

Skor0: Normal tubuler ve intersitisyum.

Skor1: Görüş Alanının <25% inde tubular dilatasyon ve fira kenar kaybı.

Skor2: Görüş Alanının <50% inde Tubular atrofi, dilatasyon ve kastların varlığı,

Skor3: Görüş Alanının <75% inde Tubular atrofi, dilatasyon ve kastların varlığı,

Skor4: Görüş Alanının <75% inde Tubular atrofi, dilatasyon, kastların varlığı ve fibrosis (135,136).

2.5.2. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler Elabela hormonunun böbrek dokusundaki varlığının ve lokalizasyonun belirlenmesi için ve şüpheli qRT-PCR sonuçlarının doğrulanması için yapıldı. Dekapitasyonun ardından sıçanların ilgili dokuları hızla çıkarılıp %10 formaldehitte tespit edildikten sonra doku takip işleminden geçirildi

ve histokimyasal incelemeler için parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5–6 mm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antijen geri kazanımı için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika tutuldu. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sırasıyla sekonder antikor (30 dakika), Streptavidin Alkaline Phosphatase (30 dakika) ve Fast Red Substrate System ile inkübe edildi. Mayer's hematoxilen ile zıt boyaması yapılan dokular Fosfat salin tamponu (PBS) ve distile sudan geçirilip uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX50 ışık mikroskopunda incelenip fotoğrafı çekildi.

2.6.Eliza Analizleri

Kesim sonrası serumu ayırmak için kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumlar ayrıldı.

Aşağıda adları belirtilen Elisa kitleri kullanılarak, serum elabela düzeyleri belirlendi:

Rat Elabela (ELABELA) (*Shanghai YL Biont Co.Ltd. Cat No: YLA1445RA, Çin*),

Rat Interleukin 6 (IL-6) (*Shanghai YL Biont Co.Ltd. Cat No:YLA0031RA, Çin*),

Rat Kidney injury molecule 1 (Kim-1) (*Shanghai YL Biont Co.,Ltd. Cat No:YLA0396RA, Çin*),

Rat Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) (*Shanghai YL Biont Co.Ltd. Cat No:YLA0394RA, Çin*)

Böbrek fonksiyonlarının düzenli işlediğinin göstergesi olan biyokimyasal parametrelerin (glukoz, BUN, Kreatinin, Ürik Asit, Kolesterol, Na⁺⁺ Cl⁻ K⁺ ve Ca⁺⁺) analizleri serumlarda çalışıldı (Beckman Coulter 480). Sonuç olarak gruplardaki böbrek hasarının düzeyi yukarıdaki parametreler değerlendirilerek gruplar arasında karşılaştırıldı.

2.6.1. Eliza Testi

Serum örneklerinden Elabela, Kim-1, Il-6 ve NGAL seviyelerinin tayini için ELISA testleri yapıldı. Yöntemin uygulanabilmesi için dekapite edilen sıçanların kanları aprotininli tüplere toplandı. Santrifüj (3500 RPM’de, 5 dk) işlemi uygulandıktan sonra supernatant kısım alınarak ELISA testinde kullanıldı. Çalışma protokolü aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

Solüsyonların Hazırlanması

Yıkama Tamponu: Kitte bulunan konsantre yıkama solüsyonundan 30 ml alındı ve üzerine 750 ml deiyonize distile su koyuldu.

Standart Solüsyonu: Her kitin protokolüne bağlı kalınarak 6 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.

Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu: Her bir numune için 1 µl Biotin-etiketli antikor üzerine 99 µl antikor seyreltme tamponu eklendi (Örn: Numune sayısı*1 µl Biotin-etiketli antikor ve numune sayısı*99 µl antikor seyreltme tamponu).

2.6.1.1 Eliza Prosedürü

1. Standart solusyonundan 50 ul ve numunelerden 40 ul her bir kuyucuğa koyuldu. Örneklerin kuyucuklardaki yerleri kaydedildi.
2. Kuyucuklardaki standart ve numunelerin üzerine 50 µl Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu ve 10 ul antikorlar eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C’de 60 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı. Sıvı boşaltılarak her kuyucuk 100 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklarda yıkama tamponu 1 dk bekletilip döküldü ve yeniden eklendi. Bu işlem 5 kez tekrarlandı.
4. Yıkama işleminin ardından ilk olarak her bir kuyucuğa 50 µl Kromojen A daha sonra 50ul Kromojen B çalışma solüsyonu eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C’de 10 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı.
- 5.İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi (Mavi renk hemen sarı renge dönüştü).
6. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okuma yapıldı.
7. Hesaplama işlemi gerçekleştirildi.

2.7.İstatistik Analizler

Elde edilen veriler ortalama±standart hata (SH) olarak belirtildi. İstatistiksel farklar bağımsız gruplarda “one-way ANOVA” ve “independent student-t” testleri ile hesaplandı. Aynı grubun farklı zaman noktalarındaki değerleri arasındaki farkı değerlendirmek için “paired student-t test” kullanıldı. Elde edilen sonuçların yorumlanmasında $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Sıçan Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Gruplar arasında deneyin ilk gününde sıçan ağırlıkları açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0.204$). Deney sonunda sıçan ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında kontrol ve Ela-21 grubuna göre Dox grubunda anlamlı azalma ($p=0.012$ ve $p=0.011$, sırasıyla) olduğu gözlemlendi. Yine deney sonunda kontrol ve Ela grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda ağırlık azalmasının anlamlı değişim göstermediği belirlendi ($p=0.369$ ve $p=0.269$, sırasıyla).

Tablo 8. Deney gruplarında deneyin ilk gün ve son gün ağırlık ölçümleri

Gruplar	İlk ağırlık (gr)	Son ağırlık (gr)
K	330.83 $\pm$ 49.33	339.83 $\pm$ 46.95
Ela-21	331.50 $\pm$ 46.29	351.00 $\pm$ 44.96
Dox	330.20 $\pm$ 33.03	249.40 $\pm$ 40.88 ^{a,b}
Dox+Ela-21	289.66 $\pm$ 15.22	298.83 $\pm$ 18.89
F ve P değeri	1.704 ve 0.204	6.903 ve 0.003

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bEla-21 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cDox grubuna göre karşılaştırıldığında. $p<0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi. Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

3.2. Elisa Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

3.2.1. Serum Elisa Verilerinin Değerlendirilmesi

Serum elabela seviyeleri (Tablo 9) gruplar arasında karşılaştırıldığında Elabela'nın kontrol grubuna göre hem Dox hem de Dox+Ela grubunda anlamlı

olarak azaldığı görülmüştür ($P=0.012$ ve $P=0.005$, sırasıyla). Ela-21 ve Dox grubuna grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda anlamlı azalma olduğu gözlenmiştir ($P=0.031$ ve $p=0.043$, sırasıyla).

KIM-1 düzeylerinin, kontrol grubuna göre Dox ve Dox+Ela-21 grubunda anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($P=0.019$ ve 0.018 , sırasıyla). Yine Kim-1 serum düzeylerinin Ela-21 grubuna göre Dox ve Dox+Ela grubunda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p=0.021$ ve $p=0.020$, sırasıyla). Kim-1 düzeyleri açısından Dox grubuna göre Dox+ Ela-21 grubunda anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir ($P>0.05$).

Serum NGAL seviyelerinin kontrol grubuna göre gruplarda anlamlı değişim göstermediği belirlenmiştir ($P>0.05$).

Serum IL-6 seviyesi kontrol grubuna göre hem Dox hem de Dox+Ela-21 gruplarında anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($P=0.048$ ve $P=0.046$, sırasıyla). Serum Il-6 seviyeleri açısından Dox ve Dox+Ela-21 grupları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p=0,193$).

MDA düzeyleri açısından, diğer gruplarla kıyaslandığında, Dox grubunda anlamlı bir artma olduğu gözlendi ($p=0.001$ ve $p=0.003$, sırasıyla). Yine Dox grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda MDA düzeylerinin azaldığı, kontrole benzer düzeylere geldiği gözlenmiştir ($p=0.001$).

Tablo 9. Serum Eliza Sonuçları

GRUPLAR						
Parametre	Kontrol	Ela-21	Dox	Dox+Ela-21	F	P
ELABELA	10.77± 1.19	14.20± 0.67 ^a	15.47± 0.73 ^a	11.42± 0.78 ^{bc}	8.34	0.001
KİM-1	0.09± 0.04	0.58± 0.03 ^a	0.15± 0.01 ^{a.b}	0.15± 0.004 ^{a.b}	8.30	0.001
NGAL	1.4 ± 0.17	1.44± 0.13	1.81± 0.06	1.75± 0.13	2.64	0.083
IL-6	0.37± 0.04	0.37± 0.02	0.53± 0.03 ^{a.b}	0.48± 0.03 ^{a.b}	5.43	0.008
MDA	7.87±0.82	8.10±4.15	16.79±4.14 ^{a.b}	7.93±1.62 ^c	12.29	0.000

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bEla-21 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cDox grubuna göre karşılaştırıldığında. p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi. Değerler ortalama ± standart sapma veya standart hata olarak verildi.

3.3.Biyokimya Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol ve Ela-21 gruplarına göre kan Glukoz düzeyleri Dox ve Dox+Ela-21 gruplarında anlamlı olarak artmıştır (P=0.000 ve P=0.000, sırasıyla). Dox grubuna göre Dox+Ela gruplarında anlamlı olarak azalma görülmüştür (P=0.000). Ela grubuna göre Dox+Ela grubunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (P=0.965).

Kan Üre düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim olmadığı gözlenmiştir (p>0.05).

Kontrol ve Ela-21 gruplarına göre serum Ürik Asit düzeyleri Dox grubunda anlamlı olarak artmıştır (P=0.000 ve p=0.000; sırasıyla). Dox grubuna

göre serum ürik asit düzeylerinin Dox+Ela-21 grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($P=0.000$). Serum Ürik Asit düzeyleri açısından Ela-21 grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda anlamlı değişim gözlenmemiştir ($P=0.965$).

Serum Kreatinin düzeyleri Kontrol ve Ela-21 grubuna göre DOX grubunda anlamlı olarak artmıştı ($P=0.000$ ve $p=0.000$; sırasıyla). Dox grubuna göre Dox+Ela grubunda anlamlı olarak azalma görülmüştür ($P=0.035$).

Serum kolesterol düzeyleri hem Kontrol hem de Ela grubuna göre Dox grubunda anlamlı olarak artmıştır ($p=0.000$ ve $p=0.000$; sırasıyla). Serum kolesterol düzeylerinin Dox grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($p=0.035$). Diğer grup içi karşılaştırmalarda anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($P>0.05$).

Kan Kalsiyum, Sodyum ve Klor düzeyleri tüm gruplarda anlamlı değişim göstermemiştir ($P>0.05$).

Kan Potasyum düzeyleri Kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı bir değişim göstermemiştir ($P>0.05$). Ancak Ela grubuna göre Dox grubunda potasyum düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ($P=0.012$).

Tablo 10. Biyokimyasal parametreler

GRUPLAR						
Serum	Kontrol	Ela-21	Dox	Dox+Ela-21	F	P
Glukoz	119.70±3.66	122.75± 2.40	283.12±36.07 ^{a,b}	138.10± 3.15 ^c	27.36	0.000
Üre	103.70±2.76	102.37± 1.25	106.25± 4.10	101.40±1.10	0.47	0.708
Ürik Asit	1.65±0.08	2.08±0.08	6.89±0.94 ^{a,b}	1.79±0.07 ^c	41.41	0.000
Kreatinin	0.25±0.05	0.31±0.03	0.45±0.11 ^{a,b}	0.25±0.03 ^c	13.31	0.000
Kolesterol	39.58±2.01	50.12±3.13	186.12±48.92 ^{a,b}	105.90±13.09 ^{a,b,c}	14.36	0.000
Kalsiyum	10.20±0.27	10.82±0.14	11.24±0.60	10.58±0.15	1.875	0.150
Sodyum	138.70±3.59	139.37±1.63	145.62±5.82	140.80±1.57	0.619	0.607
Potasyum	7.53± 0.25	8.13±0.37	6.40±0.44 ^b	7.67±0.12	4.524	0.008
Klor	103.70±2.76	102.37±1.25	106.25±4.10	101.40±1.10	0.465	0.708

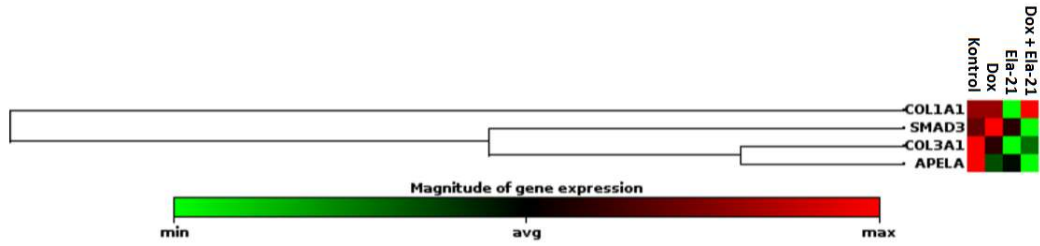
^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bEla-21 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cDox grubuna göre karşılaştırıldığında. p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi. Değerler ortalama ± standart sapma veya standart hata olarak verildi.

3.4. qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi

Gruplar arasında kontrole göre Elabela gen ifade düzeylerinin sadece Dox+Ela-21 grubunda anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (p=0.016). Değerlendirilen SMAD3, Col1A1 ve COL3A1 gen ifadeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir (p>0.05).

Tablo 11. Böbrek Dokusunda mRNA Kat Değişimi

Gruplar Genler	ELA-21		DOX		DOX+ ELA-21	
	F	P	F	p	F	P
GAPDH	1	0	1	0	1	0
SMAD3	0.9395	0.81448	1.1567	0.57817	0.6417	0.14539
COL1A1	0.6242	0.13698	1	0.99577	1.0943	0.72885
COL3A1	0.7792	0.36994	0.9075	0.70138	0.8409	0.50037
ELABELA	0.6373	0.14962	0.5434	0.07648	0.2994	0.01663



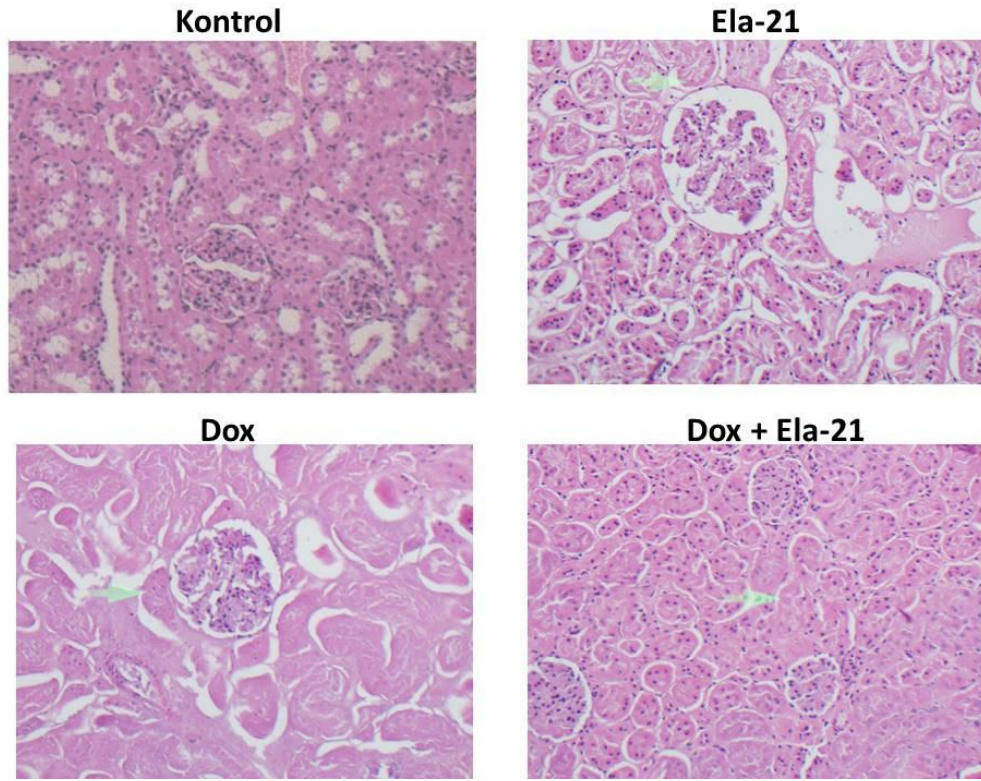
Şekil 7. Böbrek dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.

3.6. Renal Histopatolojik Bulgular

3.6.1. Hematoksilen Eosin Boyama Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubu, epitelyal desquamasyon gibi normal veya hafif değişiklikler gösterdi. Glomeruli ve fırça kenar yapıları sağlam olarak gözlemlendi. Ela-21 grubu kontrol grubunda gözlemlendiği gibi benzer morfolojik değişiklikler göstermesinin yanı sıra bazı alanlarda tübüler hasarların varlığı dikkat çekiciydi.

En belirgin hasar, DOX grubundaki tübüler değişiklikler ve glomerüloskleroz idi. DOX grubunda glomerüller, glomerüler kılcal yumakların obliterasyonu ve glomerüler yumakların kapsüler adezyonunun varlığıyla karakterizedydi. Ayrıca, bu grupta belirgin tübüler nekroz, tübüler epitel hücrelerinde şişme ve etkilenen tübüllerde fırça kenarının yaygın şekilde kaybı gözlemlendi. Öte yandan, glomerulosklerozun DOX + ELA-21 grubunda hafiflediği gözlemlense de, lezyonların tamamen iyileşmediği belirlendi (Şekil.8). Tablo.11’de yarı kantitatif skorlama yöntemleri kullanılarak, glomerüloskleroz ve tübüler hasarın ortalama değerleri belirlendi.



Şekil 8. Böbrek dokularından elde edilen kesitlere yapılan Hematoksilen&Eosin boyama görüntüleri. Kontrol: Böbrek dokusunun normal morfolojik özelleikleri gözlemlenmiştir. Ela-21: Belirli oranda tübüler hasar. DOX: glomerüler kılcal yumakların obliterasyonu, glomerüler yumakların kapsüler adezyonu, tübüllerde belirgin nekroz, tübüler epitel hücrelerde şişme, fırçası kenar kaybı. DOX+Ela-21: Dox grubunda görülen bozulmalar daha hafif şekilde görülebilmektedir.

Kontrol sıçan böbreğinin histopatolojik değerlendirmesi; normal böbrek veya minimal tübüler ve glomerüler hasar olduğunu gösterdi. Kontrol sıçanlarına göre ela-21 grubunda glomerular ve tubuler hasarın olduğu, bu hasarın kontrole göre anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p=0.001$). Kontrole göre DOX grubunda glomerüler hasar anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.000$). Dox grubuna göre Dox+Ela-21 grubunda hasarın anlamlı olarak azaldığı gösterildi ($p=0.000$).

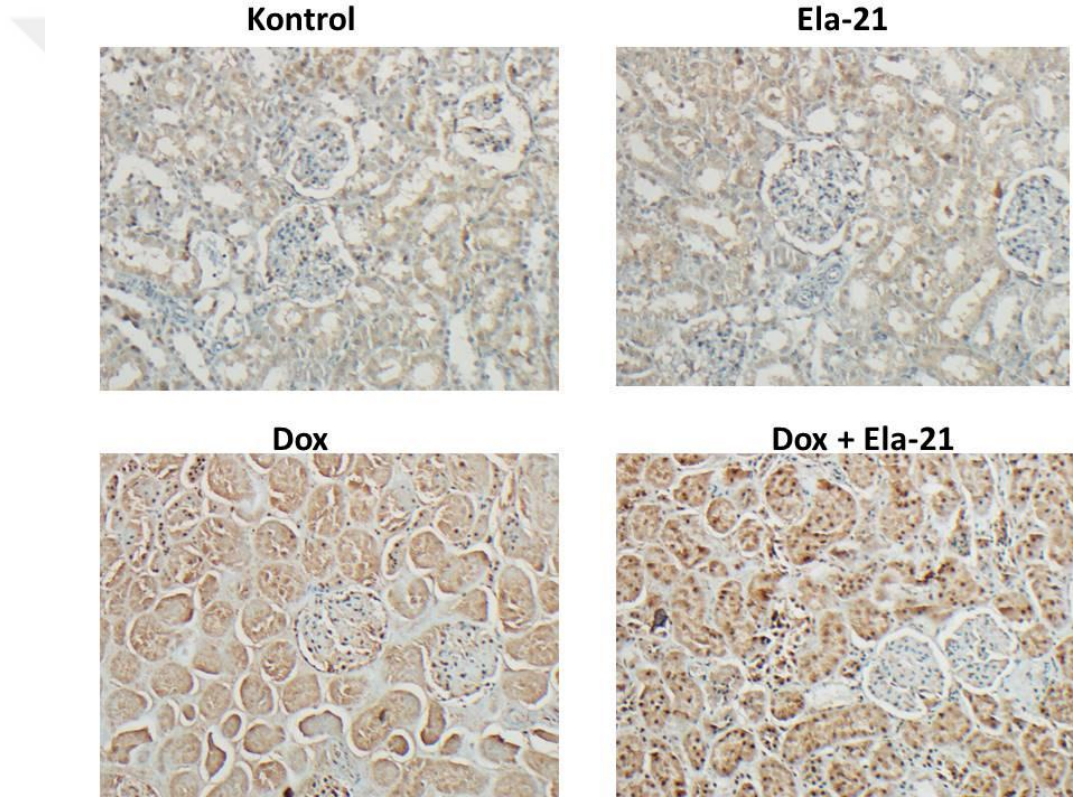
Tablo 12. Gruplarda glomerulosklerozis ve renal tübüler hasarının ciddiyetinin karşılaştırılması.

Gruplar	Hasarsız glomerulus (%)	Glomerulosklerozis	Tübüler hasar
Kontrol	91±4.33	0.07±0.005	0.00±0.00
Ela	75.66±4.50 ^a	0.36±0.05 ^a	1.21±0.10 ^a
Dox	40.33±5.00 ^{ab}	0.73±0.06 ^{ab}	2.62±0.42 ^{ab}
Dox+Ela	57.33±12.1 ^{abc}	0.63±0.04 ^{abc}	1.83±0.31 ^{abc}
P ve F değeri	$P=0.000$ F=104.10	$P=0.000$ F=247.7	$P=0.000$ F=101.9

Veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak gösterilmiştir. Böbrek hasarının farklı gruplardaki değişikliklerinin istatistiki analizinde One Way ANOVA testi uygulanmıştır. ^a Kontrol grubuna kıyasla; ^b Ela-21 grubuna kıyasla; ^c Dox grubuna kıyasla; ^d Dox+Ela-21 grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı farklılığı ($p < 0.05$) ifade etmektedir.

3.6.2. İmmünreaktivite Verilerinin Değerlendirilmesi

Ela'nın böbrekte yüksek oranda ifade olduğu gözlemlendi. Apelanın baskın olarak renal tübüler epitelial hücrelerde özellikle tübüllerin lümen kısmında ifade olduğu gözlemlendi. Glomerüler boyanmanın oldukça zayıf olduğu belirlendi. Ayrıca toplama kanallarının boyandığı gösterildi. Böbrek dokusunda Ela immünreaktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında DOX ve DOX+Ela-21 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştı ($p < 0.001$).



Şekil 9. Böbrek dokularından elde edilen kesitlere yapılan immün boyama görüntüleri

4. TARTIŞMA

Antrasiklik antibiyotiklerin kanser tedavisinde etkili olmasına rağmen bu ilaçların klinik kullanımları sırasında böbreği de içeren çeşitli organlarda toksisite meydana gelmektedir. Antrasiklin türevi kemoterapötik bir ilaç olan Doksorubisin (Dox, DXR, Adriamisin), renal fibrozise yol açan proteinürik nefropatinin kemirgen modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (137). Genel olarak podositlerde gerçekleşen ilk hasarın, proteinüriye neden olduğu kabul edilmekle birlikte, Dox'un neden olduğu nefropatinin kesin patolojisi tam olarak anlaşılmamıştır (138). Sürekli inflamasyon ve oksidatif stresin rolü (139, 140, 141), Dox nefropati modelleri (142-145) dahil olmak üzere birçok deneysel renal fibroz modelinde gösterilmiştir. Literatür tarama verilerimize göre mevcut çalışma, Ela-21 peptidinin Dox'un indüklediği sıçan nefropati modelindeki etkilerinin biyokimyasal, immünohistokimyasal ve moleküler düzeyde gösterildiği ilk çalışmadır.

ELA'nın promoter ve enhancer dizileri; Tcfcp2L1, Myc, Nanog, Sox2 ve Oct4 gibi böbrek gelişiminde görevli ana transkripsiyon faktörleri için pek çok bağlanma bölgesine sahiptir. Bu veri, Ela peptidinin böbrekte yüksek oranda ifade edildiğini açıklamaktadır (146, 147). Son zamanlarda Deng ve ark., Ela-32 ve Apelin-13 peptidlerinin Fosfo-Ekstraselüler sinyalle Düzenlenen Kinaz (p-ERK) düzeyleri ve sıvı homeostazisi üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında; sıçanlarda diürezis ve su alımının düzenlenmesinde ve ERK fosforilasyonun uyarılmasında, apelin-13 ile karşılaştırıldığında, ELA-32 peptidinin daha yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermişlerdir (182). Chen ve ark. (148) Ela'nın hipoksi veya iskemi ile uyarılan böbrek hasarında artan TGF- β 1

ve azalan inflamasyon düzeyini bulmuşlardır. Aynı çalışmada Ela -32 ve Ela-11 (0.3 ile 3µM) konsantrasyonlarının APJ endositozu ve ERK fosforilasyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Şu ana kadar Ela'nın APJ dışında reseptörü tanımlanmamış olmasına rağmen, APJ bağımsız fonksiyonlara sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulguyu destekleyecek şekilde APJ ifadesi görünmeyen insan embriyonik kök hücrelerinde kendini yenileme sürecinin sürdürülmesinde Ela'nın endojen bir ligand olarak görev yaptığı bildirilmiştir (15). Bu bulgu renal hasarda Ela peptidinin eş zamanlı kullanımının, tedavi üzerindeki etkilerini araştırmak için yeni çalışmaların yapılması gerektiğini ortaya koymuştur. Mevcut çalışmada Dox ile uyarılan böbrek hasarında Ela düzeylerinin arttığı, ancak ilginç bir şekilde Dox+Ela-21 grubunda Ela-21 seviyelerinin kontrole benzer olduğu gözlenmiştir. Hamada ve ark. Dox ile uyarılan kardiotoksisite modelinde hem Apelin hem de Apelin reseptör ifadesinin azaldığını ifade etmişlerdir (179). Çalışmamızda Dox+Ela-21 grubunda elde ettiğimiz düşük ifadenin altında eğer APJ reseptöründe bir azalma olduğu farzedilirse Ela'nın farklı bir reseptör kullanarak iyileştirici etkiler meydana getirdiği düşünülebilir. Ancak şu ana kadar Elabela'nın ek reseptörleri olduğu ifade edilmesine rağmen Elabela'ya özgü bir reseptör henüz tanımlanmamıştır.

Dox nefropatisi, glomerüler geçirgenlikteki değişikliklerden sorumlu olan glomerüler yapı üzerindeki doğrudan toksisite yoluyla, aşamalı olarak proteinüri gelişimi ile karakterize edilmiş, interstisyel fibrozis için iyi bir modeldir. Farklı çalışmalarda akut böbrek hasarı oluşturmak için Dox, farklı dozlarda ve farklı sürelerde kullanılmıştır. Yağmurca ve ark., 20mg/kg/gün dozundaki Dox'un tek bir dozunun histolojik olarak tübüler ve glomerüler hasara neden olduğunu

göstermişlerdir (149). Jathav ve ark. da benzer şekilde Dox nefrotoksitesinin tübüler ve glomerüler hasar gibi histolojik etkilerini göstermişlerdir (150). Lenderink ve ark, 8-10 haftalık sıçanlarda 10-11 mg/kg/gün Dox'u tek bir doz uygulamışlar ve hayvanları 4-5 hafta sonra sakrifiye etmişlerdir (183). Histolojik olarak glomerüler sklerozis, tübüler dilatasyon, tubulo interstisyel ve inflamasyon bulgularını elde etmişlerdir. Veening ve ark. 7.5mg/kg/gün dozundaki Dox'un tek intravenöz dozunun verildiği sıçanlarda glomerüler epitelyal hücrelerde şişme ve vakuolizasyon olduğunu gözlemlemişlerdir (184). Dziegiel ve ark, bir hafta aralıklarla Dox'un 3mg/kg/gün dozunun histolojik olarak glomerüler skleroz, glomerüler vakuolizasyon, tübüler dilatasyon, tübüler antrofil interstisyel ve lenfositik infiltrasyon gibi histolojik bulgular gözlemlemişlerdir (151). Saad ve ark. Dox'un 25mg/kg/gün dozunun böbreklerde fokal tübüler atrofiye neden olduğunu göstermişlerdir (152). Boonsanit ve ark, Dox'un 7.5 mg/kg/gün intravenöz uygulanmasının glomerüler, kapiller ve tübüler dilatasyona neden olduğunu ifade etmişlerdir (153). Park ve ark, Dox'un 7.5 mg/kg/gün tek doz uygulamasından 21 saat sonra sakrifiye edip histolojik olarak tübüler dilatasyon, tübüler lümende eozonofilik material, glomerüler vakuolizasyon bowman kapsülünde incelmeye ve edhezyon varlığını tespit etmişlerdir (143). Mansour ve ark. 15 mg/kg/gün tek bir Dox alınımindan sonra 24-48 saat içerisinde total protein ve albumin düzeylerinin keskin bir şekilde azaldığını serum üre düzeylerinin arttığını göstermişlerdir (154). Bertani ve ark. Dox'un 7.5mg/kg/gün tek bir Dox dozunun ip enjeksiyonundan sonraki 4-5 günde proteinüri varlığını tespit etmişlerdir (155). Khames ve ark. 3 hafta içinde haftada 2 kez 3 mg/kg/gün Dox'un ip uygulanmasının serum üre, kreatinin ve ürik asit

düzeylerinin anlamlı olarak artırdığı göstermişlerdir. Aynı çalışmada sildenafil ve febuxostat uygulamasının nefrotoksisite markerlarında, inflamatoar aracılar da anlamlı azalmalara neden olduğu ve renal kaspas-3 ekspresyonu ile oksidatif stress biyo-markerlarının normalleşmesini sağladığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada sildenafil ve febuxostat uygulamasının Dox ile indüklenen histolojik değişiklikleri de iyileştirdiği gösterilmiştir (156). Özetle; farklı çalışmalarda DOX'un 7.5-25 mg/kg/gün arası dozlarda intraperitoneal veya intravenöz uygulanmasının doza bağlı olarak böbreklerde farklı düzeylerde hasara neden olduğu gösterilmiştir. Mevcut çalışmada Dox 10mg/kg/gün dozunda tek doz olarak uygulamasının böbreklerde histolojik düzeyde glomerüler ve tubuler hasara neden olduğu, Ela-21 peptid uygulamasının bu hasarı belirli düzeyde iyileştirdiği gösterilmiştir.

Böbrek fonksiyon belirteçlerinden olan kreatinin ve kan üre azotu (BUN) (157), Dox uygulamasında belirgin bir artış göstermektedir (158). Khalil ve ark., Dox ile uyarılan sıçan böbrek hasarında tipik olarak renal böbrek hasarı göstergeleri olan üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı artışlar olduğunu ifade etmişlerdir (185). Çalışmamızda da benzer şekilde ürik asit ve kreatinin düzeylerinin Dox grubunda anlamlı olarak arttığı, Ela-21 uygulanmasının ise bu artışı normelleştirdiği gösterilmiştir. El sait ve ark., yaptığı bir çalışmada Dox'un indüklediği renal hasarda serum üre, kreatinin ve böbrek ağırlığının anlamlı olarak arttığını, serum albumin ve çalışma sonundaki sıçan vucut ağırlığında ise anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir (159). Mevcut çalışmada da benzer şekilde serum üre, ürik asit, kreatinin, kolesterol ve glukoz düzeylerinin Dox sıçan nefrotoksisite modelinde arttığı, Ela-21 uygulamasının ise bu değerleri normalize ettiği gösterilmiştir.

KIM-1'in, böbrek hasarı durumunu izlemek için klinik öncesi ve klinik çalışmalarda böbrek toksisitesine karşı oldukça duyarlı bir biyobelirteç olduğunu kanıtlanmıştır (160). KIM-1 genellikle normal sağlıklı dokuda saptanamayan tübüler bir trans-membran proteinidir. Hem akut böbrek hasarı (ABH) hem de kronik böbrek hasarında (KBH) aşırı ifade edilir (160, 161, 162). Ichimura ve ark. (163) böbrek hasarından sonra yeniden iyileşme sürecinde böbrek tübülündeki apoptotik ve nekrotik hücrelerin fagositozunda KIM-1'in görev aldığını ortaya koymuşlardır. KIM-1, böbrekte apoptotik tübüler epitelial hücreler tarafından ifade edilen apoptotik hücre yüzey spesifik epitoplara olan fosfatidilserin ve oksidize lipoproteinleri özgül olarak tanıyabilmektedir. Bu nedenle Kim-1, hasar ve renal tamir kapasitesinden sonra yeniden modellemede rol oynayabilir. Ayrıca, renal Kim-1 düzeyleri idrarla atılan Kim-1 düzeyleriyle yakından ilişkilidir. Bu veriler Kim-1'in erken tübüler hasar için bir belirteç olarak ve böbrek koruyucu müdahaleyi yönlendirmek ve bireyselleştirmek için kullanılabileceğini göstermektedir (164). Daha önceki raporlarla tutarlı olarak, yapmış olduğumuz çalışmamızda Dox uygulaması yapılan grupta yüksek Kim-1 seviyeleri gözlemlenmiştir. Ancak Ela-21 uygulamasının Kim-1 düzeylerini normalize edemediği görülmüştür.

Doksorubisine bağlı toksisitenin patogeneğinde; antioksidan enzimlerde azalmanın, serbest radikal oluşumunda ve lipid peroksidasyonunda artmanın rol oynayabileceğini göstermektedir (165). Tulubas ve ark. (166) yaptıkları çalışmada, doksorubisini 30 mg/kg tek doz ip vermişler ve kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında sıçanlarda serum, karaciğer ve böbrek dokularında, superoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve redükte Glutatyon

(GSH) düzeylerinde azalma ve MDA düzeylerinde ise artış meydana geldiğini göstermişlerdir. Çetin ve ark. (167) doksorubisin ile oluşturulan böbrek hasarından sonra omega-3 yağ asitlerinin kullanımının; artmış serum, böbrek ve karaciğer MDA seviyelerinde anlamlı azalma sağladığını ve GSH, SOD ve GSH-Px düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir. Kalaiselvi ve ark. (168) yaptıkları benzer bir çalışmada, 10 mg/kg i.v doksorubisin uygulaması sonrasında enzimatik antioksidan seviyelerinde (SOD, Katalaz (CAT), GSH Px, GSH redüktaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve GSH-S-transferaz) önemli derecede düşüş ve MDA seviyesinde ise artış olduğunu saptamışlardır. Koul ve ark. (169) yaptıkları çalışmada Doksorubisinin indüklediği nefrotoksisitenin böbrek dokularında, GSH, GSH Px, GSH redüktaz ve Katalaz (CAT) aktivitelerinde önemli bir azalmaya neden olduğunu, likopenin bu enzim aktivitelerinde belirgin artışa yol açtığını göstermişlerdir. Khan ve ark., wistar sıçanlarda naringenin kullanımının, Doksorubisin (Dox;10 mg / kg) kaynaklı nefrotoksisitenin neden olduğu oksidatif stres, kan üre azotu (BUN), kreatinin, laktat dehidrojenaz (LDH) ve böbrek hasarı molekülü-1 (KIM-1) düzeylerindeki artışı normalize ettiğini göstermişlerdir (170). Altınkaynak ve ark., Sprague Dawley sıçanlarda Dox (20 mg/kg) ile oluşturulan böbrek nefrotoksisite modelinde, L-Theanine kullanımının, artmış doku ve plazma glutation-disülfid (GSSG), Gama-glutamyltransferaz 1 (GGT1), nükleer faktör kappa B p65 (NF-κB p65) seviyelerini ve doku apoptoz indekslerini (AI%), önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuşlardır (171). Mevcut çalışmada da DOX'un böbrek dokusunda MDA düzeylerini anlamlı bir şekilde artırdığı, Ela-21 uygulamasının ise bu artışı normalize ettiği gösterilmiştir.

Üriner NGAL atılımı, sadece akut böbrek hasarın duyarlı bir göstergesi olmayıp (172, 173), aynı zamanda Proteinüri ile ilişkili interstisyel fibroz ve tübüler atrofi (IFTA) (174) sırasında da tübüler hasarın duyarlı bir göstergesidir. Szalay ve ark., Charles Dawley (CD) ve Rowett, Black Hooded (BH) sıçanlarda 10 mg/kg Dox'un nefrotoksik etkilerini 8 hafta boyunca gözlemişlerdir (175). BH'de Dox uygulamasından sonra düşük tübüler hasar, daha az idrar NGAL atılımı ve CD suşundakine göre daha az proteinüri olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgulara, daha az böbrek hasarı ve daha az proteinüri, daha iyi korunmuş vücut ağırlığı ve BH sıçanlarında önemli ölçüde uzun süreli sağkalım eşlik etmiştir. Aynı çalışmada NGAL'ın 4 hafta civarında anlamlı düzeyde arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda sıçanlar ilk 14 gün içerisinde kesildiği için Ngal düzeylerinin bu kadar kısa sürede serumda anlamlı olarak artmamış olması muhtemeldir.

Zhang ve ark. (176) dioscinin hem in vivo hem de in vitro Dox kaynaklı hücre hasarını önemli ölçüde azalttığını, açıkça in vitro reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesini düşürdüğünü ve belirgin şekilde BUN, Cr, MDA seviyelerini düşürdüğünü ve sıçanlarda SOD, GSH ve GSH-Px seviyelerini belirgin şekilde arttırdığını göstermiştir. Ek olarak, dioscinin, Nükleer faktör- κ B (NF- κ B) ve Yüksek Hareketlilik Grubu Kutu 1'in (HMGB1) nükleer yer değiştirmesini baskıladığı ve daha sonra iltihaplanmaya karşı interlökin-1 (IL-1), IL-6 ve Tümör nekrozis faktör-alfa'nın (TNF- α) mRNA seviyelerini düşürdüğü gösterilmiştir. Wang ve ark. (177) Doksorubisin enjeksiyonundan 7, 14, 28 ve 42 gün sonra nefropati grubunda kontrol grubundakilere göre idrarda protein atılımının anlamlı olarak arttığını, idrar ve böbrek dokularında ise IL-6 ekspresyonunun

doksorubisin enjeksiyonundan 7, 14, 28 ve 42 gün sonra kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığını göstermişlerdir. Ma ve ark., Dox ile oluşturulan sıçan böbrek hasarında fibronektin (FN) mRNA, kollajen III (Col III) mRNA, TNF-alfa ve IL6 seviyelerinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koymuşlardır (186). Mevcut çalışmada DOX grubunda artmış olan serum IL-6 seviyelerinin Ela-21 peptidi tarafından normalize edilmediği gösterilmiştir.

Ela 19 ve Ela-32 amino asitlik peptidlerin bağlanma afinitelerinin birbirine benzer olduğu ve APJ reseptörüne bağlanmak için apelin-13 peptidi ile yarıştıkları gösterilmiştir (180). Elabela'nın intravenöz enjeksiyonunun üriner ozmolarite ve elektrolit atılımını (Na-K) anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (131). Ancak çalışmamızda serum Na veya K düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Bu farklı bulgunun ana nedeninin çalışmamızda kullandığımız dozdan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Murza ve ark., çalışmalarında Ela-13, 6,6 nM dozda verildiğinde, G α i1'nin aktive olduğunu ancak 45 nM ve üstü dozda Ela-13 verildiğinde B-arrestinin aktive olduğunu ifade etmişlerdir (180). Mevcut çalışmada kullanılan 39 nM'lık Ela-21 dozunun sadece G α i1 yolağını aktive etmesi muhtemeldir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut çalışma temel olarak Ela-21 peptidinin sıçanda Dox ile oluşturulan böbrek hasar modelinde onarıcı etkilerinin moleküler, histolojik ve biyokimyasal olarak gösterildiği ilk çalışmadır. Bu veriler, Ela'nın sıçan böbrek hasarının iyileştirme için potansiyel aday olabileceğini göstermektedir. Çalışma verilerinden yola çıkılarak, Ela-21 peptidinin etkinliğinin muhtemel onarıcı etkisinin, başka sıçan böbrek hasar modellerinde çalışılarak, mevcut verilerin doğrulanmasına gereksinim olduğu kanaati oluşmuştur.

KAYNAKLAR

1. Conesa LE, Valero F, Nadal JC et al. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. *AmJ Physiol* 2001;281:r730-r737.
2. Smoyer WE, Mundel P. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med* 1998; 76: 172-83.
3. Krishnan RG, Nephrotic syndrome. *Paediatr Child Health* 2012; 22: 337- 40.
4. Ding WY, Saleem MA. Current concepts of the podocyte in nephrotic syndrome. *Kidney Res Clin Pract* 2012; 31: 87-93.
5. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: F213-29.
6. Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 92: 42-53.
7. Artunc F, Nasir O, Amann K, et al. Serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 1624-1634.
8. Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J Neurochem* 2000; 74: 34-41.
9. Szokodi I, Tavi P, Földes G, et al. Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ Res* 2002; 91: 434-40.
10. Zhong JC, Huang DY, Liu GF et al. Effects of alltrans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 743-50.
11. Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, et al. Apelin Stimulates Myosin Light Chain Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1267-72.
12. Chng SC, Ho L, Tian J, et al. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev Cell*.2013; 27, 672–680.
13. Pauli A, Norris ML, Valen E, et al. Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science*.2104;343, 1248636.

14. Hamada J, Kimura J, Ishida J, et al. Evaluation of novel cyclic analogues of apelin. *Int J Mol Med*.2008; 22, 547–552.
15. D'Aniello C, Lonardo E, Iaconis S, et al. G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70S6 kinase signaling pathway. *Circ Res*.2009; 105, 231–238.
16. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J Neurochem*.2003; 84, 1162–1172.
17. Tatemoto K., Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*.2001; 99, 87–92.
18. Ishida J, Hashimoto T, Hashimoto Y, et al. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo. *J Biol Chem*.2004; 279, 26274–26279.
19. Kartal H, Comu FM, Kucuk A, et al. Effect of apelin-13 on erythrocyte deformability during ischaemia-reperfusion injury of heart in diabetic rats *Bratisl lek* . 2017;118(3):133-136.
20. Arınsoy T. 'Böbrek Fizyopatolojisi', Reaktif , ISBN: 978-605-85107-5-3.
21. Guyton AC, Hall JE, Çev (Ed). Çavuşoğlu H. Tıbbi Fizyoloji 10. Baskı, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2001.
22. Textbook of Medical Physiology,10 ed. Philadelphia: WB Saunders, Chapters 25-31. 2001.
23. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 331-340.
24. Schreiner GF. The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 74-82.
25. Erek E, Süleymanlar G. Böbreğin Yapısı ve Fonksiyonları. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç hastalıkları. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 2003: 1211-1228.

26. Kriz W, Elger M. Renal Anatomy. Feehally J, Floege J, Johnson RJ. Comprehensive Clinical Nephrology 3rd ed. Philadelphia: Mosby; 2007: 1-4.
27. Anonim [http://www. biyolojisisitesi.net/uniteler/bosaltim-sistemi/nefronun-yapisi.html](http://www.biyolojisisitesi.net/uniteler/bosaltim-sistemi/nefronun-yapisi.html). 09.08.2019.
28. Gyton A. C.,Hall J. E. Urine formation by the kidneys: Glomerular filtration, renal blood flow and their control In: Medikal physiology. Edit. Gyton A. C. , Chapter 26. 279-294; 2001.
29. Paul R. V., Ploth D. W. The renal circulation. Textbook of nephrology. Edit. Massry S. G. 4th edition. Chapter 2. 43-55; 2001.
30. Dworkin LD. Brenner BM. The renal circulation. In: Brenner BM, ed. The kidney, 5th edn. Philadelphia: WB Saunders ; 247- 85; 1996.
31. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. Nefroloji El Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 1-23.
32. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. N Engl J Med 1996; 334: 1448-1460.
33. Bullock J, Boyle J, Wang BM. NMS Physiology 4th edition. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 289-296.
34. Lameire N, Biesen VW, Vanholder R Epidemiology, Clinical evaluation, and prevention of acute renal failure, Comprehensive Clinical Nephrology Philadelphia: Mosby 2007;979- 1000.
35. Dent CL, Ma Q, Dastrala S, et al. Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin predicts acute kidney injury, morbidity and mortality after pediatric cardiac surgery: a prospective uncontrolled cohort study. Crit Care 2007;11(6):R127.
36. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemiareperfusion. Kidney Int 2003;63:1714-1724.
37. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, et al. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery and novel therapeutics. Mol Genet Metab 2003;80:365-376.
38. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Neutrophil GelatinaseAssociated Lipocalin (NGAL): a

- nove urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004;24:307-315.
39. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by NGAL. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:3073-3082.
 40. Han WK, Bailly V, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury *Kidney Int.* 2002 Jul;62(1):237-44.
 41. Daftarian P M, Kumar A, Kryworuchko M, et al. IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 1996, 157:12-20.
 42. Aulitzky WK, Schlegel PN, Wu DF, et al. Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992; 199, 93–96.
 43. Bonventre J. V, Vaidya V. S, Schmolder, et al. Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28, 436–440.
 44. Hildebrand H, Rinke M. Urinary antigens as markers of papillary toxicity. II: application of monoclonal antibodies for the determination of papillary antigens in rat urine. *Arch. Toxicol.* 1999; 73, 233–245.
 45. Hoffman D, Ennulat D, Kurth P et al. Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with Cisplatin. *Toxicol. Pathol.* 2010; 38, 943–956.
 46. Sistare FD, Dieterle F, Troth S, et al. Towards consensus practices to qualify safety biomarkers for use in early drug development. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28, 446–454.
 47. England BK, Mitch WE. Mechanisms of progression of renal insufficiency, *Textbook of Nephrology*, 3rd edition, Volume 2, Baltimore, Williams and Wilkins 1995;1261-69.
 48. Heinzelmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC Neutrophils and renal failure, *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 384-99.
 49. Singal PK, Li T, Kumar D, et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem.* 2000; 207: 77-85.
 50. Küçüküseyin C. Kanser kemoterapisi. Özünler Z. Temel ve Klinik Farmakoloji. 3. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi, 1995: 1116-1117.
 51. Aubel SG, Lodos G.D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 1984; 66: 333-52.

52. Doroshoow JH. Anthracyclines and anthracenediones. In BA Chabner, DL Longo (eds), Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practic. Lippincott. Philadelphia: Williams and Wilkins, 2006: 416.
53. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe TAŞ, 10. Baskı, Ankara: 2002: 402.
54. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. Annu Rev Biochem. 1989; 58: 351-375.
55. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE et al. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. Heart 2008; 94: 525-533.
56. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG et al. General principles of chemotherapy. Pizzo PA, Poplack DG (eds). Principle and Practice Pediatric Oncology. JB. Lippincott Company, 1989: 186-189.
57. William EE. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders. Pediatr Clin North Am. Clinical Pharmacology 1989; 36: 1206-1209.
58. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. Crit Rev Oncol Hematol 1991; 11: 43-64.
59. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. Cardiovasc Toxicol 2007; 7: 160-164.
60. Çetinkaya Y, Kabakçı MG, Aydemir K. Antrasiklinler ve kalp. İlaç ve Tedavi Dergisi 1995; 8: 214-218.
61. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, et al. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. IUBMB Life 2001; 52: 83-88.
62. Müller I, Niethammer D, Bruchelt G et al. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). Int J Mol Med 1998; 491-495.
63. Wolf BM, Baynes WJ. The anticancer drug, doxorubicin, causes oxidant stres-induced endothelial dysfunction. Biochimica et Biophysica Acta 2006; 1760: 267-271.
64. Bulucu F, Ocal R, Karadurmus N et al. Effects of N-acetylcysteine, deferoxamine and selenium on doxorubicin-induced hepatotoxicity. Biol Trace Elem Res 2010; 132:184-196.

65. Qin XJ, He W, Hai CX, et al. Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 271-282.
66. Srdjenovic B, Milic-Torres V, et al. Antioxidant properties of fullereneol C60 (OH) 24 in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20: 298-305.
67. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991; 11: 43-64.
68. Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, et al. Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res* 1972; 32: 1177-1183.
69. BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2006; 1-13.
70. Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, et al. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1454-1458.
71. Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys* 1993; 17: 219-252.
72. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Pui C-H (ed). *Childhood Leukemias*, Cambridge University 1999:275-276.
73. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, et al. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. 2nd Edition. Lippincott-Raven Publishers 1997.
74. American Society of Health System Pharmacists; AHFS Drug Information 2009. Bethesda MD 2009: 1049-1051.
75. Hilmer SH, Cogger VC, Muller M, et al. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition* 2004; 32:794-799.
76. Hardman JG, Limbird LE. *Goodman&Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th Edition 2001: 1425-1429.
77. Vargel İ, Erdem A, Ertoý D, et al. Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GM-

- CSF and G-CSF. *Ann Plast Surg* 2002; 49: 646-653.
78. Khan MS, Holmes JD. Reducing the morbidity from extravasation injuries. *Ann Plast Surg* 2002; 48: 628-632.
79. Ener RA, Meglathery SB, Styler M. Extravasation of systemic hematological therapies. *Annals of Oncology*. 2004; 15: 858-862.
80. Wojtacki J, Lewicka NE, Lesniewski KK. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention review of the literature. *Med Sci Monit* 2000; 6: 411-420.
81. Singal PK, Iliskovic N, Li T, et al. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997; 11: 931-116.
82. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 817-828.
83. Cummings J, Anderson L, Willmott N, et al. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 1991; 27: 532-535.
84. Barbey MM, Fels LM, Soose M. et al. Adriamycin affects glomerular renal function: Evidence for the involvement of oxygen radicals. *Free Radic. Res. Commun* 1989; 7: 195-203.
85. Lahouel M, Viotte G, Sumereau E, et al. Haematotoxicity of doxorubicin and 1- (2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) and of their association in rats. *Drugs Exp Clin Res* 1987; 13: 593-599.
86. Llesuy SF, Arnaiz SL. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology* 1990; 63: 187-198.
87. Shug AL. Protection from adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Z. Kardiol* 1987; 76: 46-52.
88. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, et al. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 114-22.
89. Sakemi T, Ohtsuka N, Tomiyoshi Y, et al. Sex difference in progression of adriamycin-induced nephropathy in rats. *Am J Nephrol* 1996; 16: 540-547.
90. Wang Y, Wang YP, Tay YC, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice:

- Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000; 58:1797-804.
91. Mahajan D, Wang Y, Qin X. CD4+CD25+regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17:2731-2741.
 92. Wang Y, Feng X, Bao S. Depletion of CD4 (+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 975-84.
 93. Wang Y, Mahajan D, Tay YC et al. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in Adriamycin nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10: 470-77.
 94. Cuttillo F, Zoja C, Broggin M, et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 1986; 30: 488-496.
 95. Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 92: 42-53.
 96. Lee V, Harris D. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 2011; 16: 30-38.
 97. Munoz M, Rincon J, Pedrañez A et al. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *J RAAS* 2011; 12: 404-412.
 98. Wang Y, Wang YP, Tay YC et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000; 58:1797-804.
 99. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46: 16-23.
 100. Bertani T, Remuzzi G, Rocchi G, et al. Steroids and adriamycin nephrosis. *Appl Pathol* 1984; 2: 32-38.
 101. Franco R, Gut A, Ferrari-Spadotto A, et al. Pressor mechanisms in adriamycin-induced nephropathy with hypertension in rats. *Hypertension* 1994; 23: 1246-1249.
 102. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986; 29: 502-510.
 103. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 213-229.
 104. Lee VW, Harris DC, Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental

- glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)* 2011; 16: 30-38.
105. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3(5): 705-13.
106. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251(2): 471-476.
107. Katugampola S, Davenport A. Emerging roles for orphan G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Trends in Pharmacological Sciences* 2003; 24(1): 30-35.
108. Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, et al. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 2001; 77(4): 1085-1096.
109. Tang SY, Xie H, Yuan LQ, et al. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3- K/Akt signaling pathways. *Peptides* 2007; 28(3): 708-18.
110. Cayabyab M, Hinuma S, Farzan M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan seven-transmembrane receptor APJ, inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry. *Journal of Virology* 2000; 74(24): 11972-11976.
111. Beltowski J. Apelin and visfatin: Unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Medical Science Monitor* 2006; 12(6): Ra112-Ra119.
112. Ladeiras-Lopes R, Ferreira-Martins J, Leite-Moreira AF. The apelinergic system: The role played in human physiology and pathology and potential therapeutic applications. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia* 2008; 90(5): 374-380.
113. Medhurst AD, Jennings CA, Robbins MJ, et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *Journal of Neurochemistry* 2003; 84(5): 1162-1172.
114. Klein MJ, Davenport AP. Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 2005; 107(2): 198-211.
115. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, et al. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides* 2001; 99(2-3): 87-92.

- 116.Kawamata Y, Fukusumi S, Hosoya M, et al. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 2001; 1538(2-3): 162-171.
- 117.Foldes G, Horkay F, Szokodi I, et al. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 308(3): 480-485.
- 118.Japp AG, Cruden NL, Amer DAB, et al. Vascular effects of apelin in vivo in man. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 52(11): 908-913.
- 119.Odowd BF, Heiber M, Chan A, et al. Human Gene That Shows Identity with the Gene Encoding the Angiotensin Receptor Is Located on Chromosome-11. *Gene* 1993; 136(1-2): 355-360.
- 120.Habata Y, Fujii R, Hosoya M, et al. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1999; 1452(1): 25-35.
- 121.Hosoya M, Kawamata Y, Fukusumi S, et al. Molecular and functional characteristics of APJ - Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(28): 21061-21067.
- 122.Pitkin SL, Maguire JJ, Bonner TI, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin Receptor Nomenclature, Distribution, Pharmacology, and Function. *Pharmacological Reviews* 2010; 62(3): 331-342.
- 123.Lee DK, Cheng R, Nguyen T, et al. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of Neurochemistry* 2000; 74(1): 34- 41.
- 124.Edinger AL, Hoffman TL, Sharron M, et al. An orphan seven-transmembrane domain receptor expressed widely in the brain functions as a coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* 1998; 72(10): 7934-7940.
- 125.Reaux A, Gallatz K, Palkovits M, et al. Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 2002; 113(3): 653-662.
- 126.Brailoiu GC, Dun SL, Yang J, et al. Apelin-immunoreactivity in the rat hypothalamus and

- pituitary. *Neuroscience Letters* 2002; 327(3): 193-197.
- 127.Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, et al. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2006; 26(6): 1267- 1272.
 - 128.Zhong JC, Huang DY, Liu GF, et al. Effects of all-trans retinoic acid on orphan receptor APJ signaling in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 2005; 65(3): 743-750.
 - 129.Taheri S, Murphy K, Cohen M, et al. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 291(5): 1208-1212.
 - 130.Tobin VA, Bull PM, Arunachalam S, et al. The Effects of Apelin on the Electrical Activity of Hypothalamic Magnocellular Vasopressin and Oxytocin Neurons and Somatodendritic Peptide Release. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6136-6145.
 - 131.Zhang Y, Wang Y, Lou Y, et al. Elabela, a newly discovered APJ ligand: Similarities and differences with Apelin. *Peptides*. 2018; 10923-32.
 - 132.Kartal H, Comu FM, Kucuk A et al. Effect of apelin-13 on erythrocyte deformability during ischaemia-reperfusion injury of heart in diabetic rats *Bratisl lek* . 2017;118(3):133-136.
 - 133.Xiao-lei W, Tuo Z, Liu-Hua H et al. Comparison of effect of different station on contrast-induced acute kidney injury in rat: Histopathological and Biochemical Finding. *Oxid. Med. Cell Longey*. 2017;2017:6282-486.
 - 134.Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Al-Amin MA et al. Fenofibrate attenuates diabetic nephropathy in experimental diabetic rat's model via suppression of augmented TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Arch Physiol Biochem*. 2016;122(4):186-194.
 - 135.Szalay CI, Erdélyi K, Kökény G et al. Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain. *PLoS One*. 2015 Jun 18;10(6):e0127090.
 - 136.Köse E, Oğuz F, Vardi N, et al. Therapeutic and protective effects of montelukast

- against doxorubicin-induced acute kidney damage in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2019 Apr;22(4):407-411.
137. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16(1):30–8. Epub 2010/12/24. 10.1111/j.1440-1797.2010.01383.
 138. Zhu C, Xuan X, Che R, et al. Dysfunction of the PGC-1 α -mitochondria axis confers adriamycin-induced podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(12):F1410–7. 10.1152/ajprenal.00622.2013.
 139. Kokeny G, Nemeth Z, Godo M, et al. The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1458–62. Epub 2009/12/24. 10.1093/ndt/gfp689 .
 140. Tapia E, Soto V, Ortiz-Vega KM, et al. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:269039 Epub 2012/08/25. 10.1155/2012/269039.
 141. Toba H, Nakashima K, Oshima Y, et al. Erythropoietin prevents vascular inflammation and oxidative stress in subtotal nephrectomized rat aorta beyond haematopoiesis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(12):1139–46.
 142. Rashid S, Ali N, Nafees S, et al. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(5):337–45.
 143. Park EJ, Kwon HK, Choi YM, et al. Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of pERK-dependent ATF3. *PLoS One*. 2012;7(9):e44990.
 144. Ma H, Wu Y, Zhang W, et al. The effect of mesenchymal stromal cells on doxorubicin induced nephropathy in rats. *Cytotherapy*. 2013;15(6):703–11.
 145. Polhill T, Zhang GY, Hu M, et al. IL-2/IL-2Ab complexes induce regulatory T cell expansion and protect against proteinuric CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(8):1303–8.
 146. Ho L, Tan SY, Wee S, et al. ELABELA is an endogenous growth factor that sustains hESC self-renewal via the PI3K/AKT pathway. *Cell Stem Cell* 17: 435–447, 2015.
 147. Li M, Gou H, Tripathi BK, et al. An Apela RNA-containing negative feedback loop

- regulates p53-mediated apoptosis in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 16: 669–683, 2015.
148. Chen H, Wang L, Wang W, et al. ELABELA and an ELABELA Fragment Protect against AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Sep;28(9):2694-2707.
 149. Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, et al. Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardio-toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2003;48:377e382.
 150. Jadhav KR, Shaikh IM, Ambade KW, et al. Applications of microemulsion based drug delivery system. *Curr Drug Deliv* 2006; 3(3): 267-273.
 151. Dzie P, Jethon Z, Suder E et al. Role of exogenous melatonin in reducing the cardiotoxic effect of daunorubicin and doxorubicin in the rat. *Exp Toxicol Pathol*; 2002; 53:433–439.
 152. Saad SY, Najjar TA, Al-Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001;43:211-8.
 153. Boonsanit D, Kanchanapangka S, Buranakarl C. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology (Carlton)*. 2006 Aug;11(4):313-20.
 154. Mansour MA, El-Din AG, Nagi MN, et al. Nomega-nitro-L-arginine methylester ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *J Biochem Mol Biol*. 2003 Nov 30;36(6):593-6.
 155. Bertani T, Poggi A, Pozzani R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rat : sequence of pathology rat. *Lab Invest* 1982; 46(1):16-23.
 156. Khames A, Khalaf MM, Gad AM, Abd El-Raouf OM. Ameliorative effects of sildenafil and/or febuxostat on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*. 2017; 15;805:118-124.
 157. Dabla, P.K., 2010. Renal function in diabetic nephropathy. *World journal of diabetes*, 1 (2), 48–56.
 158. Skovso, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *Journal of diabetes investigation*, 2014; 5 (4), 349–358.
 159. El-Sayed M, El-Sayed A.M, Mansour W.S, et al. Protective effect of proanthocyanidins against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. Article in *Journal of Biochemical*

- and Molecular Toxicology, 2017; 31(1):e21965
- 160.Vaidya V. S, Ramirez V, et al. Urinary kidney injury molecule-1: A sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury.Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2006; 290: F517–F529.
 - 161.Huo W, Zhang K, Nie Z, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. Transplantation reviews 2010; 24, 143–146.
 - 162.Shao, X, Tian L, Xu W, et al. Diagnostic value of urinary kidney injury molecule 1 for acute kidney injury: a meta-analysis. PLoS One, 2014; 9, e84131.
 - 163.Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. J Clin Invest. 2008 May;118(5):1657-68.
 - 164.Kramer AB, van der Meulen EF, Hamming I, et al. Effect of combining ACE inhibition with aldosterone blockade on proteinuria and renal damage in experimental nephrosis. Kidney Int 71: 417–424, 2007.
 - 165.Injac R, Boskovic M, Perse M. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fulleranol C60(OH)24 via suppression of oxidative stres. Pharmacological Reports 2008; 60: 742-9.
 - 166.Tulubas F, Gurel A, Oran M, et al. The protective effects of ω -3 fatty acids on doxorubicin-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. Toxicol Ind Health 2013.
 - 167.Feride Ç, Nevzat G, Nalan K, ve ark. Doksorubisin Uygulanmasının Sıçan Böbrek Dokusunda Meydana Getirdiği Değişiklikler Üzerine Benfotiamin'in Koruyucu Etkileri. Fırat Tıp Derg/Firat Med J 2015; 20(1): 8-14.
 - 168.Kalaiselvi P, Pragasam V, Chinnikrishnan S, et al. Counteracting adriamycin-induced oxidative stress by administration of N-acetyl cysteine and vitamin E. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 834-40.
 - 169.Koul A, Shubrant, Gupta P. Phytomodulatory potential of lycopene from Lycopersicum esculentum against doxorubicin induced nephrotoxicity. Indian J Exp Biol 2013; 51: 635-45.

170. Khan TH, Ganaie MA, Alharthy KM, et al. Naringenin prevents doxorubicin-induced toxicity in kidney tissues by regulating the oxidative and inflammatory insult in Wistar rats. *Arch Physiol Biochem*. 2018 Nov 8;1-8.
171. Altinkaynak Y, Kural B, Akcan BA, et al. Protective effects of L-theanine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018 Dec;108:1524-1534.
172. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534–43.
173. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*. 2005;365(9466):1231–8.
174. Entin-Meer M, Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, et al. Accelerated renal fibrosis in cardiorenal syndrome is associated with long-term increase in urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels. *Am J Nephrol*. 2012;36(2):190–200.
175. Szalay CI, Erdélyi K, Kökény G, et al. Oxidative/Nitrative Stress and Inflammation Drive Progression of Doxorubicin-Induced Renal Fibrosis in Rats as Revealed by Comparing a Normal and a Fibrosis-Resistant Rat Strain. *PLoS One*. 2015 Jun 18;10(6):e0127090.
176. Zhang Y, Xu Y, Qi Y, et al. Protective effects of dioscin against doxorubicin-induced nephrotoxicity via adjusting FXR-mediated oxidative stress and inflammation. *Toxicology*. 2017 Mar 1;378:53-64.
177. Wang LM, Chi YJ, Wang LN, et al. Expression of interleukin-6 in rat model of doxorubicin-induced nephropathy. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010 Nov;12(11):912-4.
178. Wang Z, Yu D, Wang M, et al. Elabela-apelin receptor signaling pathway is functional in mammalian systems. *Sci Rep*. 2015 Feb 2;5:8170.
179. Hamada J, Baasanjav A, Ono N, et al. Possible involvement of downregulation of the apelin-APJ system in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015 Apr 15;308(8):H931-41.

180. Murza A, Sainsily X et al. Discovery and Structure-Activity Relationship of a Bioactive Fragment of ELABELA that Modulates Vascular and Cardiac Functions. *J Med Chem*. 2016 Apr 14;59(7):2962-72.
181. Anonim <https://uroklinik.com.tr/bobrek-nedir/> 15.08.2019.
182. Deng C, Chen H, Yang N et al. Apela Regulates Fluid Homeostasis by Binding to the APJ Receptor to Activate Gi Signaling. *J Biol Chem*. 2015 Jul 24; 290(30): 18261–18268.
183. Lenderink M.A., Liegel K., Ljubanovic D. et al. (2007) The Alternative Pathway of Complement is Activated in the Glomeruli and Tubulointerstitium of Mice with Adriamycin Nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(2):F555- 64
184. Weening J.J., Rennke G.H. (1983) Glomerular Permeability and Polyanion in Adriamycin Nephrosis in the Rat. *Kidney International*, 24: 152–159
185. Khalil SR, Mohammed AT, Abd El-Fattah AH et al. Intermediate filament protein expression pattern and inflammatory response changes in kidneys of rats receiving doxorubicin chemotherapy and quercetin. *Toxicol Lett*. 2018 May 15;288:89-98.
186. Ma XH, He LQ. Effects of Jianpi Qinghua Decoctions on immune inflammatory injury in adriamycin-induced nephropathic rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2014 Jan;45(1):19-23.