

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİN İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEDE FERULİK ASİTİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BETÜL SARI

İZMİR-2018

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**GENTAMİSİN İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEDE FERULİK ASİTİN ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BETÜL SARI

Danışman Öğretim Üyesi:

Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı TıptUzmanlık
Öğrencisi Betül SARI'nın ‘‘**Gentamisin İle İndüklenenefrotoksisitede Ferulik Asitin
Etkisi**’’Konulu Uzmanlık Tezi 24.12.2018 tarihinde başarılı/başarısız olarak
tamamlanmıştır.



İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
GRAFİK DİZİNİ.....	v
TABLO DİZİNİ.....	vi
RESİM DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Böbrek Anatomisi.....	7
2.1.1. Böbreğin yerleşimi, şekil ve büyüklüğü.....	7
2.1.2 Böbreğin kenarları	7
2.1.3 Böbreğin Uçları:	7
2.1.4 Böbreği dıştan saran yapılar	7
2.1.5 Böbreğin Bölümleri	9
2.1.6 Böbreklerin Damarları Ve Sinirleri	11
2.1.6.1 Böbreğin Damarları:	11
2.1.6.2 Böbreğin Lenfatikleri	12
2.1.6.3 Böbreğin Sinirleri	13
2.2 Böbrek Embriyolojisi.....	13
2.2.1. Mezonefroz Böbrek Gelişimi	14
2.2.2. Metanefroz Böbrek Gelişimi.....	14
2.2.3. Toplayıcı Sistem	16
2.2.4. Boşaltıcı Sistem	17
2.2.5. Böbrek gelişiminin moleküler kontrolü	18
2.2.6. Böbreğin pozisyonu	20
2.2.7. Böbreğin fonksiyonları	20
2.3. Böbrek Histolojisi	20
2.3.1. Nefron	22
2.3.2. Böbrek Cisimciği	23

2.3.3. Glomerül;.....	26
2.3.4. Böbrek tübülü.....	27
2.3.5. Jukstaglomerüler aparat.....	32
2.3.6. Böbrek ara dokusu (intersitisyum).....	33
2.4. Böbrek Fizyolojisi	33
2.4.1. Böbrek Fonksiyonları	34
2.4.2. Metabolik Atık Ürünlerinin Atılımı.....	34
2.5. Nefrotoksisite	35
2.6. Böbrek Yetmezliği.....	35
2.6.1. Akut böbrek yetmezliği	36
2.6.2. Kronik böbrek yetmezliği	36
2.6.3. İlaça bağlı akut böbrek yetmezliği	36
2.7. Aminoglikozit ve Gentamisin.....	37
2.7.1 Aminoglikozidler.....	37
2.7.2 Farmakokinetik Özellikleri	37
2.7.3 Gentamisinin kimyasal yapısı.....	40
2.7.4 Patoloji ve patofizyolojisi	40
2.7.5 Gentamisin Nefrotoksisitesinin Mekanizmaları	41
2.8 Oksidatif Stres Ve Serbest Oksijen Radikalleri	41
2.8.1 Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	42
2.8.2 Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri.....	43
2.8.3 Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu	43
2.8.4 Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler	43
2.9 Antioksidan Sistem.....	43
2.9.1 Nonenzimatik Antioksidanlar.....	43
2.9.2 Enzimatik Antioksidanlar:	44
2.10 Apoptozis:.....	45
2.10.1 A.Hücre içi uyaranlar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi	46
2.10.2 B. Hücre dışı uyaranlar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi.....	47
2.11 Ferulik Asit	49
2.12 Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1)	51
2.13 VEGF	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM	54
3.1. Araştırmanın Tipi	54
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	54
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	54
3.4. Çalışma Materyali	56
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	56
3.6. Veri Toplama Araçları	57
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	57

3.6.2 . Araştırmada Kullanılan Gentamisin ve Ferulik asitin Hazırlanması.....	57
3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	57
3.6.3.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	57
3.6.3.2. Böbrek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	58
3.6.3.3. Histokimyasal İncelemeler.....	58
3.6.3.3.1. Rutin Doku Takibi	58
3.6.3.3.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi.....	59
3.6.3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü.....	61
3.6.3.4. Böbrek dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi:.....	63
3.6.3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler.....	63
3.6.3.5.1. İmmünohistokimya Boya Protokolü	63
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi	70
4.BULGULAR	71
4.1 Deneklerin Ağırlıkları.....	71
4.2 Deneklerin İdrar ve Kandaki Üre ve Kreatinin Sonuçları.....	75
4.3 Histolojik Bulgular	81
4.3.2 4.3.1 Hemotoksilen Eozin Boyama Değerlendirmesi.....	81
4.3.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi.....	101
4.5. Histomorfometrik Bulgular	116
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	119
4.6.2. KIM-1 İmmünohistokimyası Sonuçları	131
4.6.3. VEGF İmmünohistokimyası Sonuçları.....	139
4.7. Biyokimyasal Bulgular.....	148
4.7.1 Serum Malondialdehit MDA düzeyi Değerlendirmesi	148
4.6.2 Serum Süperoksit dismutaz (SOD) düzeyi Değerlendirmesi	150
4.6.3 Serum Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeyi Değerlendirmesi	151
5. TARTIŞMA Ve SONUÇ	152
6. KAYNAKLAR	161

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Böbreğin anatomisi	9
Şekil 2: Renal korteks, medulla ve pelvisi gösteren oblik ve dikey kesit.....	11
Şekil 3: Böbreğin damarları	13
Şekil 4: Böbreğin embriyolojik gelişimi	15
Şekil 5: Metanefroz ve toplayıcı sistemin embriyolojik gelişimi.....	16
Şekil 6:Nefron yapısının gelişimi	18
Şekil 7: Böbrek gelişiminin moleküler kontrolü.....	19
Şekil 8 : Renal korteks.....	21
Şekil 9 : Korteks –medulla –nefron.....	23
Şekil 10:Renal Korpuskül –maküla densa	26
Şekil 11: Glomerul –filtrasyon membranı	27
Şekil 12: Nefron –korteks-kıvrıntılı tubül-medulla	32
Şekil 13:Juksta glomeruler aparat	33
Şekil 14: GM kimyasal yapısı.....	39
Şekil 15: Hücre içi uyaranlar ile apoptoz	47
Şekil 16: Hücre dışı uyaranlar ile apoptoz	49
Şekil 17:Ferulik asit.....	51
Şekil18:KIM-1.....	52
Şekil 19: Böbreğin histomorfometrik incelenmesi.....	66

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1. Deneklerin deney önce ve deney sonrası ağırlık karşılaştırma	72
Grafik 2. Sağ ve sol böbrek ağırlık karşılaştırma	73
Grafik 3. Son ağırlık/ort. böbrek ağırlık karşılaştırma.....	74
Grafik 4. Ortalama böbrek ağırlık karşılaştırma.....	75
Grafik 5.İdrarda kreatin ölçüm düzeyleri karşılaştırma.....	76
Grafik 6. Kanda kreatin ölçüm düzeyleri karşılaştırma	78
Grafik 7. İdrar üre önce ve sonra karşılaştırma	79
Grafik 8. Kanda üre değerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırma	80
Grafik 9. Tubüler genişleme karşılaştırma.....	99
Grafik 10. Tubüler vakualizasyon karşılaştırma.....	100
Grafik 11. Mononükleer hücre infiltrasyonu karşılaştırma	101
Grafik 12. Fırçamsı kenar kaybı karşılaştırma	115
Grafik 13. Hiyalin kast karşılaştırılma	115
Grafik 14. Distal tubül çap karşılaştırılma.....	117
Grafik 15. Glomerul çap karşılaştırılma.....	118
Grafik 16. Proksimal tubul çap karşılaştırma	118
Grafik 17:Aktif Kaspaz-3, VEGF ve KIM-1 immünohistokimya karşılaştırma	148
Grafik 18. Gruplar arasında malondialdehit ölçüm düzeyleri karşılaştırma	149
Grafik 19. Gruplar arasında süperoksit dismutaz enzim aktivitesi karşılaştırma	150
Grafik 20. Gruplar arasında glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi karşılaştırma	151

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip protokolü	58
Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü	59
Tablo 3: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü.....	61
Tablo 4: İmmünohistokimyasal boya protokolü.....	64
Tablo 5: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama	67
Tablo 6: Denek ağırlıklarının karşılaştırılması	71
Tablo 7: Sağ ve sol böbrek ağırlıklarının karşılaştırılması	72
Tablo 8: Son ağırlık ve ortalama böbrek ağırlığı oranı	73
Tablo 9. Ortalama böbrek ağırlıkları	74
Tablo 10. İdrarda kreatinin ölçümleri	76
Tablo 11. Kanda kreatinin ölçümleri	77
Tablo 12. İdrarda üre ölçümleri	78
Tablo 13. Kan üre ölçümleri	80
Tablo 14. Histolojik parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması	98
Tablo 15. Distal tubül, glomerul, proksimal tubul çaplarının ölçümleri	117
Tablo 16: Aktif kaspaz-3, VEGF ve KIM-1 immünohistokimya karşılaştırmaları	147
Tablo 17. Oksidatif stres belirteçlerinin karşılaştırılması	149

RESİM DİZİNİ

Resim 1:Kontrol grubuna ait kesit x4 H&E.....	83
Resim 2: Kontrol grubuna ait kesit x40 H&E	84
Resim 3: FA grubuna ait kesit x4 H&E	85
Resim 4:FA grubuna ait kesit x40 H&E.....	86
Resim 5: GM grubuna ait kesit x4 H&E	87
Resim 6: GM grubuna ait kesit x40 H&E	88
Resim 7: GM grubuna ait kesit x40 H&E.....	89
Resim 8: GM grubuna ait kesit x20 H&E	91
Resim 9: GM grubuna ait kesit x40 H&E E	91
Resim 10: GM grubuna ait kesit x40 H&E.....	92
Resim 11: GM grubuna ait kesit.x20 H&E.....	93
Resim 12: GM grubuna ait kesit x 20 H&E.....	94
Resim 13: GM grubuna ait kesit x40 H&E.....	95
Resim 14: GM+FA grubuna ait kesit x10. H&E	96
Resim 15: GM+FA grubuna ait kesit x40 H&E	97
Resim 16: GM+FA grubuna ait kesit x40H&E	98
Resim 17: Kontrol grubuna ait kesit x40 PAS.....	102
Resim 18: Kontrol grubuna ait kesit.x40 PAS.....	103
Resim 19: FA grubuna ait kesit x 40 PAS	104
Resim 20: FA grubuna ait kesit x40 PAS	105
Resim 21: GM grubuna ait kesit x40 PAS.....	106
Resim 22: GM grubuna ait kesit x40 PAS.....	107
Resim 23: GM grubuna ait kesit.x 20 PAS.....	108
Resim 24: GM grubuna ait kesit.x40 PAS.....	109
Resim 25: GM grubuna ait kesit.x.20 PAS.....	110
Resim 26: GM grubuna ait kesit.x40 PAS.....	111
Resim 27: GM grubuna ait kesit .x20 PAS.....	112
Resim 28: GM+FA grubuna ait kesit x40. PAS.....	113
Resim 29: GM+FA grubuna ait kesit x40 PAS.....	114
Resim 30: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi x40.....	120
Resim 31: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi .x100.....	121
Resim 32: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi.x40.....	122
Resim 33: FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40	123
Resim 34: FA grubunda AK3 immunreaktivitesiç.x100	124
Resim 35:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40	125
Resim 36:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100	126
Resim 37:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100	127
Resim 38: GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40.....	128
Resim 39: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40.....	129
Resim 40: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100	130
Resim 41: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x 100	131
Resim 42: Kontrol grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40	132

Resim 43: Kontrol grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100.....	133
Resim 44: FA grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40.....	134
Resim 45: FA grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100.....	135
Resim 46: GM grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40	136
Resim 47: GM grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100.....	137
Resim 48: GM+FA grubunda KIM-1 immunreaktivitesi.x40	138
Resim 49: GM+FA grubunda KIM-1 immunreaktivitesi.x100	139
Resim 50: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40	140
Resim 51: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100.....	141
Resim 52: FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40.....	142
Resim 53: FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100.....	143
Resim 54: GM grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40	144
Resim 55: GM grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100.....	145
Resim 56: GM+FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40	146
Resim 57: GM+ FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100	147

KISALTMALAR

ABY: Akut böbrek yetmezliği

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

GM: Gentamisim

FA: Ferulik asit

GSH: Glutatyon

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

SR: Serbest radikal

GPx: Glutatyon Peroksidaz

GR: Glutatyon Redüktaz

CAT: Katalaz

KIM-1: Kidney Injury Molecule 1

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

AK3: Aktif Kaspaz 3

MDA: Malondialdehit

SOD: Süperoksit Dismutaz

PAS: Periyodik Asit Schiff

H&E: Hematoksilen Eozin

DNA: Deoksiribonükleik asit

DT: Distal tubül

PT: Proksimal tubül

TV: Tubuler vakuolizasyon

TD: Tubüler dilatasyon

HK: Hiyalin kast

MNH: Mononükleer hücre

TEŞEKKÜR

Histoloji ve embriyoloji alanında tıpta uzmanlık eğitimim boyunca tecrübe, bilgi birikimi ve ışığını esirgemeyen, tez çalışmalarında bana destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN'e

Uzmanlık eğitimi aldığım sürede mesleki ve kişisel gelişimime eşsiz katkılarda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Bekir ERGÜR, Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof. Dr. Ülker CANKURT , Prof. Dr. Işıl TEKMEN, Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN , Doç. Dr. Seda ÖZBAL, Doç. Dr. Başak BAYKARA, Doç. Dr. Serap ÇİLAKER MIÇILI'ya ,

Tez çalışmalarına katkı ve destek sağlayan deneyim ve güler yüzünü esirgemeyen birlikte çalışmaktan onur duyduğum Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Zahide Çavdar'a

Uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman destek olan değerli arkadaşlarım Özcan ÜSTÜN, Selma AYDEMİR, Nevin ERSOY, Gözde ERKUL, Yavuz GENÇ, Gökçen BİLİCİ, Şeyda DEMİR, Filiz YILMAZ ve Umut DEMİRDELEN'e

Beni her daim destekleyen, sonsuz sevgiyle büyüten çok değerli canım annem Lütfiye Fazile ATIŞ'a canım babam İlhan Atış'a , çok sevgili eşim yol arkadaşım, aşkım Özkan SARI'ya ve varlığı için sonsuz şükran duyduğum biricik oğlum Poyraz SARI'ya teşekkürlerimi sunarım.

GENTAMİSİN İLE İNDÜKLENEN NEFROTOKSİSİTEDE FERULİK ASİTİN ETKİSİ

BETÜL SARI

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,

Balçova, İzmir, drbetulatis@gmail.com

ÖZET

Amaç:

Gentamisin (GM), genellikle hayatı tehdit edici Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotiktir. Gram negatif bakterilere karşı geniş bakterisid spektruma sahip olmakla birlikte beta-laktamlara direnç gösteren mikroorganizmalara karşı etkin olması ve maliyetinin düşük olması nedeni ile kullanım alanı oldukça geniştir. En önemli yan etkisi ise nefrotoksisitedir ve akut böbrek yetmezlikli olguların %10-20'sinden sorumludur.

Ferulik asit, bitkilerin tohum ve yapraklarında bulunan fenolik asittir. Özellikle pirinç, buğday, yulaf, portakal, ananas, enginar gibi bitkilerde miktarı oldukça fazladır. Ayrıca kimyasal yapısı güçlü bir antioksidan olan kurkumine benzer ve hidroksisinnamik asit ailesine mensuptur. Daha önce yapılan çalışmalar ferulik asitin DNA ya zarar veren süperoksit, nitrikoksit ve hidroksil radikalleri gibi serbest radikalleri etkisiz hale getiren bir antioksidan olduğunu gösterilmiştir.

Gentamisin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı ferulik asitin etkisinin histolojik olarak incelenmesine ait çalışmaya literatürde rastlamadık. Biz bu çalışmada amacımızı gentamisin verilerek nefrotoksiste oluşturulan sıçan böbrek dokusunda, meydana gelen hasara karşı kuvvetli bir antioksidan olan ferulik asitin uygulamasının histokimyasal, histomorfometrik, immünohistokimyasal, ve biyokimyasal etkilerini incelemek olarak belirledik.

Yöntem:

Çalışmamızda 28 adet wistar albino suşu dişi sıçan kullandık. Deneklerimizi kontrol = Grup 1 (n=7), Gentamisin = Grup 2 (n=7), Gentamisin +ferulik asit =Grup 3 (n=7)ve

Ferulik asit = Grup 4 (n=7) olarak 4 grupta topladık. Tüm grupları deneyin başlangıcında ve sonunda 24 saatlik metabolik kafeslerde bekleterek kan ve idrar örneklerini topladık. Kontrol (Grup1) grubumuza hiçbir uygulama yapmadık. Gentamisin grubuna (Grup 2) 8 gün süre ile günde tek doz ip.yol ile Gentamisin (80mg/kg) enjeksiyonu yapıldı . Gentamisin + Ferulik asit grubuna (Grup 3) 8 gün süre ile günde tek doz ip yoldan (80mg/kg) Gentamisin ve p.o yol ile Ferulik asit (50 mg/kg) uygulandı. Ferulik asit grubuna (Grup 4) 8 gün süre ile günde tek doz p.o yoldan 50 mg/kg Ferulik asit uygulandı. 8. Günün sonunda denekler metabolik kafeslerde 24 saat tutuldu ve deneklerin idrar ve kan örnekleri alınarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Bulgular:

Sakrifikasyon yolu ile elde ettiğimiz doku örnekleri histolojik ve biyokimyasal yönden değerlendirildi. Kontrol ve Ferulik asit grubunda histolojik,immunhistokimyasal ve biyokimyasal olarak normal sonuçlar elde ederken Gentamisin grubunda serum ve idrarda artmış üre ve kreatinin değerleri ile böbrek dokusunda tubüler dilatasyon, fırçamsı kenar kaybı, tubüler dejenerasyon, hiyalin kast ve mononükleer hücre infiltrasyonuna yoğun olarak rastlandı. VEGF, KIM-1, Aktif Kaspaz 3 immunreaktivitesi de Gentamisin grubunda artmış olarak tespit edildi. Gentamisin + Ferulik asit grubunda ise Gentamisin grubunda olan değişikliklerin oldukça azaldığı gözlemlendi.

Sonuç:

Elde ettiğimiz verilere dayanarak Gentamisine bağlı nefrotoksisitede Ferulik asitin koruyucu etkisinin olduğunu gözlemledi.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, Gentamisin, Ferulik Asit, Rat

EFFECT OF FERULIC ACID ON GENTAMICIN INDUCED NEPHROTOXICITY

BETUL SARI

**Dokuz Eylul University, Medical Faculty, Department of Histology and Embriology,
Balçova, İZMİR, drbetulatis@gmail.com**

ABSTRACT

Objective:

Gentamicin (GM) is an aminoglycoside group antibiotic used in the treatment of diseases caused by life-treatining Gram negative bacteria. Although it has a wide bactericidal spectrum against gram negative bacteria, it has a wide range of applications due to its low cost and microorganisms that are resistant to beta-lactams. The most important side effect is nephrotoxicity and it is responsible for 10-20% of patients with acute renal failure.

Ferulic acid is phenolic acid found in the seeds and leaves of plants. Especially in rice, wheat, oats, oranges, pineapple, artichoke, such as the amount of plants is quite large. In addition, the chemical structure is a strong antioxidant similar to that of kurkumin and belongs to the hydroxycinnamic acid family. Previous studies have shown that ferulic acid is an antioxidant that neutralizes free radicals such as superoxide, nitric oxide and hydroxyl radicals which damage DNA.

Histological study of the effects of ferulic acid against gentamicin-induced kidney damage was not reported in the literature. In this study, we aimed to investigate the histochemical, histomorphometric, immunohistochemical, and biochemical effects of the application of ferulic acid, a powerful antioxidant against damage in rat kidney tissue, in which nephrotoxicity was induced by gentamicin.

Method:

We used 28 wistar albino strain female rats in our study. We collected our subjects in four groups as control = Group 1 (n = 7), Gentamicin = Group 2 (n = 7), Gentamicin + ferulic acid = Group 3 (n = 7) and Ferulic acid = Group 4 (n = 7). We collected blood and urine samples by resting all groups at the beginning and end of the experiment in 24-hour metabolic cages. We did not apply anything to our control group (Group 1). Gentamicin (80mg / kg) was injected into the gentamicin group (Group 2) once daily for 8 days with a single dose of ip. Gentamicin + ferulic acid group (Group 3) was administered a single daily dose of (80 mg / kg) per day for 8 days with Gentamycin and pO pathway for ferulic acid (50 mg / kg). Ferulic acid was administered to the ferulic acid group (Group 4) for 8 days with a single dose of p.o. (50 mg / kg) per day. At the end of the 8th day, subjects were kept in metabolic cages for 24 hours and urine and blood samples were taken and sacrifice was performed. The tissue samples obtained by sacrifice were evaluated histologically and biochemically. In control and ferulic acid groups, normal results were obtained histologically, immunohistochemically and biochemically, whereas in gentamicin group, tubular dilatation, brush border loss, tubular degeneration, hyaline cast and mononuclear cell infiltration in kidney tissue and urinary urea and creatinine values were found to be increased. VEGF, KIM-1, Caspase 3 immunoreactivity was also increased in the Gentamycin group. Changes in the gentamicin group were observed to be significantly reduced in the Gentamicin + Ferulic acid group.

Conclusion:

Based on the obtained, we observed that ferulic acid has a protective effect on nephrotoxicity due to gentamicin.

Key Words: Kidney, Gentamicin, Ferulic Acid, Rat

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Akut böbrek yetmezliği (ABY), sıklıkla nefrotoksik ve iskemik olaylar sonucunda meydana gelmektedir. Akut böbrek yetmezliği hızlı ilerleyen bir tablodur, kontrol edilmesi zor olan elektrolit, asit-baz ve sıvı dengesizliğine neden olmaktadır. Akut böbrek yetmezliğinde glomerüler filtrasyon hızı hızla düşmektedir. (1,2) Organik çözücüler, ağır metaller, glikoller ve aminoglikozit grubu antibiyotikler akut böbrek yetmezliğine yol açan başlıca etkenlerdir.(3)

Aminoglikozit grubu geniş spektrumlu bir antibiyotik olan Gentamisin hayatı tehdit edici Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Kimyasal stabiliteleri ve hızlı bakterisidal etkilerinden ötürü çeşitli klinik durumlarda ilk basamak ilaç olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar (4-5,6). Ancak bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonları nefrotoksiktir, akut böbrek yetmezlikli olguların %10-20'sinden sorumludur (4,5,7,8). Bazı durumlarda, bu yan etkinin çok şiddetli olması ilacın kullanımının bırakılmasını gerektirmektedir. Bu nefrotoksik etkiler ise aminoglikozidlerle 7 günden daha fazla tedavi edilen hastaların %30 unda ortaya çıkmaktadır (4,6). Çeşitli çalışmalar, gentamisine bağlı böbrek hasarında reaktif oksijen türlerinin ilişkisi olduğunu göstermektedir. Serbest oksijen radikalleri (ROS) doğrudan lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) içeren hücre bileşenlerini etkiler ve onların yapılarını bozar (9). Oksidatif stres membran lipidlerinin peroksidasyonu; çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasına ve çeşitli aldehid ve alkenlerin salınmasına neden olur (10). Bu salınım gentamisinin böbrek kortikal mitokondrisi tarafından serbest radikallerden oluşan oksijen salınımına, eş zamanlı olarak apoptoza ve poliferasyona neden olur (11). Üretilen serbest radikaller (SR), böbrek glomerüllerin temel membranlarına zarar verir, tübül fonksiyonunu bozar, kollajen ve diğer matriks bileşenlerini parçalar (12). Gentamisin uygulamaları ile ilişkili böbrek hasarını iyileştirmek ya da korumak için GM ile birlikte eşzamanlı olarak çeşitli faktörler kullanılmasına rağmen (13,14,15), gentamisine bağlı nefrotoksisiteye karşı güvenilir bir tedavi bulunmamaktadır.

Ferulik asit (FA, 3-methoxy, 4-hydroxy cinnamic acid), sebze ve meyvelerde sıklıkla fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklan, fenolik bileşiktir (21,22). Kimyasal yapısı zerdaçalın sarı rengini veren ve önemli bir antioksidan olan kurkumine

benzemektedir. Özellikle tohumlarda ve yapraklarda hem serbest formunda hem de lignin ve diğer biyopolimerlere bağlı olarak bulunur (23). Mısırdaki, buğday, pirinç, yulaf, çavdar gibi tahılların kepeklerinde, kavrulmuş kahve, domates ve turuncgillerde bulunmaktadır (21). Ferulik asit, fenoksiradikal yapısına bağlı olarak yüksek antioksidan potansiyele sahiptir. Etkili bir serbest radikal süpürücüdür ve bazı ülkelerde lipit peroksidasyonunu engellemek amacıyla gıda katkısı olarak da kullanılmaktadır (24). Ferulik asitin insanlarda, güçlü bir membran antioksidanı olarak etki ettiği ve deri kanseri, yaşlanma, yorgunluk, soğuk algınlığı, grip ve influenzaya karşı koruyucu etkili olduğu bilinmektedir (25). Ferulik asit hidroksil radikali, hipokloröz asit ve peroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerini süpürücü etkiye sahiptir; serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı ispatlanmıştır (26). FA'nın sıçanların pankreatik hücrelerinde insülin salınımını arttırdığı bildirilmiştir (27). Antioksidan özellikleri ratlarda kimyasallar aracılığıyla oluşturulan karsinogeneze ve farelerde deri tümörü oluşumunda da görülmüştür (28). Çalışmalar, ferulik asidin aynı zamanda fotoprotektif (29), hepatoprotektif (30), antiaterojenik(31) ve antimutajenik (32) özellikleri de olduğunu göstermiştir.

Gentamisin'in nefrotoksik etkisinin en önemli nedenlerinden birisi serbest oksijen radikalleri oluşturmalarıdır. Ferulik asit ise iyi bilinen serbest oksijen radikali süpürücüsüdür. Bu nedenle çalışmamızda gentamisin'in oluşturduğu nefrotoksisteye ferulik asitin etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Böbrek Anatomisi

2.1.1. Böbreğin yerleşimi, şekil ve büyüklüğü

Böbrekler, columna vertebralisin her iki yanında sağda ve solda torakal 12. ve lumbal 3. vertebra lar arasındaki seviyede bulunan retroperitoneal olarak yerleşmiş organlardır. Karın boşluğunun sağ üst kısmında karaciğer bulunduğu için sağ böbrek sol böbreğe nazaran biraz daha aşağıda bulunmaktadır. (33,34,) her bir böbrek yaklaşık 11,5 cm uzunluğunda 5-7 cm genişliğinde 2,5 cm kalınlığında ve yaklaşık olarak 140-170 gr. ağırlığındadır. Böbreği içten dışa olmak üzere üç adet kılıf sarmaktadır ;kapsula fibrosa ,kapsula adiposa ve fascia renalis (34).

2.1.2 Böbreğin kenarları

Margo lateralis:

Karın duvarının arka dış kısmına yönelmiştir. Biraz arkaya, dışa ve yukarı bakar. Sağ böbreğin dış kenarı periton ile karaciğerin sağ lobundan ayrılır. Sol böbreğin dış kenarı üstte periton ile örtülü ve dalak ile komşudur. Margo medialis margo lateralden daha kalındır (35,36).

Margo medialis:

Böbreğin her iki ucu konvektir. İç kenarının orta kısmı ise konkavdır. Bu kenarın orta bölümünde vertikal bir yarık uzanır bu yarığa hilum renale denir. Buradan damarlar, sinirler ve pelvis renalis geçer. Hilum renaleden böbreğin içerisindeki sinus renalis olarak adlandırılan boşluğa geçilir. Hilum renalede bulunan yapılar önden arkaya doğru sırayla v.renalis, a. renalisin 2-3 dalı, üreter ve a.renalisin bir dalıdır (35,36)

2.1.3 Böbreğin Uçları:

Extremitas superior: Kalın ve yuvarlak olup orta çizgiye daha yakındır. Bu uca glandula suprarenalis oturur.

Extremitas inferior: Üst uca göre daha küçük ve daha incedir (37)

2.1.4 Böbreği dıştan saran yapılar

Böbrekler içten dışa doğru capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis adı verilen üç bağ dokusu örtüsüne sahiptir.

Capsula Fibrosa (Renal kapsül): Böbreği saran sağlam, ince fibröz bir kılıftır. Kollajen liflerden oluştuğu için genişleme kabiliyeti azdır. Tamamen böbreğe yapışmaz ve kolayca ayrılabilir. Böbrek hilusunda iki yaprağa ayrılır, yapraklardan birisi hilustaki yapıların üzerine geçerek, onların adventisyası olarak devam ederken diğer yaprak hilum renaleden içeri girer papillalar hariç sinüs renalisin iç yüzünü döşer.

Capsula Adiposa (Perirenal yağ tabakası): Fibröz kapsülü dıştan saran yağ tabakasıdır. Böbreği darbelere karşı korumaktadır. Bu tabaka hilusdan geçerek sinüs renalise girer ve buradaki yapıların arasını doldurur.

Fascia Renalis (Gerota fasyası, perirenal fasya): Adipoz kapsülün dışındadır. Karın duvarındaki ekstrapéritoneal yağ dokusunun yoğunlaşması ile oluştuğu kabul edilir. Renal fasya ve adipoz kapsül böbreği adrenal bezle beraber sarar (38,39).

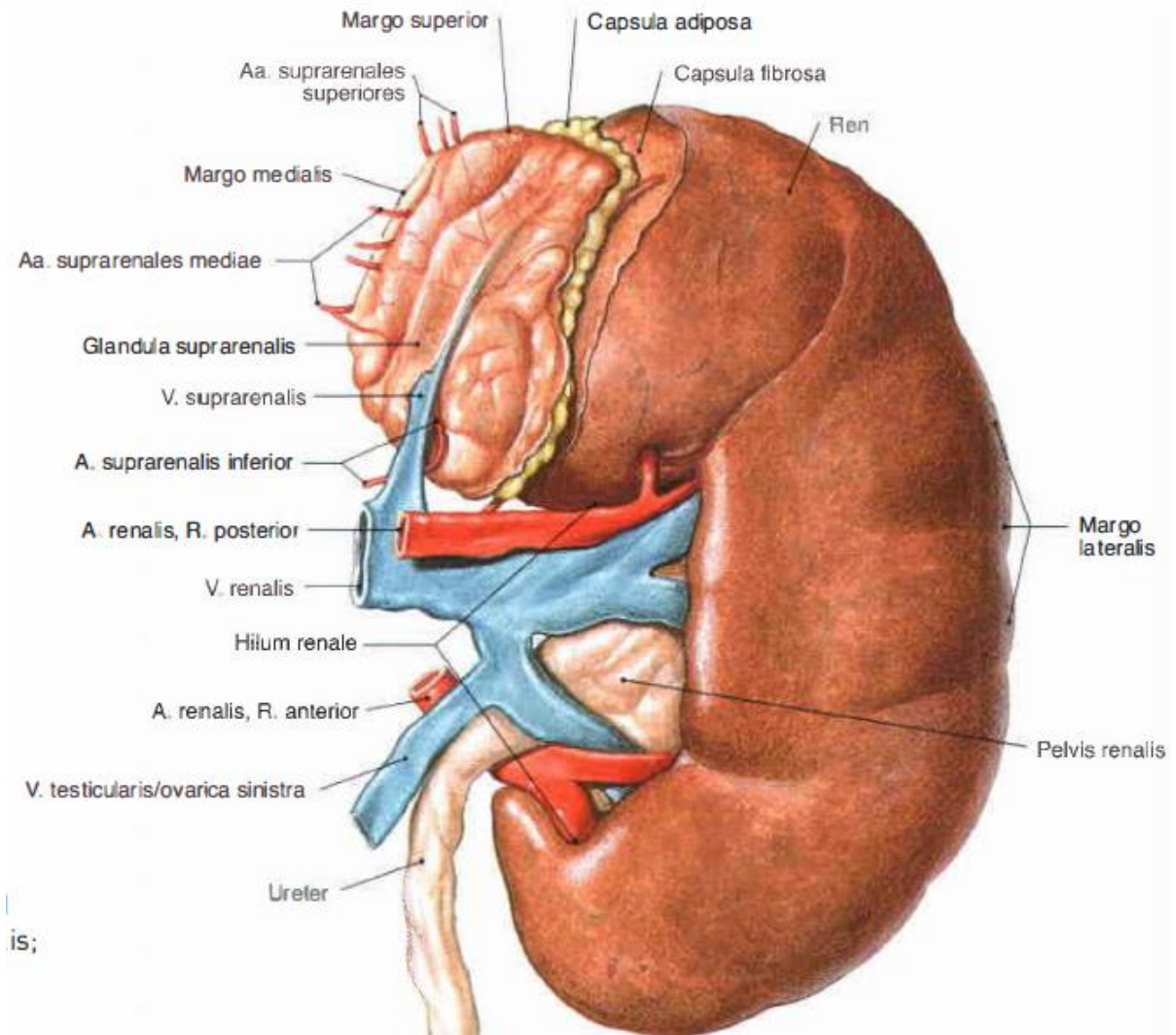
Karın arka duvarında retroperitoneal olarak bulunan böbrekler biraz da olsa aşağı -yukarı yönde hareket edebilirler. Üst yarıları diyaframa yaslandığından dolayı, derin inspirasyonda 1-2 cm aşağı inerler. Böbrekleri yerinde tutan en önemli oluşumlar, böbreklerin damarları ve fascia renalistir. Ayrıca capsula adiposa ve pararenal yağ tabakası böbrekleri yerinde tutmaya yardımcı yapılardır.(37,40).

Böbreklerin ön ve dışı bakan facies anterior, arka ve içe bakan facies posterior olmak üzere iki yüzü, margo medialis, margo lateralis olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere de iki ucu vardır.

Böbrekler yukarıdan diyafragma ile komşudurlar. Diyafragma, böbrekleri plevral boşluktan ve 12. kostadan ayırır.

Sağ böbreğin ön yüzü; surrenal bez, karaciğerin sağ lobu, colon ascendens, fleksura coli dekstra, duodenumun ikinci parçası (pars descendens) ve jejunum kıvrımları ile komşudur.

Sol böbreğin ön yüzü; surrenal bez, dalak, mide, pankreasın gövdesi, splenik damarlar, fleksura coli sinistra, kolon descendensin başlangıcı ve jejunum kıvrımları ile komşuluk yapar. Böbreklerin üst-iç yüzleri surrenal bez ile komşudur(33)



Şekil 1: Böbreğin anatomisi (41)

2.1.5 Böbreğin Bölümleri

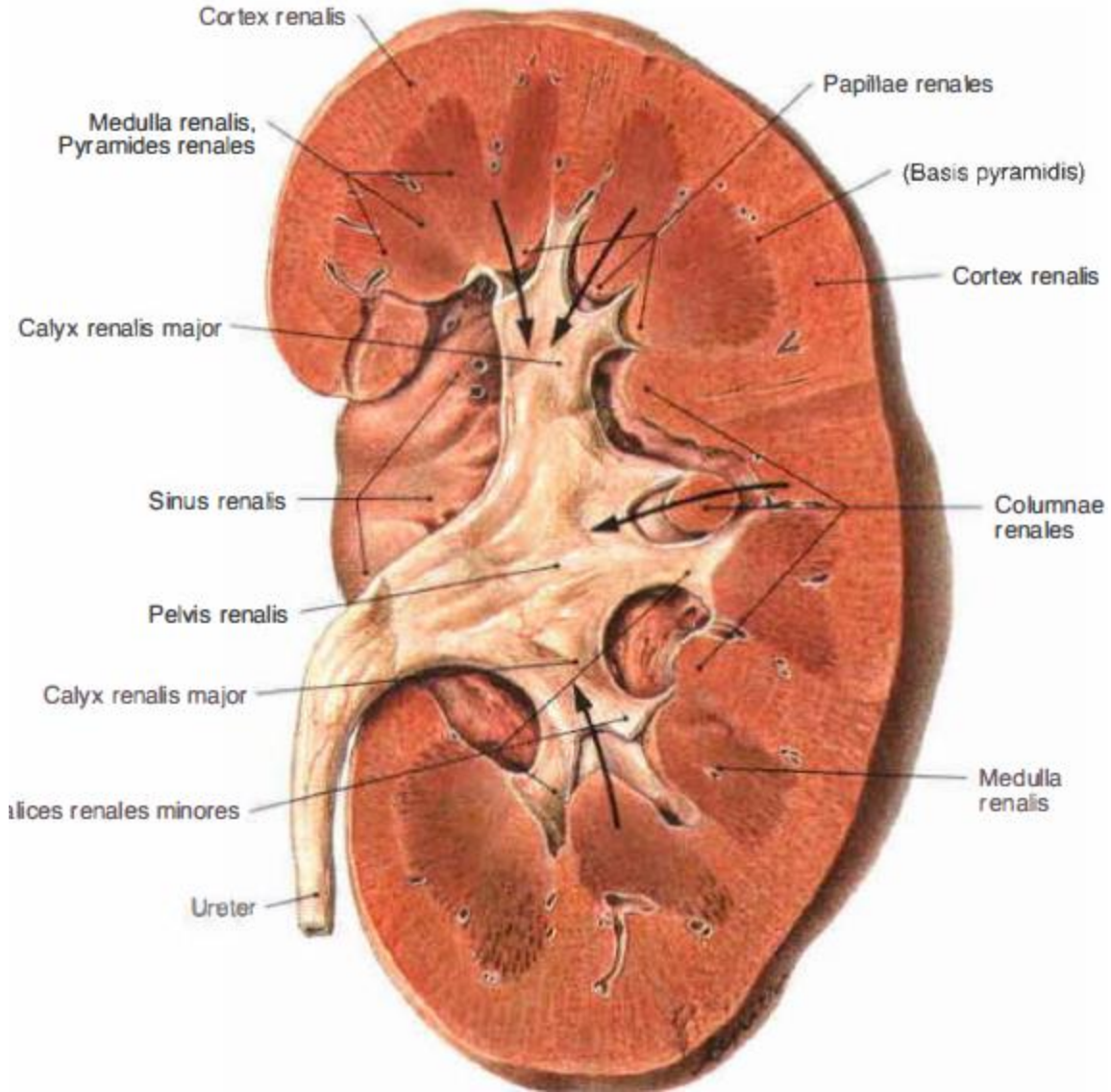
Taze bir böbrek vertikal kesitle ikiye ayrıldığında renk olarak farklı iki kısımdan oluştuğu görülür. Daha açık renkli olan dış kısmına cortex renalis, daha koyu renkli ve çizgili görünümlü iç kısmına medulla renalisdir. Hilum renaleye açılan boşluk sinus renalisdir. (42,43,44)

Pelvis renalis: Tepesi hillum renaleden çıkmış, üreterle uzanan, gövdesi sinus renalis icine oturmuş, kas ve zardan yapılı, huni biciminde bir bölümdür. Pelvis renalis, proksimalde büyük ve küçük kaliksler seklinde böbrek dokusu icinde uzanır (38).

Medulla renalis: pyramides renales (Malpighi piramitleri) denilen koyu kırmızı renkli sayıları 8-10 arasında değişen koni şeklindeki yapılardan oluşur. Bu piramitlerin tabanı

cortex renalis'e paralel olarak uzanır. Tepesi sinüs renalis'e bakar. Tepesinde calices renales minoresin içine doğru uzanan papillae renales adı verilen kabarık yapılar bulunmaktadır. Papillaların üzerinde sayıları birden fazla olan delikler bulunur. Bu deliklere foramina papillaria denir. Pyramis renalislerin aralarında cortex renalisin uzantıları olan columna renalis adı verilen sütunlar bulunur. Bir pyramis renalis ve onun etrafını saran korteks parçasına bir böbrek lobu (lobus renalis) denir. Pyramis renalislerin tabanından kortekse doğru uzanan çizgilere pars radiata (stria medullaris, ferrein uzantıları) denir (37)

Cortex renalis: Böbrekte fonksiyonel olarak idrarı yapan kısımdır. Bu kısımda arterio glomerulus afferens ve arterio glomerulus efferensin oluşturduğu damar yumağına glomerulus ve bunu saran yapıya bowman kapsülü denir. Her bir malpighi cisimciği ve buna ait idrar kanalcığı kandan idrarı süzen nefron diye adlandırılan birimi oluşturmaktadır. Her bir böbrekte yaklaşık bir milyon nefron bulunmaktadır. Her bir idrar kanalcığı kısa bir parça ile toplayıcı kanallara açılır. Bu toplayıcı kanallarda birleserek daha büyük toplayıcı kanalları oluşturur ve sonunda papilla renalisde bulunan deliklerle calix renalis minora açılırlar (42,43,44)



Şekil 2: Renal korteks, medulla ve pelvisi gösteren oblik ve dikey kesit (ventral görünümü) (41).

2.1.6 Böbreklerin Damarları Ve Sinirleri

2.1.6.1 Böbreğin Damarları:

Böbreğin işlevsel ve besleyici damarları a. renalislerdir. A. renalisler dik açı ile ayrılır. Sol renal arter sağ renal arterden biraz daha yukarıda bulunur. A. renalisler kalın damarlardır. Bu nedenle böbreklerden kısa sürede fazla miktarda kan geçer. A. renalisler hilum renalisine gelince 5 segmental dala ayrılırlar. Bu dallara A. Segmentalis denir ve çoğu pelvis renalisin ön tarafından geçer , bir tanesi pelvis renalisin arkasından geçer. A.

segmentalisler sinus renaliste yeniden dallara ayrılırlar. Böbrek lobları arasında uzanan bu dallara a. interlobaris denir ve calix renalis minorların çevresinde columna renalise girerler. A. interlobarisler kortikomedullar birleşim yerine değin ilerler ve yan tarafa kıvrılarak iki katman arasında bir kavis şeklinde uzanırlar. Bu arterler birbirleriyle anastomoz yapmazlar ve a. arcuata olarak adlandırılırlar. A. arcuatalardan dik olarak ince dallar çıkar, böbrek lobçukları arasında uzanır. Bunlara A. interlobularis adı verilir. A. interlobularislerden yan tarafa uzanan ince dallara ise arteriola glomerularis afferens denir. Bunlar capsula glomerularisin (Bowman Kapsülü) damar kutbundan girerek içeride rete capillare glomerulare denilen kılcal damar yumağını oluşturur. Bu kapiller yumak, yeniden birleşerek arteriola glomerularis efferens yapar. Arteriola glomerularis efferens kortexe geldiğinde idrar kanalları arasında peritubular kapiller ağı oluşturur. Kapiller ağdaki kan yoğun olup yavaş seyreder. İdrar kanalcığındaki idrar ise suludur aradaki bu fark nedeni ile kan, idrar kanalındaki suyu yeniden emer. Böylelikle glomerulustan süzülerek Bowman kapsülüne geçen suyun büyük bir kısmı yeniden emilmiş olur. Bu kapiller ağdan sonra venöz dönüş başlar. Arterin girdiği kutuptan çıkarak ilk olarak v. interlobularise açılır. V. İnterlobularisler arterleri izleyerek sırasıyla v. arcuata, v. interlobaris, v. segmentalis ve v. renalis olarak v.cava inferiora açılırlar(35,36).

Böbreğin medulla bölgesini besleyen damarlar (Fasciculus vascularis= Vasa recta), kısmen arteriola glomerularis efferensten, kısmen de a. arcuatadan ayrılır. Medullar bölgeyi besleyen bu damarlar venula recta denilen venler ile yeniden dönüş yaparak v. arcuataya açılırlar. A. interlobularislerin uç kısmından ayrılan ince dallara a. capsularis denir ve böbreğin dış yüzüne doğru uzanırlar. Böbrek dokusundan çıkan bu dalcıklar capsula fibrosa içinde bir plexus oluştururlar. Capsula fibrosa, böbrekten ayrıldığında bu damarlar kopar. Capsula fibrosa ve capsula adiposayı besleyen bu dalcıklar a. lumbalis, a. suprarenalis ve a. testicularisden gelen dalcıklarla anastomoz yapar. Bu dalcıklar ile gelen kanı drene eden venlere v. capsularis denir. Bu venler venula stellatalara, venula stellatalar da v. interlobularise açılırlar (36).

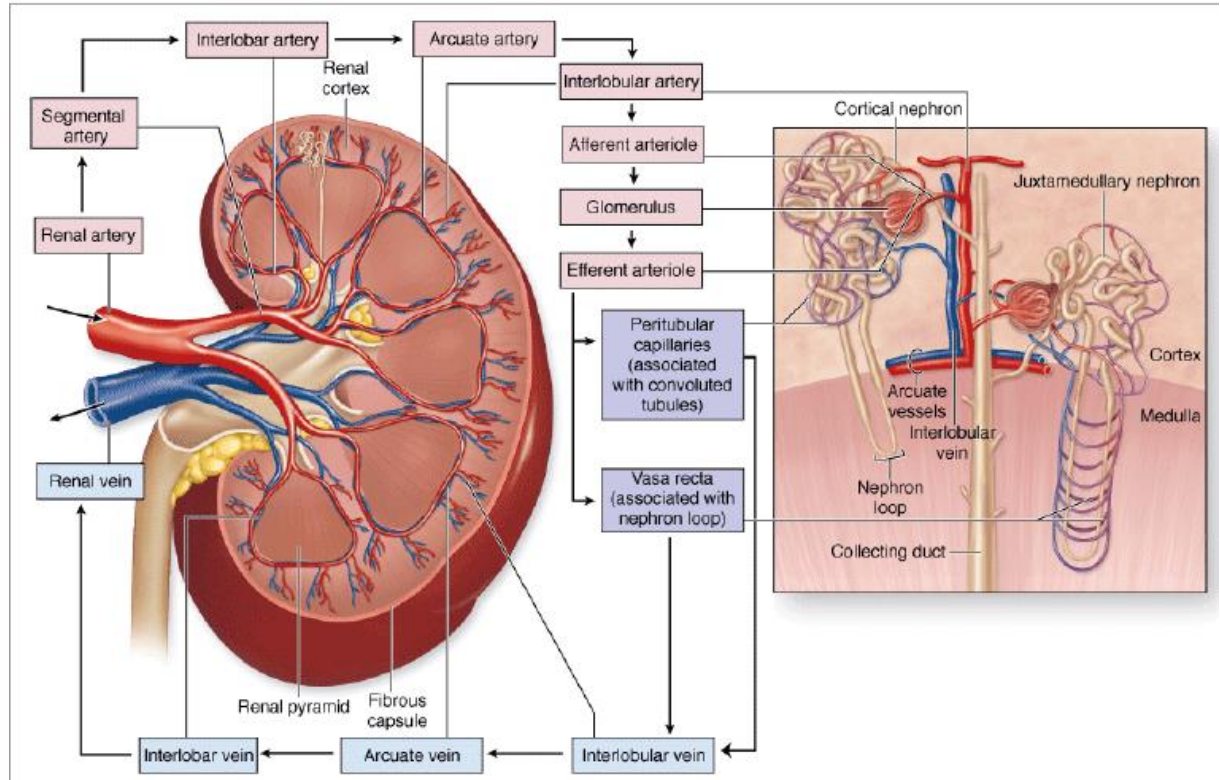
2.1.6.2 Böbreğin Lenfatikleri

Böbreğin lenf damarları üç adet plexus oluşturur. İlk ikisi böbreğin içinde olup biri tubulus renalisin etrafında, diğeri ise capsula fibrosanın altında yer almaktadır. Üçüncüsü ise capsula adiposada bulunur. (37) Tubulus renalisin çevresindeki damarlar birleşerek üç-

dört esas dal oluştururlar. Hilum renaleden çıkarken diğer iki pleksusa ait damarlar ile birleşirler. Böbrekten çıkan lenf damarları v. renalisi izleyerek aorta'nın yan tarafındaki nodi lymphatici lumbalese (nodi aortici laterales) açılırlar (45)

2.1.6.3 Böbreğin Sinirleri

Böbrekler, sempatik liflerini n. splanchnicus minor ve n. splanchnicus minimusdan alırlarken parasempatiklerini ise n. vagusdan alırlar. Preganglionik sempatik ve parasempatik lifler a. renalis etrafındaki plexus renalis içindeki ganglionik nöronlarla sinaps yapmaktadırlar. Postganglionik sempatik lifler a.renalisin böbrek içindeki dallarında dağılmaktadırlar. Sempatiklerin vazokonstriktör etkisi, A. renalislerin dalları boyunca dağılan postganglionik parasempatik liflerin ise vazodilatör etkisi olduğu düşünülmektedir (42,43,44).



Şekil 3: Böbreğin damarları (46)

2.2 Böbrek Embriyolojisi

İntrauterin yaşam süresince kranialden kaudala doğru birbirinden farklı olarak 3 böbrek sistemi gelişmektedir. Bunlar, pronefroz, mezonefroz ve metanefroz böbrek sistemleridir. Bu sistemlerden pronefroz insan embriyolarında dördüncü haftanın başında

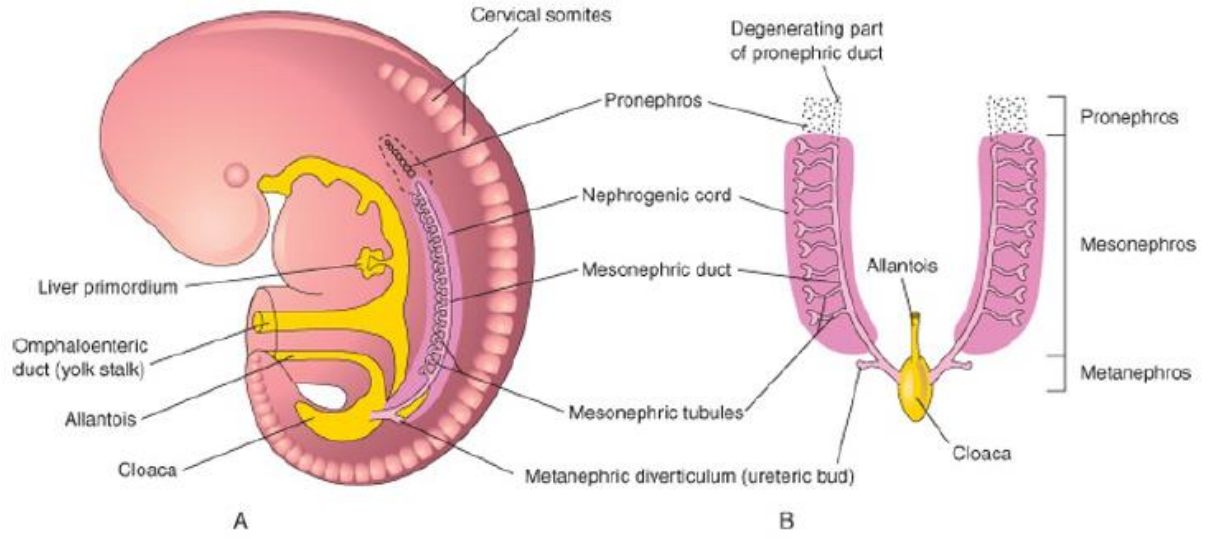
servikal bölgede 7-10 solid hücre topluluğu tarafından temsil edilir rutimenter ve işlevsizdir. Mezonefroz ise intrauterin yaşamın özellikle erken dönemlerinde kısa süreli fonksiyon görmektedir. Üçüncü sistem olan metanefroz kalıcı böbrekleri oluşturan sistemdir(47).

2.2.1. Mezonefroz Böbrek Gelişimi

Mezonefroz ve mezonefrik kanallar üst torasikle üst lumbar segmentlerin intermediate mezoderminden gelişirler. Gelişimin 4. haftasının başlarında mezonefroza ait ilk boşaltım kanalları belirmeye başlar. Bu tübüllerin boyları hızlıca uzar , ‘S’ şeklinde kıvrımlanırlar. Medial uzantılarının ucunda ise kapiller yumaktan oluşan bir glomerulus oluşur. Glomerulusun etrafındaki tübüller bowman kapsülünü oluşturmaktadırlar. Bu iki yapı birlikte renal korpuskül olarak adlandırılırlar. Kıvrımlı tübülüs mezonefrik ya da wolffian kanalı olarak adlandırılan toplayıcı kanala girer. İkinci ayın ortasında ise mezonefroz orta hattın her iki yanında oval şekilli bir organ halini alır. Bu süreçte kaudaldeki tübüller farklılaşmaya devam ederken, kranial tübüller ve glomeruluslar dejenere olarak ikinci ayın sonlarında tamamen ortadan kalkmış olurlar(48).

2.2.2. Metanefroz Böbrek Gelişimi

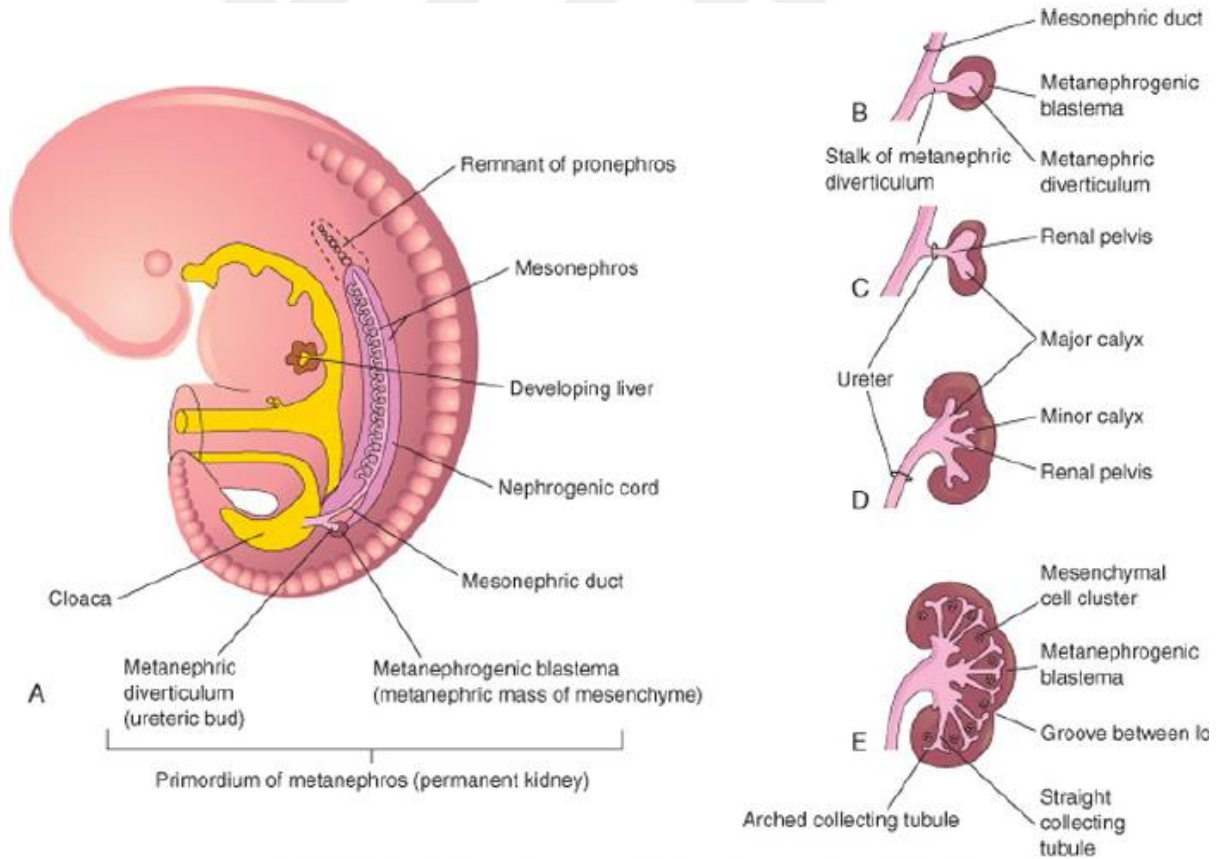
Beşinci haftada beliren bu kalıcı böbreklerin boşaltım birimi metanefrik mezoderminden gelişir. Ancak, kanal sisteminin gelişimi diğer böbrek sistemlerinden farklıdır. Metanefroz, mezoderm kaynaklı iki parçadan oluşur. Bunlar üreter tomurcuğu ve metanefrojenik doku şeklindedir. Mezonefrik kanalın bir çıkıntısı olan üreter tomurcuğu renal pelvis, renal kaliksler, toplayıcı kanallar ve toplayıcı tübülleri oluşturur (47).



Şekil 4: Böbreğin embriyolojik gelişimi (33)

2.2.3. Toplayıcı Sistem

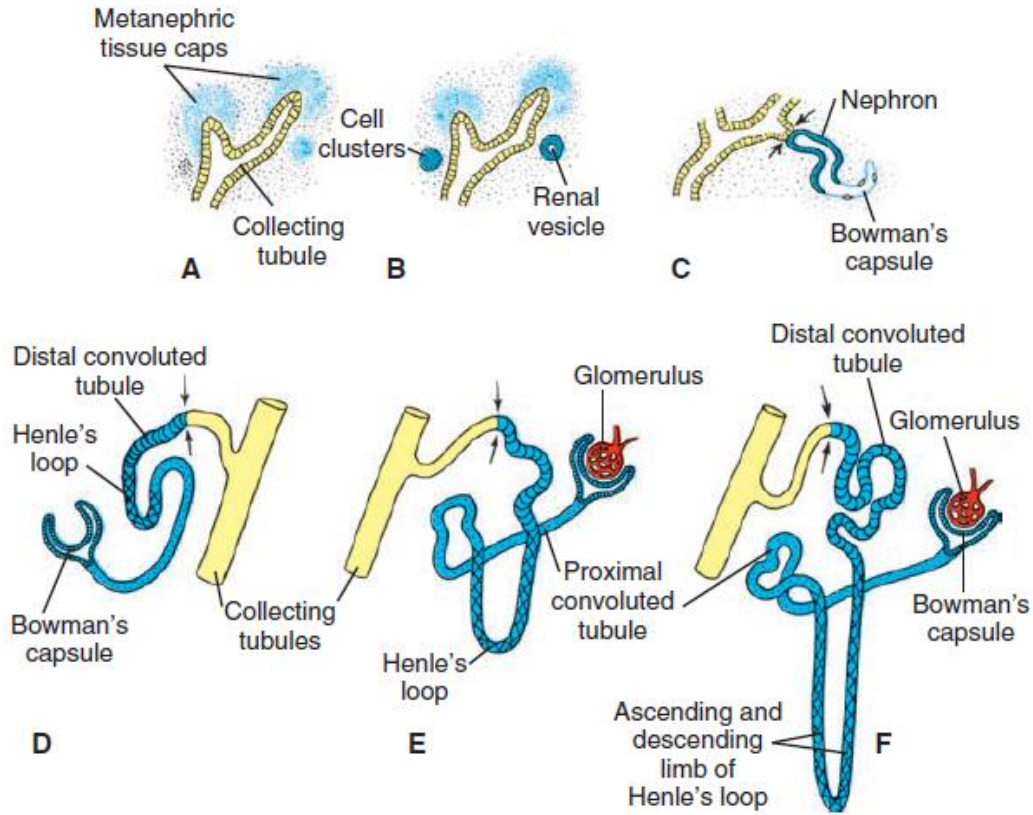
Kalıcı böbreklerin toplayıcı kanalları, mezonefrik kanalın kloakaya girişine yakın noktasında ortaya çıkan çıkıntıdan, üreter tomurcuğundan gelişir. Bu tomurcuk metanefrik doku içine penetre olur. Penetrasyonun ardından üreter tomurcuğu genişleyerek primitif renal pelvisi oluşturur ve gelecekteki major kaliksleri oluşturmak üzere kraniyel ve kaudal parçalara ayrılır. Kalikslerin her biri metanefrik dokuya penetre olurken iki yeni tomurcuk oluşur. Bu tomurcuklarda 12 ve daha fazla sayıda tübül oluşturana kadar bölünmeye devam ederler. Beşinci ayın sonuna kadar periferde bir miktar tübül daha oluşur. İkinci generasyondaki tübüller genişleyerek, 3. ve 4. generasyona ait tübülleri absorbe ederek renal pelvisin minör kalikslerini oluştururlar. Gelişimin ilerleyen evrelerinde toplayıcı tübüller uzarlar ve minör kalikslerin tepesinde birikerek renal piramitleri meydana getirir(48).



Şekil 5: Metanefroz ve toplayıcı sistemin embriyolojik gelişimi (33)

2.2.4. Boşaltıcı Sistem

Yeni oluşan her toplayıcı tübülün distal ucu metanefrik bir doku şapkası ile örtülüdür. Bu şapkadaki hücreler, tübüllerin indükleyici etkisi ile renal vezikül olarak bilinen küçük kesecikleri oluştururlar vedaha sonra bunlardan ‘S’ biçimli, küçük tübüller meydana gelmektedir. S’nin bir ucundaki cebin içine doğru büyüyen kapiller damarlar glomerule farklanırlar. Bu tübüller glomerulleri ile birlikte nefronu oluştururlar. Her nefronun proksimal ucu, glomerul tarafından derin şekilde kavislendirilmiş bowman kapsülünü oluşturur. Tübülün distal ucu ise bowman kapsülünden toplayıcı kanallara geçişi sağlayacak şekilde toplayıcı kanallardan biri ile ilişki kurar. Boşaltıcı tübüllerin uzamaya devam etmesi ile proksimal kıvrıntılı tübüller, henle kulpu ve distal kıvrıntılı tübüller meydana gelir. Doğuma kadar devam eden nefron oluşumuyla bebek doğduğunda her böbrekte 1 milyon nefron bulunur. Böbrekler glomeruler kapillerlerin diferansiyasyonundan kısa bir süre sonra, gestasyonun 10. haftasından itibaren, idrar üretmeye başlarlar. Doğumda böbrekler lobuler bir görünümdeydir. Çocukluk döneminde nefronların büyümeye devam etmesi ile bu lobuler görünüm kaybolur. Ancak nefronların sayısında bir artış olmaz (48,49)



Şekil 6:Nefron yapısının gelişimi (48)

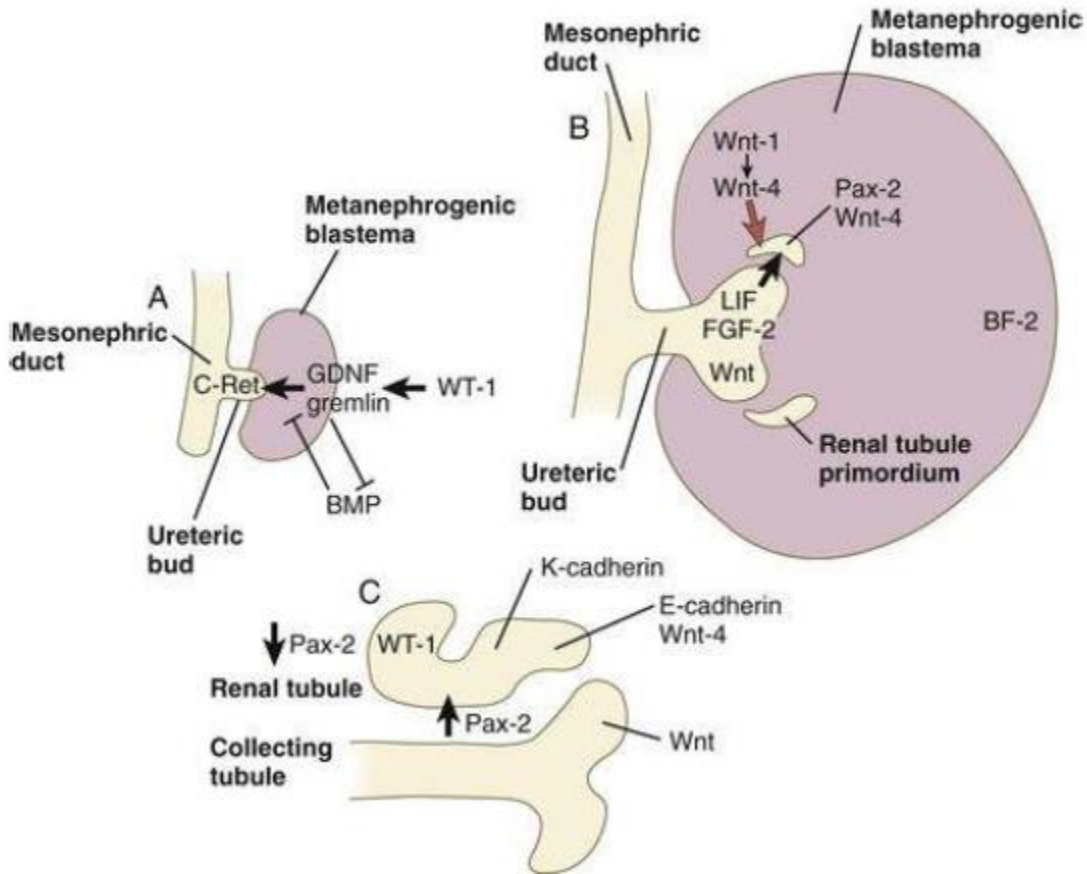
2.2.5. Böbrek gelişiminin moleküler kontrolü

Mezenşimal dokudan salgılanan ve bir transkripsiyon faktörü olan WT1 (Wilms'tümör supressör 1) metanefrik blastemin üreter tomurcuğunun uyarısına yanıt verebilecek durumuna gelmesine olanak verir. WT1 aynı zamanda mezenşim dokusundan üreter tomurcuğunun büyümesini sağlayan **Glial Kökenli Nörotrofik Faktör (GDNF)** ve **Hepatosit Büyüme Faktörleri'nin (HGF)** yapımını da kontrol eder. Üreter tomurcuğu epitelinde yapılan GDNF için **RET** ve HGF için **MET** adlı tirozin kinaz reseptörleri epitelium ve mezenşimal dokular arasındaki etkileşimi sağlayacak sinyalizasyon yollarını oluşturur. Üreter tomurcukları da mezenşimi **Fibroblast Büyüme Faktörü-2 (FGF-2)** ve **Kemik Morfojenik Proteini-7 (BMP-7)** vasıtasıyla uyarır. Bu büyüme faktörlerinin her ikisi de bir yandan WT1 yapımının sürmesini sağlarken diğer yandan da hem apoptozisi bloke eder hem de metanefrik mezenşimin proliferasyonunu uyarır. Mezenşimal dokunun

nefron oluşturmak amacıyla epitele dönüşmesinde, ekstrasellüler matriks modifikasyonu yoluyla üreter tomurcuklarının da rolü vardır. Böylece epitelyal bazal laminanın temel özelliği gereği

Fibronektin, Kollajen I ve Kollajen III; Laminin ve Tip IV Kollajenle değiştirilir.

Bunlara ek olarak, mezenşimal dokunun yoğunlaşarak epitele dönüşmesi için elzem olan hücre adezyon moleküllerinden **Syndecan** ve **E-cadherin** de sentezlenir. Bütün bu süreç **PAX 2** ve **WNT-4** genleri tarafından bloke edilir. Bunların yanı sıra ürogenital kabartının oluşumunda **Steroidojenik Faktör-1** ve **DAX 1** genleri önemlidir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, X'e bağlı konjenital adrenal hipoplazi ile sonuçlanmaktadır (50).



Şekil 7: Böbrek gelişiminin moleküler kontrolü (49)

2.2.6. Böbreğin pozisyonu

Böbrekler başlangıçta pelviste, sakrumun ventralinde, birbirine yakın konumdadırlar. İntrauterin gelişim süresince vücudun dikleşmesi, lumbal ve sakral bölgelerdeki büyüme sonucunda böbrekler yavaş yavaş yukarı doğru kayarlar. Kalıcı böbrek olan metanefrozlar, pelvis içindeyken arteriyel kan dolaşımını Aort'un pelvik bir dalından alır. Böbrek yükseldikçe, her seferinde daha yukarı kesimlerdeki Aorta dalı olan arterlerden kan dolaşımını sağlamaya devam eder. Altta kalan önceki arterler genellikle dejenere olur. Böbrekler dokuzuncu haftada yetişkindeki pozisyonuna ulaşır. Başlangıçta hilus (hilum) ventrale bakmaktadır. Ancak böbreklerin yükselmesiyle hilus medial hatta doğru 90°'lik bir dönüş yapar. Dokuzuncu haftayla birlikte hilus arteromedial hatta yönelmiştir (33,50).

2.2.7. Böbreğin fonksiyonları

Metanefrozdan oluşan kalıcı böbrek onikinci haftada işlevsel hale gelir. İdrar amniyon boşluğuna geçer ve amniyon sıvısıyla karışır. Bu karışım fetüs tarafından yutulur ve fetal sindirim sistemine girer. Burada emilerek kan dolaşımına geçer ve tekrar böbrekler tarafından amniyon sıvısına atılır. Fetal yaşam süresince yıkım ürünlerinin atılımı görevi plasenta tarafından üstlenilmiş olduğundan böbrekler sorumlu değildir (33,50)

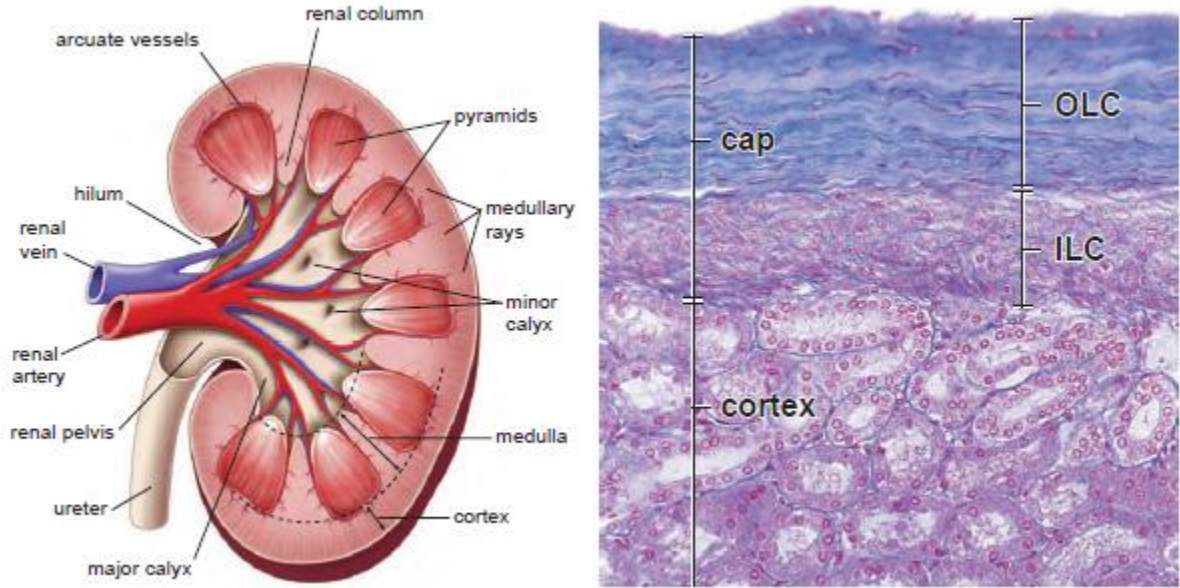
2.3. Böbrek Histolojisi

Böbreklerin dış yüzleri bağ dokusu kılıfı ile çevrelenmiştir. Bu kılıf dış ve içte iki tabakadan oluşur. Dış tabakada fibroblast ve kollajen lifler bulunurken, iç tabakamiyofibroblastlardan yapılmıştır. İç tabakadaki miyofibroblastlar böbrekte basınç ve hacim değişimlerinin düzenlenmesinde görev alırlar. Böbrekler dışta korteks (Corteks renalis-kabuk) içte medulla (Medulla renalis-öz) olarak iki kısma ayrılırlar. Korteks tabakası da kendi içinde iç ve dış bölgelere ayrılmıştır. Kortekste 1-4 milyon nefron bulunmaktadır. Korteks içeriği nedeniyle medullaya göre daha koyu ve granüler görünümdedir. Granüler görünümün nedeni, farklı düzeylerde yerleşmiş olan çok sayıdaki proksimal ve distal tübüllerdir. Böbreğin medullası 10-18 adet piramidal ya da konik şekilli medulla piramitlerinden (Pyramis renalis, malpighi Piramitleri) oluşmaktadır. Bu piramitlerin basis pyramidis olarak adlandırılan taban kısımları böbreğin dış yüzüne

yönelmiştir. Papilla renalis adını alan tepe kısımları ise böbrek kalikslerinin içerisine doğru yönelmiştir. Medulla piramitleri birbirlerine değmeyecek şekilde sinus renalis çevresinde dizilmişlerdir. Medulla piramitlerinin aralarında Bertini sütunları (columna renalis) denilen kortikal doku uzantıları bulunmaktadır. Medulla piramitlerinin çevresini saran korteks dokusu böbrek lobunu (lobus renalis) oluşturduğu için bir böbrekte piramit sayısı ile böbrek lobu sayısı aynıdır (51,54).

Medulla piramidlerinin taban kısımlarından kortekse doğru birbirine paralel uzanan tübül demetleri girer. Bu demetlere medullar ışınlar (pars radiata, medulla uzantıları= Ferrein piramitleri) denir. Medullar ışınlar böbreğin işlevsel birimi olan birkaç nefron ile toplayıcı kanallardan oluşurlar. Korteksin dış bölgesi böbreği bir kabuk gibi sarmaktadır. Korteks, Kapsula fibrosa ile medulla piramitlerinin taban kısımları arasındaki bölümdür. İç bölgesi ise medulla piramitlerinin arasındadır. Bu bölüm sinus renalis'e değin uzanır ve kesitlerde piramitler arasında sütun şeklinde görülmektedir. Bu nedenle Bertini sütunları (columna renalis) olarak isimlendirilirler (51,52).

Böbrekler gevşek bağ dokusu, kan ve lenf damarları ve sinirleri içeren stroma ile çevrelenmiş nefron ve toplayıcı kanallardan oluşur.



Şekil 8 : Renal korteks (54)

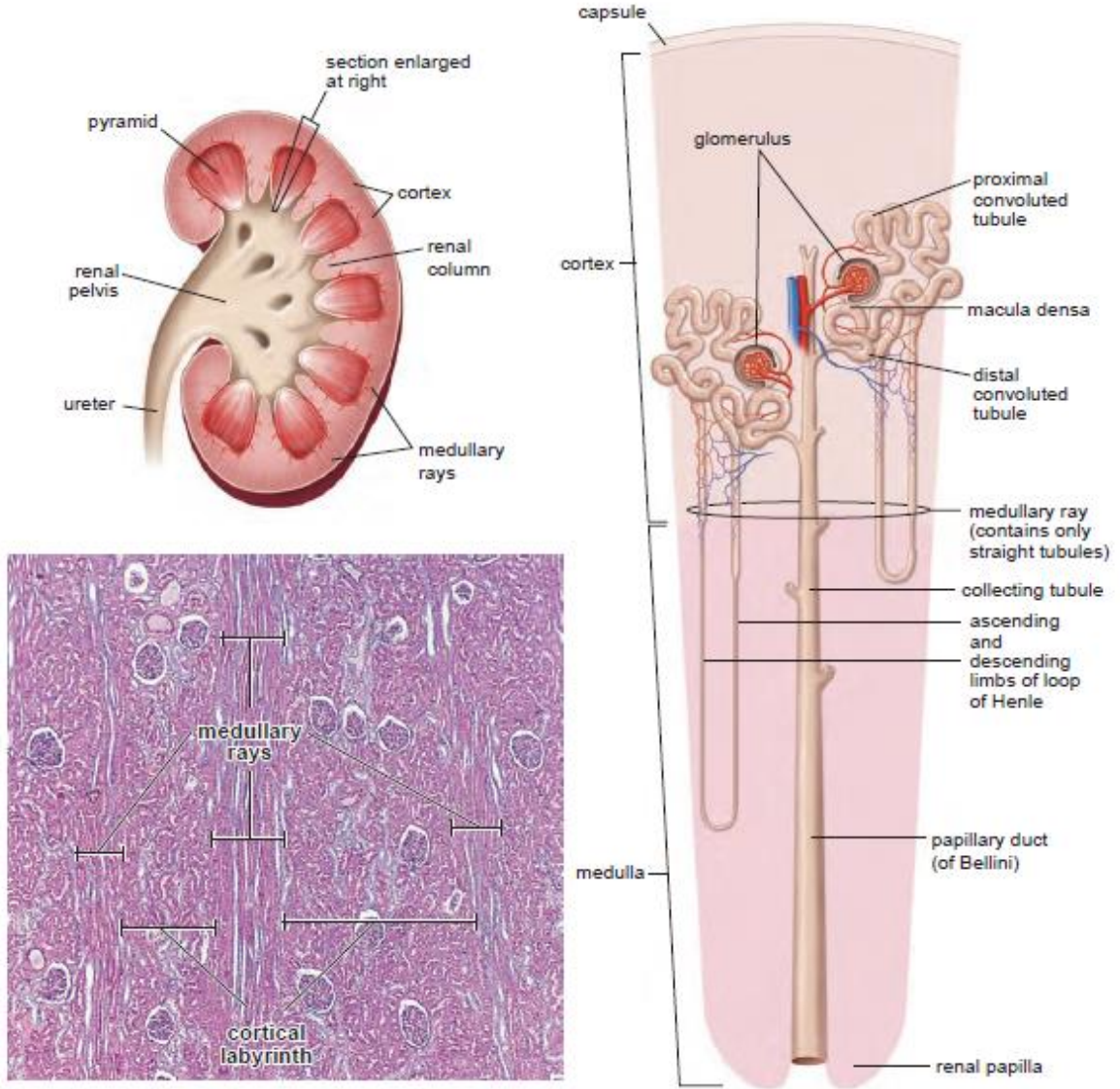
2.3.1. Nefron

Böbrek parankiminin en küçük yapısal ve işlevsel birimine nefron denir. Her bir böbrek 1-4 milyon nefron içermektedir. Nefronlar düz ya da kıvrımlı uzanırlar ve yerleşim yerlerine göre subkapsüler (kortikal), jukstamedullar ve intermediate nefronlar olarak üçe ayrılır.

1. Kortikal (subkapsüler) nefronlar: Nefronların %85' ini oluşturmaktadırlar. Böbrek cisimcikleri korteksin dış bölgesinde yerleşiktir. Henle kulbunun inen ince kolları çok kısa olup medullanın dış kısmına doğru genişlerken çıkan ince kol bulunmaz.

2. Jukstamedullar nefronlar: Nefronların %15' ini oluşturmaktadırlar. Böbrek cisimcikleri medulla piramitlerinin taban kısmında yerleşiktir. Jukstamedullar nefronların henle kulpları çok uzundur ve medulla piramitlerinin iç kısmında uzanırlar. Jukstamedullar nefronlar, medulla intersitisyumundaki hipertonic gradiyenti ayarlama da rol alırlar. Medullanın hipertonic ortamı, böbreğin hipertonic idrar üretmesini sağlar.

3. Intermediate nefronlar: Böbrek cisimcikleri korteksin orta bölgesinde yerleşiktir henle kulbları medullanın ortasına değin uzanır (52,57,58).Nefronlar böbrek cisimciği ve böbrek tübülü olarak iki kısımdan oluşurlar. Nefronun başlangıç kısmında özel kapiller yumağı saran, 300 µm çapında, ampül şekilli bir genişleme bulunur bu kısım böbrek cisimciği (corpusculum renale Malpighi, renal cisimcik, malpighi cisimciği) olarak adlandırılır. Bunu böbrek tubülü izler. Böbrek tubülü birçok bölümden oluşur. Bunlar; proksimal kıvrıntılı tübül, proksimal düz tübül, ince (ara) parça, distal düz tübüller, distal kıvrıntılı tübüller, toplayıcı tübül ve kanallardır. Proksimal düz tübül, distal düz tübül ve ince parça Henle kulp' u olarak isimlendirilir. Toplayıcı tübül ise kortikal bölüm, dış ve iç medullar toplayıcı tübüller olarak üç bölüm içerir: henle Kulpu'nun kalın inen ve kalın çıkan kolları sırasıyla proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller, henle Kulpu'nun ince koluna bağlar. Toplayıcı kanallar ise nefronda meydana gelen idrarı toplayarak pelvise iletir (52,54).



Şekil 9 : Kortex –medulla –nefron (54)

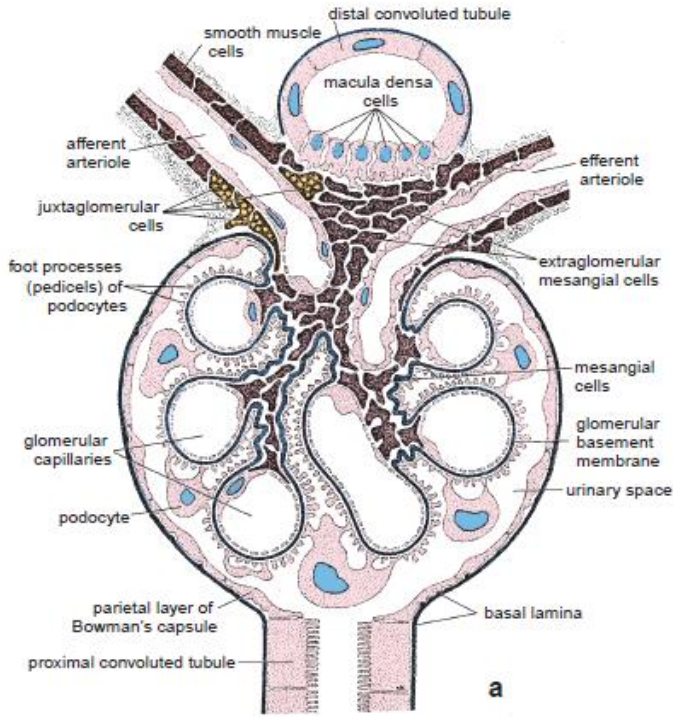
2.3.2. Böbrek Cisimciği ;

Böbrek cisimcikleri özel bir kapiller damar yumağı olan glomerüller ve glomerulleri saran çift katlı epitel örtüsü olan bowman kapsülü' nden oluşmaktadır. Kapsülün iç kısmına glomerül kapillerlerini örten visseral kat denir (paries internus). Böbrek cisimciğinin dış sınırını oluşturan dış kısım bağ dokusu stroma ile birliktedir ve pariyetal kat (paries externus) ismini alır. İki tabaka arasında, kapiller duvarından ve visseral kattan süzülen sıvının toplandığı glomerül boşluğu (idrar boşluğu, üriner boşluk, Bowman Boşluğu) bulunur (69,64).Böbrek cisimciğinde, getirici (afferent) arteriyollerin girip götürücü (efferent) arteriyollerin çıktığı bir damar kutbu (polus vascularis) ile

proksimal kıvrıntılı tübüllerin başladığı bir idrar kutbu (polus tubularis) bulunur. Afferent arteriyol böbrek cisimciğine girdikten sonra 2-5 ana dala ayrılır, kapiller ağı (rete capillare glomerulare) oluştur ve glomerüller şekillenir. Bowman kapsülünün pariyetal katmanı ince retiküler lif ağı ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitelden oluşur. Bu epitel idrar kutbunda tek katlı kübik ya da prizmatik epitele dönüşür. Visseral katman ise kapiller yumağı oluşturan tüm kapillerleri çevreleyerek dış yüzlerini örter. Visseral katman podosit olarak isimlendirilen, ileri derecede yassılaşmış olan uzantılı epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Sitoplazma ince olduğundan çekirdekleri glomerül boşluğuna doğru çıkıntı yapar. Podosit hücre sitoplazmasında bol miktarda serbest ribozomlar bulunur. Buna ek olarak belirgin golgi kompleksi, az sayıda mitokondriyon, granüllü endoplazmik retikulum tubulus, vezikül ve mikrofilamanlar kapsar. Podosit hücrelerinin gövdesinden birkaç birincil uzantı şekillenir ve bunlar kısa bir uzanımdan sonra pedisel olarak isimlendirilen çok sayıda ikincil uzantı oluşur. Pediseller glomerül kapillerlerini çevreler. Bol miktarda mikrotübül ve mikrofilaman içerirler, organelleri ise ya az sayıdadır ya da yoktur. Pediseller arasında 25 nm'lik sabit aralıkla, podosit ve kapiller endotel hücrelerinin bazal laminası ile doğrudan temas halindedir. Bazal laminayı kaplamak için içiçe geçerler ve bazal laminaya $\alpha 3\beta 1$ integrin ile tutunurlar. Podosit hücre gövdesi ve birincil uzantıları bazal lamina ile temas etmez. Bir podositten uzanan pediseller birden fazla kapillerlere kenetlenir. Pedisellerin sabit aralıkları süzülme (filtrasyon) yarıkları olarak adlandırılır. Podosit sitoplazmasında aktin filamanları bulunduğu için kasıldıklarında süzülme yarıklarını daraltıp genişletebilirler. Süzülme yarıkları 6 nm kalınlığındaki membranöz materyal olan, filtrasyon yarığı diyaframı ile birbirlerine bağlanır. Bu diyafram aktin filamanlarına CD2AP proteini ile tutunan nefrin proteininden oluşur. Nefrin hem bazal laminadan hem de endotel pencerelerinden moleküllerin geçişini geciktirir. Podositler, glomerüllerdeki pencereli endotel hücreleri ve bu yapıların ilişkili olduğu bazal lamina glomerüler süzme (filtrasyon) bariyerini oluşturur. Bariyerin görevi plazma ultrafiltratındaki moleküllerin geçişini denetlemektir. Denetimi sağlayan diğer etkenler ise boyut ve elektrik yüküdür. Pozitif yüklü ya da nötr olan ve 3,5 nm' den daha küçük olan moleküller, daha kolay süzülürken 3.6 nm boyutunda ve negatif yüklü albumin zor geçer (51,53,55). Kanı glomerulusa arteria kortikalis radiata'dır. A. Kortikalis radiata'dan arteriola afferensler çıkar. Arteriola aferentesler her bir böbrek cisimciğine ulaşan küçük

dallardır. Damar kutbundan böbrek cisimciğine giren arteriola afferentesler dallanırlar, birbirleriyle anastomoz yapmayan kıvrıntılı bir şekilde uzanan ve herbiri bir yumakçık oluşturan kapiller damarları oluştururlar ve bu damarlar diğer uçları ile yeniden birleşerek arteriola efferensi yaparlar. Normalde bir arter ve bir ven arasında olan kapiller dolaşım böbrekte normalden farklı olarak yapılanmıştır. Bu yapılanmaya plexus mirabilis denilmektedir. Böylelikle glomerül içi kan basıncının daha yüksek olması sağlanmaktadır. Filtrasyon ise kan basıncına bağlıdır. İdrar (ultrafiltrat) miktarı glomerüler kan basıncının yüksek olması ile artar. (51,52,53).

Glomerüler kapillerler oldukça genişirler ince bir endotel ile döşelidirler hücre sitoplazması incedir, organelleri çekirdek çevresinde yoğunlaşmıştır. Sitoplazmanın kenar bölümü pencerelidir ve pencereci kapillerlerin açıklıklarını kaplayan diyafram bulunmaz. Glomerül kapillerindeki pencereci endotel hücreleri ile dış yüzeylerini örten podositler arasında 320 nm genişliğinde kalın bir bazal membran bulunmaktadır. Bu membran idrar boşluğu ile kapillerdeki kanı birbirinden ayırır. Bazal membran podositlerin bazal laminası ve endotel hücrelerinin bazal laminasının kaynaşması sonucunda oluşur. Bazal lamina seçici bir filtre görevi görmektedir. Elektron mikroskopuyla incelendiğinde bazal membranda, lamina densa denilen elektron yoğun bir orta katman ve bu katmanın her iki yanında elektron geçirgen lamina rara bulunmaktadır. Lamina densa ağ şeklinde bir yapıdır ve yapısında negatif yüklü bir proteoglikan olan ve katyonik moleküllerin geçişini engelleyen heparan sülfat içeren bir matriks, Tip IV kollajen ve laminin bulunmaktadır. Fiziksel bir filtre görevi görmektedir. Lamina rara katmanında hücrele adezyonunda görev alan fibronektin bulunmaktadır. Anyonik bölgeler elektriksel engel oluştururlar bu nedenle seçici bir makromoleküler filtredir. Bazal laminadan büyüklükleri 10 nm'den daha büyük olan partiküller geçemez. Molekül ağırlığı albumin molekül ağırlığından (69 kDa) fazla olan negatif yüklü proteinler ise membrandan eser miktarda geçebilirler(44,46,53). Erişkin bir kişide her iki böbreğe gelen kan, dakikada 1,2-1,3 litredir. Bu da vücutta dolaşan tüm kanın her dört-beş dakikada bir böbrekten geçmesi anlamına gelmektedir. Glomerül süzüntüsü, kanın hidrostatik basıncına yanıt olarak oluşmaktadır. Bu basını dengeleyen, kolloidlerin oluşturduğu onkotik basınç ve Bowman kapsülü içindeki sıvıların hidrostatik basıncıdır. İdrar (ultrafiltratın) bileşimi kan plazmasına benzer ancak glomerül duvarından makromoleküller geçemediğinden dolayı hemen hemen hiç protein içermez (52,53)



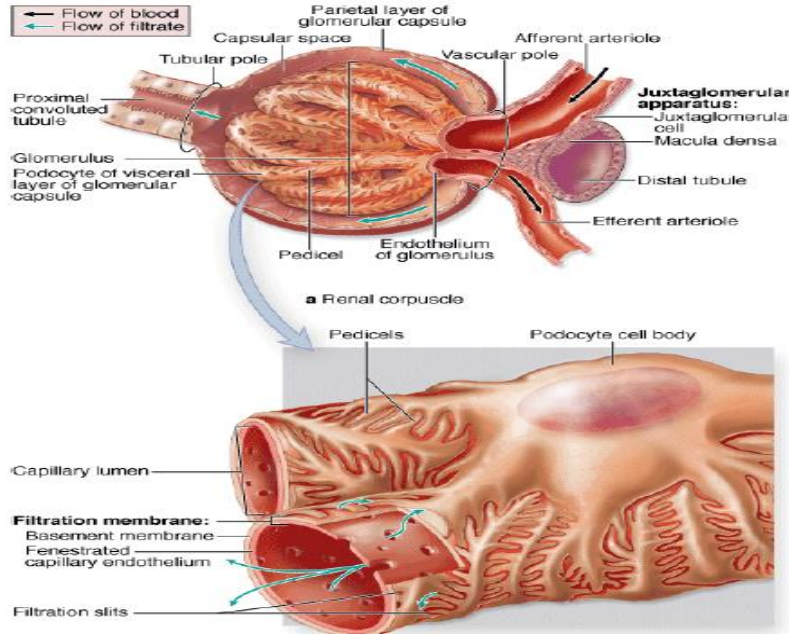
Şekil 10: Renal Korpuskül –maküla densa (54)

2.3.3. Glomerül;

Bowman kapsülü'nün visseral katını oluşturan **podositler** Pencereci endotel hücreleriyle döşeli ancak diyafram içermeyen **glomerüler kapillerler** Mezengiyal matrikse gömülü halde bulunan mezengiyal hücrelerin oluşturduğu **mezangiyum** olmak üzere üç bileşenden oluşmaktadır. Mezengiyum, glomerül içi (intraglomerüler) bir yapıdır. Glomerüler kapillerler arasında bulunan mezengiyal hücreler ve mezengiyal matriksten oluşur. Aynı zamanda mezengiyal hücreler, makula densa ile afferent ve efferent arteriyollerle sınırlandırılan glomerül dışı bir bölgede de toplanırlar. Bunlara ekstraglomerüler mezengiyal hücreler denilmektedir. İntraglomerüler mezangiyal hücreler, ekstraglomerüler mezangiyal hücrelerle devam edebilirler (51,52,54). İntraglomerüler mezangiyal hücreler, makrofajlar ve düz kas hücrelerinin özelliklerine sahip özelleşmiş perisitlerdir. Bazal membranı desteklerler. Fagositik işlevleri sayesinde bazal membran bileşenlerinin korunmasına yardım ederler.

Bu hücreler; kasılma, fagositöz yapma, çoğalabilme, matriks ve kollajen lif sentezleme, prostaglandinler ve endotelinler gibi biyolojik olarak aktif maddeleri salgılama yeteneğine sahiptirler. Endotelinler, afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin kasılmasını

uyarır. Mezengiyal hücreler, glomerüler süzme sürecine katılırlar ve bu süreçte; kasılabilme özellikleri ile kan akışını düzenlerler, prostaglandin ve endotelinleri salgırlar, glomerüler kapiller için mekanik destek sağlarlar, fagositik özellikleri sayesinde glomerüler bazal lamina gereçlerinin dönüşümünü denetlerler ayrıca anjiyotensin II' ye yanıt vererek glomerül içerisindeki kan akımını azaltırlar (44,52,55). Glomerüler süzücü membranın her bölgesi kapillerle çevrelenmez. Süzme bariyerini geçemeyen komplement moleküller, immünoglobulinler mezengiyal matrikse girebilirler. Matrikste biriken immünoglobulin bileşikler mezangiyal hücrelerce glomerülusun tıkanmasına neden olan immün yanıt tetikleyici sitokinlerin üretimini artırır.



Şekil 11: Glomerul –filtrasyon membranı (46)

2.3.4. Böbrek tübülü

a) Proksimal kıvrıntılı tübül: (Tubulus contortus proximalis, Pars kontorta) Kortekste bulunur. Böbrek cisimciğinin idrar kutbunda, pariyetal yaprağın tekkatlı yassı epiteli

proksimal kıvrıntılı tübül epiteli olan tek katlı kübik ya da prizmatik epitel ile devam eder. Epitelin boyu lümendeki idrarın gerginlik derecesine ve hücrelerin işlev durumuna göre değişebilmektedir. Proksimal kıvrıntılı tübül distal kıvrıntılı tübüllere karşı daha uzun olduğundan böbrek cisimciklerinin çevresinde daha sık görülür. Tübül epitel hücreleri çok sayıda mitokondriyon içerdiğinden dolayı sitoplazma asidofiliktir. Hücrelerin apikal yüzünde çok sayıda ki mikrovilluslar bulunur, fırçası kenar oluştururlar. Mikrovillusların tabanları arasında bulunana çok sayıda kanalcık makromoleküllerin emiliminde görev alır. Tübül lümeni genelde dardır. Lümen yıldız şeklinde kıvrıntılı ya da uzundur ve lümeni çevreleyen 5-6 epitel hücresi birbirlerine interdigitasyonlarla tutunmuşlardır. Hücrelerin apikal sitoplazmasında uç zarlar içe doğru girinti yaparlar ve pinositotik vezikülleri oluşturur. Bu veziküllerin içinde glomerüler süzgeçten geçen makromoleküller bulunur. Makromoleküller lizozomlarda parçalanarak pinositotik vezikülleriyle kaynaşırlar ve oluşan monomerler dolaşıma geri döner. Golgi kompleksi çekirdeğin üst ve yan kısmında yerleşiktir. Hücre çekirdeği yuvarlak şekillidir ve merkeze yakın durur(51,53).

Proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde mitokondriyonlar iyi gelişmiştir ve çok sayıdadırlar. Bazal sitoplazmada bazal hücre zarına dik olarak birbirine paralel sıralanmış uzun mitokondriyonlar bölgenin ince çizgili görünmesine neden olurlar. Bazolateral zarlarda bulunan Na^+/K^+ ATPaz (sodyum potasyum pompası) Na^+ iyonlarının aktif olarak hücre dışına atılmasını sağlar. Elektron mikroskop ile incelendiğinde bazal hücre zarının sitoplazma içine doğru katlantılar yaptığı görülür. Bu katlantılar intrasitoplazmik membranlar olarak adlandırılır. Bu membranlar anastomoz yaparak, bazal sitoplazmayı içerisinde mitokondriyonlar bulunan bölmelere ayırırlar. Bölmeler ve mitokondriyonlar işlevsel birim oluştururlar. Bu düzenlenme ile hücrenin tabanında yüzey alanının artırılması sağlanır (44,46,48,55)

Proksimal kıvrıntılı tübülden; idrar boşluğundaki plazma ultrafiltratı, su, glukoz ve aminoasitlerin tamamı, sodyum klorürün (NaCl) %85' i, kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) emilir. Üre ve glukoz, taşıyıcı bir protein ile hücre zarını geçerken su osmozis ile pasif olarak sıkı bağlantılar arasından yan hücrelerarası boşluğa iletilir. Süzüntüdeki glikoz miktarı proksimal tübülün emme yeteneğini aştığı durumda idrar miktarı artar ve idrar glikoz içerir. Ek olarak, proksimal kıvrıntılı tübüller paraaminohippurik asit, penisilin gibi vücuda yabancı maddeleri ve kreatinin gibi maddeleri idrara geçirirler.

Bu maddelerin salgılanma hızlarının incelenmesi, böbrek işlevinin klinik yönden değerlendirilmesinde önemlidir. Geri emilen maddenin önce hücrelerarası ortama oradan da peritübüler kapiller ağına girişi, bölme ve mitokondriyonlarca oluşturulan işlevsel birim sayesinde gerçekleşir. Proksimal kıvrıntılı tübüller emilim işlevine uygun olarak bazı yapısal özellikler içermektedir. Bunlar; apikal kısımda iyi gelişmiş fırçamsı kenar, apikal tübüloveziküller ve lizozomlar, yoğun hücre zarı kıvrımları ve interdigitasyonları içeren bir bazolateral bölge ve hücre zarı kıvrımları arasına yerleşik uzun mitokondriyonların varlığıdır (44,46,52,54).

b) Proksimal düz tübül (Tubulus rectus proximalis, Pars rekta) : Medullar uzantılar içinde ve dış meduller bölgede bulunurlar. Henle kulpu' nun inen kolunun başlangıç bölgesidirler. Proksimal kıvrıntılı tübüle kıyasla lümenleri daha geniştir. Lümeni çevreleyen epitel hücreleri kübik şekillidir apikal yüzlerindeki mikrovilluslar seyrelmiştir. Bazal kısımlarındaki intrastoplazmik membranlar neredeyse kaybolmuştur. Bu bölgedeki mitokondriyonlar az sayıda ve yuvarlak şekillidirler (51,54).

c) İnce parça (ara parça): İnce parça, proksimal düz tübülü izler ve çapı diğer tübüllere göre daha dardır. Henle bölümü oluşturur. Böbreğin medulla tabakasında bulunur. Lümeni geniş ve tek katlı yassı epitel ile döşelidir. Epitel hücre sitoplazması çok incedir ve çekirdek içeren kısım lümeneye doğru kabarmıştır. Hücrelerde apikal yüzde kısa, düzensiz yerleşimli mikrovilluslar bulunur. Mitokondriyonlar az sayıda ve yuvarlak şekillidir. Bazal intrastoplazmik membran içermez (44,51,52).

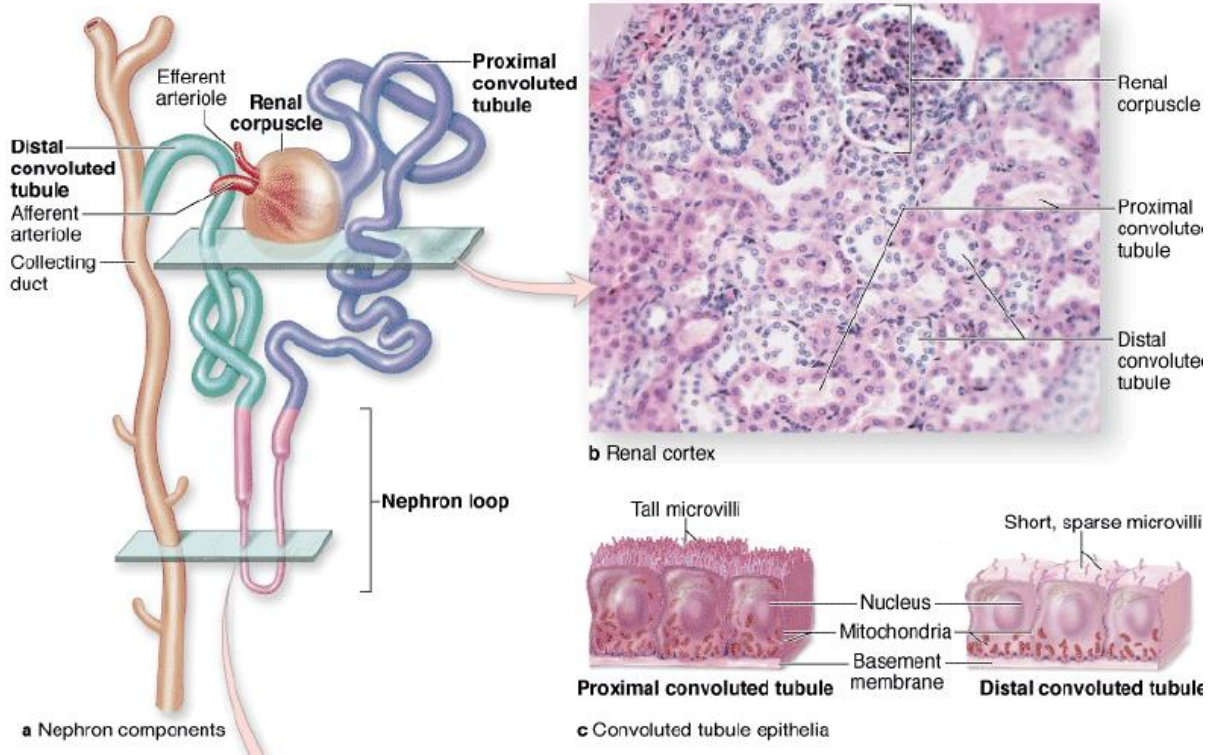
d) Distal düz tübüller (Tubulus rectus distalis, Pars rekta): Henle kulpu' nun çıkan kolunu oluşturur. Dış medullar bölge ve medullar uzantılarda bulunur. Lümeni tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Apikal sitoplazmada bol miktarda vezikül ve yuvarlak mitokondriyonlar vardır. Fırçamsı kenar içermez. Seyrek diziliimli küçük mikrovilluslar bulunur. Bazal intrastoplazmik membran ve mitokondriyonlar ise belirgindir (51,54).

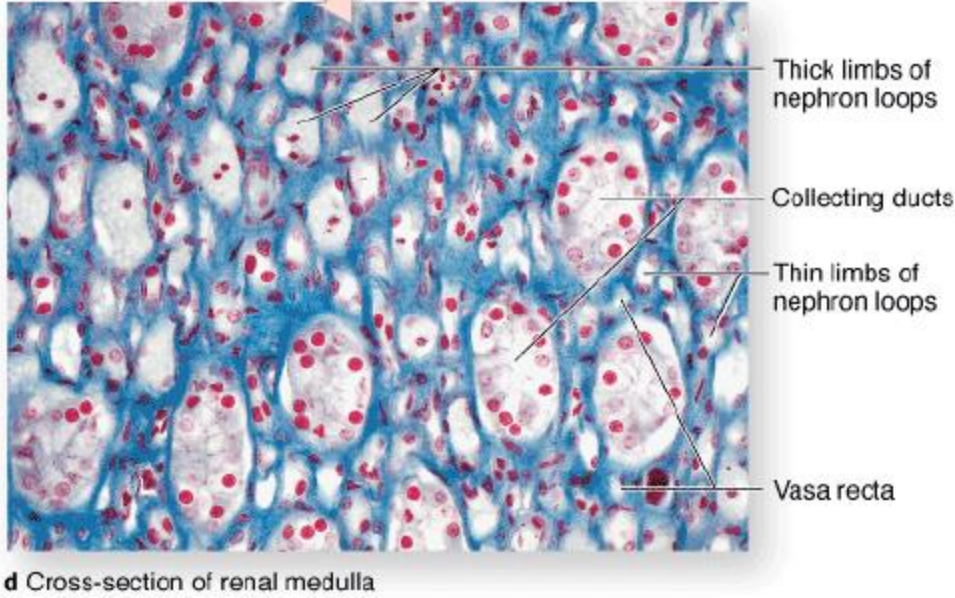
e) Distal kıvrıntılı tübül (Tubulus contortus distalis, Pars kontorta): Henle kulpu' nun çıkan kalın kolu korteks katmanına girer, belli bir yolu kat eder, kıvrımlar oluşturur ve tek katlı kübik epitel ile döşeli distal kıvrıntılı tübül oluşur. Proksimal tübüle göre daha kısa ve az kıvrıntılıdır. Lümeni düzgün ve geniştir. Distal ve proksimal kıvrıntılı tübüller kortekste bulunurlar ancak distal kıvrıntılı tübüller apikal yüzlerinde fırçamsı kenar ve apikal kanal

içermezler aynı zamanda apikal veziküller azdır. Hücreleri daha küçüktürler ve açık renk boyanırlar. Distal tübül hücreleri proksimal tübül hücrelerine göre daha küçük ve düzdür bu nedenle distal tübülde daha fazla sayıda çekirdek görülür. Distal kıvrıntılı tübül hücreleri iyon geçişinde görev aldıklarından daha ince intrasitoplazmik membranlara ve bunlara eşlik eden iyi gelişmiş, paralel dizilimli mitokondriyonlara sahiptirler (51,54,55). Distal kıvrıntılı tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait böbrek cisimciğinin damar kutbuna temas eder. Bu bölgede distal tübül ve afferent arteriyol yapısal olarak farklılaşır. Distal kıvrımlı tübül epitel hücreleri sık olarak dizilen dar ve yüksek boylu hücrelerden oluşan prizmatik epitele dönüşür ve çekirdekleri bir araya toplanır. Bu kısım hücrelerin yüksekliği ve çok sayıda hücre çekirdeği olması nedeniyle lümene çıkıntı yapan yoğun bir plak oluşturur. Golgi kompleksi hücrenin bazal bölümünde yerleşiktir. Hücre çekirdeklerinin yakın yerleşimi nedeniyle daha koyu görünen bu distal tübül segmenti “makula densa” olarak isimlendirilir. Makula densa hücreleri tübül içi sıvıda klorür iyon (Cl^-) içeriğine ve su hacmine duyarlıdır. Makula densa hücreleri dolaşıma renin salgılanmasını başlatan moleküler sinyaller üretirler (51,52). Distal kıvrıntılı tübüllerde aldosteron yüksek olduğunda sodyum iyonu (Na^+) emilir ve potasyum iyonları (K^+) dışarı verilir. Bu sayede vücudun toplam tuz ve su içeriği düzenlenir. İdrara hidrojen ve amonyum iyon sekresyonu distal tübülde gerçekleşmektedir. Bu sayede kandaki asit-baz dengesinin korunması sağlanır (52,53).

Toplayıcı tübül ve kanallar: Distal kıvrıntılı tübüller toplayıcı tübüllere açılırlar, bunlar daha büyük ve düz şekilli toplayıcı kanallara açılırlar. Bu kanallar Bertini papiller kanalla kanalları olarak isimlendirilir ve medulla piramitlerinin uçlarına doğru gittikçe genişlerler. Küçük toplayıcı tübüller, yaklaşık 40 μm çapındadır kübik epitel hücreleri ile döşelidirler. Medullanın derinliklerine indikçe toplayıcı tübül hücrelerinin boyları uzar ve çapları 200 μm ’ ye varan prizmatik epitel hücreleri bulunur. Medulla piramitlerinin ucuna yakın toplayıcı kanalların çapı artar, dar açılar oluşturarak birleşip duktus papillarisleri oluştururlar. Bu yapılar da kalikslere ve pelvis renalise açılır. Toplayıcı tübül ve kanal hücreleri açık renk boyanırlar. Sitoplazmalarında organelleri azdır(52,54,55). Toplayıcı tübüllerde esas hücreler ve interkalat hücreler olmak üzere iki hücre tipi bulunmaktadır. Esas hücrelerin organel içeriği az olduğundan sitoplazmaları daha soluktur. Çekirdekleri oval ve merkezi yerleşimlidir. Mikrovillusları seyrek, az sayıda katlantı ve

mitokondriyon içeren bazolateral yüzü vardır. Na^+ ve suyu geri emerler ve Na-K ATPaz pompasına bağımlı durumdaki K^+ u salgırlarlar. İnterkalat hücreler H^+ iyonu ya da HCO_3^- ı salgırlarlar. Asit-baz dengesinin önemli düzenleyicileridir. Bu hücreler daha fazla organelle sahiptirler ve yoğun sitoplazmalıdır. Esas hücrelere göre daha az sayıdadırlar. Apikal hücre zarında küçük mikropalakalar, apikal kısımda 50-200 nm çapında çok sayıda vezikül ve oldukça fazla mitokondriyon içerirler. Çekirdekleri yuvarlak ve merkezi yerleşimlidir (44,55).





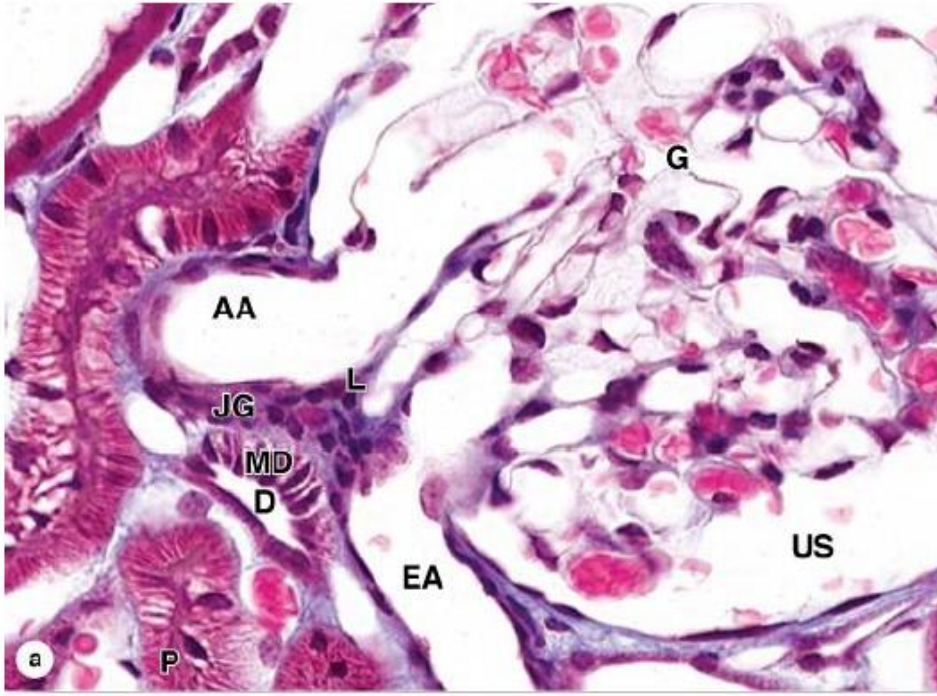
Şekil 12: Nefron –kortex-kıvrıntılı tubül-medulla (46)

2.3.5. Jukstaglomerüler aparat

Böbrek cisimciğinin hemen bitişiğinde, afferent arteriyolün tunika mediasında değişmiş düz kas hücreleri bulunmaktadır. Bu hücelere jukstaglomerüler (JG) hücreler adı verilir. Bu hücrelerin bulunduğu yerde afferent arteriyolün membrana elastika internası görülmez. JG hücrelerin çekirdekleri oval şekillidir. Sitoplazmalarında PAS (+) boyanan salgı granülleri bulunur renin salgırlarlar. Renin kan basıncının korunmasında işlevsel bir enzimdir. Distal kıvrıntılı tübüllerde bulunan makula densa, JG hücrelerin bulunduğu afferent arteriyole yakındır. Jukstaglomerüler hücreler makula densa ile birlikte jukstaglomerüler aparatı oluşturur. Jukstaglomerüler aparatta ayrıca açık renk sitoplazmalı ve glomerül dışı mezengiyal hücreler (Lacis hücreleri ya da Polkissen hücreleri) olarak adlandırılan hücreler bulunur. JG hücrelerin sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bol miktarda gelişkin granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve 10-40 nm çaplı renin içeren salgı granülleri bulunur (44,51,52,53).

JG hücrelerce salgılanan renin, karaciğerde üretilen bir plazma proteini olan Anjiyotensinojeni inaktif dekaeptit olan Anjiyotensin I' e dönüştürür. AnjiyotensinI, akciğer endotel hücrelerinde yüksek yoğunlukta bulunan dönüştürücü bir Enzim olan

(ACE) etkisiyle, iki aminoasitini yitirerek etkin vazopresif bir oktapeptit olan Anjiyotensin II' ye dönüşür. Anjiyotensin II arteriyolları daraltılır ve aldosteron salgısı artarak kan basıncının düşmemesi sağlanır. Aldosteron böbrek tübül hücrelerini etkileyerek sodyum ve klor iyonlarının geri emilimini artırır. Böylece sıvı hacmi artar ve kan basıncı yükselerek hipotansiyon düzenlenir (44,46,52).



Şekil 13:Juksta glomeruler aparat (46)

2.3.6. Böbrek ara dokusu (intersitisyum)

İnteristisyum korteks ve medulla tabakalarında idrar tübülleriyle kan ve lenf damarları arasındaki boşlukları doldurur. Bu bölgelerde özelleşmiş intersitisyel hücreler vardır. Kortekste kan damarlarının çevresinde izlenirler. Medullada daha yoğunurlar. Medulladaki hücreler tübül eksenine paralel yerleşmişlerdir ara madde ve prostoglandin üretirler (51,54).

2.4. Böbrek Fizyolojisi

Böbreklerin görevi vücudu, hem dışarıdan alınan hem de içeride metabolizma sonucu oluşan atıklardan arındırmaktır. Bu işlevini gerçekleştirirken iç ortam kimyasal bileşenlerini denetleyerek homeostazisi sağlar (56). Başlıca aktif ve pasif emilim, filtrasyon ve salgılama gibi bir dizi işlem aracılığıyla vücut sıvılarının bileşim ve hacmini

denetlerler. Vücuda alınan ve vücutta açığa çıkan su ve elektrolit miktarları arasındaki denge, önemli ölçüde böbrekler tarafından sağlanır. Böbreğin en önemli görevi filtrasyondur. Vücudun gereksinimine göre maddeleri filtrat ile değişik hızda uzaklaştırır. Filtrasyon, kan plazması ultrafiltratının süzülmesiyle gerçekleşir. Nefronun tübül kısımlarından özellikle proksimal kıvrımlı tübüller, filtrat içindeki vücut için yararlı olan maddeleri geri alırlar. Bu şekilde iç ortamdaki homeostazisin sürekliliğini sağlamış olur. Ayrıca böbrekler uzun süreli açlıkta, glukoneogenez de yaparak kan glukoz düzeyine katkıda bulunmaktadır (56,57).

2.4.1. Böbrek Fonksiyonları

Böbreğin temel görevleri;

- 1- Metabolik atık ürünlerin (ürik asit, kreatinin, üre) atılımı
- 2- Vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması ve sürdürülmesi
- 3- Hücreler arası sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
- 4- Toksinler, ilaçlar ve metabolitlerinin atılımı ve detoksifikasyonu
- 5- Hormon sentezine ve metabolizmasına katkıda bulunma
- 6- Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımı
- 7- Metabolik etki: Glukoneogenez, lipid metabolizması
- 8- İnsülin ve glukagon hormonlarının yıkımı (56).

2.4.2. Metabolik Atık Ürünlerinin Atılımı

Protein metabolizması sonucu oluşan ürik asit üre ve kreatinin böbrekler yolu ile vücuttan uzaklaştırılır. Karaciğerdeki üre oluşumu aminoasit deaminasyonu sonucunda oluşan amonyağın kanda toksik seviyelere ulaşmasını engellenmektedir. Karaciğerde fazla miktarda aminoasit katalizlendiğinde üre oluşumu ve kan üre azotu (BUN) düzeyleri artmaktadır. Oluşan ürenin %40-50 kadarı proksimal tübüllerde geri emilmektedir. Kreatinin ise iskelet kasında kreatinden enzimatik olmayan dehidrasyon yolu ile oluşur. Glomerüllerden serbestçe filtre olan kreatinin tübüllerden geri emilmemektedir (56). Böbrekte kronik veya akut yetmezlik olduğu zaman vücutta nitrojen metabolizmasının son ürünleri birikir ve protein kaynaklı olmayan nitrojenlerin düzeyi yükselir. Bu durumda BUN ve serum kreatinin düzeylerinde yükselmeye neden olur. Nitrojen ürünlerin birikimi sonucunda azotemi gelişir. Bu durum ise böbreklerin metabolizma artıklarını atabilme yeteneğini kaybettiği üremi ile sonuçlanır (57).

2.5. Nefrotoksisite

Böbrekler özellikle metabolik aktivitenin fazla olması, zararlı maddelerin vücuttan uzaklaştırılması ve aktif transport fonksiyonlarından dolayı birçok ilaç ve toksik madde için hedef organ durumundadır (60,61,62).

Nefrotoksisite nefrotoksik renal yetmezlik, akut glomerulonefritis, intersitisyel nefritis, nefrotik sendrom ve aşağı nefron nefrozisi olarak tanımlanmaktadır. Nefrotoksisitede başlıca tubuler nekroz şekillendiğinden Akut tübüler nekroz (ATN) olarak da tanımlanmaktadır. ATN iskemik ve Nefrotoksik ATN olmak üzere ikiye ayrılır(60,63,64). İlaça bağlı gelişen nefrotoksisite sırasında meydana gelen değişiklikler (renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik) ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklanmaktadır (65,66). İlaça bağlı toksisite, ATN, intersitisyel nefritis ya da glomerülonefritis şeklinde oluşabilmektedir (60,67). Alınan önlemlere rağmen, hastaların % 20'sinden fazlasında ilaç toksisitesi Akut böbrek yetmezliği (ABY) ile sonuçlanmaktadır (68,69,70)

2.6. Böbrek Yetmezliği

Böbrekler çeşitli nedenlerden dolayı fonksiyonlarını kaybedebilirler. Böbreklerin fonksiyonlarının kaybı sonucunda, metabolik atık maddeler vücutta birikir, vücuttan sıvı atılımı azalır, vücut sıvılarında çözünmüş olan maddelerin konsantrasyonları değişir endokrin ve metabolik fonksiyonların kaybına bağlı hastalıklar meydana gelir. Nefronlar, öncelikle glomerül veya tübül ya da her ikisine birden zarar veren toksik, anoksik veya immunolojik yaralanmalar sonucu kaybedilirler. Böbreklerin yaralanmaya yanıt olarak işlevsel kapasitelerini artırma yetenekleri bulunmaktadır. Bu nedenle böbreğin işlevsel kütlelerinde önemli miktardaki azalma (% 50-60) belirgin bir biyokimyasal değişim ya da önemli bir belirti açığa çıkmadan gerçekleşebilir. İşlevsel değişimlerin en duyarlı ve özgül belirteci GFR ölçümüdür (58,72). GFR'nin 80 ml/dakikanın altına inmesi böbrek yetmezliği olarak tanımlanır. Bu fonksiyon kaybı geri dönüşümlü özellikte ise akut böbrek yetmezliği (ABY), geri dönüşümsüz ve ilerleyici özellikte ise kronik böbrek yetmezliği (KBY) olarak isimlendirilir (72).

2.6.1. Akut böbrek yetmezliği

ABY, GFR’de ani azalma ve azotlu atık madde retansiyonu ile karakterize edilen bir hastalıktır ve genellikle geri dönüşümlüdür. ABY, sıklıkla iskemik veya nefrotoksik olaylar sonucunda, yaygın olarak hastane ortamında oluşan bir hastalıktır. ABY hızlı gelişir ve bu nedenle kontrol edilmesi zor olan hızlı bir sıvı, asit-baz ve elektrolit dengesizliği ortaya çıkar ve ölüm oranı yüksektir. ABY’de GFR düşüşü KBY’ye göre oldukça hızlıdır günler ve haftalar içinde gelişir. ABY hasarın olduğu yere bağlı olarak prerenal, renal ve postrenal olmak üzere üç ana kategoriye ayrılır (1,73,74). Akut böbrek yetmezliği tanısı konulduktan sonra prerenal, renal, postrenal ayrımı yapılması gerek (75,76).

2.6.2. Kronik böbrek yetmezliği

KBY, çeşitli hastalıklara bağlı olarak nefronların ilerleyici ve düzelmesi mümkün olmayan kaybı ile karakterize bir hastalıktır. GFR, genellikle aylar veya yıllar içinde giderek azalır. Bu azalma temelde yatan nedene göre büyük değişkenlik göstermektedir. Böbrek yetmezliği olan bir kişide; üç ay veya daha uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbrekler kronik hastalığın göstergesidir. Bu özellikler KBY’yi ABY’den ayırt etmede kullanılmaktadır (77).

2.6.3. İlaça bağlı akut böbrek yetmezliği

Böbrekler, fazla miktarda kanlanmaları, endoteliyal yüzey genişliği ve metabolik faaliyetleri sebebiyle toksik hasarlara karşı çok duyarlıdır. Nefrotoksik etkiye sahip olan çeşitli ilaçların konsantre edilme durumları böbrek tübüllerinde sağlandığı için tübüllerin lümenleri ve peritübüller hücreler bu toksinlere daima maruz kalırlar. Böbrek papilları ve medullasında kan akımının düşük, çözünen madde konsantrasyonun yüksek olmasından dolayı toksisiteye karşı daha hassastırlar (78). Geçmişte akut böbrek yetmezliğine neden olan faktörler arasında organik çözücüler, ağır metaller ve glikoller ilk sıralarda yer alırken, günümüzde bu ajanlar ile daha nadir karşılaşılmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda aminoglikozit antibiyotiklerin, akut böbrek yetmezliğine yol açan maddeler içinde ön sırayı aldığı gösterilmiştir (3).

2.7. Aminoglikozit ve Gentamisin

2.7.1 Aminoglikozidler

İlk kez 1944 yılında *Streptomyces griseus*'tan streptomisin izole edilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sonra sırasıyla diğer *Streptomyces* türlerinden neomisin, kanamisin, paromamisin, tobramisin ayrılmış, bu arada *Micromonospora purpurea*'den gentamisin elde edilmiştir. 1972 yılında amikasin kanamisinden, daha sonra sisomisin, netilmisin ve son olarak da isepamisin gentamisinden sentetik olarak elde edilmiştir(79).

Tüm aminoglikozidler 6 üyeli aminosiklitol halkasından oluşurlar. Aminosiklitol halkasına şekerler glikozidik bağlarla bağlıdır. Ancak spektinomisin aminoşeker ve glikozidik bağ içermemesi ile diğer aminoglikozidlerden ayrılır. Aminoglikozitler suda çözülürken, organik çözücülerde çözünmezler, çok az lipofiliktir, bu nedenle yağ içeren zarlardan geçişleri sınırlıdır. Aminoglikozitlerin moleküler ağırlıkları 445 ve 600 dalton arasında değişmektedir. Moleküler yapıları, dondurulmaya ve 4 saat süre ile 100°C de ısıtılmaya dayanıklıdır. Ph 7,4 değerinde katyoniktirler ve oldukça yüksek pozitif yükleri vardır. Bu aynı zamanda antimikrobiyal aktivite ve toksisitesi ile de yakından ilişkilidir. Antimikrobiyal aktivite alkali pH'da artarken, asidik pH'da azalır(.80,81) Aminoglikozidler kimyasal yapılarına göre beş gruba ayrılır (82):

1. Streptomisin ailesi; streptomisin
2. Kanamisin ailesi; kanamisin A, kanamisin B, amikasin, tobramisin, dibekasin
3. Gentamisin ailesi; gentamisin C1, gentamisin C1a, gentamisin C2, sisomisin, nedimisin, isepamisin
4. Neomisin ailesi; neomisin, paromomisin
5. Spektinomisin ailesi; spektinomisin

2.7.2 Farmakokinetik Özellikleri

Aminoglikozidlerin farmakokinetikleri benzerdir. Proteine düşük oranda bağlanırlar bu nedenle hücrenin dış yüzeyi ile iyonik etkileşim halindedirler.

Aminoglikozidler bakteri hücre membranını aktif transportla geçerler. Aktif transport için oksijen gerektiği için anaerob bakteriler üzerine etkisizlerdir. Aminoglikozidlerin aktif taşıma ile hücre içinde hücre dışından dahayüksek konsantrasyona ulaşırlar bakterisidal etkinliklerinin sebebi özelliklerine bağlanmaktadır. Gram negatif bakteri hücre duvarında bulunan lipopolisakkaridlere, fosfolipidlerin polar

başlarına ve dış membran proteinlerine bağlanmak suretiyle, yarışmalı olarak Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarını harekete geçirip hücre duvarının normal geçirgenlik fonksiyonu bozarak etki ederler. Hücre zarını geçmiş olan aminoglikozid artık sitoplazma içinde irreversibl olarak kalır. Aminoglikozidler polar yapıları nedeniyle çok az lipofilik özellikte olduğundan sindirim kanalından absorpsiyonları oldukça azdır. Aminoglikozidler kan-beyin, beyinomurilik sıvısı (BOS), kan-göz bariyerini çok az geçerler(79,80,82,83)

Molekül büyüklükleri nedeniyle, polikasyonik yükleri ve lipid içinde çözünemediklerinden dolayı aminoglikozidlerin hücre içine girişleri zordur. Ancak renal tübüler hücrelere ve iç kulak hücrelerine özel bir mekanizma ile girebilirler böylelikle nefrotoksik ve ototoksik etkilerini gösterirler. Aminoglikozidler vücutta metabolize edilmezler, parenteral olarak uygulandıktan sonra % 99'u değişmeden böbrekler aracılığıyla atılmaktadır. İdrardaki yarı ömrü 48-200 saattir. Tedavi kesildikten sonra 20 gün sonra ve hatta daha uzun süreyle idrarda düşük seviyede ilaç saptanabilir (80,82,83)

2.7.3. Aminoglikozidin Yan Etkileri

Aminoglikozidlerin güvenlik aralıkları çok dardır ve kullanımlarındaki en önemli kısıtlayıcı özellik toksisitelerdir. Nefrotoksik, ototoksik ve nörotoksik (nöromuskuler blokaj) etkileri ile en sık karşılaşılmaktadır. Böbrek korteksinde ve proksimal tubüluslarda reversibl akut tubüler nekroza benzer tablo oluşturmaktadır. Aminoglikozidler renal vazokonstrüksiyona neden olurlar ayrıca proksimal tubülde direkt hücresel toksisite yaparlar. Böylelikle tubüler nekroz, tubüler atrofi, intratubüler myeloid cisimler ve interstisyel nefrit geliştirebilirler. Neomisin, kanamisin, gentamisinin nefrotoksik etkileri en fazla iken streptomisin ile nefrotoksik etki en az görülmektedir.

2.7.4. Gentamisin

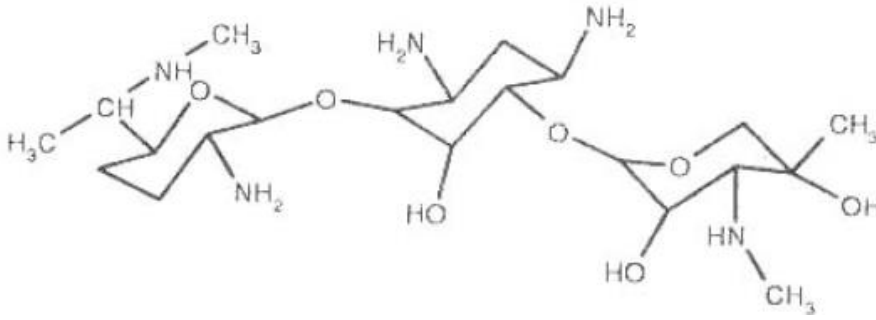
Gentamisin, Micromonospora purpurea'dan elde edilen aminoglikozid antibiyotiktir. Gerçekte yapıca birbirine çok benzeyen üç GM türünün (GM C1, C1a ve C2) karışımından ibarettir. Aminoglikozidler içerisinde, amikasinin spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek olan gentamisindir. Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz (85).

GM genellikle genellikle hayatı tehdit edici Gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan geniş spekturumlu aminoglikozid antibiyotiktir.

Kimyasal stabiliteleri ve hızlı bakterisidal etkilerinden ötürü çeşitli klinik durumlarda ilk basamak ilaç olarak sıklıkla kullanılmaktadırlar (4,7,8).

Ancak bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonları nefrotoksiktir ve akut böbrek yetmezliği olan olguların yaklaşık %10-20'sinden sorumludur(4,7,9,10). Bazı durumlarda, bu yan etki çok şiddetli olursa ilacın kullanımının bırakılması gerekebilir. Nefrotoksisitenin bu etkileri aminoglikozidlerle 7 günden daha fazla tedavi edilen hastaların %30 unda ortaya çıkmaktadır (4,8). Toksisitesinin fazlalığı ve terapötik indeksinin düşük olmasından dolayı böbrek yetmezliği olan hastalarda dozunun ayarlanması ve serumdaki düzeyinin izlenmesi gerekir (4).

Daha yeni ajanlardan olan üçüncü kuşak sefalosporinler ve azitronam, aminoglikozidler gibi terapötik ve ucuz olmasına, nefrotoksisiteyle çok bağlantılı olmamasına karşın aminoglikozidler hala geniş çapta kullanılan antimikrobiyal ajanların arasında yer almaya devam etmektedirler. Bu, onların hızlı sonuç vericiliği, farmakolojik, toksik ve terapötik özelliklerinin diğer yeni ajanların özelliklerine göre çok daha iyi bilinmesinden kaynaklanmaktadır.(86).



Şekil 14: GM kimyasal yapısı (86)

2.7.3 Gentamisinin kimyasal yapısı

GM ve diğer aminoglikozidler, çok katyonlu ve polardırlar. Gastrointestinal sistemde emilmezler fakat im. veya sc. enjeksiyondan sonra hızlıca emilim gösterirler. Ayrıca intravenöz veya intratekal olarak da verilebilirler. Plazma proteinlerine bağlanma minimaldir (85,4). GM plasentadan geçebilir fakat kan-beyin bariyerinden geçemez veya göze penetre olmaz. Doku düzeyleri renal korteks dışında küçüktür. Plazmanın yarı ömrü 2-3 saattir. Atılımı hemen hemen bütünüyle böbrekteki glomeruler filtrasyon ile olmaktadır (4).

Aminoglikozidlerin toksisitesinin metabolitleri aracılığı ile olduğu ileri sürülmüş ancak Sanders ve ark. (87)'nin yaptığı çalışmada GM öncesi ilacın metabolizma inhibitörünü kullanmış ve bunun GM nefrotoksitesini etkilemediğini göstermişlerdir. Bu da toksisitenin bir metabolitin değil ilacın kendisine bağlı bir belirti olduğunu gösterir (89).

2.7.4 Patoloji ve patofizyolojisi

GM verildikten sonra glomerülden süzülür ve süzülen ilacın sadece %2-5 gibi küçük bir kısmı bağlanır ve aktif olarak proksimal tübül hücrelerine taşınır. İlaç, proksimal tübül hücrelerine apikal fırçamsı yüz ve bazolateral yüzlerden endositoz yolu ile alınarak lizozomlarda birikir. Fırçamsı kenar transportu nefrotoksiste için daha önemlidir çünkü mitokondri ve mikrozomlar gibi anahtar organellerdeki kritik bölgelere ilacın maruz kalmasını sağlar (89). Ancak tübüldeki antibiyotik konsantrasyonu her zaman nefrotoksiste ile paralellik göstermez. GM, glomerülden filtre olduktan sonra, proksimal tübül hücrelerine bu hücrelerde bulunan megalin reseptörüne bağlanarak geçer ve özellikle proksimal tübülün daha çok kıvrımlı bölümünü içeren S1 ve S2 kısımlarında birikerek toksik etkisini gösterir. (4,10,90). İlacın proksimal tübülden geri emilim mekanizmasının L-lizin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir Bu yüzden GM ve L-lizin böbrek proksimal tübül hücrelerinin apikal membranında lokalize olmuş özel bir geri emilim mekanizmasını paylaşırlar (91).

GM verildikten sonra lizozomlarda oluşan birikim lizozomal fosfolipidozise neden olup morfolojik olarak sıkıca yapışmış iki tabakadan organize olmuş ozmiofilik bir materyal şeklinde “myeloid cisim” olarak isimlendirilir. Bazolateral membran katlantılarında azalma, fırçamsı kenarda mikrovillus kaybı ortaya çıkan ultrastrüktürel

değişikliklerdir (92). Diğer görülen değişiklikler de bazal membran erozyonları, proksimal tübül hücre şişkinliği ve fırçamsı kenar kayıpları, tübüler atrofi veya dilatasyon, interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonlarıdır (11). GM'nin genellikle proksimal tübül işlevine olumsuz etkileri olduğu kabul edilmesine rağmen Henle kulbunun kalın çıkan kolunda kısmen transportun azalmasına bağlı olarak idrar ve elektrolit atılımının arttığına dair veriler bulunmaktadır. Yine GM verilmesi ile kortikal distal tübüllerde de hasar, rejenerasyon ve apoptozis ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (4).

2.7.5 Gentamisin Nefrotoksisitesinin Mekanizmaları

GM nefrotoksisitesinin olası mekanizması(ları)nı aydınlatmak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Bazı ileri sürülen mekanizmaları şunlardır:

1. Hidroksiradikaller. Hydroxyradikaller doku hasarında güçlü mediatörlerdir. Bunlar Fenton reaksiyonu yolu ile metal şelatörlerle reaksiyona girebilirler ve çoklu doymamış yağ asitleri içeren geniş çeşitlilikte organik bileşikler oksitleyebilirler, hücre membran hasarı ve protein dejenerasyonuna neden olurlar.
2. Böbrek korteksinde fosfolipid üretimi artışı, Na⁺- K⁺ -ATPaz inhibisyonu, tromboxan A₂ ,prostoglandinler, mikrozomal protein sentezi etkisi, lizozomal hasar, mitokondriyal hasar ve vasküler faktörlerdir (4).

Gentamisin nefrotoksisitesinde farklı mekanizmaların rol oynadığı kabul edilse de bu mekanizmalardan en önemlisi renal tübüler toksisiteye neden olmasıdır (93). Bu toksisitede ise oksidatif stresdeki artışa bağlı olarak gelişen olayların etkili olduğu benimsenmektedir (94). Gentamisinin böbreklerde mitokondri kaynaklı süperoksit anyonu oluşumunu arttırdığı, elektron transport zinciri ve ATP oluşumunu inhibe ettiği, apoptoz, DNA hasarı ve lipit peroksidasyonunu uyarak böbreklerde hasara yol açtığı bildirilmiştir.

2.8 Oksidatif Stres Ve Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller; yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (95,96,97). Bu eşleşmemiş elektron nedeni ile serbest radikal molekülü kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyeli yüksektir (98,99,100,101). Bu oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipidler, glikolipidler,

membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalırlar (102,103,104). Sonuçta metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve hatta ölüme yol açarlar (105). Oksidatif stres reaktif oksijen ve nitrojen türleri ile antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan yönde bozulması ile gerçekleşir (106). Oksidatif stres doğal bir süreç olup bu stresi kontrol altında tutan özelleşmiş mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmaların yetersizliği durumlarında oksidatif hasar oluşur (107). Oksidatif streste etkili olan reaktif oksijen türleri olarak süperoksit (O_2^-), hidroksil (OH), peroksil (RO_2), hidroperoksil (HRO_2^-) gibi serbest radikaller ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$) gibi nonradikal türleri sayabiliriz. Reaktif nitrojen türleri ise nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2^-) gibi serbest radikaller ve peroksinitrit ($ONOO^-$), nitroz oksit (HNO_2), alkil peroksinitrat ($RONOO$) gibi nonradikallerdir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) veya reaktif nitrojen türlerinin oluşması radikal zincir reaksiyonları ile diğer ürünlerin üretimine

yol açarlar. Süperoksit radikali (O_2^-), organizmada NADPH oksidaz, ksantin oksidaz, siklooksijenaz gibi çeşitli oksidazlar aracılığı ile ve bazı koşullarda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile oksijenin bir elektron redüksiyonu sonucu oluşur. Ayrıca ATP sentezi için gerekli olan normal oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrial elektron transport zinciri tarafından üretilir. Normal şartlar altında O_2^- antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilir. O_2^- mitokondride manganez süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (Cu-SOD) ile H_2O_2 'e dönüştürülür. H_2O_2 ise mitokondride glutatyon peroksidaz (GSH-Px), lizozomda katalaz (CAT) tarafından H_2O ve O_2 'e parçalanır. H_2O_2 ayrıca Fe, Cu gibi elementlerin varlığında reaktif hidroksil (OH) radikaline dönüştürülebilir (Fenton reaksiyonu) (108).

2.8.1 Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Alkol, uyuşturucu gibi bağıışıklık yapan maddeler, radyasyon, hava kirliliği, pestisitler, solventler, anestezik maddeler, aromatik hidrokarbonlar, sigara ve antineoplastikler ekzojen radikal kaynakları olarak sayılabilir. Mitokondrial elektron transport sistemi, iskemi, travma, intoksikasyona bağlı oksidatif stres durumları, peroksizom enzimleri, tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, endoplazmik retikulum ve nukleus membranındaki elektron transport

sistemleri, NADPH oksidaz, lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz gibi hücre içi enzimler de endojen radikal kaynaklarındandır (109)

2.8.2 Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri

Fizyolojik şartlarda oluşan reaktif oksijen türleri; sinyal proteinleri, fagositozdaki savunma mekanizmaları, nötrofil fonksiyonları gibi olaylara müdahil olur. Aşırı oluşan oksidatif stres ise proteinler, lipidler ve DNA üzerinde zararlı etkiler yapar (108).

2.8.3 Serbest Radikallerle Oluşan Lipid Peroksidasyonu

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Özellikle hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri serbest oksijen ürünleri ile yüksek oranda tepkimeye girer ve peroksidasyon meydana gelir. Membran akışkanlığını sağlayan bu doymamış yağ asitlerinin hasarı sonucu akışkanlıkta azalma olur. Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirtici olan malondialdehit (MDA) oluşur (110).

2.8.4 Serbest Radikallerle Protein ve Nükleik Asitlerde Oluşan Değişiklikler

Protein oksidasyonu; reaktif oksijen türleri ve oksidatif stresin ikincil ara ürünlerinin proteinlerin kovalent modifikasyonuna neden olması ile oluşur. Proteinlerdeki bu değişiklikler sonrasında çeşitli hücre fonksiyonları (sinyal iletimi mekanizmaları, transport ve enzim sistemleri) etkilenir (111). Ayrıca DNA tamir enzimleri ve DNA polimerazlar da serbest oksijen türlerinden etkilenirler (112). DNA molekülünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (113)

2.9 Antioksidan Sistem

Antioksidan sistemde görev yapan moleküller; organizmada sentezlenen (endojen) veya dışarıdan alınan (ekzojen), oksidan moleküllerin hücreye zarar vermesini önleyen, enzimatik veya nonenzimatik yapılardır (114).

2.9.1 Nonenzimatik Antioksidanlar

Vitamin C: Nitrik oksit sentaz tetrahidrofolatı stabilize ederek nitrik oksit (NO) üretimini artırır (115,108).

Vitamin E: Yağda çözünen bir vitamin olup lipid peroksidasyonunu önler (97,108).

β -Karoten: Serbest radikalleri temizler, peroksitleri inaktif hale getirir (117,118).

Koenzim Q10: Yağda çözünen bir antioksidan olup O_2^- 'i temizleyerek endotelial disfonksiyonu azaltır (98,108).

Serüloplazmin: İki değerlikli demirin üç değerlikli demire yükseltgenmesini böylece fenton reaksiyonunu inhibe eder. Serbest radikal oluşumu da inhibe edilmiş olur (119).

Transferrin: Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak fenton reaksiyonunu önler (120).

Melatonin: Triptofandan sentezlenir, lipofiliktir, OH radikalini temizler (121).

Glutasyon (GSH): Tiyol grubu içeren bir tripeptiddir. Hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu gibi) yanı sıra antioksidan olarak da görev yapar (122). Serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girip oksidatif hasara karşı koruma yapar. Karaciğer vücuttaki glutasyonun en önemli kaynağıdır (123). Oksidatif stresin ölçümünde kullanılan bir antioksidan olup, redükte glutasyon/okside glutasyon oranı oksidatif strese azalır (124). Diğer nonenzimatik antioksidanlar α -lipoik asit, bakır, çinko, selenyum gibi elementler, folik asit, ürik asit, albumin gibi kofaktörler, B1, B2, B6, B12 gibi vitaminlerdir (108)

2.9.2 Enzimatik Antioksidanlar:

Süperoksit Dismutaz (SOD)

O_2^- anyonunun H_2O_2 'ye dismutasyonunu gerçekleştiren enzimdir (125),.

$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ Bu tepkimede SOD enzimi görev alır ve oksidatif strese karşı savunmayı ilk olarak başlatır (26). Tepkime sonucunda oluşan ürünler ya lizozomlardaki katalaz (CAT) tarafından ya da mitokondrideki glutasyon peroksidaz tarafından H_2O 'ye detoksifiye edilir (30).

Katalaz (CAT)

Glikoprotein yapıda bir hemoprotein olup, H_2O_2 'nin yüksek yoğunlukta olduğu durumlarda yüksek aktivite gösterir (126). H_2O_2 'yi suya dönüştürür (108).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) ve Glutasyon Redüktaz (GR)

GSH-Px, yapısında selenyum metali bulunan bir metalloenzimdir. Redükte glutasyonu okside glutasyona dönüştürürken aynı zamanda H_2O_2 'i de suya çevirir. Okside glutasyon ise glutasyon redüktaz (GR) enzimi aracılığı ile NADPH kullanılarak yeniden redükte glutasyona dönüştürülür (123). Ortamda H_2O_2 düşük yoğunlukta ise GSH-Px, CAT'a göre daha aktiftir (104).

2.10 Apoptozis:

Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptozis”, hem hücresel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücrelerin, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. Bu işlem hem çok hücreli organizmaların normal gelişim süreci olan embriyogenezis sırasında, hem de erişkinlerde nerdeyse bütün dokularda hücresel çoğalma ve yenilenme arasındaki homeostatik dengenin ve doku içeriğinin kararlılığının korunması için gereklidir (127, 128, 129). Fetusda normal doku gelişimin temel özelliğidir. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Çeşitli uyaranlar apoptozis mekanizmasını uyarır. Bunlara örnek olarak, tümör nekrozis faktör alfa (TNF-a), hücre içi kalsiyum düzeyinin artışı, glikokortikoidler, reaktif oksijen ürünleri, UV ışık, radyasyon, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar sayılabilir (130, 128). Apoptozda asıl morfolojik olay, çekirdeğin yoğunlaşması ve parçalara ayrılmasıdır. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve hücre şişerken zar yapısı bozulur. Daha sonra zarda tomurcuklanmalar oluşur ve hücre sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınıp fagosit edilirler. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle zarın dış tabakasına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır, fagositozu uyarır (131).

Apoptozisde hücresel yapının bozulmasının nedeni, Na, K ve Cl taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptoz uyarısını alan hücre çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovilluslarını kaybeder. Elektron mikroskopunda gözlenen değişiklikler ise öncelikle hücre zarının şekli bozulmasıdır ve bunu takiben kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapılar ‘zeiozis’ adını alırlar. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu

asimetri ATP'ye bağılı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliğı ya da diğerk enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfotidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğın fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler sitokin salgılanması ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirlr. Apoptoz 30– 60 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. Elektron mikroskobunda apoptozis sırasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma zarının kabarması, mitokondri dış zarında şişme, mitokondrial membran aralığına sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör (AİF) salınımı en önemli morfolojik değışikliklerdir (131).

Apoptozisin gerçekteşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Apoptoz mekanizması henüz tam anlaşılamamakla birlikte asıl önemli olan araç kaspazların aktivasyonudur (127). Proteaz ailesinden olan ve yapılarında sistein içeren bu enzimler tüm hücrelerde inaktif pro-enzim halinde bulunurlar. Ölüm sinyali olarak da kabul edilen kaspazlara karşı çeşitli virüslerde kaspaz inhibitörleri saptanmıştır (132). Uyarana bağılı olmak üzere 2 temel mekanizma aracılığıyla apoptozis başlatılır (127 ,128, 133).

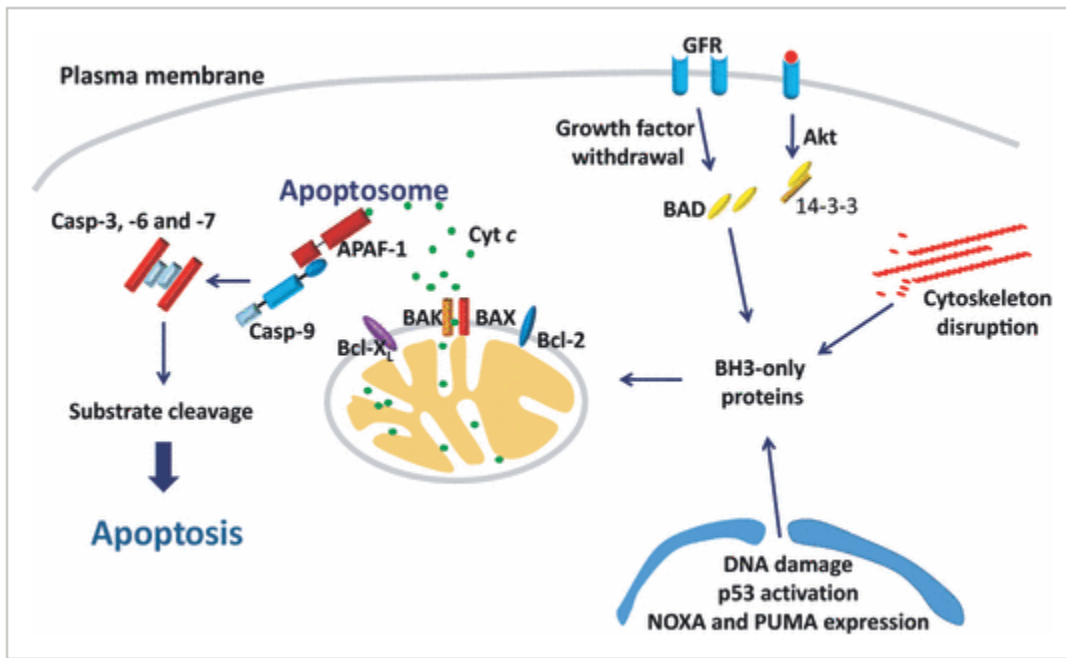
A. Hücre içi uyanlar aracılığı ile

B. Hücre dışı uyanlar aracılığı ile

2.10.1 A.Hücre içi uyanlar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi:

Birçok apoptotik uyarı, sonuçta mitokondri/apoptozom ölüm yolağı oluşturacak hücre organellerinde metabolik strese neden olabilirler. Apoptozisin çeşitli uyanları doğrudan ya da dolaylı mitokondriden sitokrom c serbestlenmesine etki eder. Sitokrom c'nin sitoplazmaya sızması mitokondri/apoptozom bağımlı (intirinsik) ölüm yolağında anahtar olaydır. Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri bu yolağın kontrolünde önemli rol oynarlar. Bcl-2 gen ailesi üyeleri, kendi içlerinde birbirlerine antagonist çalışarak apoptozu uyan veya engelleyen bcl-2 proteinlerini kodlarlar. Bu proteinlerden pro-apoptotik olanlar (Bax, Bak, Bok, Bad, bid, Bim, Bmf) apoptozu uyarırken anti-apoptotik olanlar (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-w) apoptozu engellerler (134,135,136). Bcl-2 gen ailesi üyelerinin oranı, hücrelerin yaşamasını veya ölmesini belirler. Bunların ekspresyon düzeyleri ve aktivasyon aşaması sitokrom c, prokaspaz -2, -3, -9, AİF (apoptoz içeren faktör), endonükleaz G,

Smac/DIABLO gibi apoptoza yol açan moleküllerin salınımına etki eder. Bütün bu faktörler Bax/Bak kanalları ya da mitokondriyal membrandaki spesifik olmayan porlar tarafından serbestlenir. Prokaspaz -9'un aktivasyonu dATP ya da ATP'nin varlığında Apaf-1 ve sitokrom c tarafından kolaylaştırılır. Sitokrom c, Apaf-1, kaspaz -9 ve dATP ya da ATP birleşerek moleküler ağırlığı yaklaşık 700 – 1400 kDa olan apoptozom ile büyük bir bileşik oluşturur. Apoptozom üretimindeki anahtar oyuncu mitokondridir. Bununla birlikte kaspaz -9, aktive olur ve apoptotik hücre ölümü yolağında kaspaz -3, 6, 7 aktive edilir ve apoptozis gelişir (133,137).



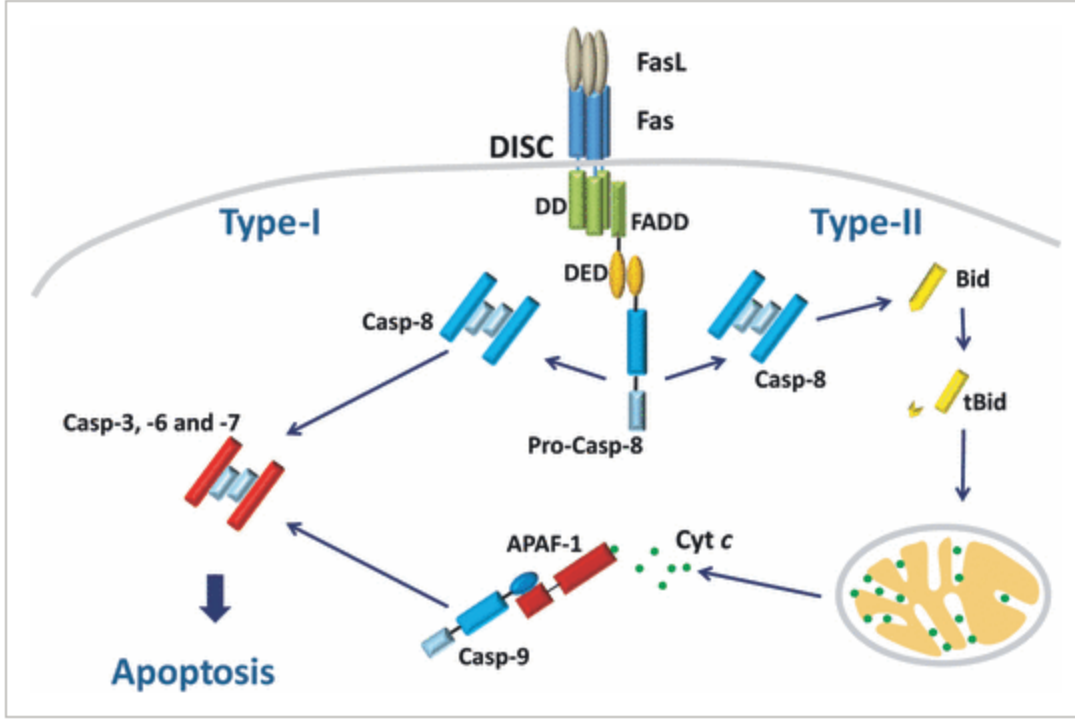
Şekil 15: Hücre içi uyarılar ile apoptoz (138)

2.10.2 B. Hücre dışı uyarılar aracılığı ile hücrenin apoptoza girmesi :

Bir diğer yolak da tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinden, ölüm reseptörlerinin aracılık yaptığı hücre dışı uyarılar aracılığı ile oluşur. Bu yolak ölüm ligandının kendi reseptörüne bağlanması ile başlatılır. Şu ana kadar, ölüm reseptör ailesinin insanda en az sekiz tanesi tanımlanmıştır. Bunlar; Fas (CD95), TNF-R1, DR-3 (Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2), DR-6, EDA-R (ektodermal displazi reseptörü) ve NGF-R'dir. Ölüme neden olan reseptörler sitoplazma içinde ölüm alanı (DD, "dead domain") olarak adlandırılan bir bölge taşırlar. Ölüm reseptörü olan Fas

(CD95), hücre yüzey reseptörü olup tümör nekroz faktör ailesinin en iyi tanımlanmış ölüm reseptörlerindendir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı da (FasL) TNF ailesinin bir üyesidir. FasL'nın hedef hücredeki Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar (136,137).

Ligandın hedef hücredeki reseptörüne bağlanmasını DISC (death-inducible signaling complex) formasyonunun oluşumu takip eder. (133,135,137). Ölüm reseptörüne kendi ligantlarının bağlanması hücre içinde adaptör proteinin de (FADD) reseptöre bağlanmasına yol açar. FADD, bu kompleks içerisinde sırasıyla prokaspaz- 8 ve -10'nun çalışmasına olanak verir. DISC'deki bu proenzimlerin yakın ilişkisi bunların katalitik aktivitesine, muhtemelen bir allosterik mekanizma tarafından pro-kaspaz-8 veya -10 molekülleri arasındaki dimerizasyona neden olur. Pro-kaspaz 8 aktif hale geçince kaspaz-8 oluşur ve kaspaz-8 direk hedef proteinleri bölerek apoptoza yol açan kaspaz-3'ü aktive eder.(133,135). DISC içindeki kaspazların aktivasyonu hücre içi proteinlerden FLICE-inhibitör proteini (cFLIP) tarafından inhibe edilebilir. Bu proteinler hem DISC'i çalıştırabilir hem de kaspaz-8 ve -10'nun aktivasyonunu baskılar (134).



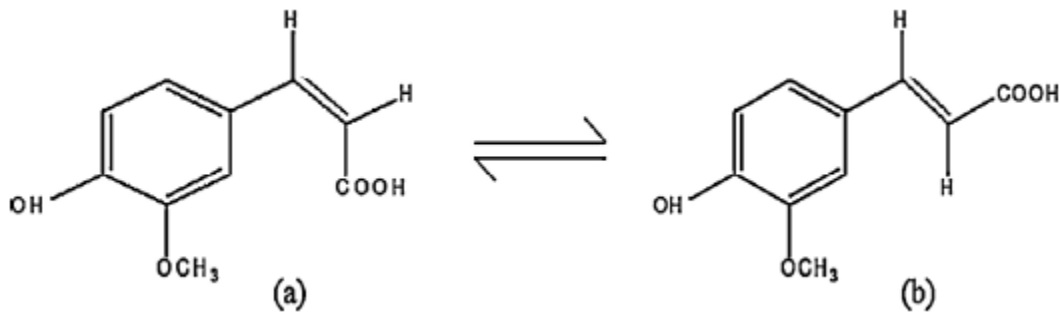
Şekil 16: Hücre dışı uyaranlar ile apoptoz (139)

Eksojen H₂O₂ gibi SOR'lerinin orta düzeyleri birçok farklı hücrede apoptoza neden olur. Endojen üretilen SOR'lerinin hücre içinde bulunması da apoptotik hücre ölümüne yol açmada çok önemlidir ve UV, kanser tedavi edici ilaçlar ve sitokinler gibi birçok uyarılar tarafından tetiklenir (139). Son zamanlarda apoptoza karşı koruyucu etki gösteren antioksidanlarla yapılmış pek çok çalışma vardır (140, 141, 142)

2.11 Ferulik Asit

İlk kez Ferula foetida'dan izole edilen ferulik asit (4-hidroksi-3-metoksisinnamik asit) ilk ismini bitkinin adından almıştır [1]. 1925 yılında ferulik asit, kimyasal olarak sentezlenmiş ve bir doymamış yan zincir varlığı ve ayrıca cis ve trans izomerik formların varlığı tasvir edilerek yapısal olarak spektroskopik tekniklerle doğrulanmıştır. Ferulik asit Ferulik asit (FA, 3-methoxy, 4-hydroxy cinnamic acid), sebze ve meyvelerde sıklıkla bulunan, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından kaynaklan, fenolik bir bileşiktir (143,144). Kimyasal yapısı zerdaçale sarı rengini veren ve önemli bir antioksidan olan kurkumine benzemektedir. Özellikle tohumlarda ve yapraklarda hem serbest formunda

hem de lignin ve diğer biyopolimerlere bağlı olarak bulunur 8(23) Mısırd, buğday, piriç, yulaf, çavdar gibi tahılların kepeklerinde, kavrulmuş kahve, domates ve turunçgillerde bulunmaktadır(143). Undaki toplam fenolik asitler içinde % 90'ını ferulik asit oluşturmaktadır (24) Ferulik asit, fenoksiradikal yapısına bağlı olarak yüksek antioksidan potansiyele sahiptir. Etkili bir serbest radikal süpürücüdür ve bazı ülkelerde lipit peroksidasyonunu engellemek amacıyla gıda katkıları olarak da kullanılmaktadır (25). Ferulik asitin insanlarda, güçlü bir membran antioksidanı olarak etki ettiğı ve deri kanseri, yaşlanma, yorgunluk, soğuk algınlığı, grip ve influenzaya karşı koruyucu etkili olduğı bilinmektedir (26). Ferulik asit hidroksil radikali, hipokloröz asit ve peroksil radikali gibi reaktif oksijen 30 türlerini süpürücü etkilidir; serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırdığı ispatlanmıştır (145). FA'nın ratlarda pankreatik hücrelerde insülin salınımını arttırdığı bildirilmiştir (27). Antioksidan özellikleri ratlarda kimyasallar aracılığıyla oluşturulan karsinogeneze ve farelerde deri tümörü oluşumunda da görülmüştür (28) Çalışmalar, ferulik asidin fotoprotektif (29), hepatoprotektif (30), antiaterojenik (31) ve antimutajenik (32) özellikleri olduğunu göstermiştir. Prasad ve arkadaşları, ferulik asidin insan lenfositlerinde radyasyonun yol açtığı sitogenetik ve biyokimyasal hasara karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu koruyucu etkinin FA varlığında gerçekleştiğı ve FA'nın hücreler tarafından alındığı ileri sürülmüştür. Buna göre ferulik asit radyoprotektif özellik göstermiştir (145). ferulik asit gastrointestinal sistem tarafınan emilir. Karaciğerde metabolize edilerek idrar ve safra yolu ile atılır(146).



Şekil 17:Ferulik asit (147)

ferulik asit cis formu

ferulik asit trans formu

2.12 Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1)

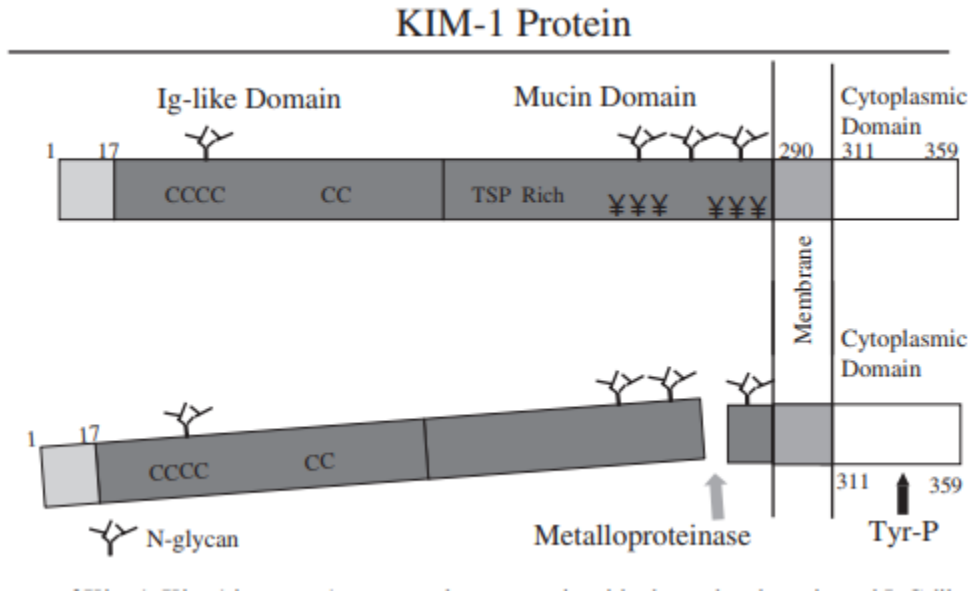
KIM-1 1998 yılında ilk kez Ischimura ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Neredeyse tamamı proksimal tübül tarafından sekrete edilen bir tip 1 membran glikoproteinidir (148). Homoloji göstermesi nedeni ile T hücre immunglobulin musin-1 (TIM-1) ve hepatositlerde de hepatit A virus hücresel reseptör-1 (HAVCR-1) olarak da adlandırılan bu molekül düşük miktarlarda lenfositlerce de üretilir (149). KIM/TIM ailesinin farede 8, ratta 6, insanda ise 3 adet üyesi tanımlanmıştır (150). Normal böbrekten ihmal edilebilir düzeyde düşük salgılanan bu marker, iskemi sonrası iskemik hasar oldukça hassas olan proksimal tübül S-3 segmentinde belirgin olarak upregüle edilir (151) KIM-1 molekülünün dış parçası proksimal tübül hasarı sonrasında dökülür. Metalloproteinaz aktivitesi çözünebilir KIM-1'in 3 salınmasına neden olur. Bu dökülmenin en azından bir kısmı strese bağlı olarak MAP kinaz yolağı aracılığıyla dökülür (152).

KIM-1'in fonksiyonel önemi de araştırmalara konu olmuştur. Post iskemik böbrekte epitelyal ölü hücrelerin tanınması ve fagositozunda rol aldığı düşünülen KIM-1'in bu hücrelerin dökülmesi ve ABY'nin karakteristik özelliği olan tübüler obstrüksiyonu tetiklediği düşünülmektedir. KIM-1 apoptotik hücreleri tanıyan ve onları lizozoma yönlendiren bir fosfatidil serin reseptörüdür. Ayrıca okside lipoproteinlerle etkileşerek apoptotik hücrelerin sinyallerine adaptasyon sağlar. Bu özelliğinden dolayı KIM-1 epitelyal hücrelerin fagositik niteliklerini tanımlayan bir nonmyeloid fosfatidilserin reseptörü olarak görülebilir (150,151). Ayrıca KIM-1 molekülünün otoimmün cevabı baskılayıcı etkinliğinin de olabileceği düşünülmektedir. Çünkü apoptotik hücre fagositozu da aslında proinflammatuvar cevabı baskılamaya yönelik bir etki gösterir. (153,154).

Proksimal tübül hasarına yol açan birçok faktör KIM-1 ekskresyonuna yol açabilir. İskemi reperfüzyon modeli oluşturulduktan 3 saat sonra, beyin ölümü sonrası ise 6. saatte herhangi bir tübül yapısal hasarı gözlenmeksizin KIM-1 salındığı açığa çıkarılmıştır (155). Tübüllerde KIM-1 üretimi renin anjiyotensin yolağı aktivitesi artıran durumlarda ve fokal

segmental glomeruloskleroz (FSGS) ve benzeri glomerüler patolojilerde de artmaktadır (155).

Sisplatin, siklosporin, krom, kadmiyum, iyonize kontrast gibi nefrotoksik ajanlarla oluşan hasarlar ve akut/kronik allograft nefropatilerinde de KIM-1 salınımı artmaktadır (156,157,155,158). Diyabetik nefropati oluşturulan farelerde 1. ayda KIM-1 sentezinin 20 kat arttığı gösterilmiştir (159). Diyabetik nefropati olgularında özellikle tübülde fibrozis ve inflamasyonun belirgin olduğu bölgelerde KIM-1 sentezi daha belirgin artmaktadır (160). KIM-1'in birçok özelliği böbrek hasarında ideal bir biyomarker olabileceğini düşündürmektedir. Bunlar arasında normal böbrekten çok az miktarda salınması, proksimal tübül apikal membranda bulunması ve değişikliklere duyarlı olması, ektodomain kısmının hızlı ve kuvvetli klevajı ve hücre tamamen rejenere olana kadar membranda persiste etmesi sayılabilir (160). Kim-1, birçok patofizyolojik duruma veya toksik maddeye yanıt olarak proksimal tübül içindeki histopatolojik değişikliklerin kestiricileri olarak kan üre nitrojeni ve serum kreatinin düzeyini geride bırakarak sıçandaki böbrek hasarının önemli bir göstergesi olduğunu kanıtlamıştır (161).



Şekil18:KIM-1(161)

2.13 VEGF

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF), vasküler endotelial hücelere özğü bir mitojendir..Vaskülogenez ve anjiyogenezi düzenlemektedir. Anjiyogenezi var olan kan damarlarından yeni kan damarı oluşumu, vaskülogenez ise dolaşımda bulunan endotel hücre öncüllerinin (endotel progenitör hüceleri) daha önceden var olan herhangi bir damardan köken almadan olgun endotel hücelere dönüşerek yeni bir damar oluşturmasıdır (162). VEGF, heparin bağlayan bir glikoprotein olup, makrofajlar tarafından üretilmektedir aynı zamanda fibroblast, endotelial ve epidermal hüceleri tarafından da sentezlenmektedir. VEGF ailesinin üyeleri kendi özel reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. VEGF; endotelial hüceleri mikrovasküler tüp oluşumunu, göçünü ve çoğalmasını uyararak, güçlü anjiyogenik etki göstermektedir (163). VEGF vücutta yeni damar yapımında, yara iyileşmesinde, damar geçirgenliğinde, embriyogenezi ve menstural döngü gibi olaylarda da rol almaktadır(164). Karaciğer hüceleri rejenerasyonunda *VEGF* ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (165). *VEGF* vücutta böbrek proksimal tübül hüceleri içinde bulunduğu birçok farklı bölgede ifade edilmektedir (166). VEGF vücutta birçok farklı hücrede sentezlenmektedir bunlardan bazıları şunlardır; akciğerdeki alveolar hüceleri, ovaryum folikülleri, korpus luteum, renal glomerül visseral epitel hüceleri, glomerul podositler, böbrek proksimal tübül hüceleri, adrenal korteksin tüm hüceleri, leydig hüceleri, aktive makrofajlar, arterioller çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hüceleri, hepatositlerdir (167,168). VEGF böbreklerde, glomerüler damar geçirgenliğinin düzenlenmesi (169), renal tübül hüceleri korunması (170), glomerular basement membran yapısının sürdürülmesi (171), kalsiyum homeostazisi ve podositleri yaşamını sürdürmesi (172) gibi çeşitli olaylarda rol almaktadır. VEGF seviyesinin akut böbrek hasarı olan hastalarda anlamlı derecede daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (173).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Prospektif deneysel bir araştırma

3.2 Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Araştırma Eylül 2017 tarihinde literatür tarama ile başlamış olup; etik kurul onayı 09 Ocak 2018 tarihinde alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında ilaç uygulama ve sakrifikasyon yapılmasını takiben, alınan böbrek dokuları histolojik analizler için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına, kan ve böbrek dokuları ise biyokimyasal analizler için Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim dalına getirilerek gerekli işlemler yapılmıştır. 12/2017-11/2018 tarihleri arasında tez yazımı ile sonlanmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada 4 deney grubu olmak üzere toplam 28 deney hayvanı (sıçan) kullanıldı ve deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

1.Grup, Kontrol Grubu: Deneklere herhangi bir madde verilmedi. Denekler deney başlangıcında ve deney sonunda 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletilerek deney öncesinde ve sonrasında kan ve idrar örnekleri alındı. Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı.8 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7). Sakrifikasyon ile elde edilen doku örneklerine histokimyasal, immunohistokimyasal ve biyokimyasal uygulamalar yapıldı.

2.Grup, Gentamisin Verilen Grup: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden önce kan örnekleri ve idrar örnekleri alındı Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. Deneklere 8 gün boyunca i.p . olarak günde bir defa 80mg/kg. dozunda Gentamisin verildi. Deney sonunda denekler 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden sonra kan ve idrar örnekleri alındı Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. 8 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

3.Grup, gentamisin + Ferulik asit Grubu: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden önce kan ve idrar örnekleri alındı Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. Deneklere 8 gün boyunca i.p . olarak günde bir defa 80mg/kg . dozunda Gentamisin verildi. Deneklere günde bir defa p.o. yolla 50mg/kg ferulik asit sıcak suda çözündürülerek verildi Deney sonunda denekler 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden sonra kan ve idrar örnekleri alındı. Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. 8 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

4.Grup, Ferulik Asit Grubu: Denekler deney öncesinde 24 saat metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden önce kan ve idrar örnekleri alındı. Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. Deneklere 8 gün boyunca günde bir defa p.o. yolla 50mg/kg ferulik asit sıcak suda çözündürülerek verildi. Deney sonunda denekler 24 saatlik metabolik kafeslerde bekletildi. Deneyden sonra kan ve idrar örnekleri alındı. Alınan idrar ve kanda üre ve kreatinin değerlerine bakıldı. 8 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

8 gün sonunda her bir deneğin ağırlıkları ölçülerek ketamin-ksilazin anestezisi (80-100 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazin) uygulandı. Anestezinin derinleşmesini takiben denekler operasyon masasına sabitlendi

Kan Örneklerinin Alınması

Sıçanlar son enjeksiyondan sonra (deneyin 8. günü) metabolik kafeslere konuldu 24 saat sonunda i.p. ketamin 80 mg/kg + ksilazin 10 mg/kg ile anestezi yapılarak, orta hat insizyonu ile batinları açıldı. Vena cava inferiorundan kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri aynı gün 1000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Ayrılan serum örneklerinden aynı gün serum üre ve kreatinin ölçümleri çalışıldı.

Böbreklerin Çıkarılması

Sıçanların böbrekleri steril şartlarda çıkarıldı. Çıkarılan böbrek dokularının ağırlıkları ölçüldü. Sol böbrek histolojik incelemeler, sağ böbrek biyokimyasal analizler için kullanıldı. Sol böbrek yeteri kadar % 10'luk nötral formol eklenmiş ependorf tüplerine konarak histolojik değerlendirme yapılmaya kadar oda ısısında muhafaza edildi. Sağ böbrek analizin yapıldığı tarihe kadar -80 C0 'de muhafaza edildi.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, Wistar Albino toplam 28 dişi sıçan (150-270 gr) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm denekler deney sonlanıncaya kadar 21°C±1 oda sıcaklığı, %50-60 nisbi nem ve 12 saat gündüz/12 saat gece aydınlatma periyotlarında bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırılmıştır. Denekler ad libitum olarak dinlendirilmiş su ve standart pellet yem ile beslenmiştir. Hayvanlara uygulanan deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Madde uygulamaları (Gentamisin, Ferulik asit)

Bağımlı değişken: Ölçülen ürünler (MDA, GPx, SOD, Üre, Kreatinin)

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deney başlangıcında ve deney sonunda denek ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi, deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılması gerekli olan distile su ihtiyacı için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrüfuj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, eliza cihazı ve buzluk kullanılmıştır.

3.6.2 Araştırmada Kullanılan Gentamisin ve Ferulik asitin Hazırlanması

Gentamisin'in Hazırlanması

Gentamisin (Genta 80 mg) İbrahim Ethem Ulugay, İstanbul firmasından temin edilmiştir. Gentamisin 8 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 80 mg/kg intraperitoneal olarak deneklere uygulanmıştır.

Ferulik asitin hazırlanması

Ferulik asit Santa –Cruz firmasından temin edilmiş ve kullanılmıştır. Ferulik asit sıcak suda çözündürülerek kullanılmıştır. Ferulik asit 8 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 50 mg/kg oral gavaj yolu ile deneklere uygulanmıştır.

3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen sağ böbreğe ait doku örneklerine rutin doku takibi prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen-Eozin (H-E), Periyodik Asit- Schiff (PAS) boyamaları, immunhistokimyasal değişiklikler için Aktif Kaspaz-3, VEGF ve KIM-1 boyamaları yapılmıştır. Sol böbreğe ait doku örneklerinden biyokimyasal olarak GPx, SOD, MDA ölçümleri yapılmıştır. Alınan kan ve idrar örneklerinden ise üre ve kreatinin düzeyleri ölçülmüştür.

3.6.3.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda deneklerin ağırlıkları ölçülmüştür. Veriler SPSS 17,0 programında, Wilcoxon sıralı işaretler testi kullanılarak değerlendirilmiş ve

gruplar arası karşılaştırmada $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.3.2. Böbrek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda sakrifiye edilen deneklerin böbrek ağırlıkları ölçülmüştür. Sonuçlar SPSS 17,0 programında Wilcoxon sıralı işaretler testi kullanılarak değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırmada $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.3.3. Histokimyasal İncelemeler

Sakrifikasyon sonunda alınan sağ böbrek, histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Sol böbrek biyokimyasal incelemeler için ependorf tüplere alınarak -80°C 'ye kaldırıldı.

3.6.3.3.1. Rutin Doku Takibi

Alınan böbrek dokusu %10'luk formaldehit solüsyonu ile 3 gün fikse edildi. Ardından fiksatifin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkama yapıldı. Dehidratasyonu sağlamak için sırasıyla %70, %80, %96'lık etil alkol serilerin içinde 20'er dakika tutuldu. Şeffaflandırma için 30'er dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saat iki kez parafin içinde immersiyonu sağlandı. Tüm bu işlemler 60°C 'lik etüv içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığıyla bloklardan $5\mu\text{m}$ 'lik parafin kesitlerin bir kısmı normal lamlara, bir kısmı ise poly-L lysine kaplı lamlara alındı (Tablo1)

Tablo 1: Doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10 Formol	24 – 48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece

Dehidratasyon	%70 – 80 – 96’lık alkol serileri	20’şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20’şer dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 – 2	30’ar dakika
	Yumuşak parafin 1 – 2	1’er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.3.3.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi

Alınmış olan kesitler, deparafinizasyon için 1 gece 60°C’liketüvde tutuldu. Daha sonra önce 20 dakika (etüvde) daha sonrakiler 10’ar dakika üç farklı ksilende bekletildi. Dehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serisinden geçirilip distile su ile çalkalandı ve hematoksilen boyası (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Böylece nükleusların boyanması sağlandı. Boyamadan sonra, 10 dakika akarsu altında kesitler yıkanarak boya fazlası uzaklaştırıldı. Eozin boyası (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 2 dakika boyandı. Böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı.

Boyamanın ardından %70, %80, %96 şeklinde azalan alkol serilerinden ve 2 kez absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırmanın sağlanması için 3 kez 20 dakika süreyle ksilende tutuldu ve Entellan (UN 1886, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
-------	-------	------

Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Mayer's Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınmış olan parafin kesitler deparafinizasyonun sağlanması amacıyla 1 gece boyunca 60°C’de etüvde bekletildi. Sonra önce 20 dakika (etüvde) daha sonra iki kez 20’şer dakika oda sıcaklığında üç kez ksilene tabii tutuldu. Daha sonra rehidratasyon sağlanması için 2 defa absolü alkol, %96, %80, %70’lik alkol sıralarından geçirilen kesitler distile suda çalkalandı. PAS (Periyodik Asit Schiff) boyama kiti (Bio-optica, 04-130802 Milano, İtalya) içerisinden periyodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile suda çalkalanarak üzerlerine 10 damla schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi.

Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit gurubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak üzerlerine potasyum metabisülfid solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler distile suda iyice çalkalandıktan sonra mayers hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dk akarsuda yıkandı. Daha sonra dehidratasyonun sağlanması için artan alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırmak için 3 değişim halinde 20 dakika süreyle ksilende bekletildi ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3)

Tablo 3: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü

Tablo 6: PAS boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika

Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 Dakika
Boyama	Reagent D	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama

Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.4. Böbrek dokusunun histomorfolojisinin değerlendirilmesi:

Elde edilen kesitler H&E ve PAS ile boyandıktan sonra böbrek dokusunu değerlendirmek için kesitlerde farklı büyütme ölçeklerinde denek başına üç birbiriyle örtüşmeyen böbrek kesitinin bulunduğu en az 30 böbrek alanı incelendi. Böbrek dokusu kesitleri ışık mikroskopunda proksimal ve distal tübüslardaki yapısal değişiklikler (fırçamsı kenar kaybı, vakuolizasyon, tübül dilatasyonu, kast formasyonu), mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu, interstisyel alandaki yapısal değişiklikler ile beraber renal korpüskül, proksimal ve distal tübül çapları değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen görüntüler semikuantitatif olarak tübülointerstisyel hasar yönünden skorlandı ve aşağıdaki gibi puanlandı: 1= $\leq$ %10, 2=%10-%25, 3=%26- %50 4= %51-%75 ,5= >%75.

3.6.3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

3.6.3.5.1. İmmünohistokimya Boya Protokolü

KIM-1, VEGF ve Aktif Kaspaz-3, İmmün reaktivitelerinin gösterilmesi amacıyla KIM-1, Vegf, ve Aktif Kaspaz-3 antikorları kullanıldı. Alınan kesitler 60°C’de etüv içerisinde 1 gece bekletildi. Sonrasında deparafinizasyon amacıyla 30’ar dakika üç kez değiştirilerek ksilolde tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Ardından dokular KIM-1 ve Aktif Kaspaz-3 boyaması için mikrodalgada sodyum sitrat solüsyonu (Bio-optica, 15-M103, Milano, İT) içerisinde, 600 wattta 5 dakika tutuldu. Dokular PBS ile yıkandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Soğuması için 20 dakika

bekletildi. VEGF için tripsin solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutuldu Tüm kesitler 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 10 dk %3 H₂O₂ ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve 30 dakika bloklama solüsyonu ile bekletildi. Primer antikör olarak rata spesifik aktif kaspaz-3 (1:100; Millipore) ile +4°C’de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kesitler oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra PBS ile 3 defa yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonderantiköründe (Histostain Plus Kit, 85-9043 San Francisco, USA) 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile 3 defa kesitler yıkandı. immunohistokimyasal reaksiyonu görünür hale getirmek için DAB (Roche, Darmstadt, Almanya) ile muamele edildi. Distile suda yıkanan kesitlere mayer’s hematoksilen kullanılarak artalandaki boyama sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: İmmünohistokimyasal boya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96’lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70’lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama

Dokuların Etrafını Çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Antigen Retrieval	Sitrat solüsyonu (mikrodalgada)	5 Dakika
Soğutma		20 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Blocking Endogenous Peroxidase activity	H2O2	20 Dakika
Primer Antikor	CD68/VEGF/SPRY2	1 Gece (4°C’de)
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Enzim Kompleksi	Streptavidin Biyotin Kompleksi	15 Dakika
Yıkama	PBS	3 x 5 Dakika
Kromojen	DAB	
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Zemin Boyası	Mayer’s Hematoksilen	
Dehidratasyon	%70’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80’lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96’lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika

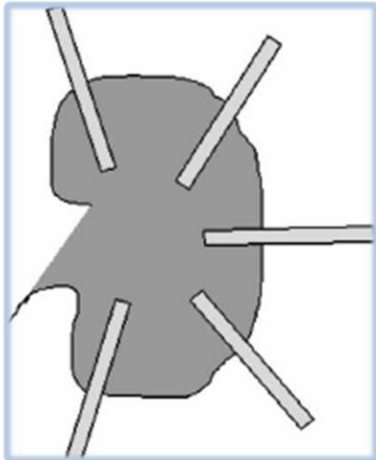
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.5.2. İmmünohistokimya Değerlendirmesi

Böbrekteki VEGF, KIM-1 ve Aktif Kaspaz-3 proteinlerinin dağılımını belirlemek için Anti – VEGF ve Anti –KIM-1,Anti-Aktif Kaspaz-3 antikor boyaması yapıldı.

3.6.3.5.3. Semikantitatif İmmünohistokimyasal Analiz

Deney gruplarında bulunan her bir denek için tubulointersitisiyel hasar ve glomerüler hasarı değerlendirmenin standart olması amacıyla böbrek dokusu kesitlerinde farklı bölgelerden 5 standart alan seçildi (şekil 19) ve semikantitatif değerlendirme yapıldı. Semikantitatif skorlama aşağıdaki gibi tanımlandı (**Tablo 19**)



Şekil 19: Böbreğin histomorfometrik incelenmesi

Tablo 5: Semikantitatif İmmünohistokimyasal Skorlama

Skor	İmmünohistokimyasal Bulgular
3 (+++)	Kuvvetli pozitif boyanma
2 (++)	Pozitif boyama
1 (+)	Zayıf pozitif boyanma
0 (-)	Pozitif boyanma yok

3.6.3.6. Biyokimyasal İncelemeler

Biyokimyasal BUN, Kreatinin Ölçümü: 1cc. kandan elde edilen serum örnekleri ve idrar örnekleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Spektrofotometrik olarak ölçümü yapılan parametreler üre (Protein metabolizmasının yıkım ürünü olan toksik etkili amonyağın detoksifikasyonu amacı ile oluşan üre suda çözünebilir ve böbrek yolu ile idrarla atılır), üre azotu (BUN) ve Kreatinin (iskelet kaslarındaki kreatinin'in su kaybetmesi ile oluşur) dir. Serum kreatinin düzeyi vücut kas kitlesinden ve kas yıkımından etkilenmekle birlikte, diyetle alınan protein içeriğinden çok az etkilenir. Bu nedenle, böbrek fonksiyonlarını değerlendirmede, serum üre ya da BUN düzeyine göre daha duyarlı olduğu için seçildi.

3.6.3.6.1. Doku Homojenatı Hazırlanması

Cerrahi işlem sonunda toplanan böbrekler serum fizyolojik ile yıkandı. Testis dokuları, 1mM EDTA, 210 mM süktroz içeren 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 amponu ile 1:8 oranında (w/v) homojenize edildi. Homojenizasyon, Tissue Lyser cihazında

gerçekleştirildi (TissueLyser II; Qiagen, West Sussex, UK). Elde edilen homojenatlar MDA için 2500 xg 10 dakika; SOD analizi ve GPx için 10000 xg 15 dakika 4°C'de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar analiz süresine kadar -80°C de saklandı. Tüm basamaklar +4 °C de (buz üzerinde) yapıldı.

MDA Düzeyinin Belirlenmesi

MDA düzeyleri ölçülerek, böbrek dokusundaki lipid peroksidasyon belirlendi. Ölçüm, (HPLC) yüksek performanslı sıvı kromatografi (Shimadzu VP Series, Tokyo, Japan) cihazı ile gerçekleştirildi. Yöntem, MDA'nın asit katalizi ile iki molekül tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin floresans dedektör ile tespiti prensine dayanmaktadır. 150-4.6 mm, C18 100-5 (Macherey-Nagel) özelliğindeki kolonda mobil faz 10 mM, %30 metanol içeren fosfat tampon (pH 7) çözeltisi kullanıldı. Ultraviyole detektörün dalga boyu 532 nm'ye, floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm ye, emisyon dalga boyu ise 553 nm'ye ayarlandı. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma, 85H2501) kullanıldı. Standart konsantrasyonları 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 µmol/L olarak kullanıldı. (1). Doku MDA değerleri µmol/mg protein olarak gösterildi.

Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

Kolorimetrik temelli kit (Cayman Kat. No. 706002, Michigan, USA) ile değerlendirildi. Kullanılan kit süperoksit anyonunun SOD tarafından indirgenmesiyle suda çözünebilen renkli formazan boya oluşum prensibine dayanır. Ticari kit prosedürüne göre çalışıldı ve ölçüm 450 nm' de mikrotplate okuyucu (BioTek, Synergy HT, KC4) ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

GPx aktivite ölçümü için ticari olarak alınmış olan, kolorimetrik kit (Cayman Kat No. 703102) ile değerlendirilmesi yapıldı. Testin yöntemi, glutasyonun (GSH) glutasyon disülfite (GSSG) oksitlenmesi süresince GPx'in kümen hidroperoksit miktarını azaltmasına dayanır. GSSG, NADPH tüketimi ile üretilir ve NADPH miktarının azalması GPx aktivitesi ile aynı orandadır. Kit son aşamasından sonra, 5 dakika süresince 340 nm'de spektrofotometrede kinetik ölçüm alındı. Sonuçlar hesaplanarak, mU/mg protein olarak gösterildi.

Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Bütün böbrek dokularında yapılmış olan analiz sonuçları mg proteine orantılanmıştır. Örneklerde protein ölçümünde biçinkonik asit (BCA) prensibine sahip olan Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Kitin prensibi bakır sülfat BCA çözeltisine ilave edildiğinde rengin yeşil olduğu görülür; yeşil çözelti protein çözeltisinin içerisine eklendiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşir. Alkali koşullarda iki değerli olan Cu^{2+} iyonları bir değerli olan Cu^{+} iyonlarına indirgenir ve mavi-mor renkli kompleks oluşmaktadır. Mavi rengin şiddeti ile protein konsantrasyonu orantılıdır (2). Protein standartı olarak 25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) hazırlandı. Protein konsantrasyonları standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{g/mL}$ şeklinde ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı Ve Takvimi

Tez Konusu Belirlenmesi ve Literatür Araştırması
09.2017-11.2017

Etik Kurul ve Yönetim Kurulu Onayı
09.01.2018

Deneyisel Verilerin Toplanması
02.2018-04.2018

Laboratuar Çalışmaları
04.2018-09.2018



Verilerin Analizi ve Tez Yazımı

09.2018-12.2018

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 17.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) kullanılarak incelenmiştir. Tanımlayıcı analizler normal dağılan değişkenler için ortalama±standart hata kullanılarak verilmiştir. Bağımlı grupların (grup içi *ağırlık önce-sonra, sağ-sol böbrek* karşılaştırmalarında vb.) karşılaştırmalarında (normal dağılım durumunda) bağımlı gruplarda t-testi (paired t test) kullanılmıştır. Gruplar arası farkın olup olmadığının tanımlanması için (Kontrol, Gentamicin, Gentamicin+Ferulik Asit, Ferulik Asit) gruplarının birbiriyle ilgili değişkenler açısından (ortalama *böbrek ağırlığı, denek ağırlığı/ort.böbrek ağırlığı, Malondialdehit-MDA, Süperoksitdismütaz-SOD, Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi-GPx, Aktif Kaspaz-3, VEGF, KIM-1, distal tubül çapı, glomerul çapı, proksimal tubül çapı, tübüler genişleme, tübüler vakualizasyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, fırçamsı kenar kaybı, hiyalin kast*) karşılaştırılmasında tek yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında anlamlı farklılık bulunan durumlarda, ikişerli post-hoc karşılaştırmalar Tukey testi kullanılarak yapılmıştır. p-değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlıdır.

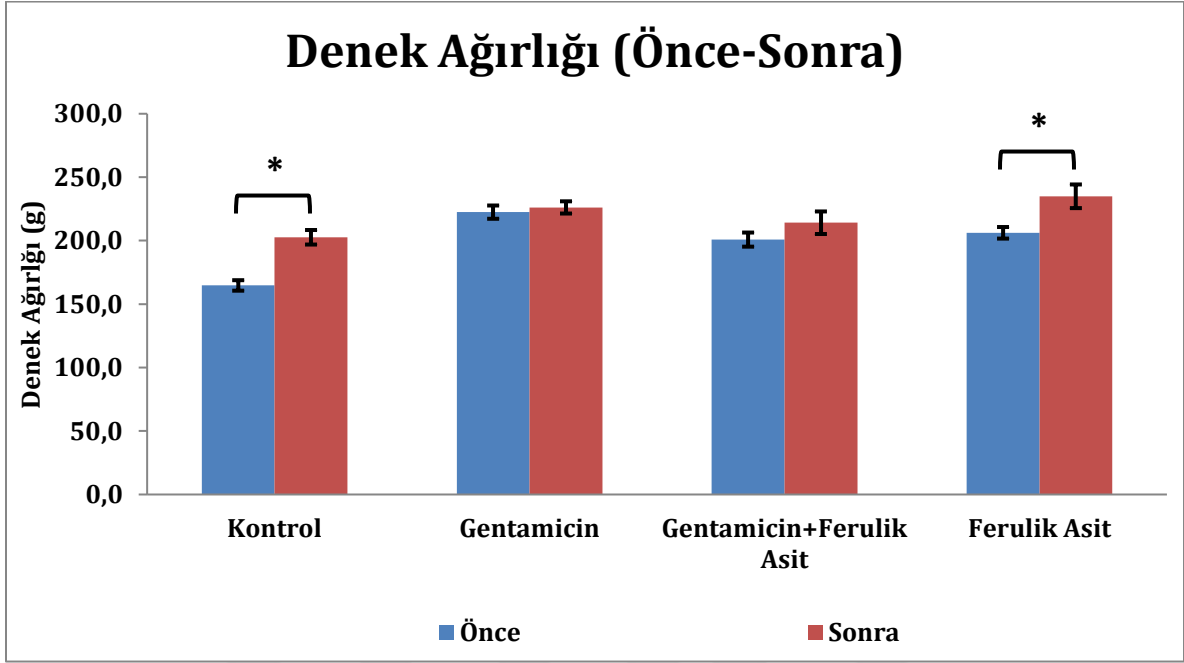
4.BULGULAR

4.1 Deneklerin Ağırlıkları

Denek ağırlıkları her grupta önce ve sonraki ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol ve ferulik asit grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak, hasar grubu olan gentamicin ve hasar+tedavi grubu olan gentamicin+ferulik asit gruplarında denek ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişmemiştir ($p>0,05$).

Tablo 6: Denek ağırlıklarının karşılaştırılması

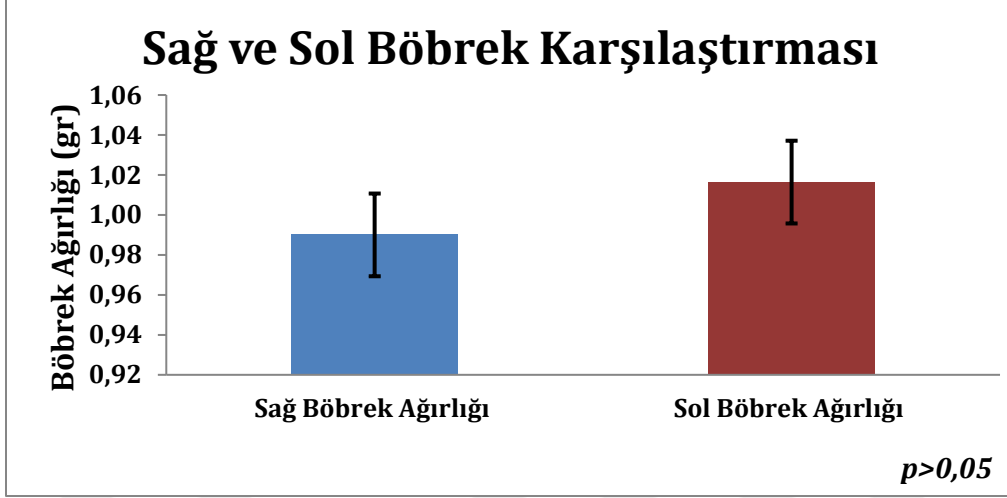
Değişkenler	Kontrol	Gentamicin	Gentamicin+Ferulik Asit	Ferulik Asit
Deney Öncesi Ağırlık (g)	164,7±4,1	222,5±5,2	200,8±5,6	206,2±4,6
Deney Sonrası Ağırlık (g)	202,7±5,7	226,2±4,8	214,1±8,9	234,9±9,3
<i>P-Değeri</i>	0,002	0,604	0,244	0,014



Grafik 1. Denek ağırlıklarının önce ve sonra karşılaştırmaları

Tablo 7: Sağ ve sol böbrek ağırlıklarının karşılaştırılması

Değişkenler	Ortalama± Std. Hata	P-Değeri
Sağ Böbrek Ağırlığı (g)	0,99±0,02	0,103
Sol Böbrek Ağırlığı (g)	1,02±0,02	

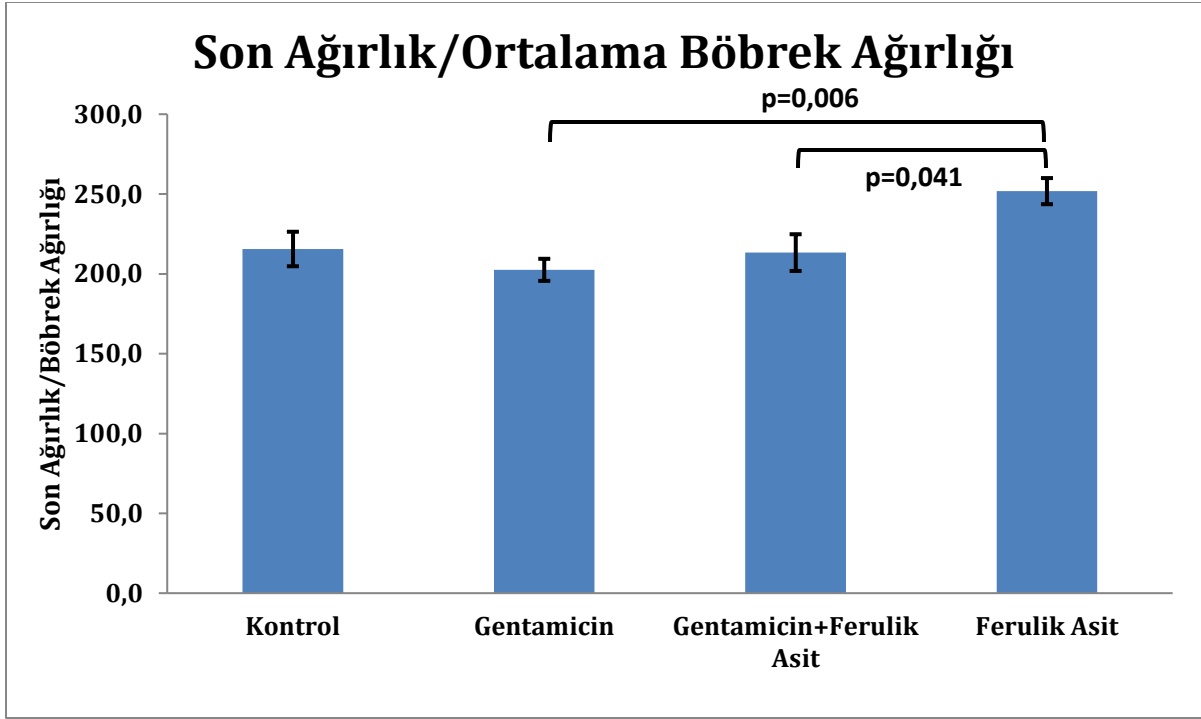


Grafik 2. Sağ ve sol böbrek ağırlık karşılaştırması

Son ağırlık ile ortalama böbrek ağırlığı oranları karşılaştırıldığında, ferulik asit ile gentamicin ve gentamicin+ferulik asit arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$).

Tablo 8:Son ağırlık ve ortalama böbrek ağırlığı oranı

Gruplar	Ortalama $\pm$ Std. Hata
Kontrol	215,6 $\pm$ 10,8
Gentamicin	202,5 $\pm$ 6,9
Gentamicin+Ferulik Asit	213,3 $\pm$ 11,5
Ferulik Asit	251,8 $\pm$ 8,2

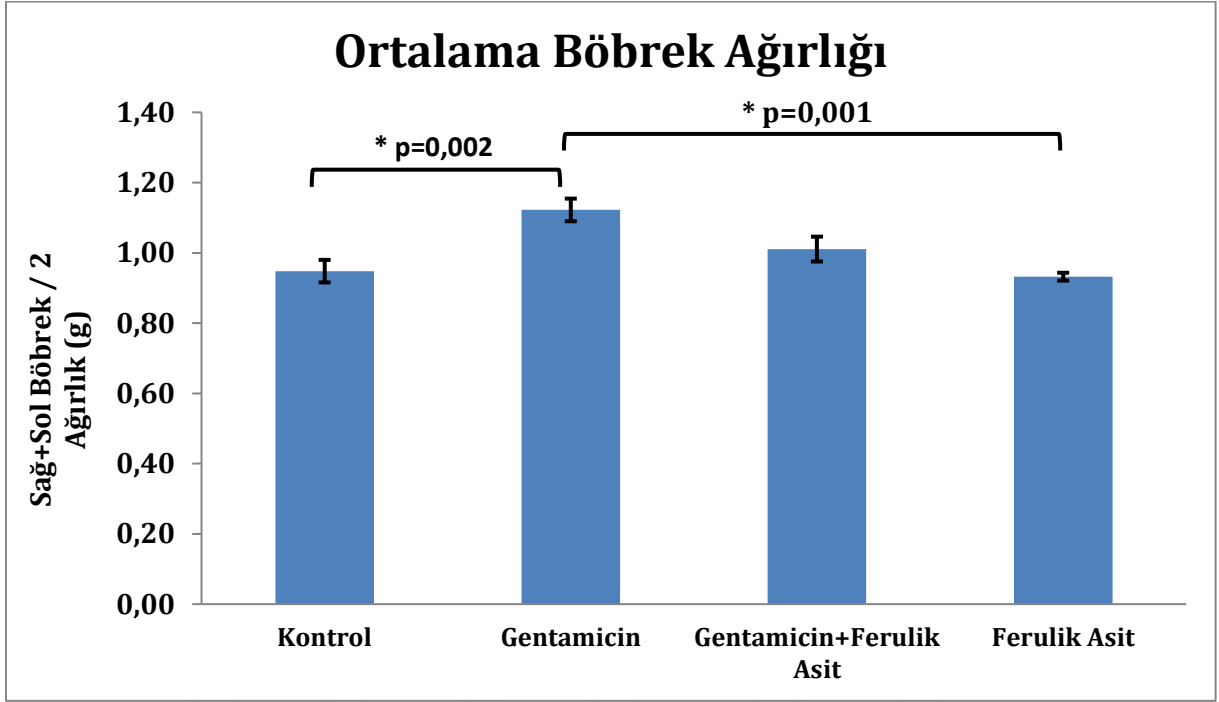


Grafik 3. Son ağırlık/ort. böbrek ağırlığı karşılaştırması

Ortalama böbrek ağırlıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında, gentamicin ile kontrol arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,002$) ve gentamicin grubunda anlamlı artış görüldü (Tablo 8 ve Grafik 8). Benzer durum, gentamicin ile ferulik asit grubu arasında da görülmektedir ve gentamicin (hasar) grubunda ferulik asit grubuna göre anlamlı artış görülmüştür ($p=0,001$). Ancak, gentamicin ile gentamicin+ferulik asit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,059$).

Tablo 9. Ortalama böbrek ağırlıkları

Gruplar	Ortalama±Std. Hata
Kontrol	0,95±0,03
Gentamicin	1,12±0,03
Gentamicin+Ferulik Asit	1,01±0,04
Ferulik Asit	0,93±0,01



Grafik 4. Ortalama böbrek ağırlıklarının karşılaştırılması

Böbrek Ağırlıkları:

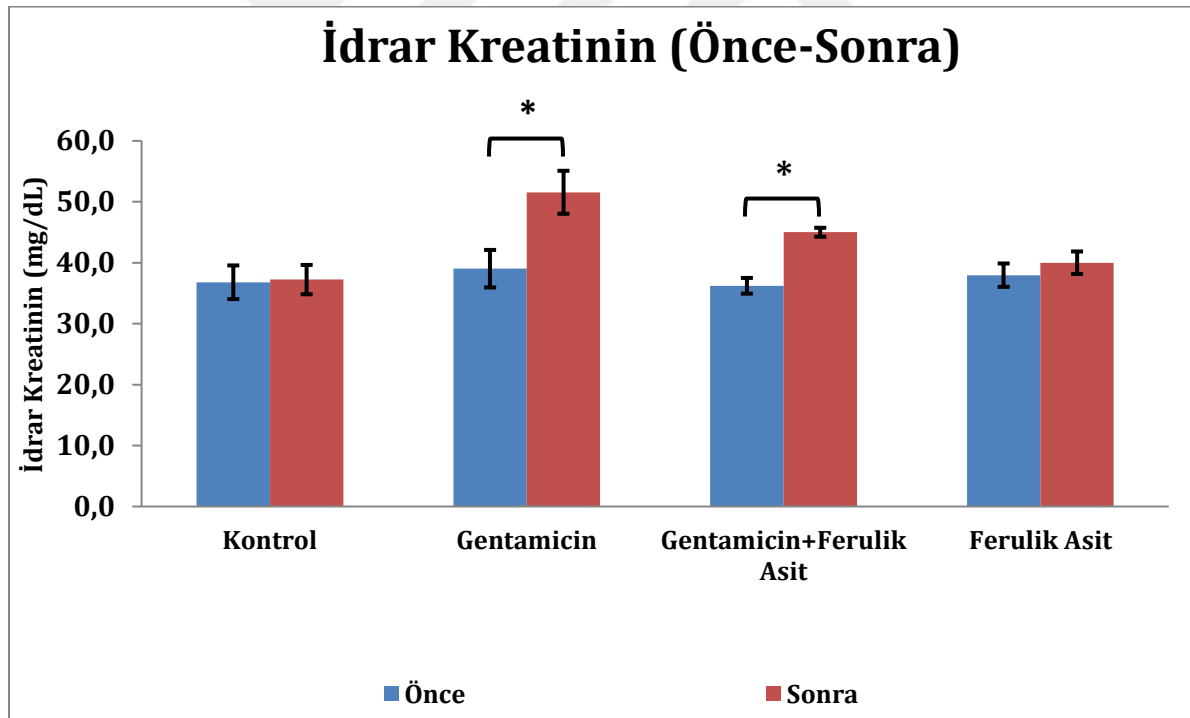
Sağ ve sol böbrek ağırlığı karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

4.2 Deneklerin İdrar ve Kandaki Üre ve Kreatinin Sonuçları

İdrarda kreatinin değerlerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırılmasında, kontrol ve ferulik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır ($p>0,05$). Gentamicin ve gentamicin+ferulik asit gruplarında ise önce ve sonraki ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 10. İdrarda kreatinin ölçümleri

Değişkenler	Kontrol	Gentamicin	Gentamicin+Ferulik Asit	Ferulik Asit
İdrar Kreatinin-Önce (mg/dL)	36,8±2,8	39,0±3,1	36,2±1,3	38,0±1,9
İdrar Kreatinin-Sonra (mg/dL)	37,2±2,4	51,6±3,5	45,0±0,7	40,0±1,9
<i>P-Değeri</i>	0,859	0,023	0,001	0,463

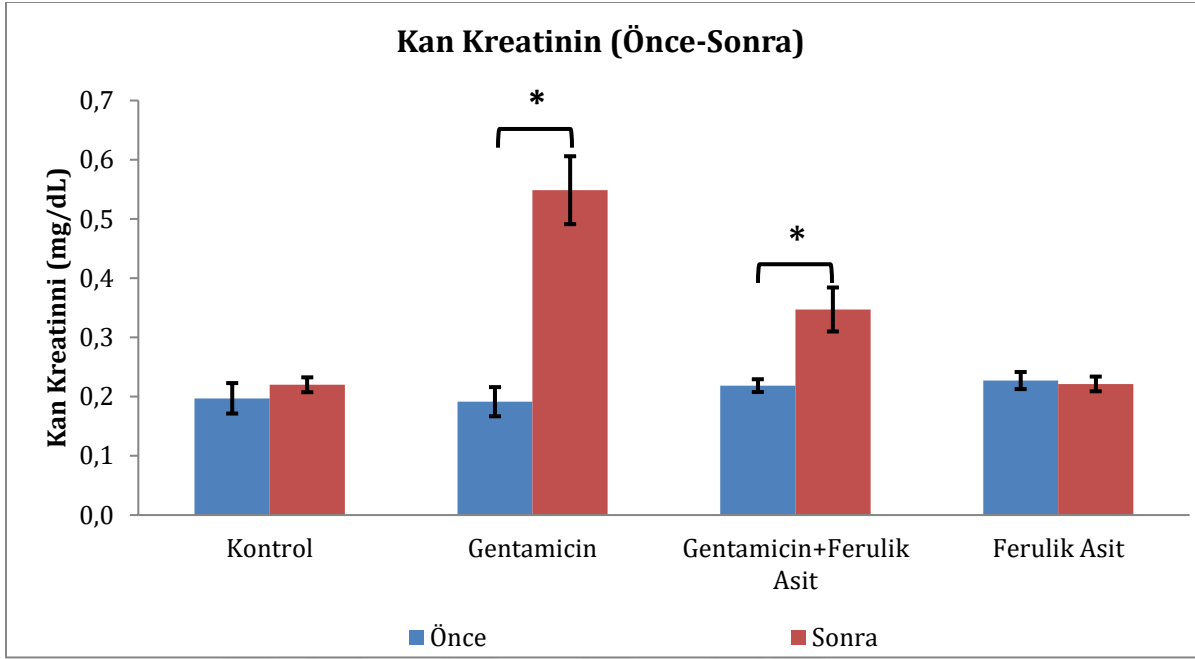


Grafik 5.İdrarda kreatinin ölçümü karşılaştırmaları

Kanda kreatinin değerlerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırılmasında, kontrol ve ferulik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır ($p>0,05$). Gentamicin ve gentamicin+ferulik asit gruplarında ise önce ve sonraki ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 11. Kanda kreatinin ölçümleri

Değişkenler	Kontrol	Gentamicin	Gentamicin+Ferulik Asit	Ferulik Asit
Kan Kreatinin-Önce (mg/dL)	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0	0,2±0,0
Kan Kreatinin-Sonra (mg/dL)	0,2±0,0	0,5±0,1	0,3±0,0	0,2±0,0
<i>P-Değeri</i>	0,439	0,001	0,029	0,742

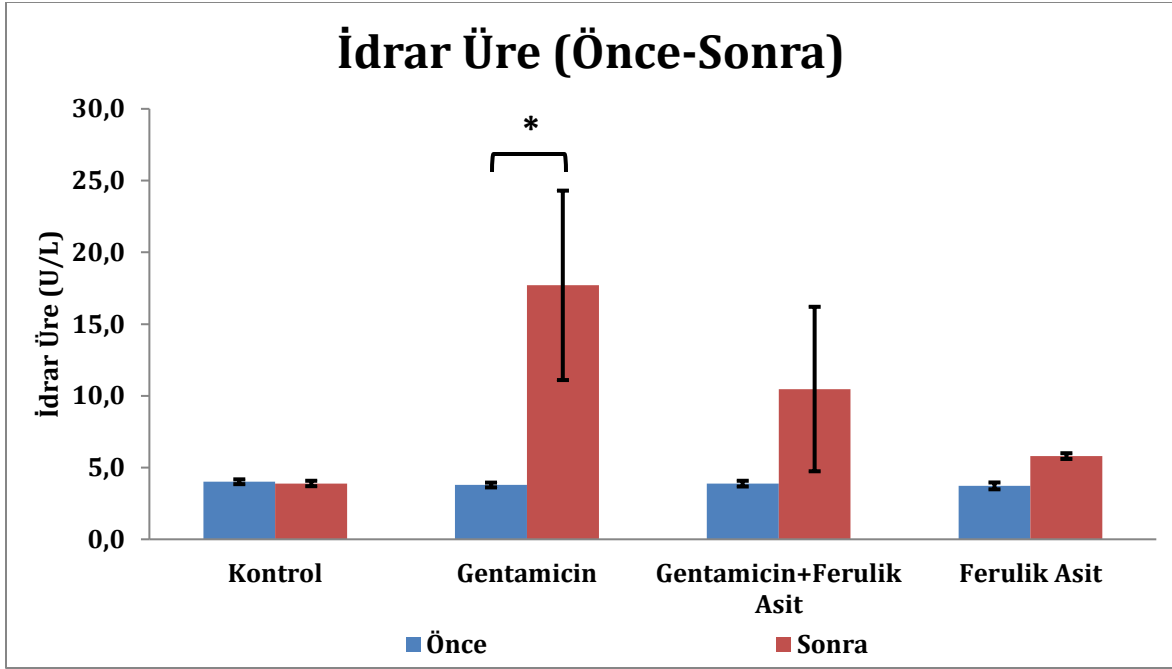


Grafik 6. Kanda kreatinin ölçümü karşılaştırmaları

İdrarda üre değerlerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırılmasında, kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır ($p>0,05$). Gentamicin (hasar) grubunda ise önce ve sonraki ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 12. İdrarda üre ölçümleri

Değişkenler	Kontrol	Gentamicin	Gentamicin+Ferulik Asit	Ferulik Asit
İdrar Üre-Önce (U/L)	4,0±0,2	3,8±0,2	3,9±0,2	3,7±0,2
İdrar Üre-Sonra (U/L)	3,9±0,2	17,7±6,6	10,5±5,7	5,8±0,2
<i>P-Değeri</i>	0,297	0,0001	0,298	0,075

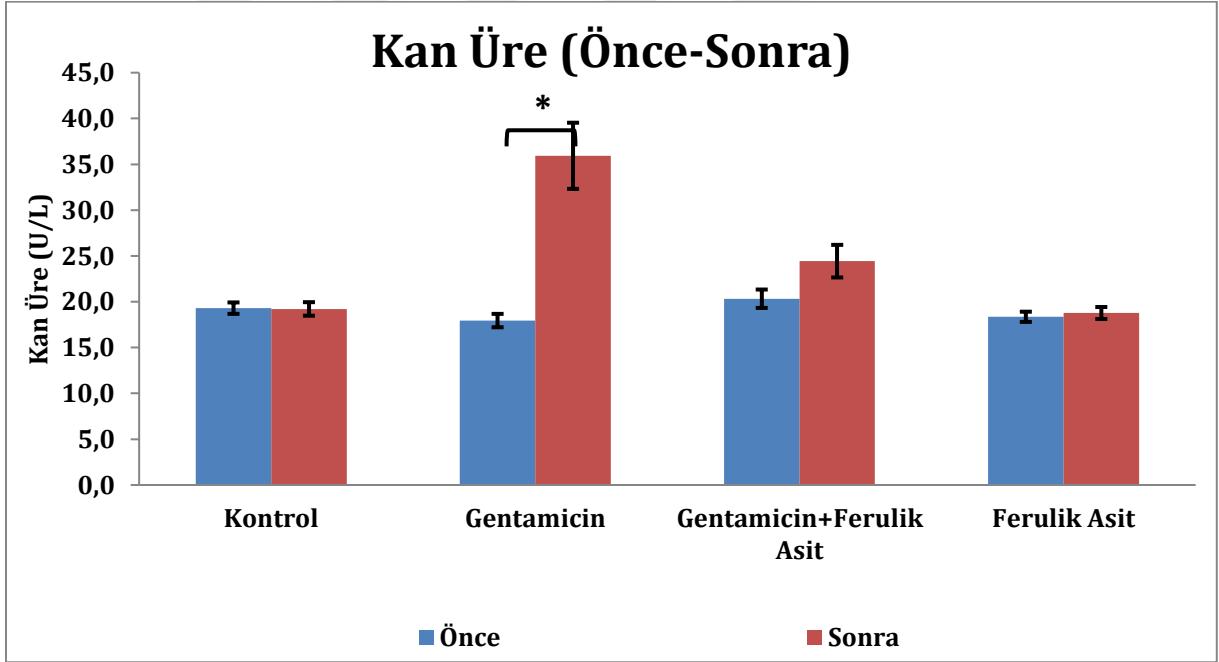


Grafik 7. İdrar üre önce ve sonra karşılaştırması

Kanda üre değerlerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırılmasında, kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmamıştır ($p>0,05$). Gentamicin (hasar) grubunda ise önce ve sonraki ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 13.Kan üre ölçümleri

Değişkenler	Kontrol	Gentamicin	Gentamicin+Ferulik Asit	Ferulik Asit
Kan Üre-Önce (U/L)	19,3±0,6	17,9±0,7	20,3±1,0	18,4±0,6
Kan Üre-Sonra (U/L)	19,2±0,7	35,9±3,6	24,4±1,8	18,8±0,7
<i>P-Değeri</i>	0,925	0,003	0,089	0,681



Grafik 8. Kanda üre değerinin önce ve sonra ölçümlerinin karşılaştırılması

4.3 Histolojik Bulgular

4.3.2 4.3.1 Hemotoksilen Eozin Boyama Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait bulgular: Kontrol grubu deneklerinden alınan böbrek korteks ve medulla materyalleri ışık mikroskopunda incelendiğinde, normal görünümlü Malpighi cisimcikleri, proksimal tübüller ve distal tübüller, toplayıcı borular, damarlar ve normal görünümde tubulointerstisyel alanlar gözlenmiştir. (Resim 1,2).

Malpighi korpüskülünün korteksteeki sayısı normal düzeyde, çapları ise normal morfolojide gözlenmiştir. (Resim 2).

Proksimal tübüller piramidal şekilli hücrelerden oluşan epitelleri ile dar bir lümeneye sahip olarak normal morfolojide gözlenmiştir. Tübül hücrelerinin apikal yüzey farklılaşmaları olarak bilinen fırçamsı kenar oluşumu proksimal tübüllerde düzenli bir görünüm sergilemiştir. Geniş bir lümeneye sahip olan distal tübüller izoprizmatik hücrelerle döşeli ve normal çapta gözlenmiştir.

Medulladaki toplayıcı borular normal çapta gözlenmiştir. (Resim1).

Ferulik Asit grubuna ait bulgular: FA grubu deneklerinden elde edilen böbrek korteks materyalleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; normal görünümlü Malpighi cisimcikleri, proksimal ve distal tübüller, toplayıcı borular ve tubulointerstisyel alanlar gözlenmiş olup kontrol grubundan farklı bir bulgu tespit edilmemiştir. (Resim 3,4).

Gentamisin grubuna ait bulgular: Sadece GM verilen 3. grup deneklerimizin böbrek korteksi incelendiğinde; kontrol ve FA gruplarından farklı olarak, en belirgin değişiklik tübüller alanlarda gözlenmiştir. Histolojik olarak göze çarpan ilk değişiklik tübüller genişlemeler olarak gözlenmiştir. Genişlemiş tübüller korteksin dış kısmında daha çok görülmüştür. Bu tübüller iç kısma doğru uzanan ve medullada devam eden, lümenleri ileri derecede genişlemiş, oval yuvarlak ve spiral şekilli yapılar olarak gözlenmiştir. (Resim 5,6,7,8,9,10). Bu genişlemeler özellikle distal tübüllerde gözlenmiştir. (Resim 16,8,9,10). Ayrıca bu genişlemiş tübüllerin içerisinde yer yer deskuame olmuş hücrelere rastlanmıştır. (Resim5,6). Yine, özellikle genişlemiş tübüllerin lümeninde hyalin cast olarak adlandırılan eozinofilik boyanmış yapılar gözlenmiştir (Resim 7,8).

Tübüler hasarın bir diğeri de proksimal tübüllerde gözlenmiştir. Tübülleri döşeyen epitel ileri derecede dejeneratif değişiklikler göstermiştir. Tübülleri döşeyen epitel

hücrelerinin sitoplazmasında, nukleusların ayırdedilemediği, epitel hücrelerinin yer yer lümeneye döküldüğü (deskuamasyon), hücre içi vakuolleşmenin belirtisi olarak sitoplazmada köpüksü bir görünüm oluştuğu (sitoplazmik vakuolizasyon) tespit edilmiştir (Resim8,9).

Kortekste ve kortikomeduller sahada bazıları damar çevresinde bazıları malpighi cisimciği çevresinde olmak üzere çok sayıda lökositik infiltrasyon odaklarına rastlanmıştır (Resim 10,11,12,13).

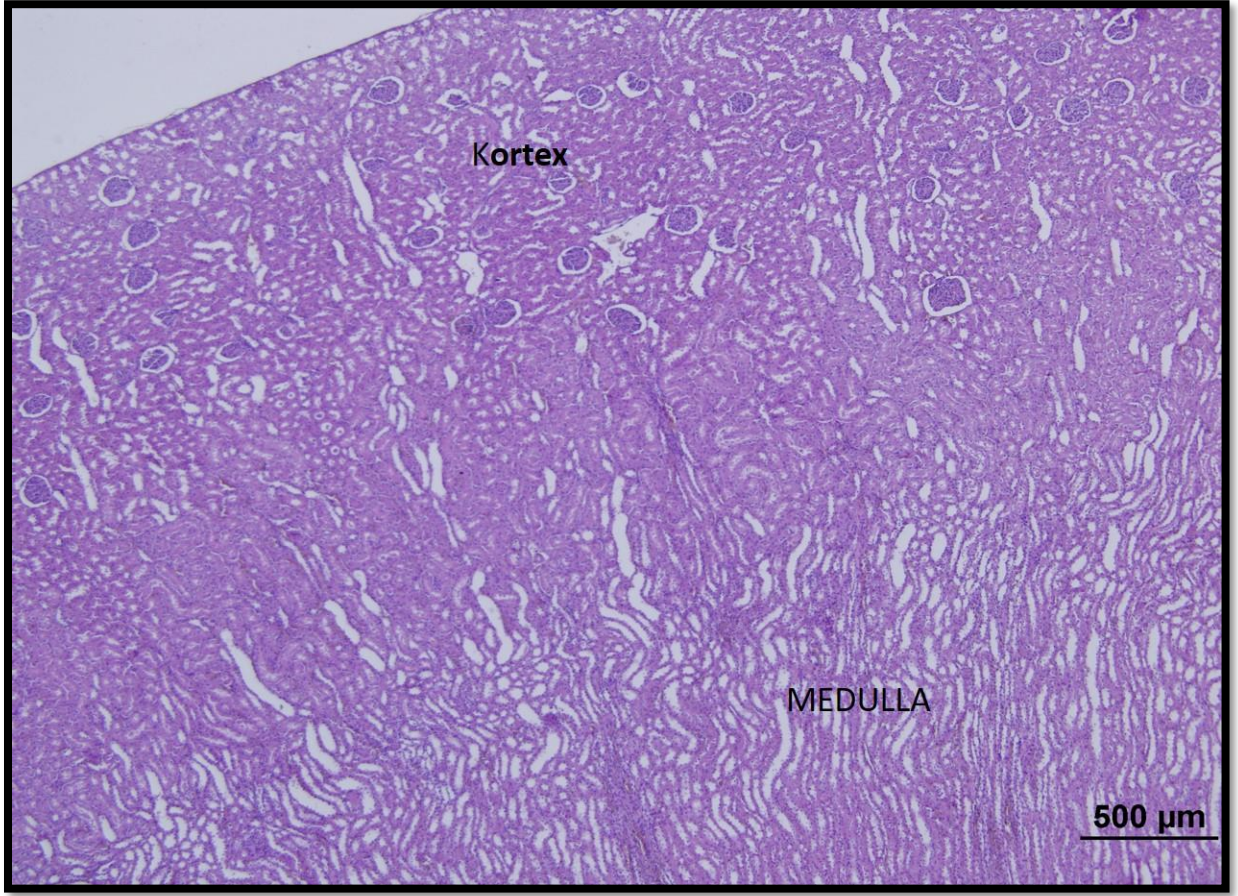
Malpighi cisimciklerinin bazıları, normal büyüklük ve şekillerini kaybetmiş olarak gözlenmiştir. Bu cisimciklerde glomerüler yapının küçülmesi sonucu Bowman boşluğunun düzensizleştiğini ve genişlediği gözlemlenmiştir. (Resim 11,12). Lökositik infiltrasyon alanları içerisinde kalan bazı Malpighi cisimciklerinde glomerüler yapının büyük oranda dejenere olmuş olarak gözlenmiştir. (Resim 12).

Kortex ve medullada tubulointerstisyel alanda eritrosit ekstravazasyonuna rastlanmıştır.(Resim 7,13)

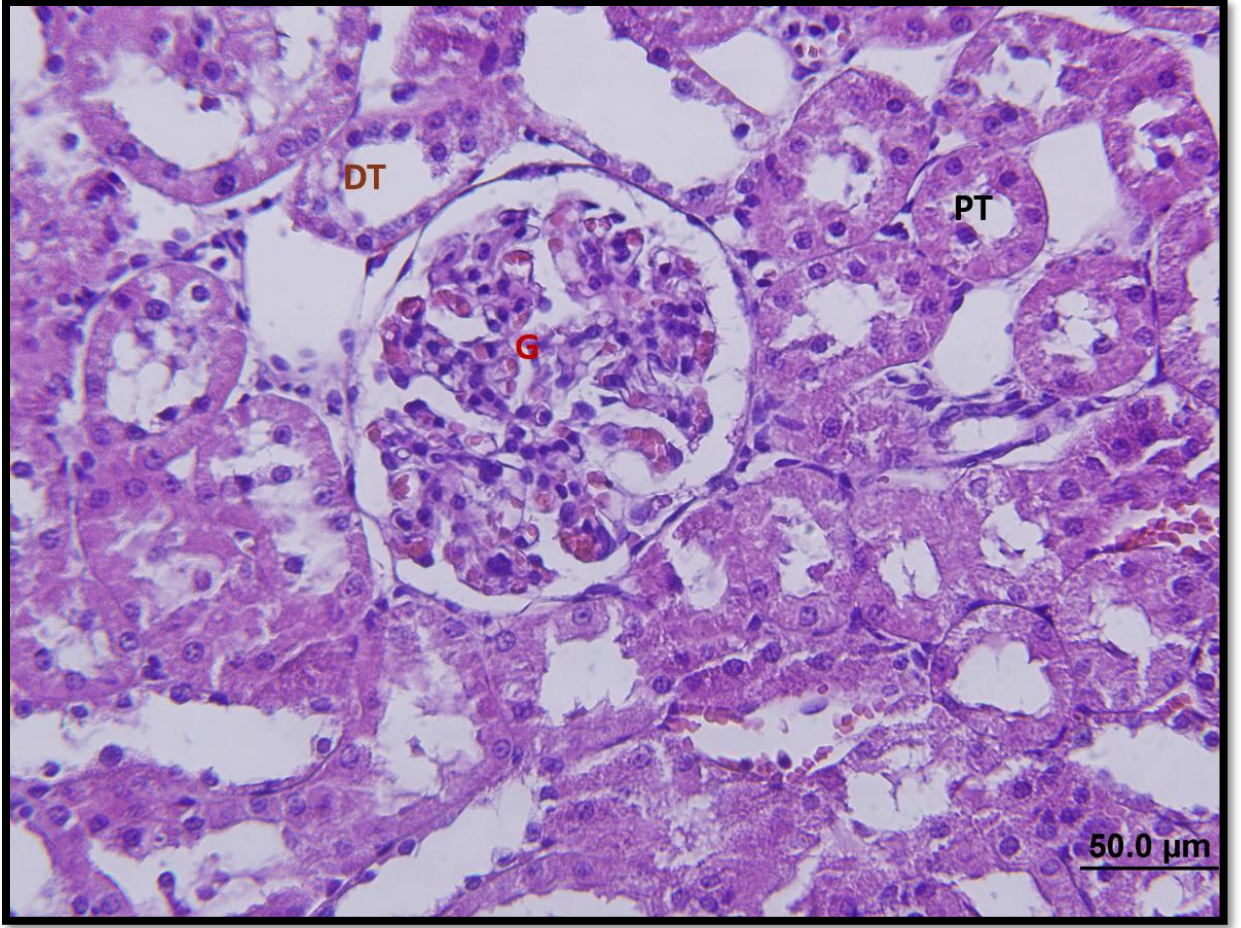
Gentamisin+Ferulik asit grubuna ait bulgular: GM ile birlikte FA verdiğimiz 4. grup deneklerimizden elde edilen böbrek korteks materyalleri ışık mikroskopunda incelendiğinde; GM grubuna göre, genel olarak yapının korunduğu, korteks bölgesinin çok daha düzgün bir histolojik görünüme sahip olduğu görülmüştür. (Resim14,15).

GM grubunda gözlenen, özellikle korteksin dış kısmında yaygın yerleşen ve medullada devam eden oval ve spiral görünümlü genişlemiş tübüllerin sayısı ve çapları belirgin azalmış olarak gözlenmiştir. Ayrıca, çoğu tübülleri çevreleyen hücrelerin nukleusları da yuvarlağa yakın olarak gözlenmiştir. Genişlemiş tübüllerin lümeninde yer alan hyalin cast'ler de sayıca azalmıştır (Resim16).

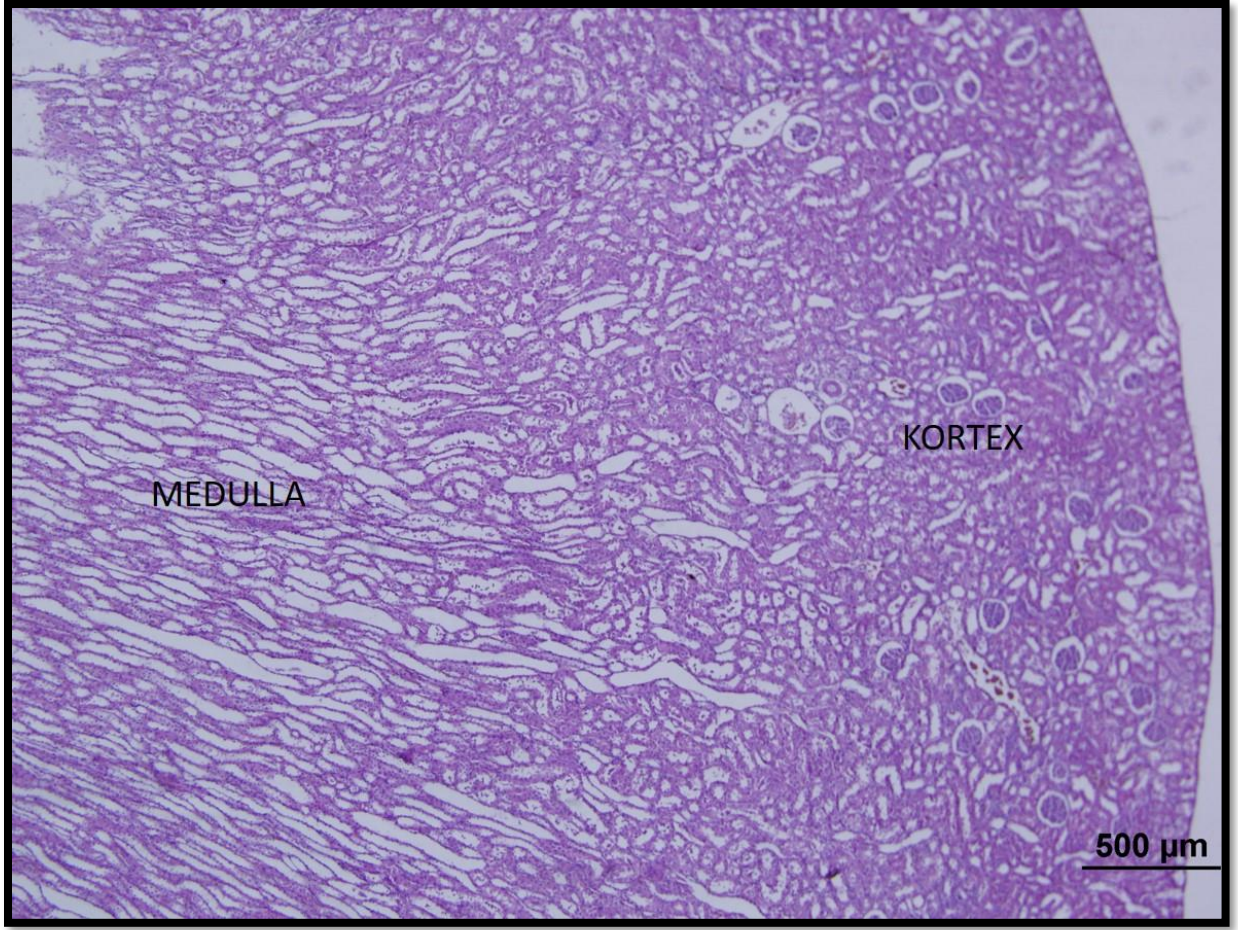
GM grubundaki dejenerasyonun aksine kortekte daha çok asidofilik hücrelerin döşediği normale yakın görünümlü proksimal tübüller gözlenmiştir (Resim14) Kortekste ve kortikomeduller sahada damar çevresinde yerleşim gösteren lökositik infiltrasyon alanları sayı ve çap olarak oldukça azalmıştır (Resim 16). Yine Malpighi cisimciklerinin etrafında görülen bu infiltrasyon alanlarında azalma gözlenmiştir (Resim16). Malpighi cisimciklerinin çoğu, şekil ve yapı bakımından normale yakın olarak gözlenmiştir. Glomerüler küçülme azalmış ve buna bağlı olarak Bowman boşluğu da normale yakın olarak görülmüştür (Şekil 16).



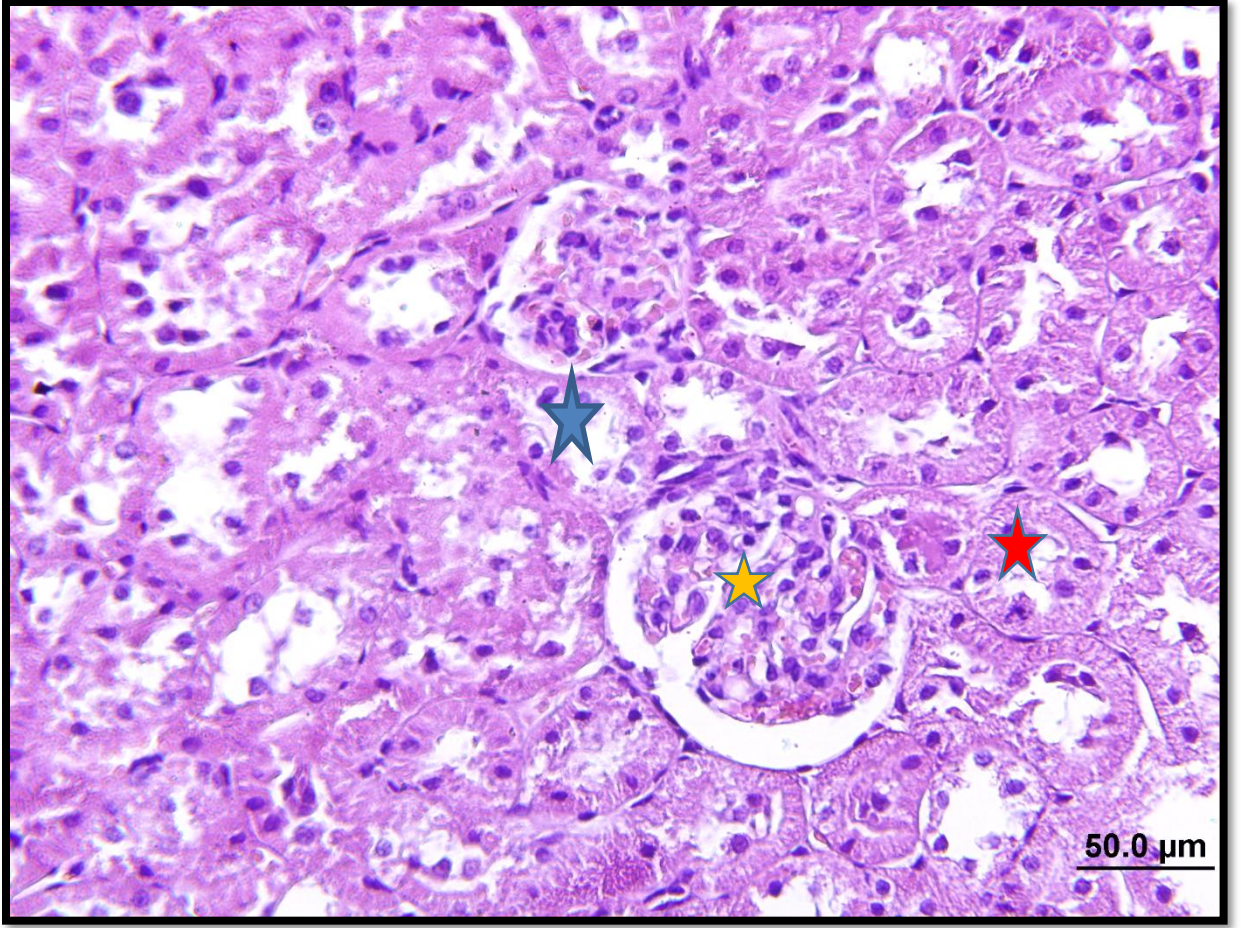
Resim 1: Kontrol grubuna ait korteks ve medulla kesitleri x4 H&E



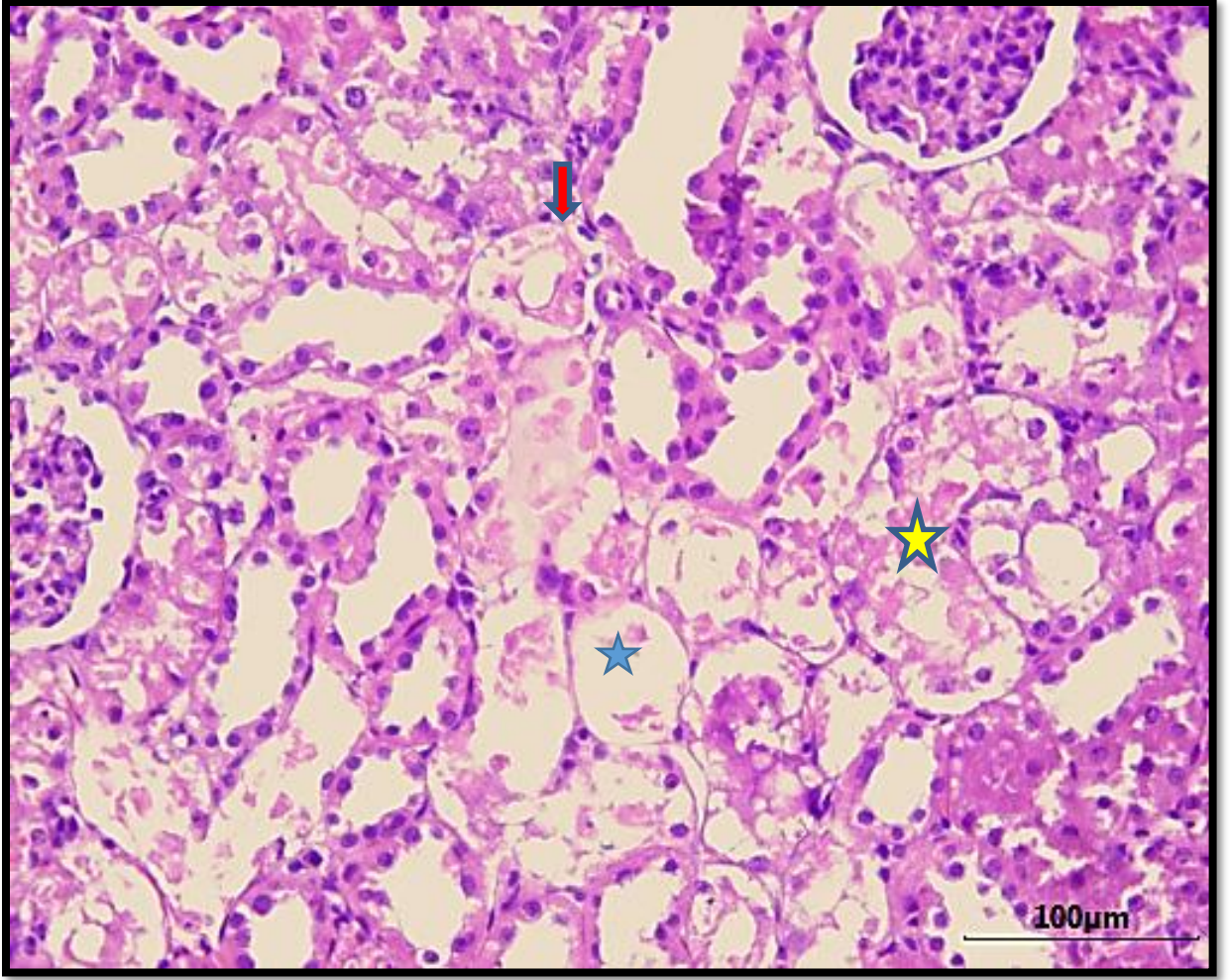
Resim 2: Kontrol grubuna ait kesitte **G**=Glomerul,**DT** distal tubul ,**PT** proksimal tubülü ifade etmektedir. X40 H&E



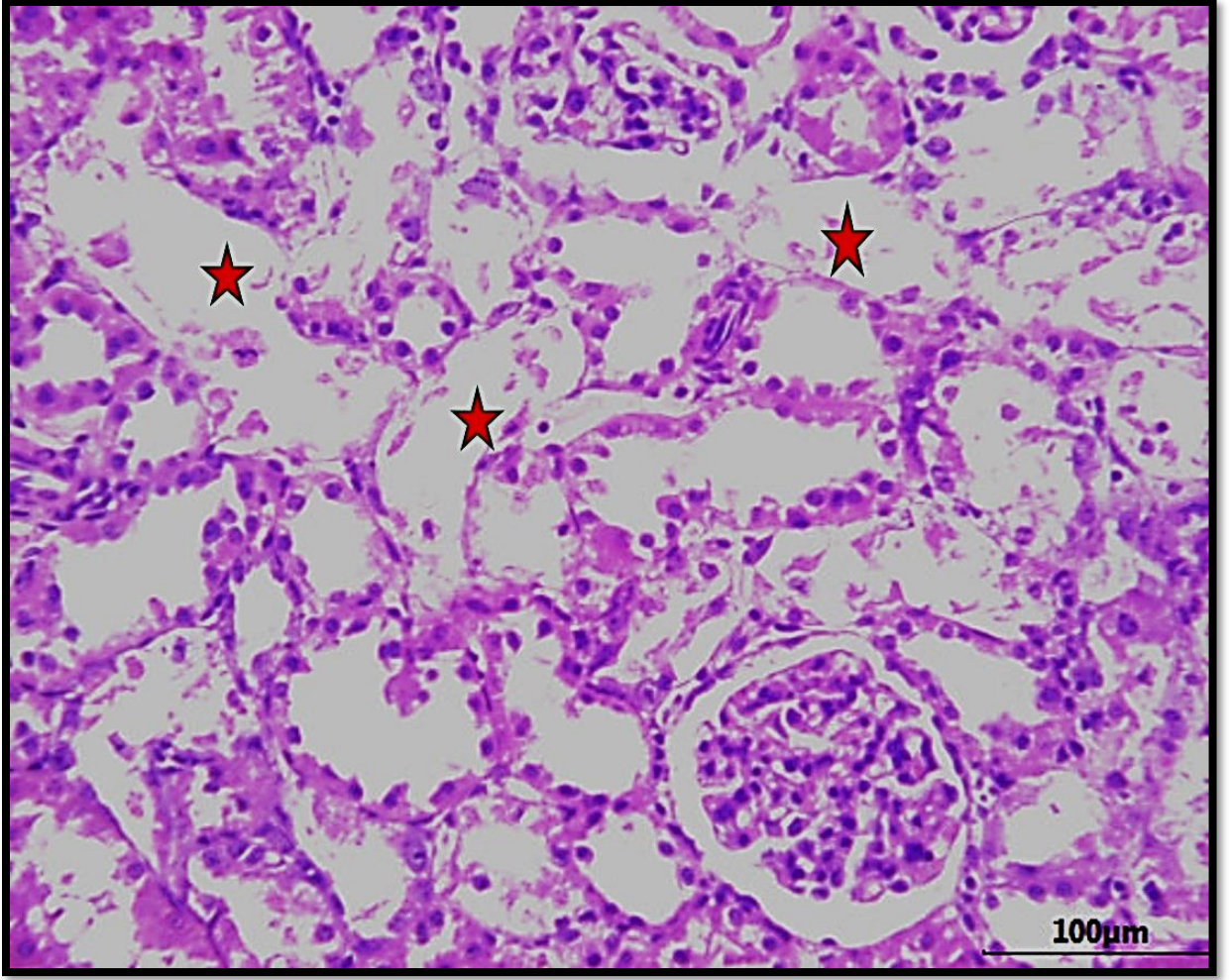
Resim 3: FA grubuna ait kesitte Kortex ve Medulla x4 H&E



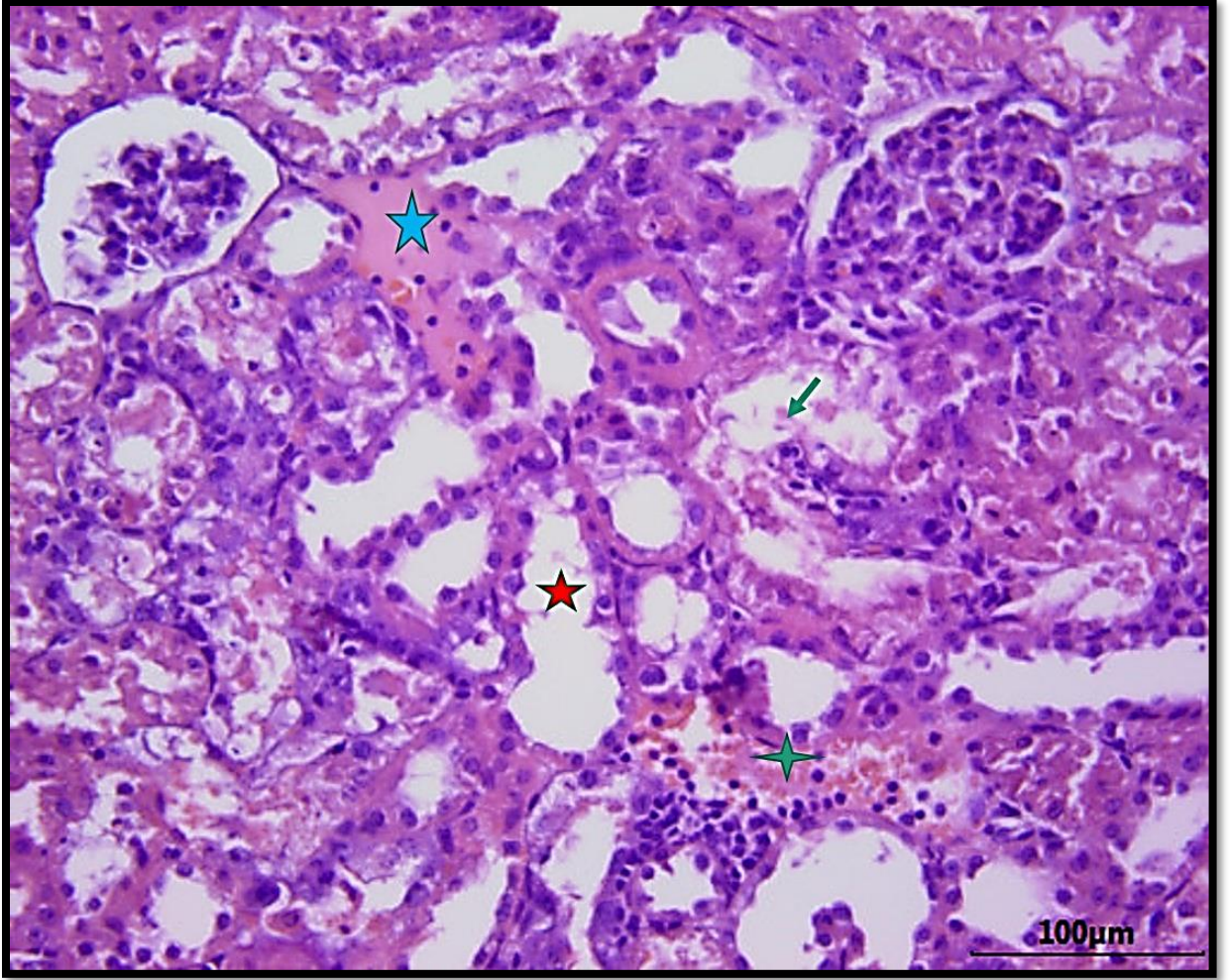
Resim 4:FA grubu normal morfolojide proksimal ve distal tub  ller ile normal morfolojide glomerul yapısı izlenmektedir. (H&E)



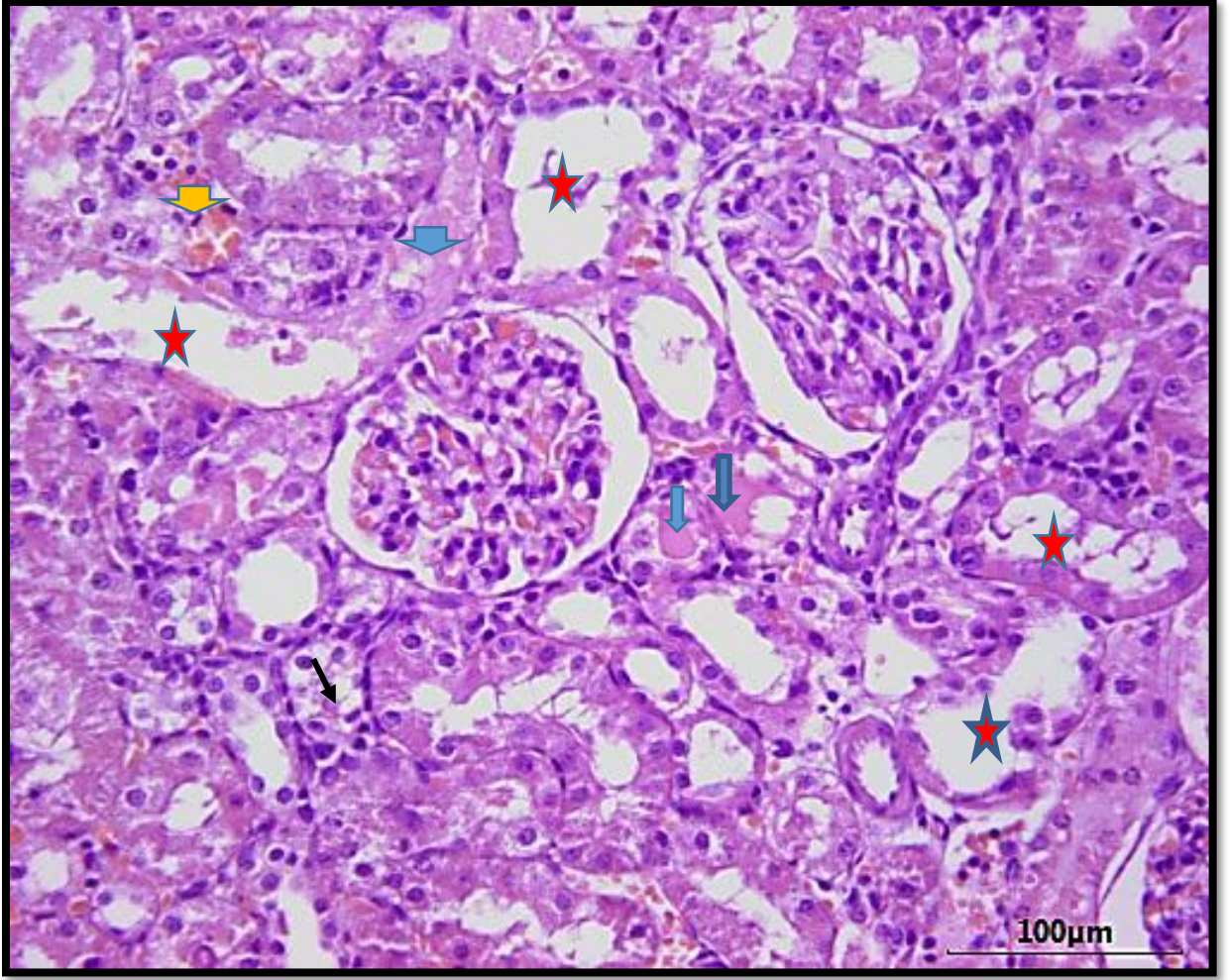
Resim 5: GM grubunda tubüllerde ileri derecede dejenerasyon, tubüler dilatasyonu, tubüler vakuolizasyon. H&E



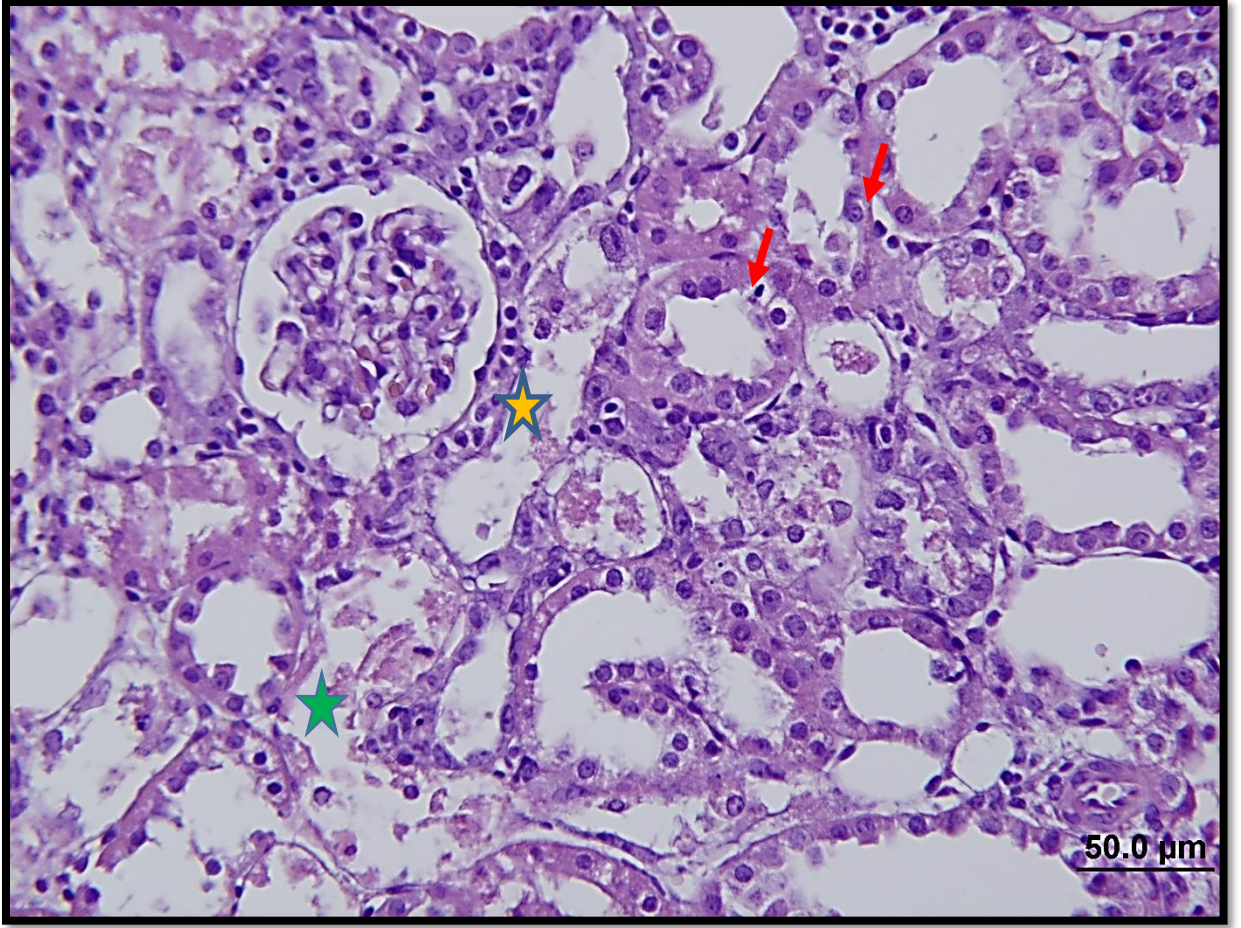
Resim 6: GM grubunda ileri derecede tubuler dilatasyon. H&E



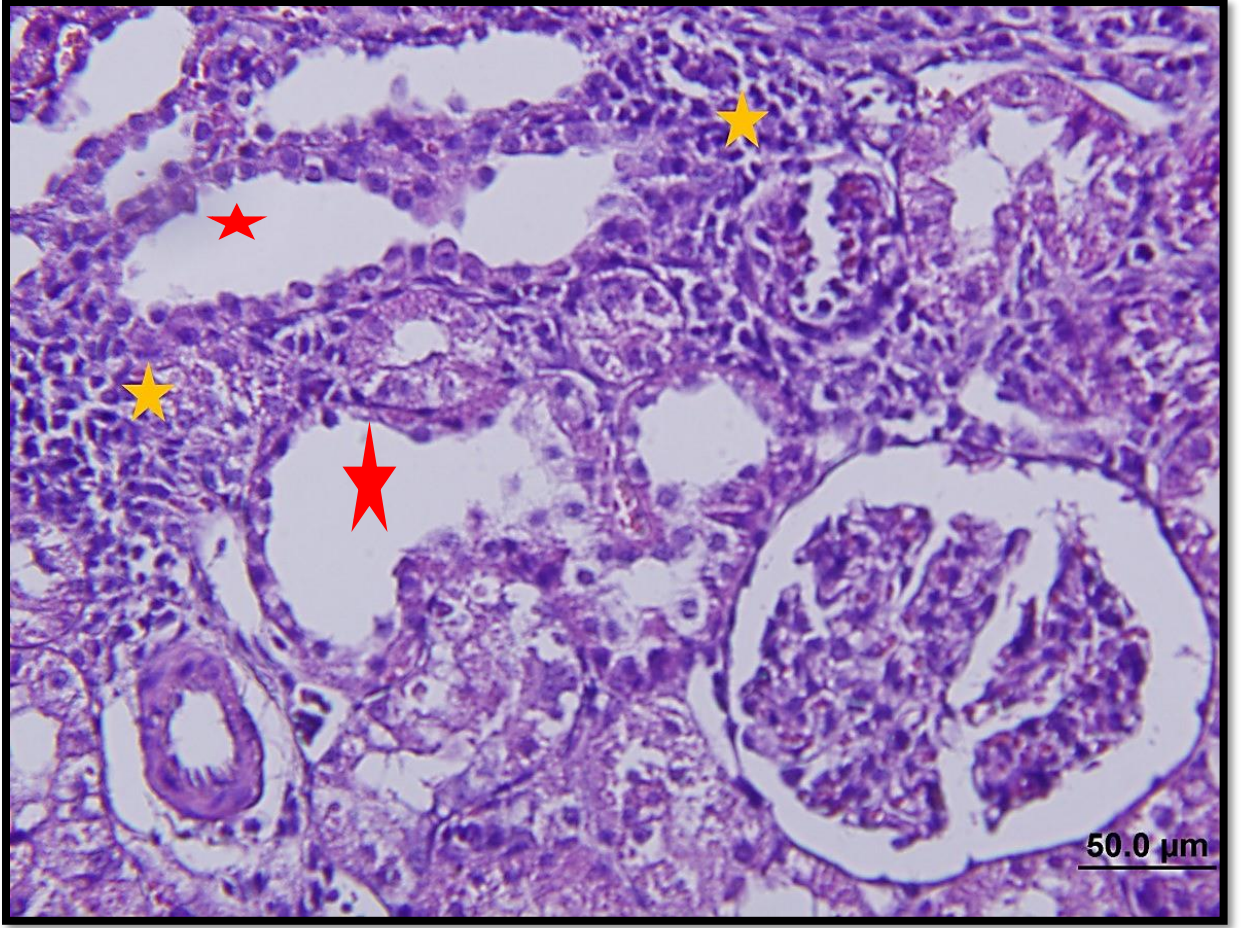
Resim 7: GM grubunda tubüler dilatasyon tubuler dejenerasyon (epitel hücrelerinin lümene dökülmesi), Mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ektravazasyonu .H&E



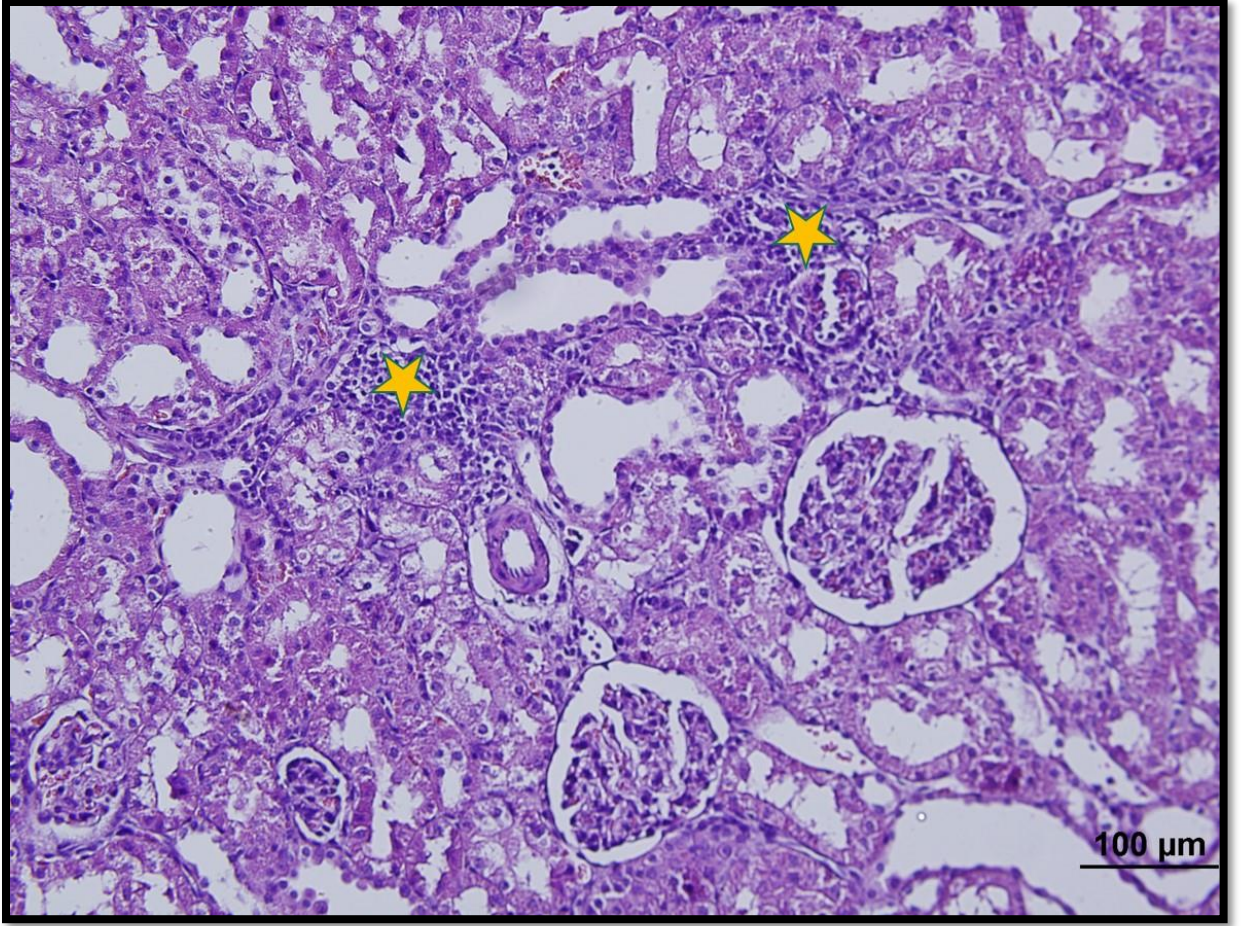
Resim 8: GM grubunda eritrosit ekstravazasyonu, tubüler dilatasyon ,hiyalin kast ,tübüler vakuolizasyon .x 20 H&E



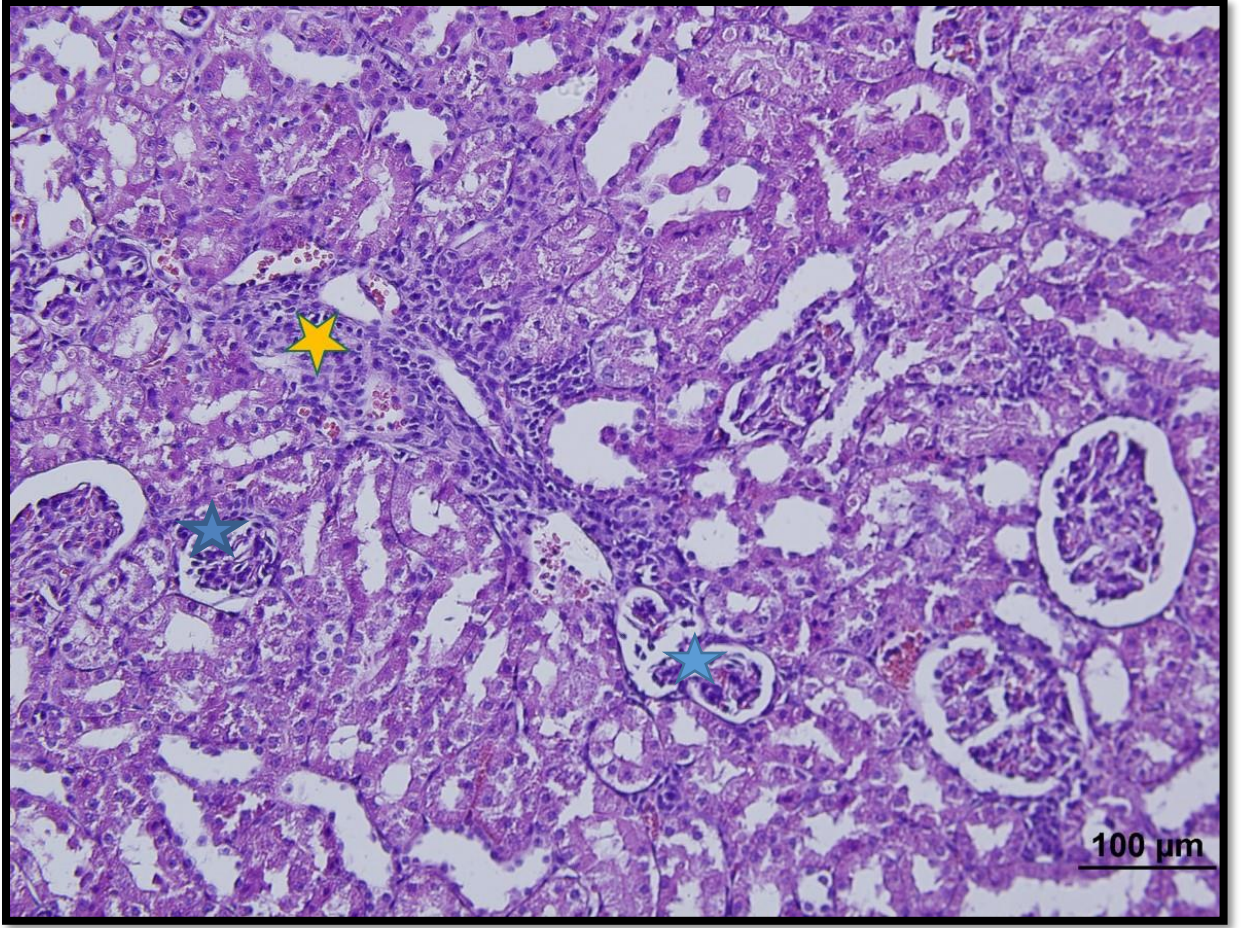
Resim 9: GM grubunda tubüler vakuolizasyon, Tubüler dilatasyon, epitel deskuamasyonu(Tubuler dejenerasyon) x40 H&E



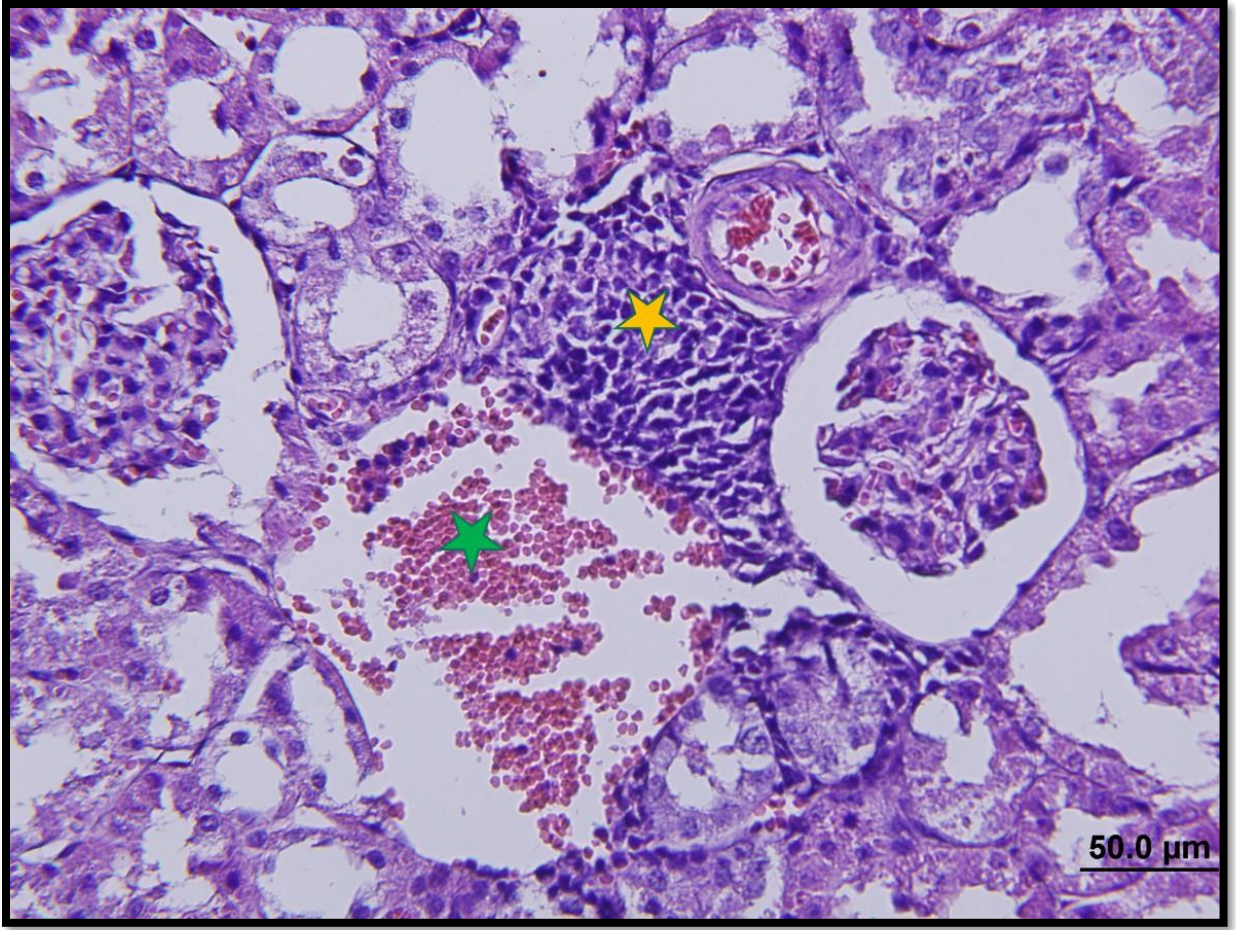
Resim 10: GM grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu,tubuler dilatasyon x40 H&E



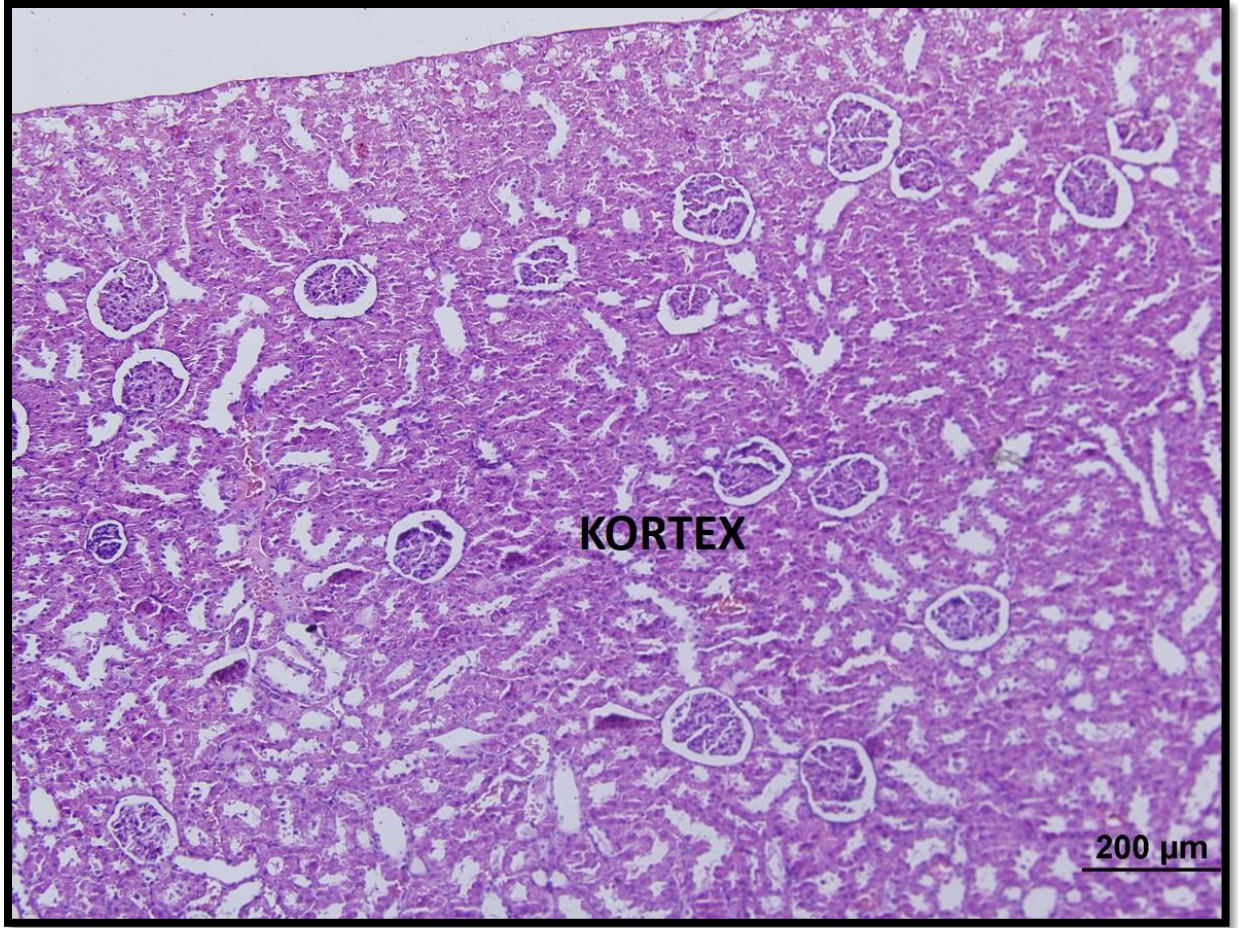
Resim 11: GM grubunda tubulointerstisyel alanda MNH infiltrasyonu.x20 H&E



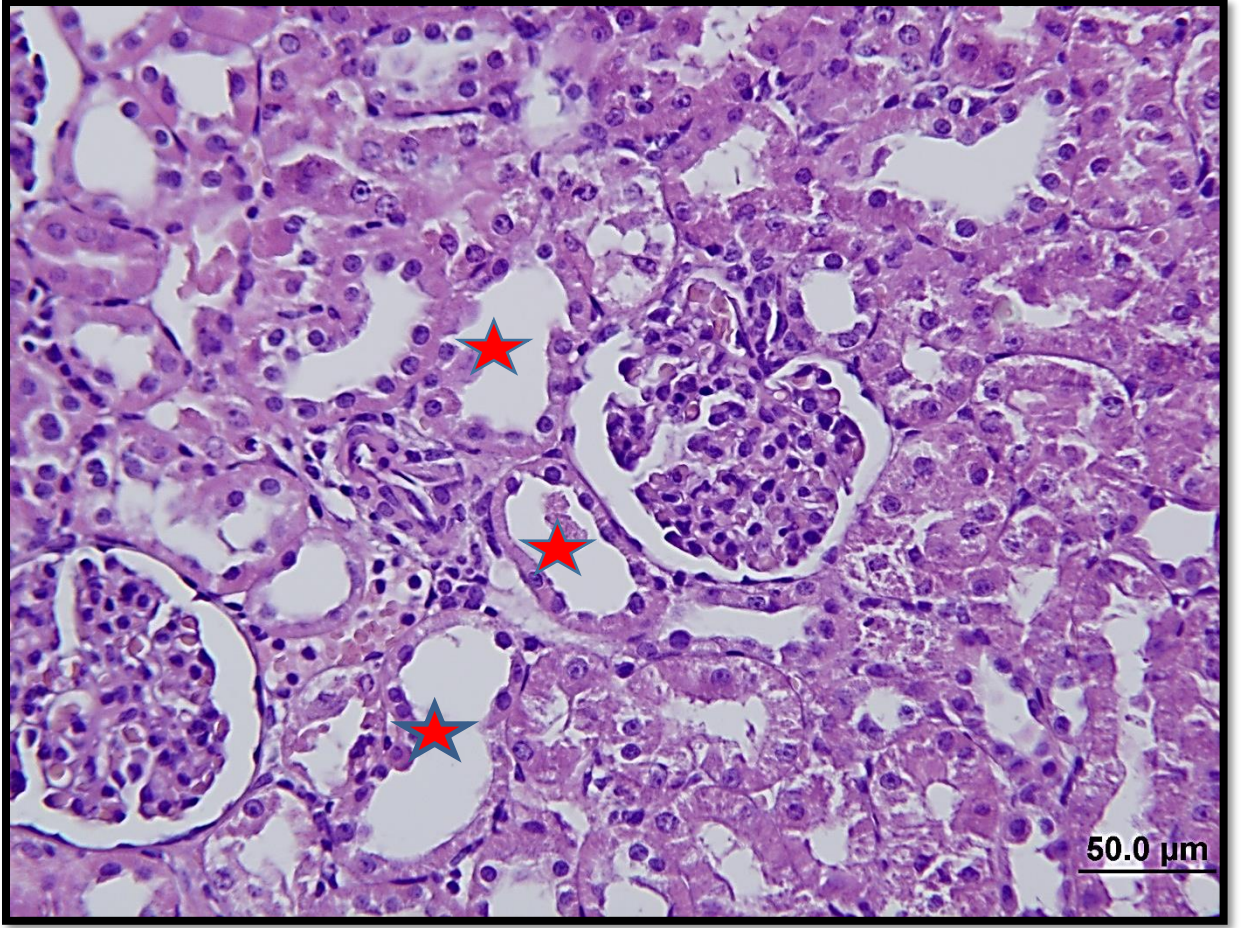
Resim 12: GM grubunda tubulointerstisyel alanda MNH infiltrasyonu ,glomerul yapısında deformasyon.x 20 H&E



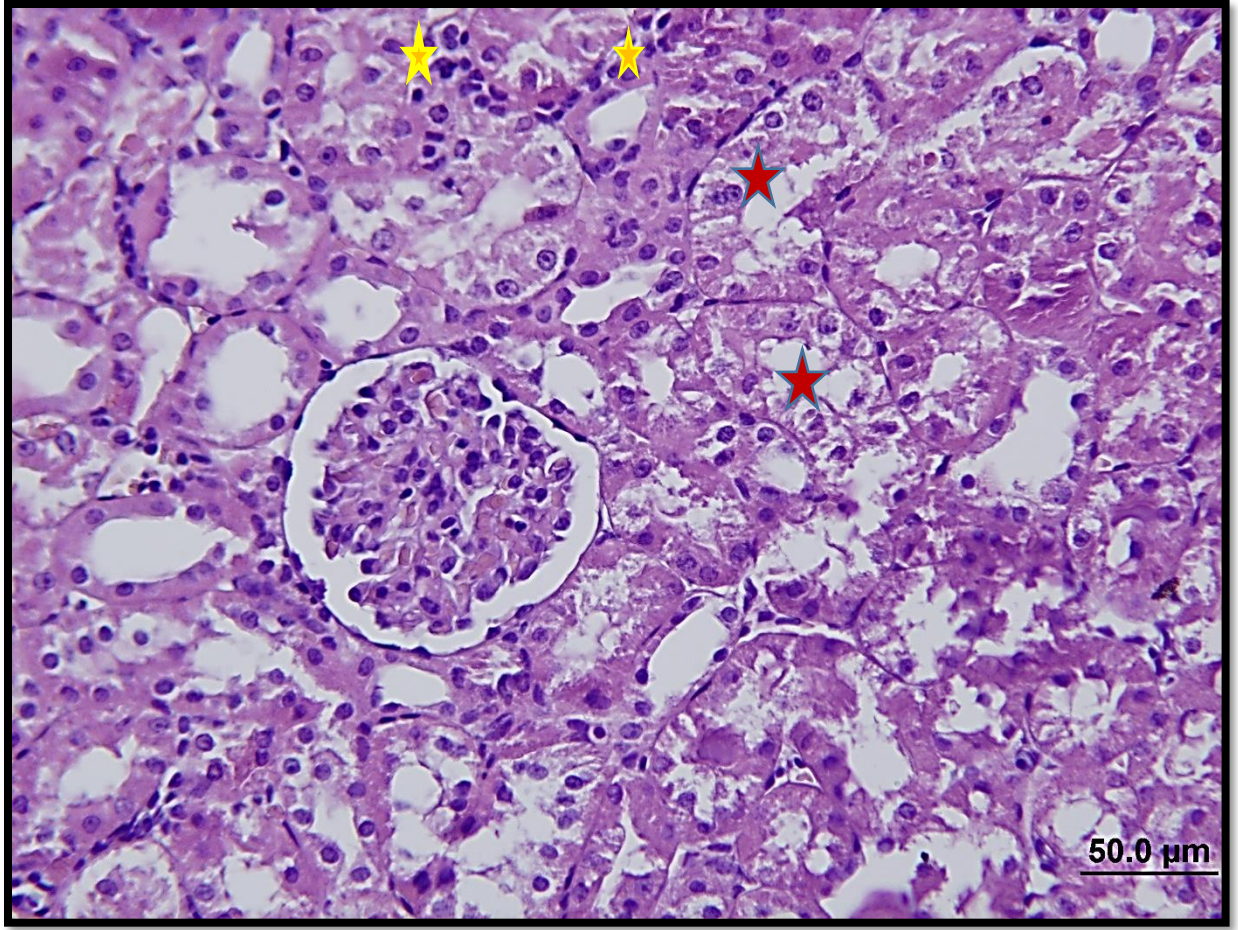
Resim 13: GM grubunda glomerul çevresinde MNH infiltrasyonu ve eritrosit ekstravazasyonu .x40 H&E



Resim 14: GM+FA grubunait kesitte kortex x10. H&E



Resim 15: GM+FA grubunda glomerul yapısı normal morfolojide izlenmekle beraber hafif şiddette tubuler dilatasyon ve izlenmektedir.x40 H&E

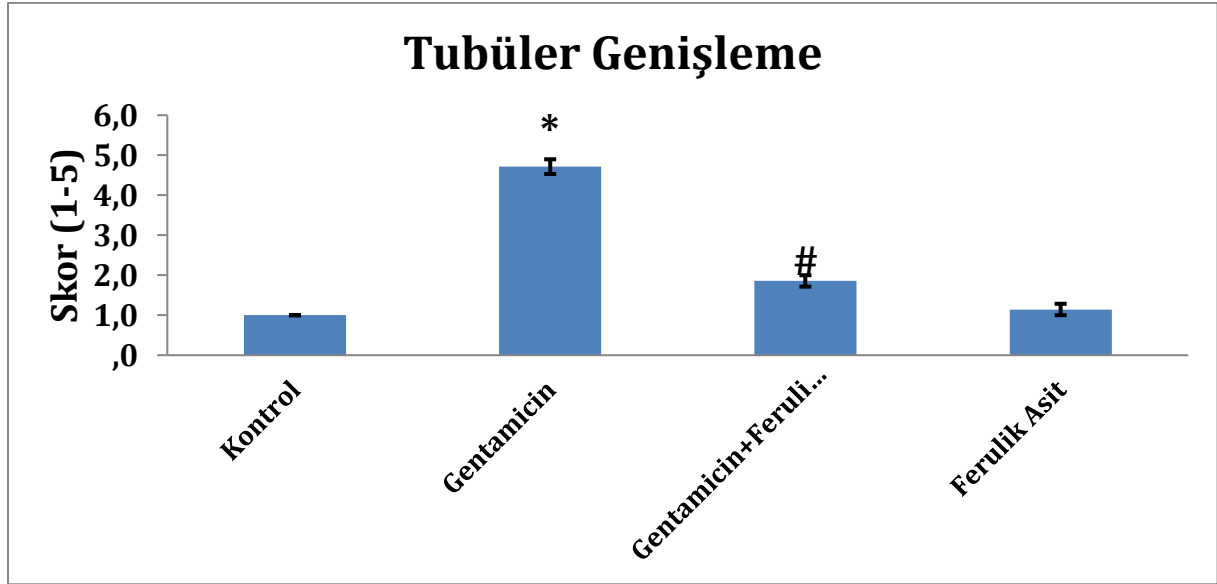


Resim 16: GM+FA grubunda az miktarda MNH infiltrasyonu, seyrek ve az şiddette tubüler dilatasyon izlenmektedir.x40H&E

Tablo 14. Histolojik parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması

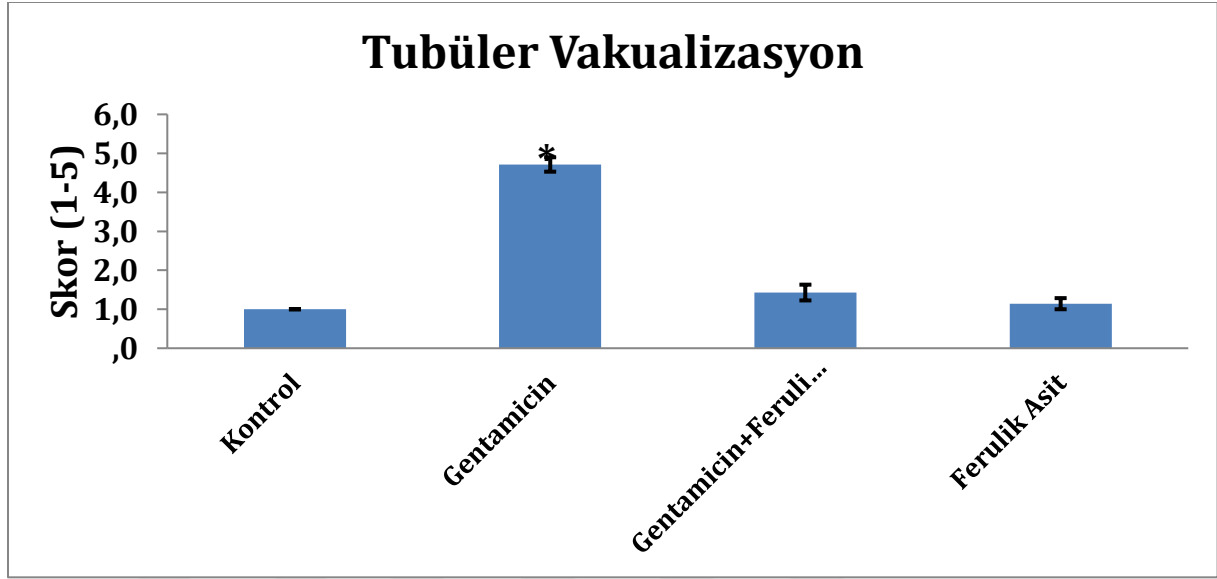
Gruplar	Tübüler Genişleme	Tübüler Vakualizasyon	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	Fırçamsı Kenar Kaybı	Hiyalin Kast
	Ortalama±Std. Hata				
Kontrol	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	1,1±0,1	1,0±0,0
Gentamicin	4,7±0,2	4,7±0,2	4,6±0,2	4,6±0,2	4,7±0,2
Gentamicin+Ferulik Asit	1,9±0,1	1,4±0,2	1,4±0,2	1,3±0,2	1,1±0,1
Ferulik Asit	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,0±0,0	1,1±0,1

Tubular genişleme skorlarında gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Benzer durum olarak gentamicin+ferulik asit ile kontrol ve ferulik asit grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile ferulik asit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



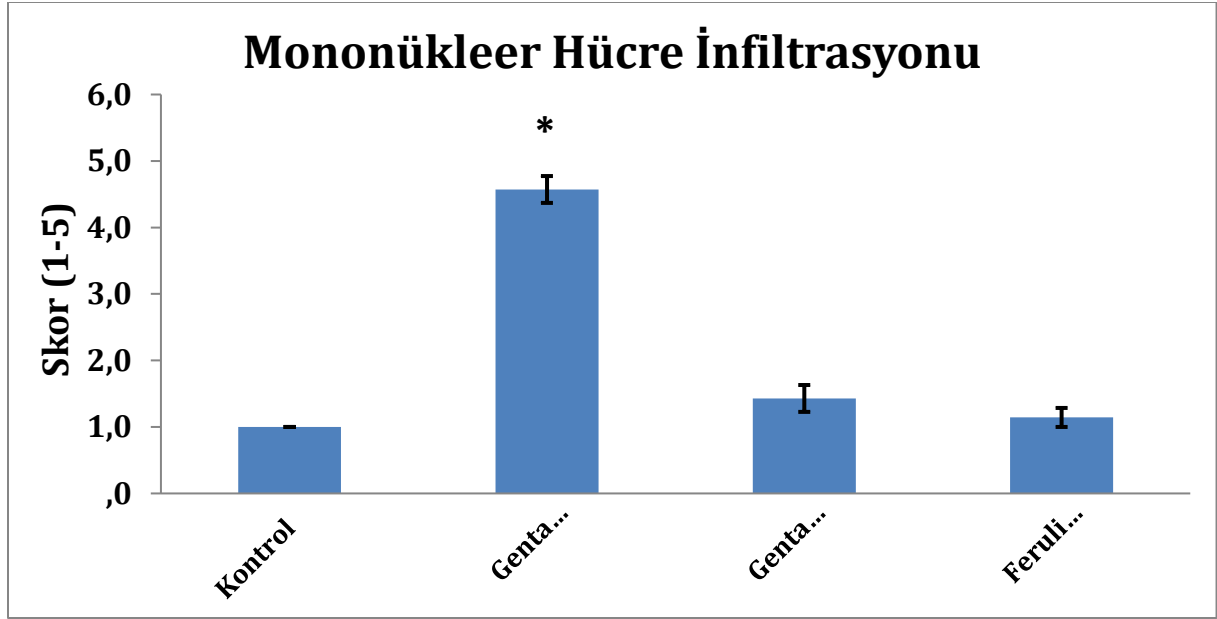
Grafik 9. Tubüler genişleme karşılaştırması

Tubular vakualizasyon skorlarında gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 10. Tubüler vakualizasyon karşılaştırması

Mononükleer hücre infiltrasyonu skorlarında gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Aynı şekilde gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).



Grafik 11. Mononükleer hücre infiltrasyonu karşılaştırması

4.3.3 Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi

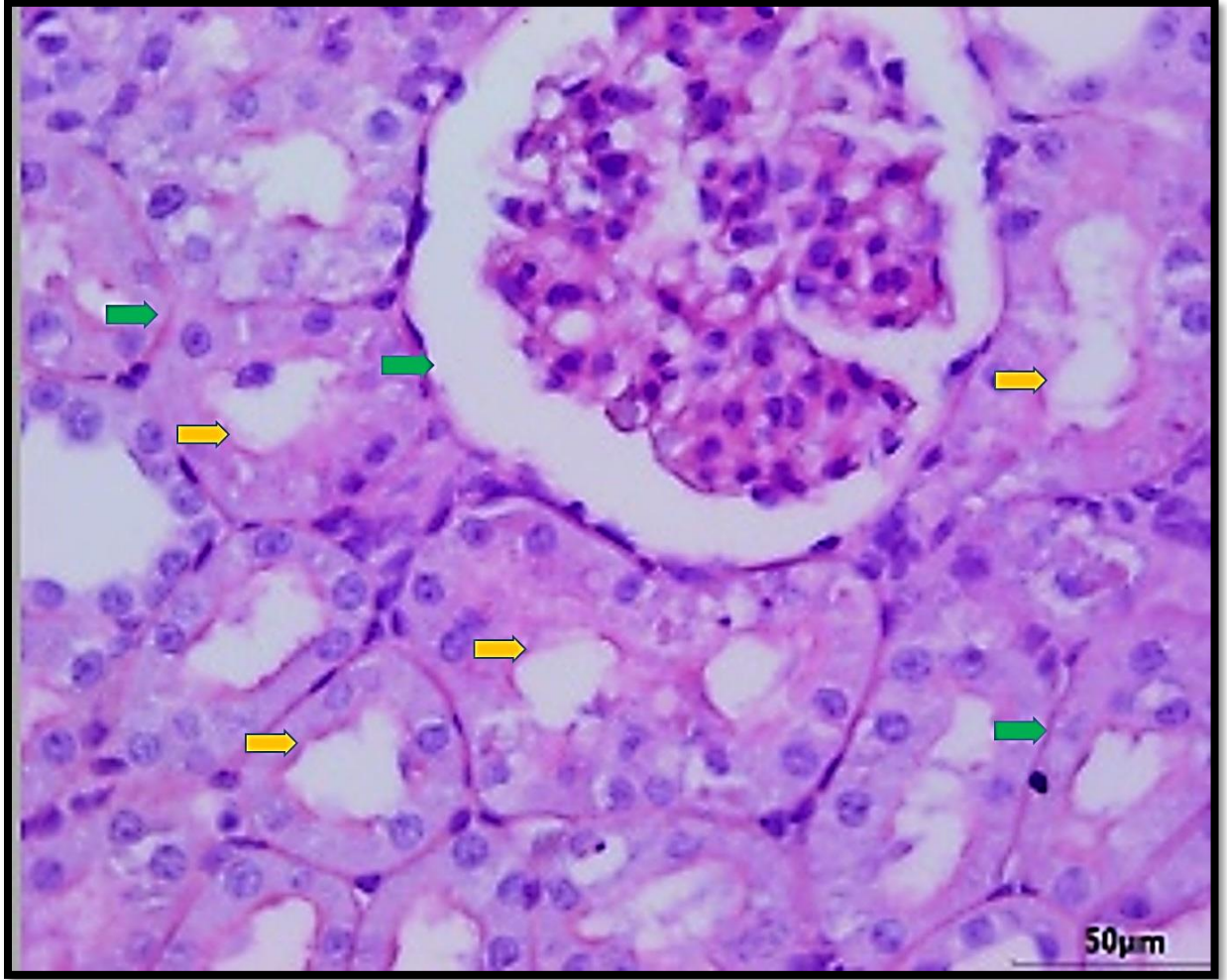
Kontrol grubuna ait bulgular: Tübüllere ait olan hücreler ve endotel hücreleri ince bir bazal membranla çevrenmiş olarak gözlenmiştir. Bu bazal membranlar ve proksimal tübül lümeninde gözlemlenen fırçamsı kenar oluşumu PAS boyamasında pozitif (+) reaksiyon gösterdiği gözlenmiştir (Resim17,18).

Proksimal ve distal tubul hücrelerinde bazal membran yapısı ve Proksimal tubul fırçamsı kenar yapısı normal morfolojide gözlenmiştir

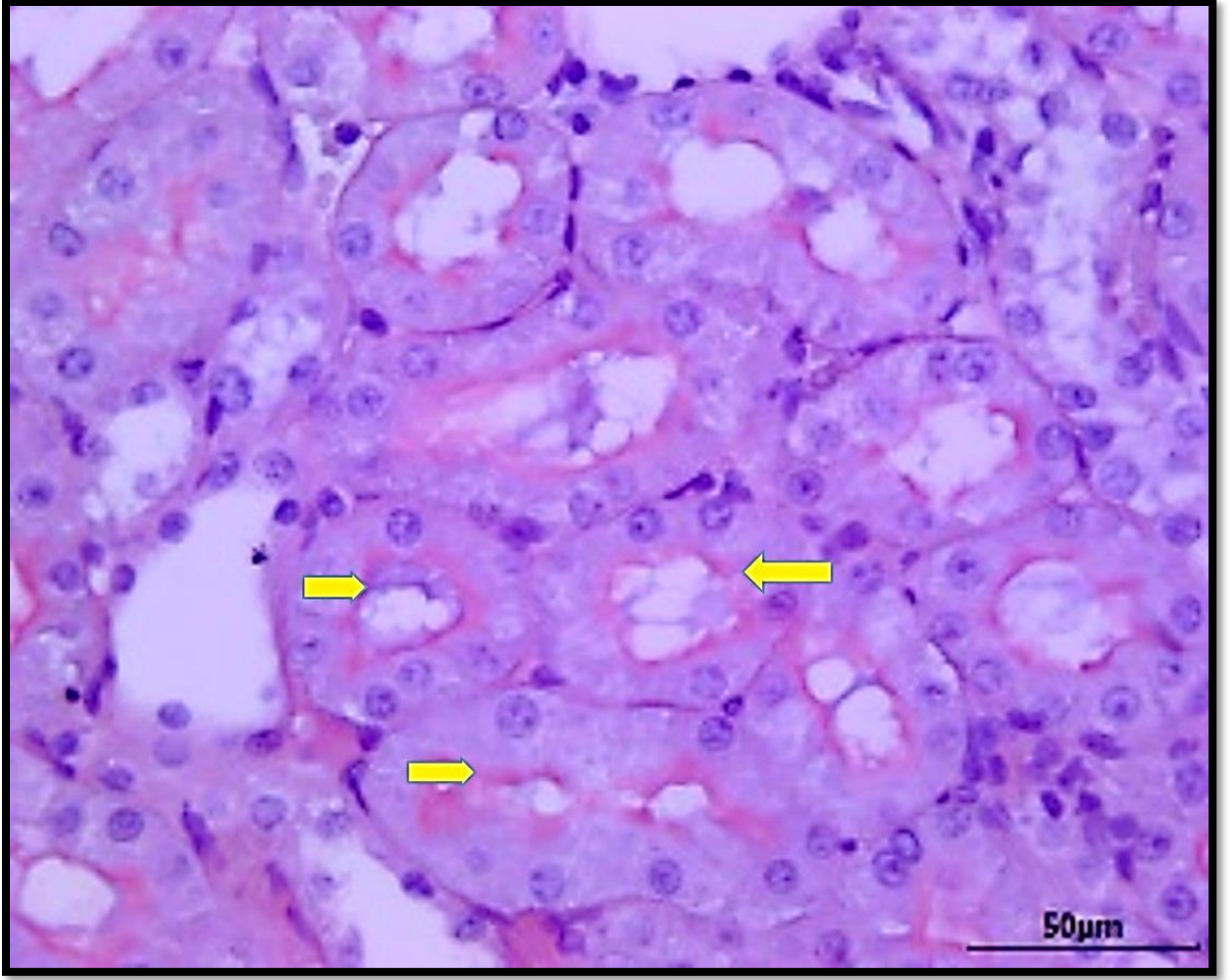
Ferulik Asit grubuna ait bulgular: Tübüllere ait olan hücreler ve endotel hücreleri ince bir bazal membranla çevrenmiş olarak gözlenmiştir. Bu bazal membranlar ve proksimal tübül lümeninde gözlemlenen fırçamsı kenar oluşumu PAS boyamasında pozitif (+) reaksiyon gösterdiği gözlenmiştir (Resim 19,20).

Gentamisin grubuna ait bulgular: Hücreler apikal yüz farklılaşmaları olarak gözlemlenen fırçamsı kenar kopmaları ve kayıpları nedeni ile PAS (+) görünümünü yitirmiş olarak gözlenmiştir. Bazı tübüllerde ise tübüler yapının tamamen dağılmış olduğu gözlenmiştir. (Resim 21,22,23,26). Yine bazı tübüllerde mononükleer hücre infiltrasyonu, tubuler dilatasyon ve tübüler vakuolizasyon ile hiyalin kast formasyonu gözlenmiştir. (Resim 21,22,23,24,25,26,27)

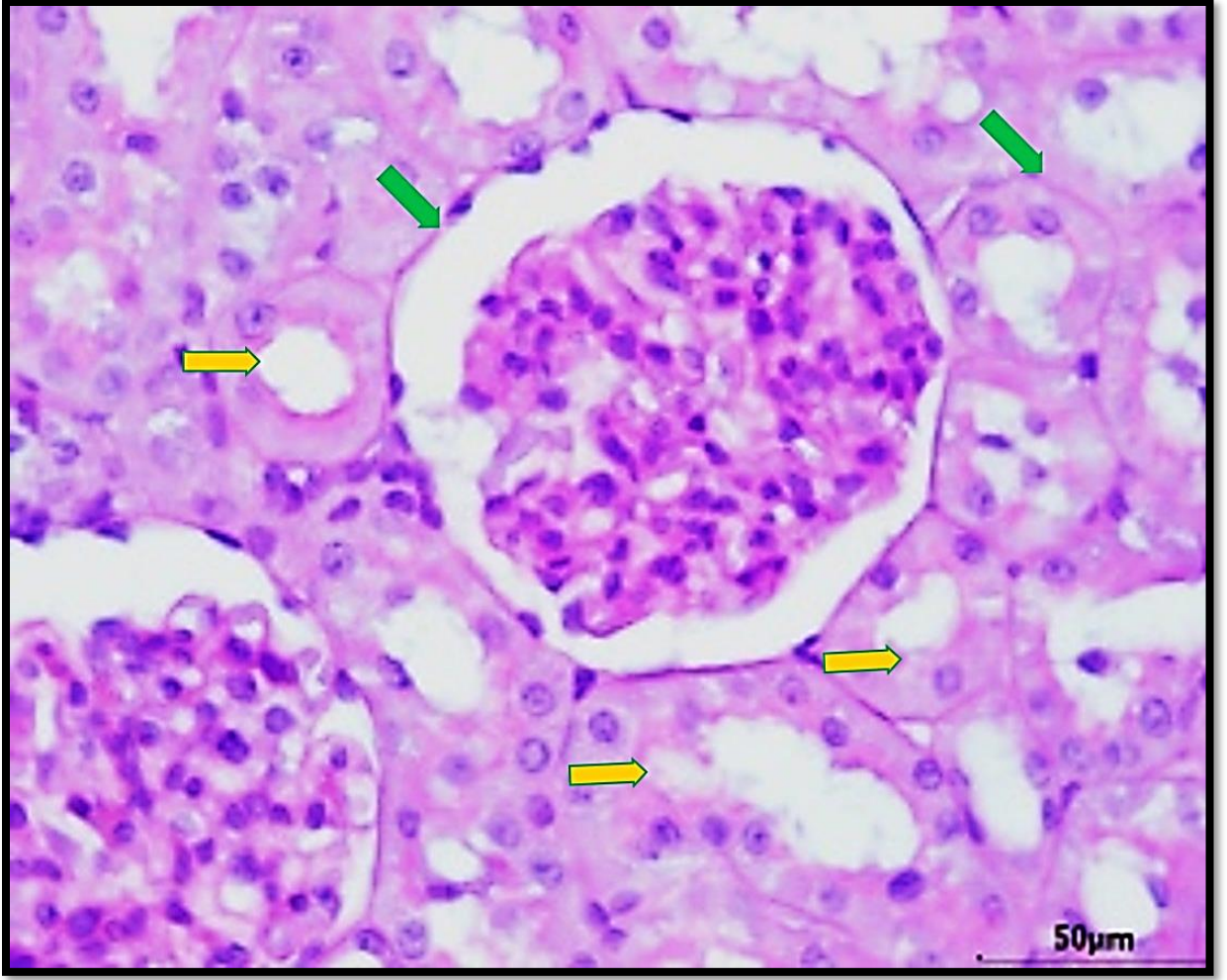
Gentamisin+Ferulik asit grubuna ait bulgular: Proksimal tübül hücrelerinin apikal yüzlerinde yer alan fırçamsı kenarların PAS (+) boyanma gösterdiği ve oldukça düzenli olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tübül hücrelerindeki vakuolizasyon ve deskuamasyonun da oldukça az olduğu değerlendirilmiştir.(Resim 28,29)



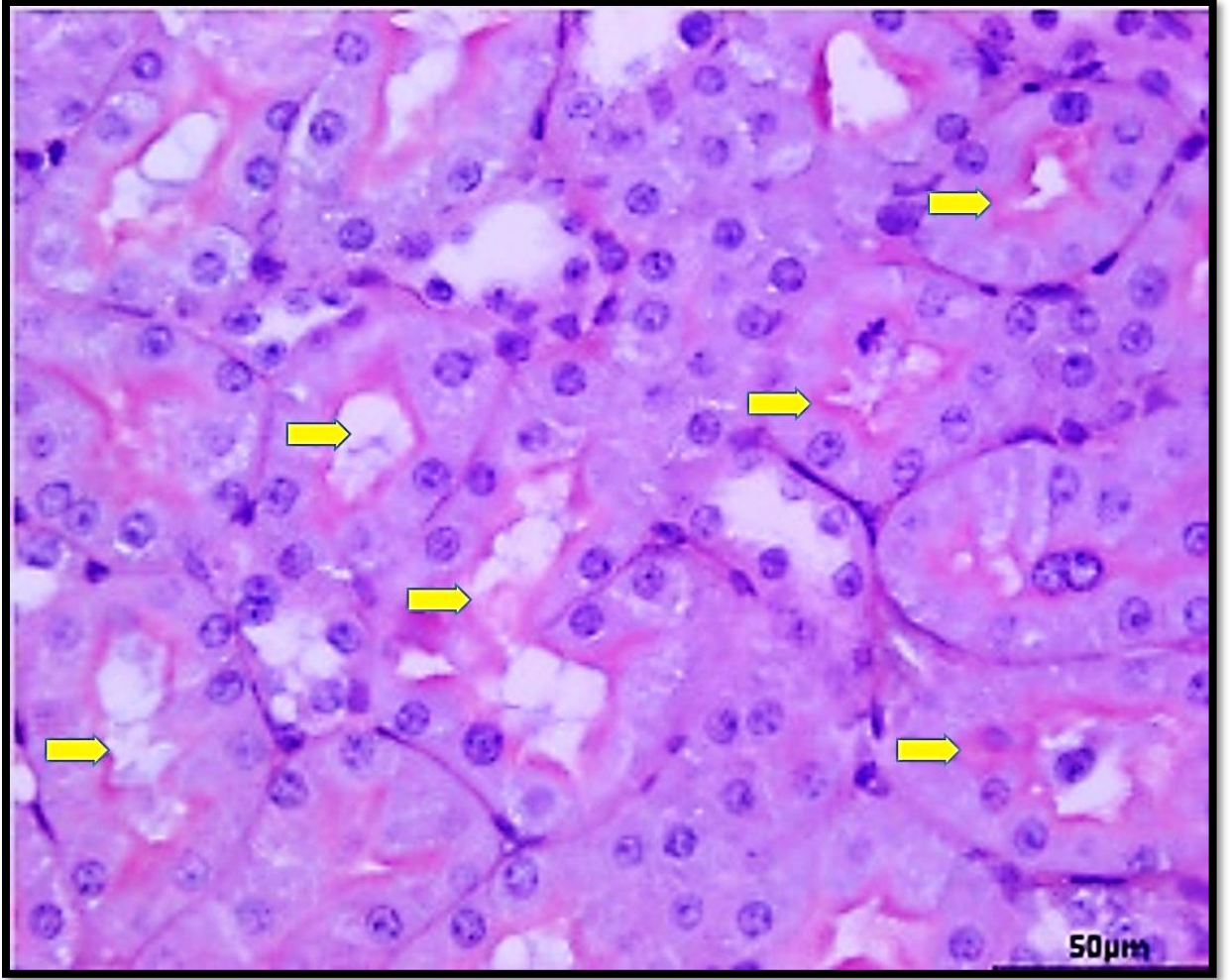
Resim 17: Kontrol grubuna ait kesitte bazal membran ve fırçamsı kenar yapısı normal olarak gözlenmektedir.x40 PAS



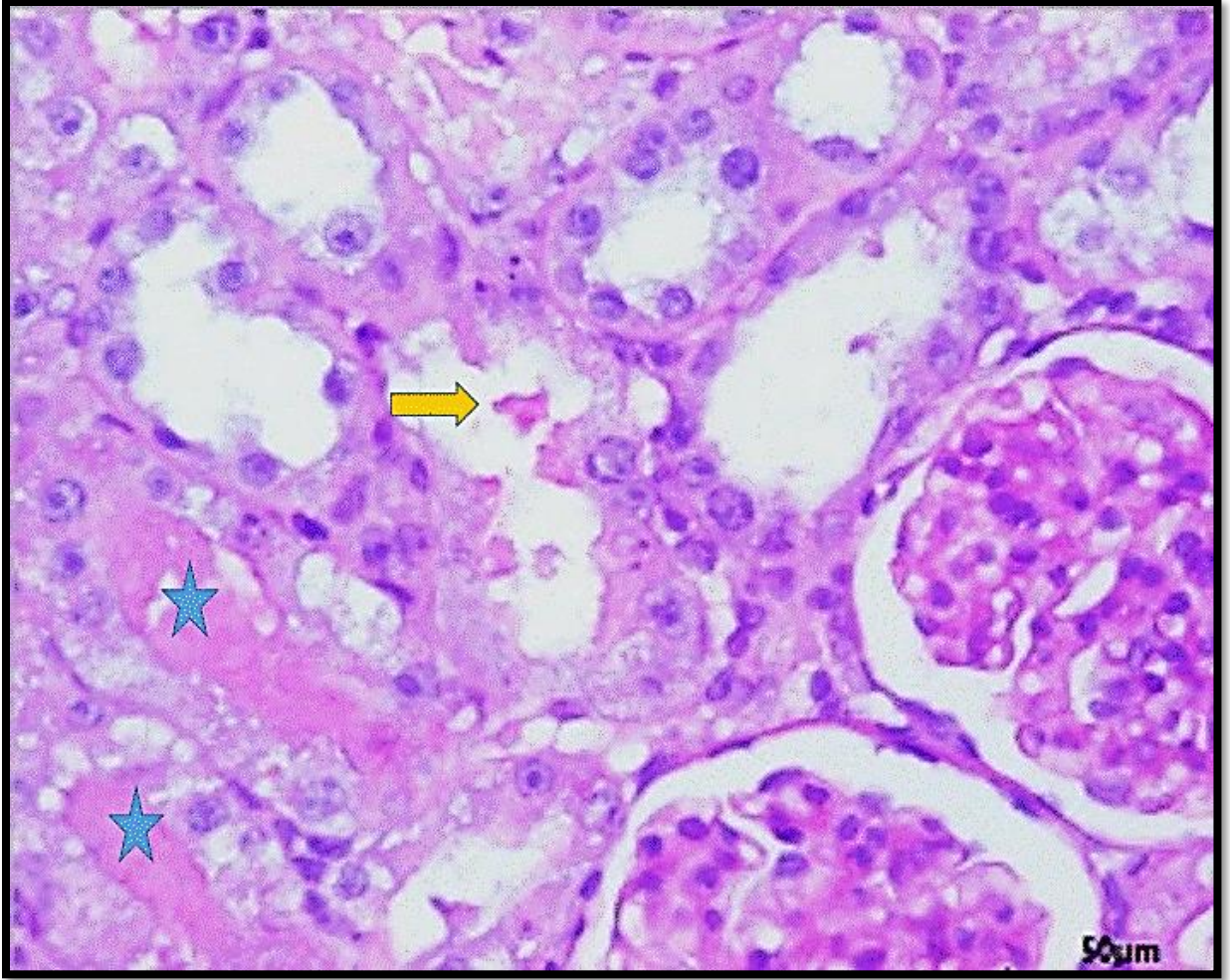
Resim 18: Kontrol grubunda normal morfolojide fırçasmsı kenar yapısı izlenmektedir.x40
PAS



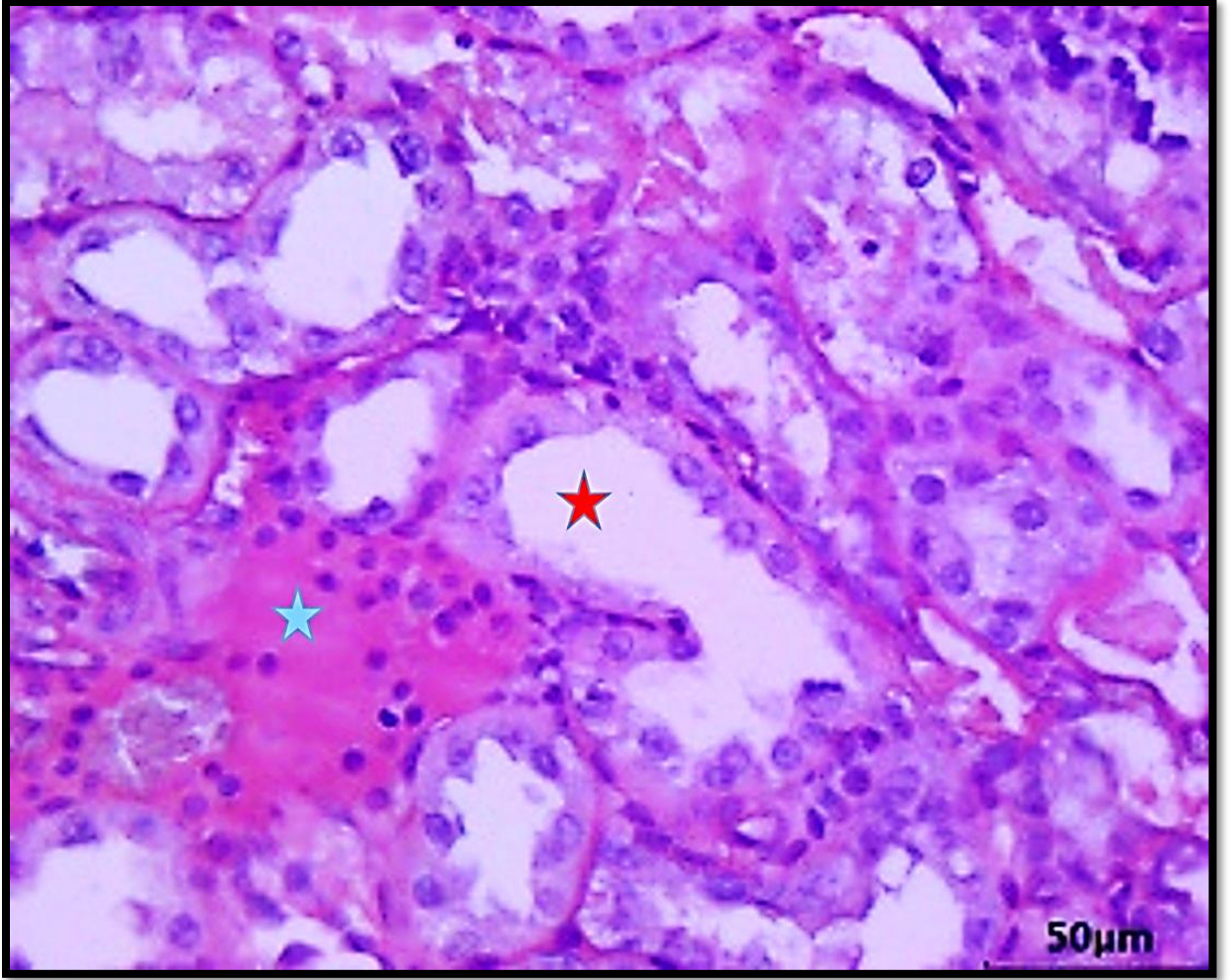
Resim 19: FA grubuna ait kesitte bazal membran ve fırçamsı kenar yapısı normal olarak gözlenmektedir. x 40 PAS



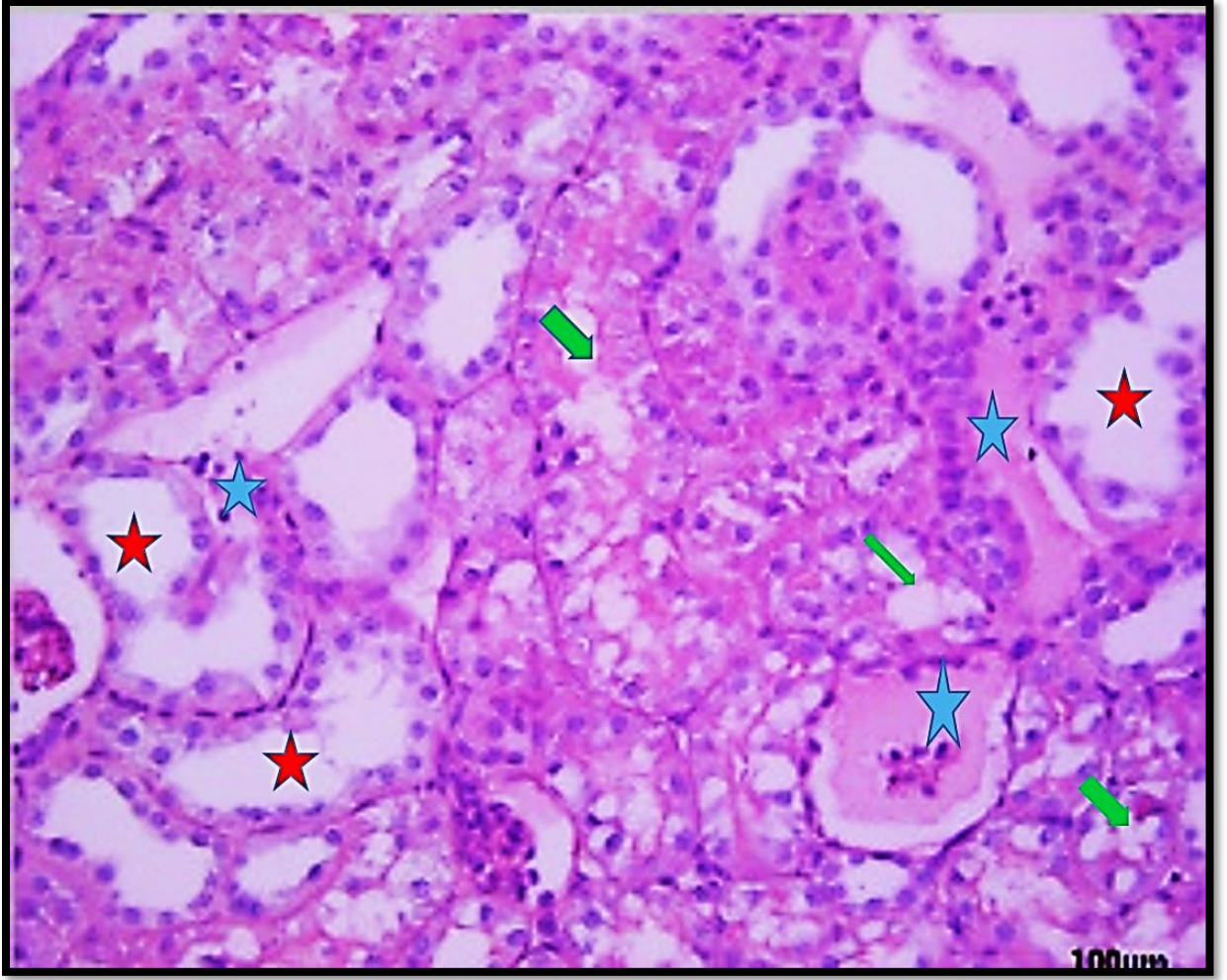
Resim 20: FA grubunda normal morfolojide fırçasmsı kenar yapısı izlenmektedir.x40 PAS



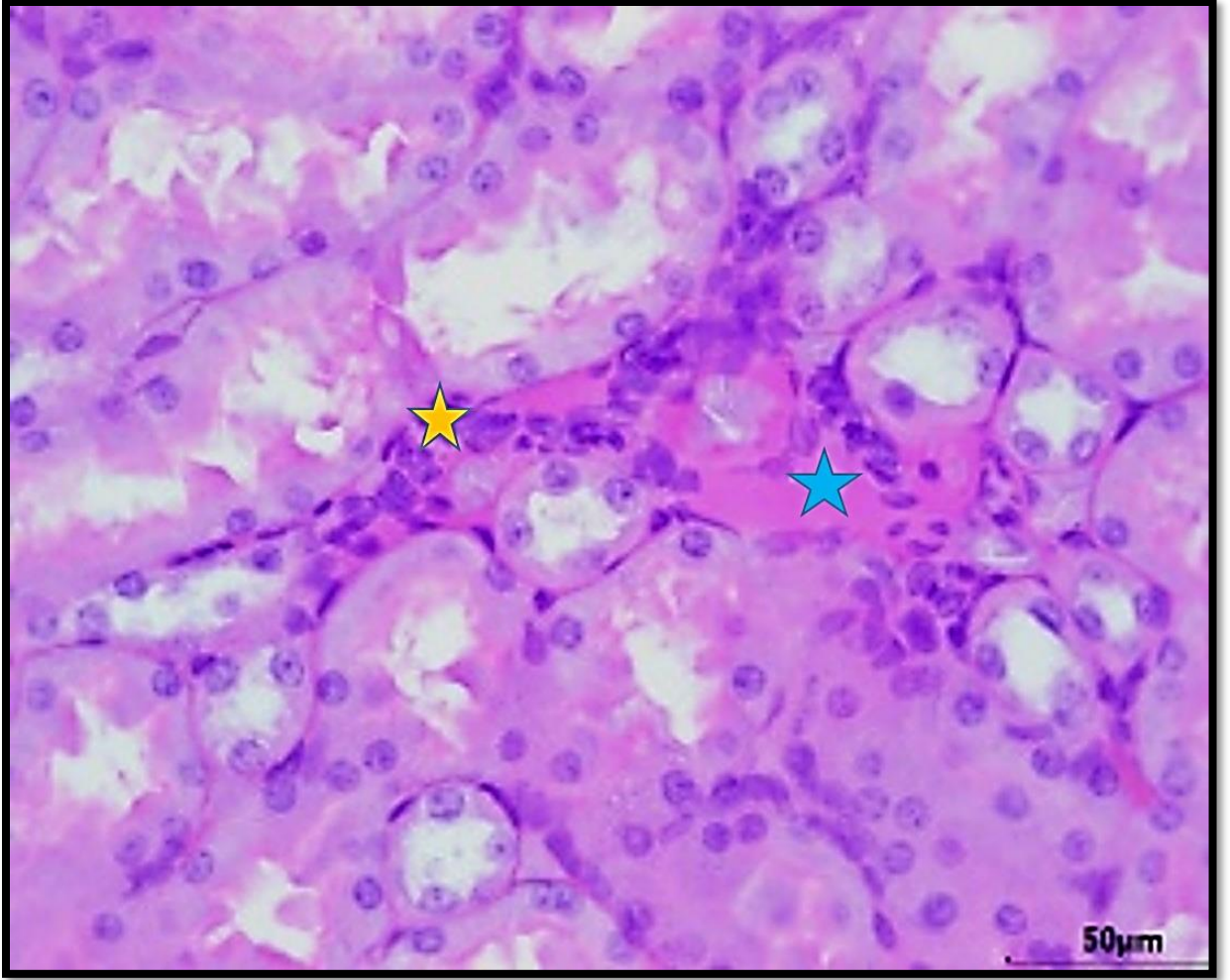
Resim 21: GM grubunda hiyalin kast birikimi bozulmuş fırçamsı kenar yapısı izlenmektedir.x40 PAS



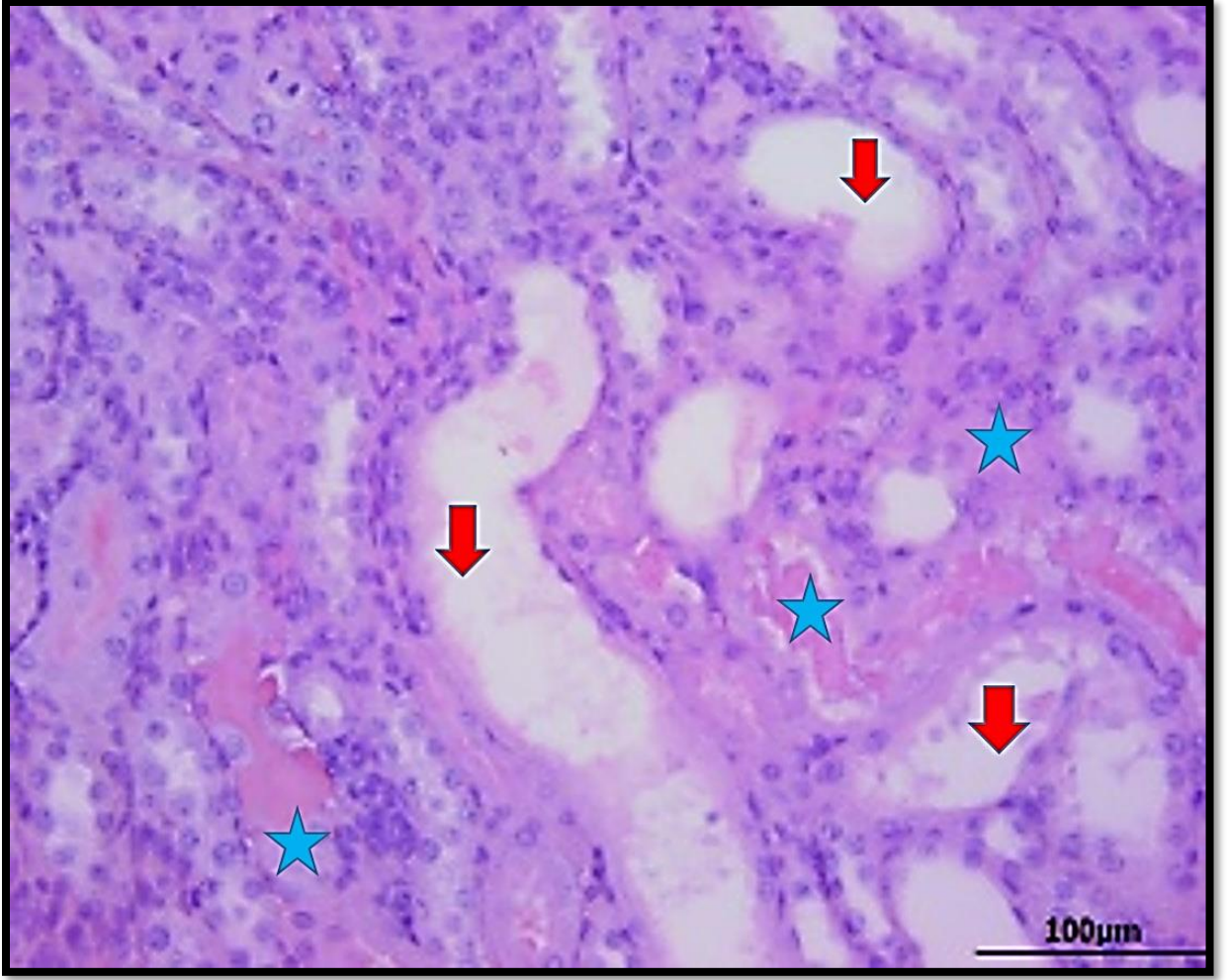
Resim 22: GM grubunda hiyalin kast birikimi bozulmuş fırçamsı kenar yapısı ve tubüler dilatasyon izlenmektedir.x40 PAS



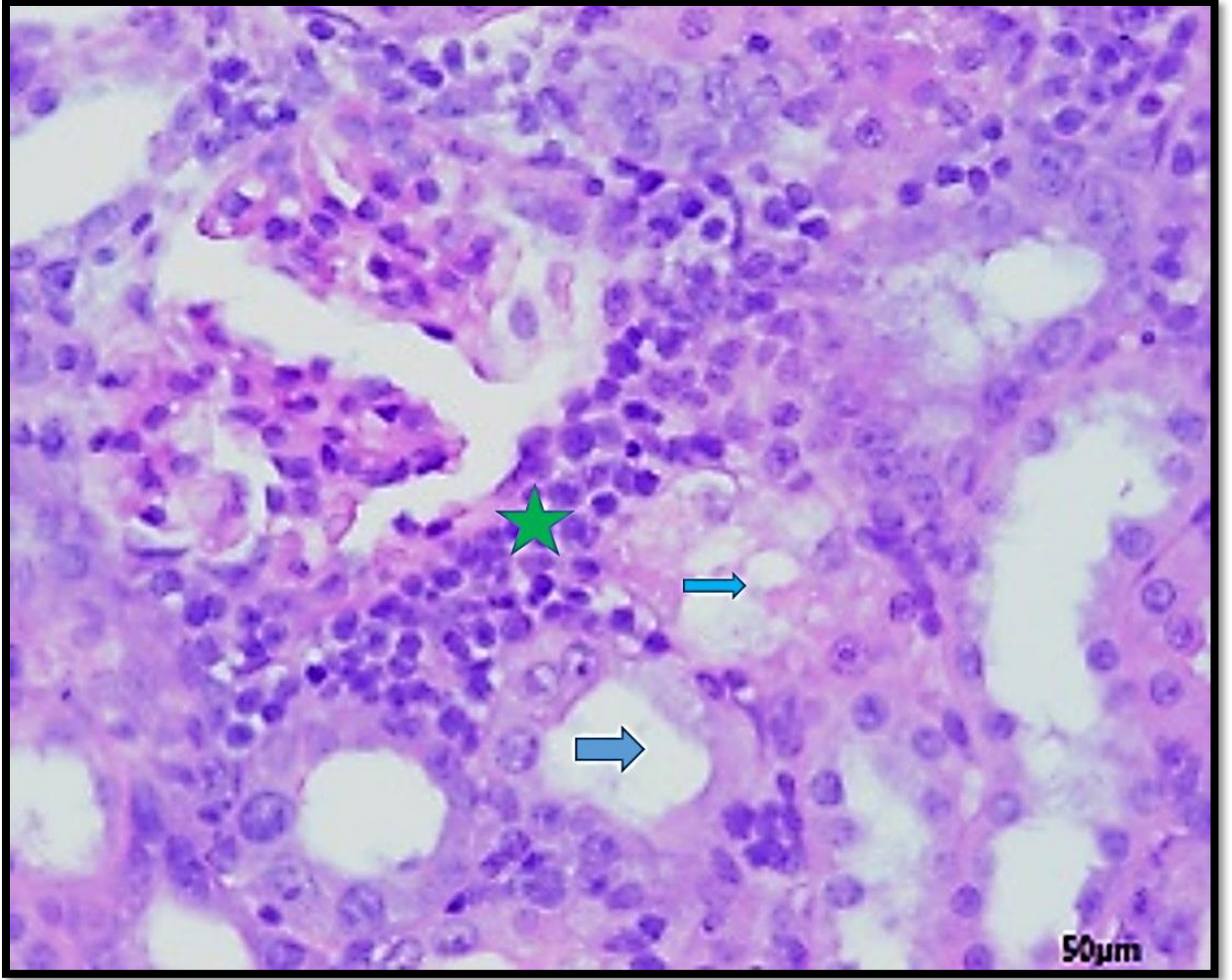
Resim 23: GM grubunda hiyalin kast birikimi, bozulmuş fırçamsı kenar yapısı ve tubüler dilatasyon, tubüler vakuolizasyon izlenmektedir.x 20 PAS



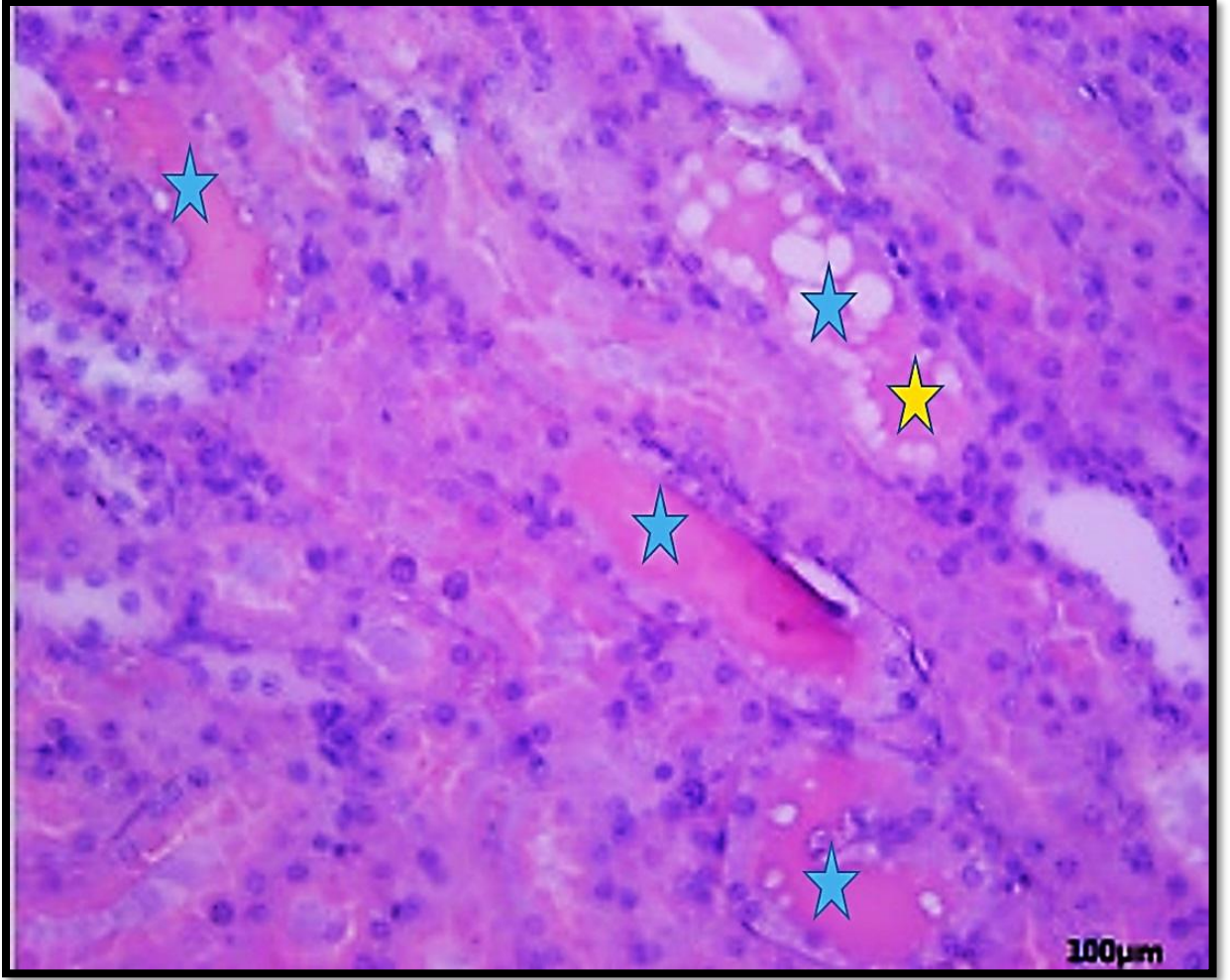
Resim 24: GM grubunda hiyalin kast, MNH infiltrasyonun izlenmektedir.x40 PAS



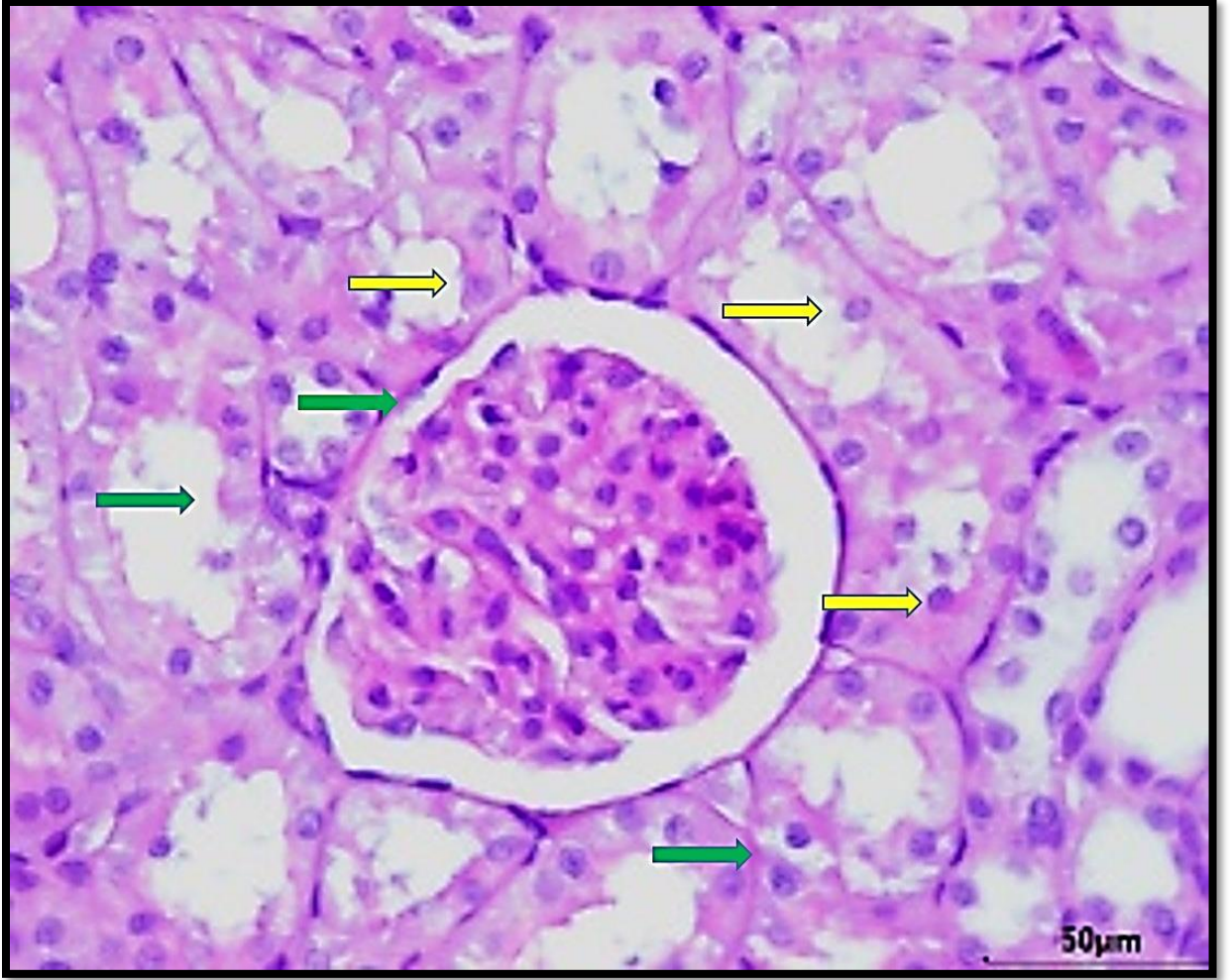
Resim 25: GM grubunda MNH infiltrasyonu, tubuler dilatasyon,hiyalin kast oluşumu görülmektedir.x.20 PAS



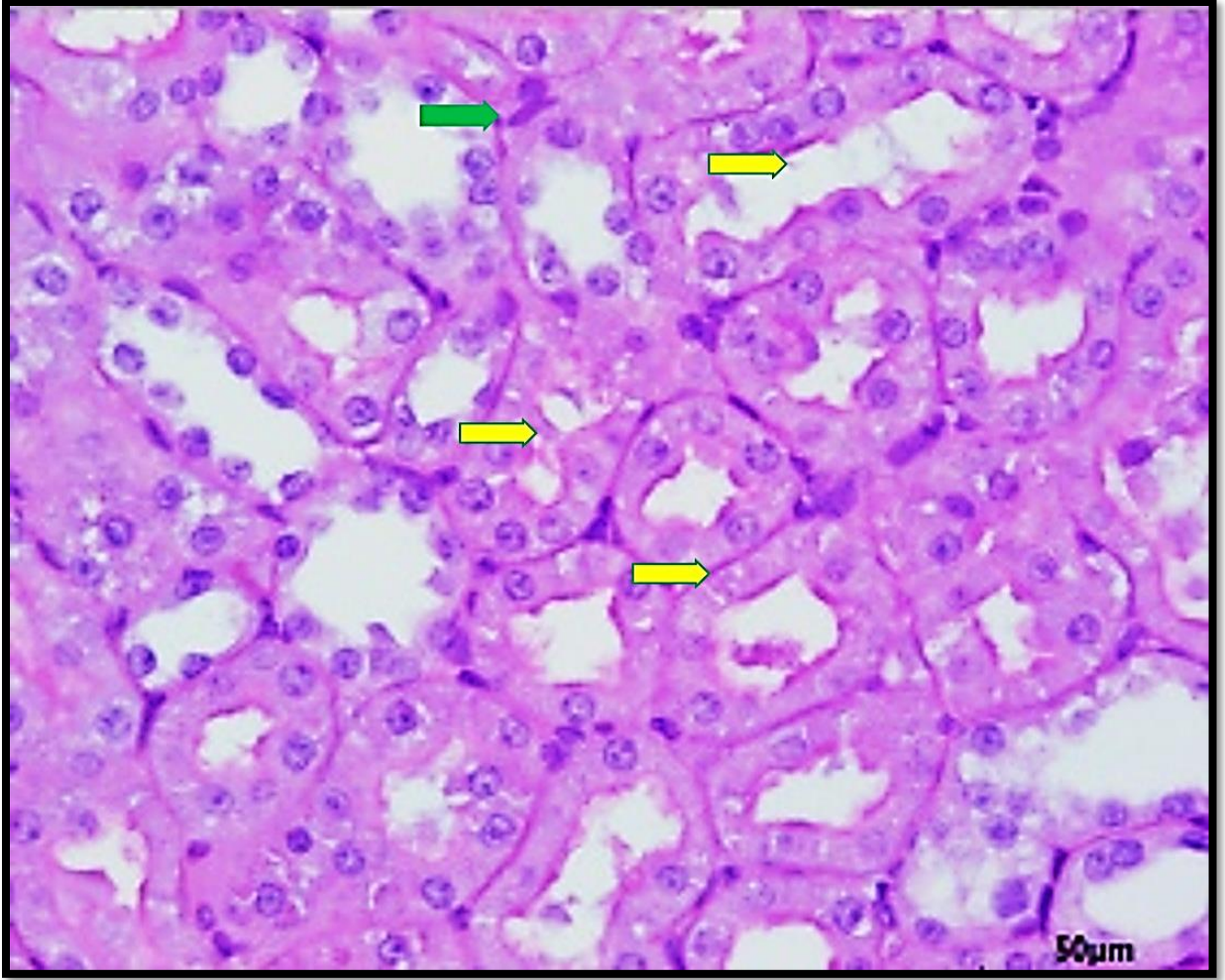
Resim 26: GM grubunda MNH infiltrasyonu ve fırçası kenar kaybı izlenmektedir.x40
PAS



Resim 27: GM grubunda Hiyalin kast, tubüler dilatasyon izlenmektedir.x20 PAS

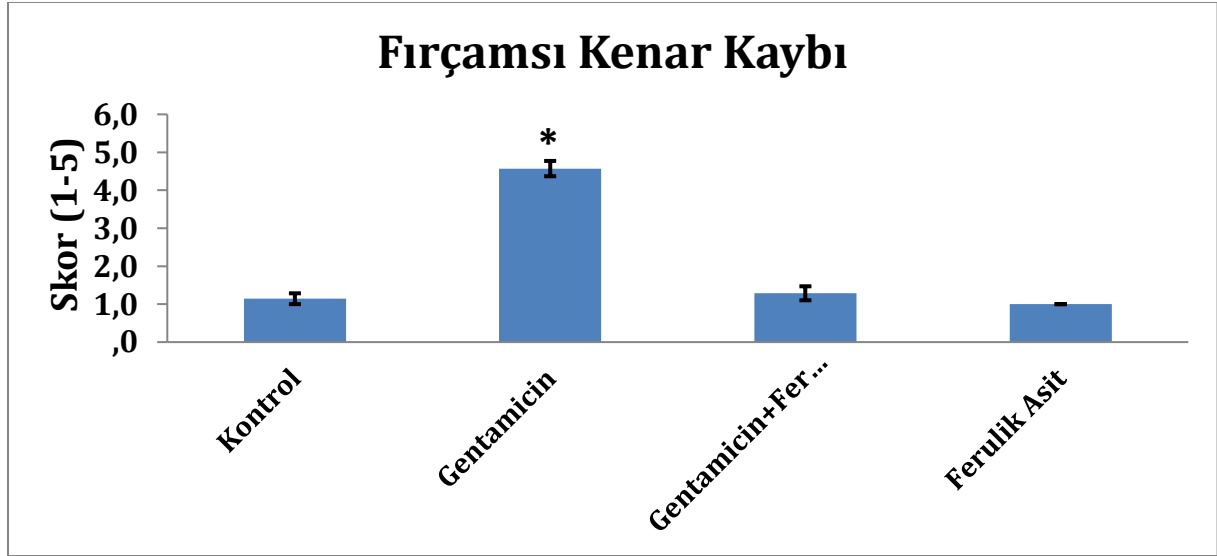


Resim 28: GM+FA grubunda bazal membranlar ve PT fırçası kenar oluşumu normal morfolojide izlenmiştir. x40. PAS



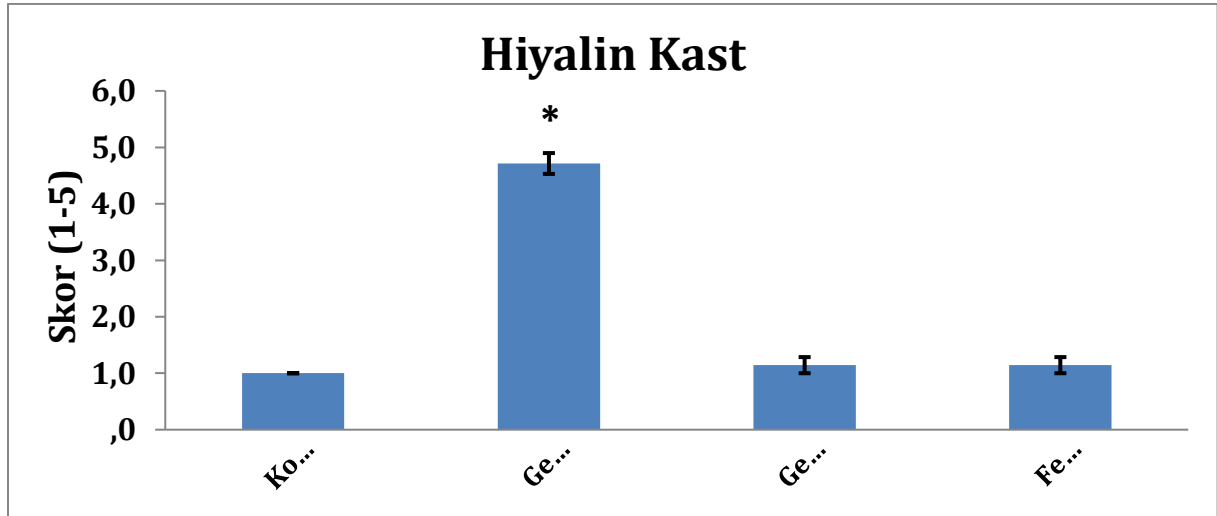
Resim 29: GM+FA grubunda bazal membranlar ve PT fırçasmsı kenar oluşumu normal morfolojide izlenmiştir.x40 PAS

Fırçasmsı kenar kaybı skorlarında ise gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 12. Fırçamsı kenar kaybı karşılaştırması

Hiyalin cast skorlarında gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 13. Hiyalin kast karşılaştırması

4.5. Histomorfometrik Bulgular

Glomerul ap lümü:

Görüntü elde etmek için her standart alandan glomerülleri içeren 3 kortikal görüntü sabitlendi. Böylece her denek için 15 görüntü elde edildi. Glomerul çapları ölçüldü. Kontrol ve FA grubunda glomerul çapları benzer iken GM grubunda glomerul çaplarında azalma GM+FA grubunda ise kontrol ve FA grubuna yakın sonuçlar elde ettik. Ancak glomerul çaplarının gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Proksimal Tubül ap lümü

Görüntü elde etmek için her denekten elde edilen kortex tabakasından rastgele seçilen alanlardan proksimal tubül çapları ölçülmüştür. Kontrol ve FA grubunda benzer proksimal tubül çapları ölçülmüşken GM grubunda proksimal tubül çaplarında oldukça az bir artma tespit edilmiştir. GM+FA grubunda ise kontrol ve FA grubuna benzer sonuçlar bulunmuştur. Ancak tubül çaplarının gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

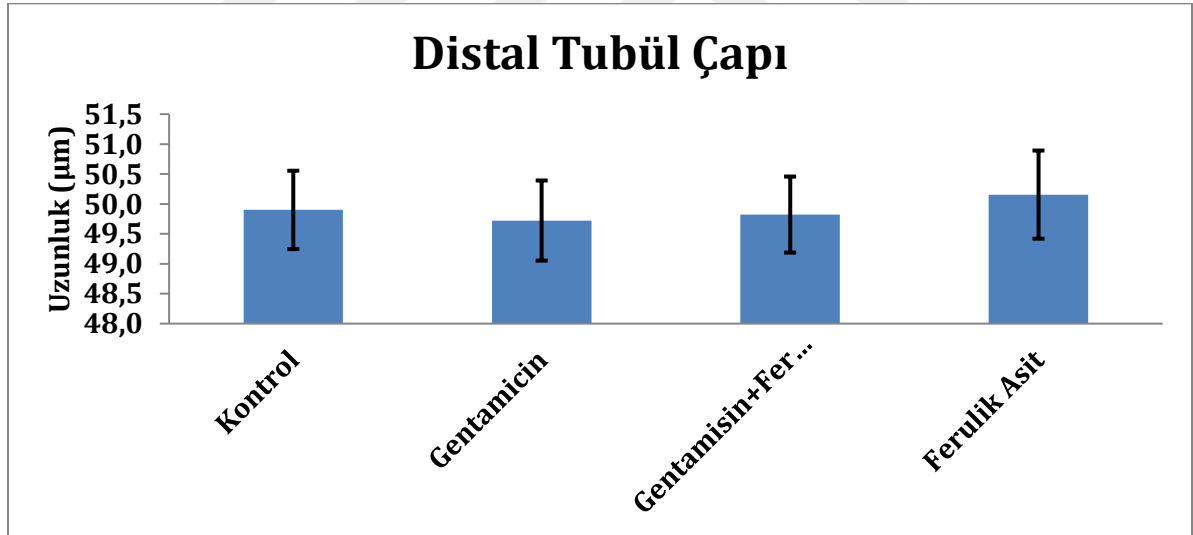
Distal Tubül ap lümü

Görüntü elde etmek için her denekten elde edilen kortex tabakasından rastgele seçilen alanlardan distal tubül çapları ölçülmüştür. Kontrol, FA, GM ve GM+FA gruplarında benzer sonuçlar bulunmuştur. Distal tubül çaplarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

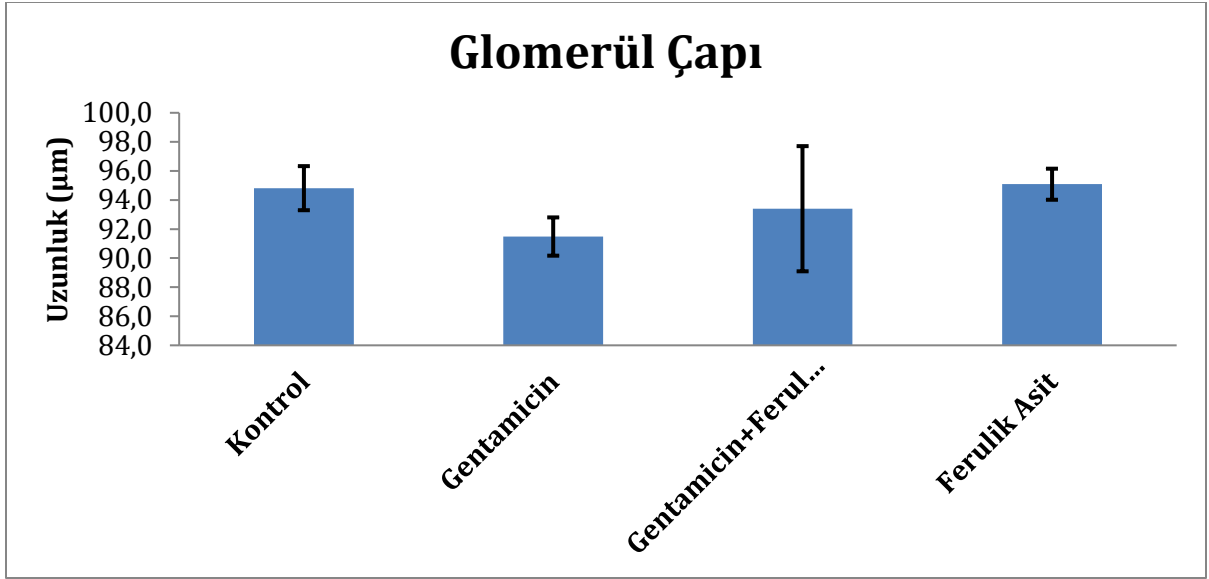
Tablo 15. Distal tubül, glomerul, proksimal tubul çaplarının ölçümleri

Gruplar	Distal Tubül Çapı	Glomerül Çapı	Proksimal Tubül Çapı
	Ortalama $\pm$ Std. Hata		
Kontrol	49,9 $\pm$ 0,7	94,8 $\pm$ 1,5	52,0 $\pm$ 0,8
Gentamicin	49,7 $\pm$ 0,7	91,5 $\pm$ 1,3	52,7 $\pm$ 0,6
Gentamisin+Ferulik Asit	49,8 $\pm$ 0,6	93,4 $\pm$ 4,3	51,1 $\pm$ 1,2
Ferulik Asit	50,2 $\pm$ 0,7	95,1 $\pm$ 1,1	50,9 $\pm$ 0,5

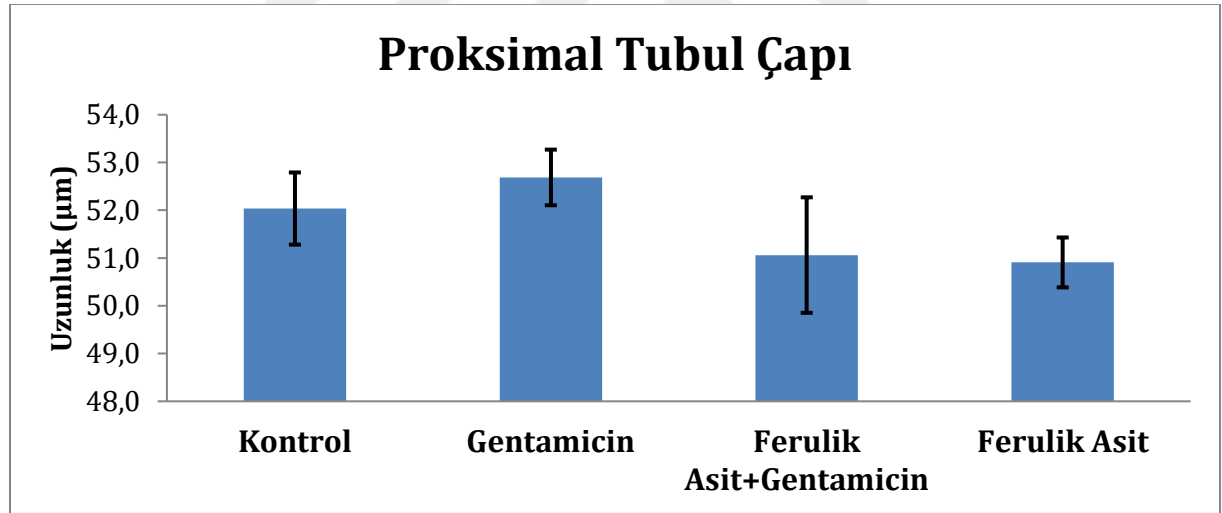
Distal tubül çapı, glomerül çapı ve proksimal tubül çapı ölçümlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 14. Distal tubül çapı karşılaştırması



Grafik 15. Glomerul çapı karşılaştırılması



Grafik 16. Proksimal tubul çapı karşılaştırılması

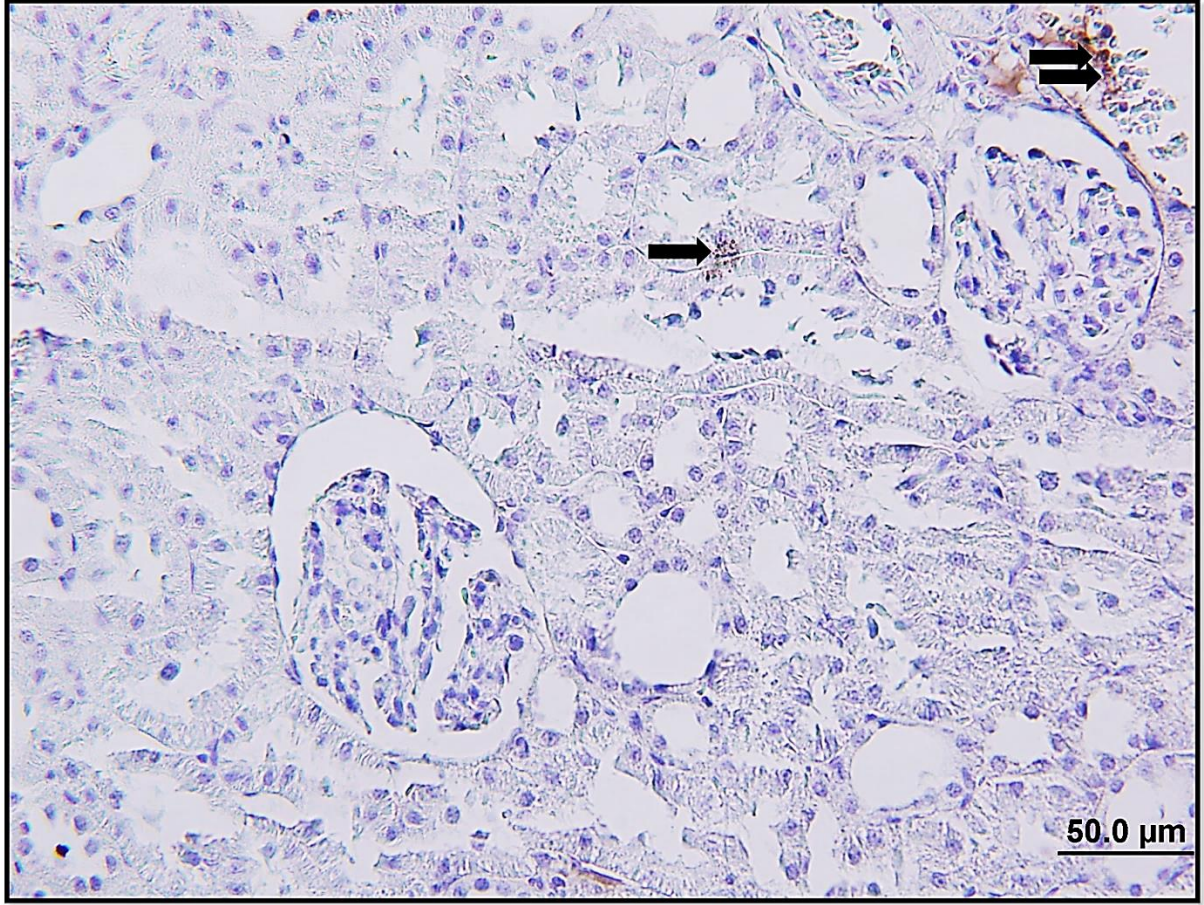
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait böbrek dokularında uygulanan Aktif Kaspaz 3, VEGF, Ve KIM-1 antikorlarının immünoreaktivitesi semikantitatif olarak değerlendirilmiştir.

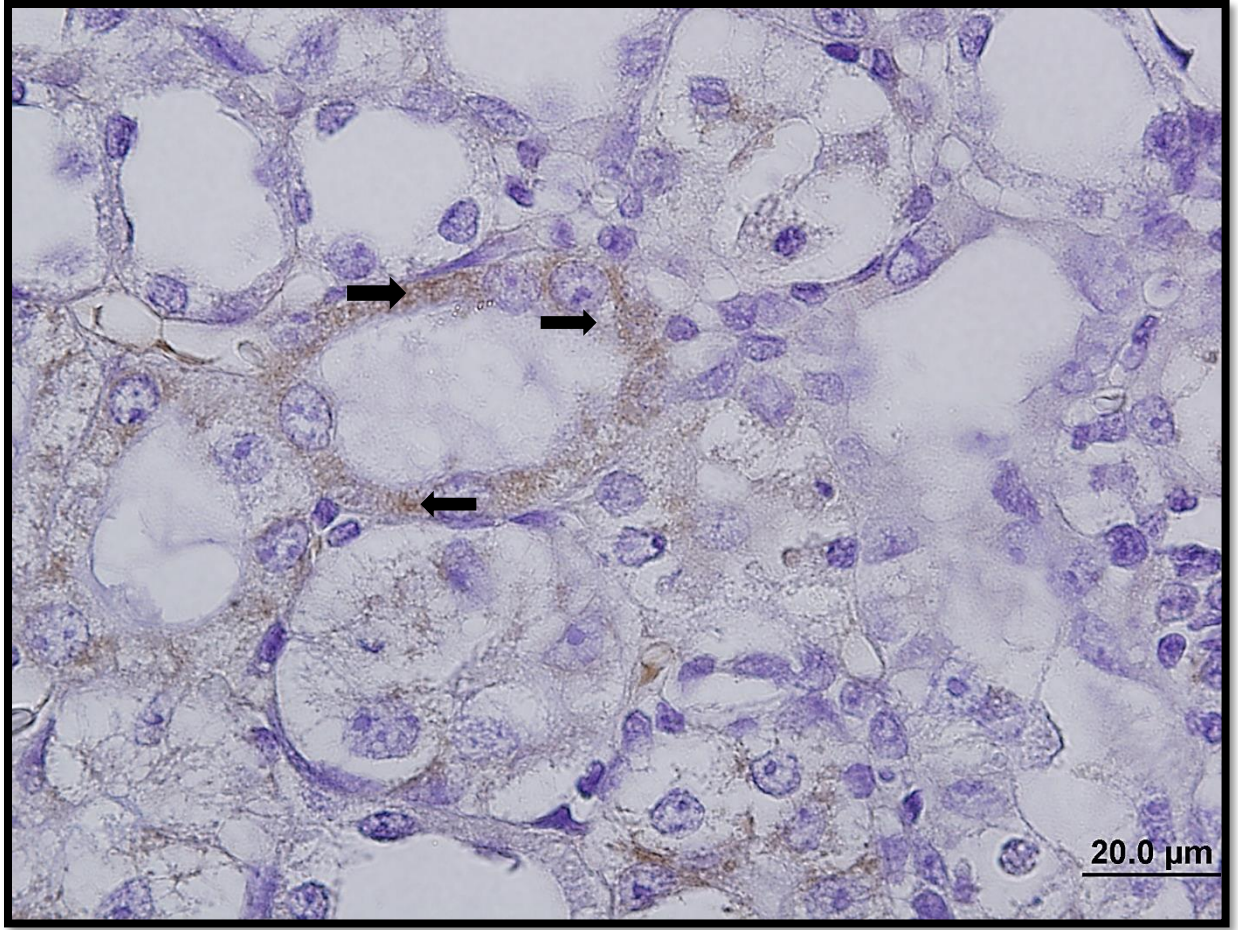
4.6.1. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimyası sonuçları.

Böbrek korteksinde Aktif Kaspaz 3 immünoreaktivitesi kontrol ve FA grubunda zayıf immünoreaktivite (Resim30,31,32,33,34);GM grubunda ise Aktif Kaspaz immünoreaktivitesi, kuvvetli pozitif olarak izlenmiştir (Resim35,36,37,38). GM+FA grubu incelendiğinde, Aktif Kaspaz immünoreaktivitesi belirgin oranda azalmış ve zayıf pozitif ya da pozitif olarak gözlenmiştir(Resim39,40,41).

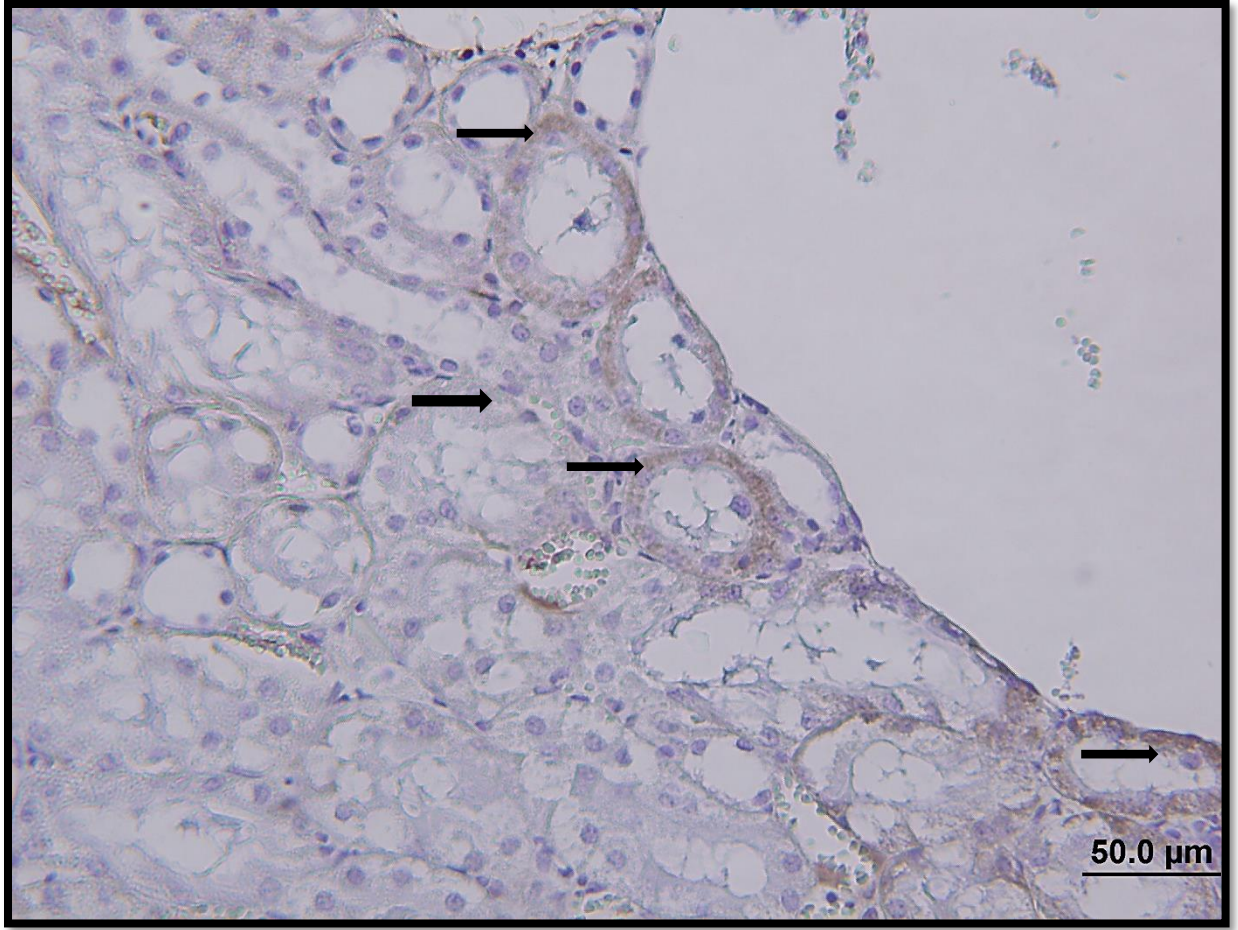
Tüm grupların immünoreaktivitesi incelendiğinde, GM grubundaki, Aktif Kaspaz immünoreaktivitesinin kontrol ve FA grubuna göre anlamlı derecede arttığı (kuvvetli pozitif), GM+FA grubunda ise GM grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı (zayıf pozitif) saptanmıştır.



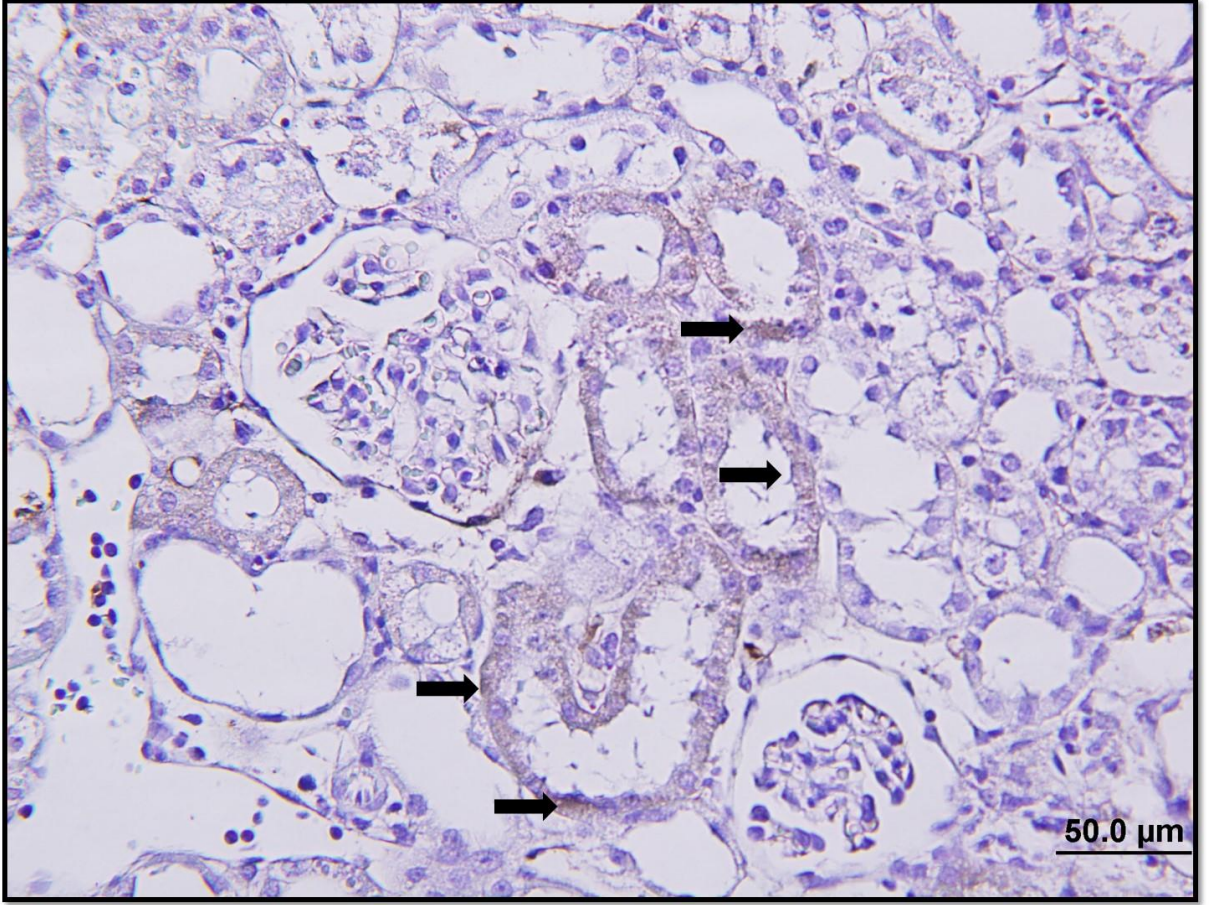
Resim 30: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi x40



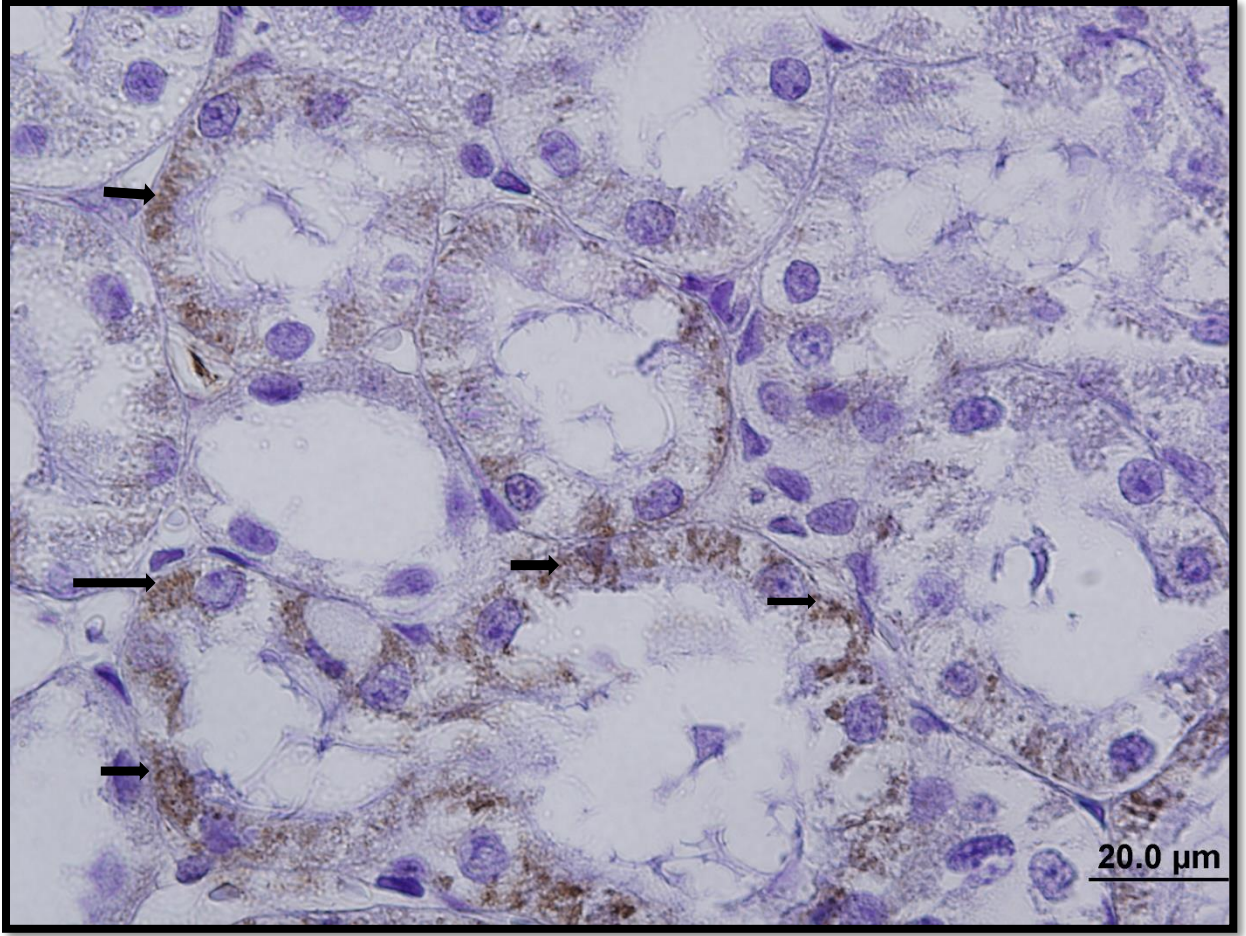
Resim 31: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi .x100



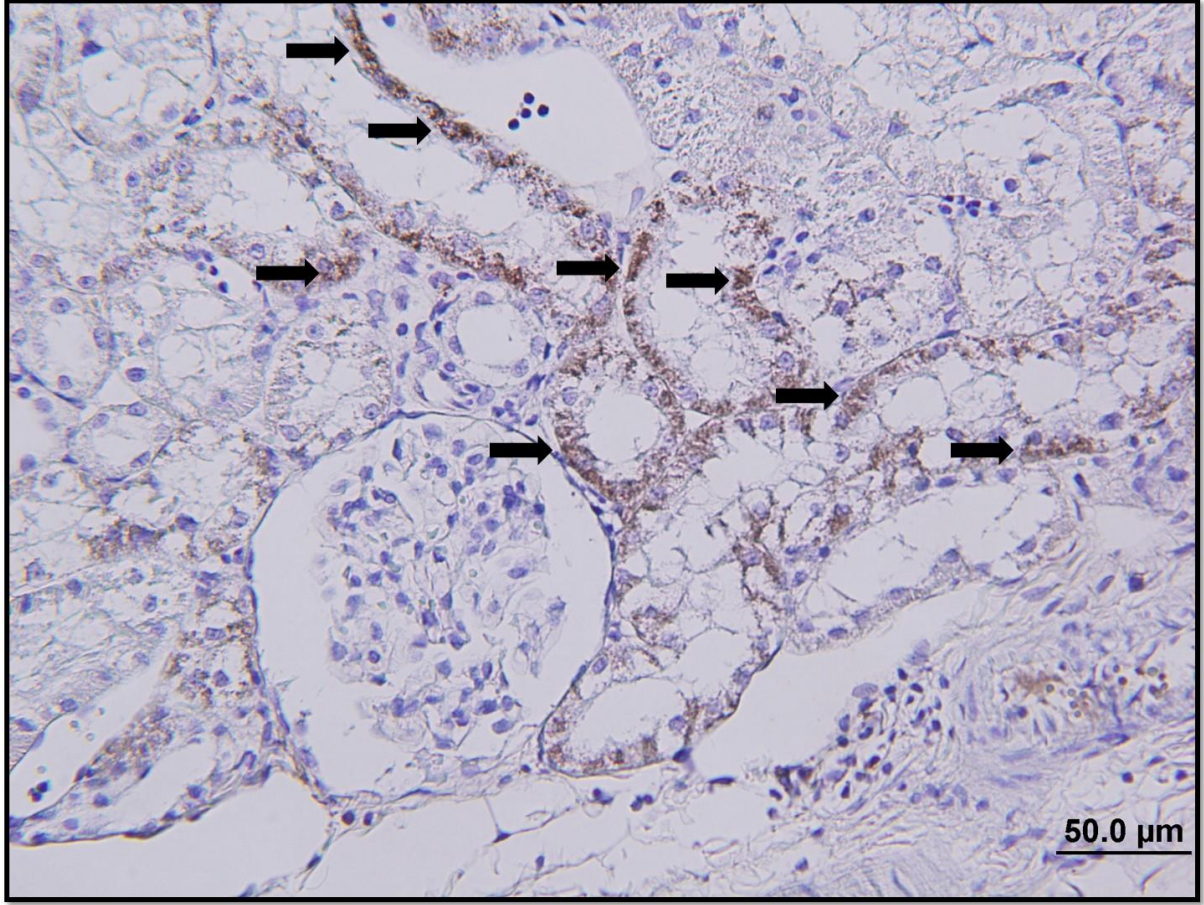
Resim 32: Kontrol grubu AK3 immunreaktivitesi.x40



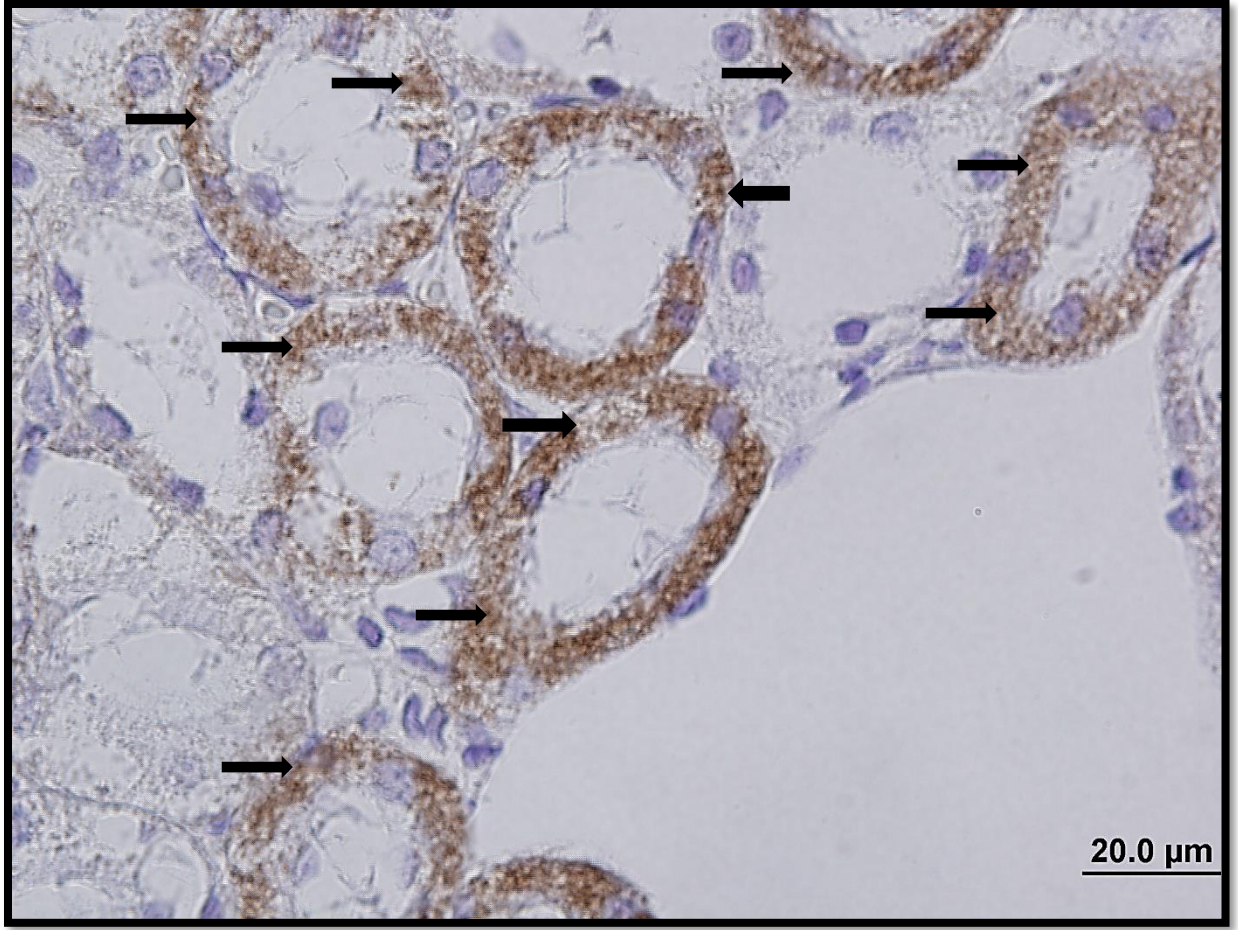
Resim 33: FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40



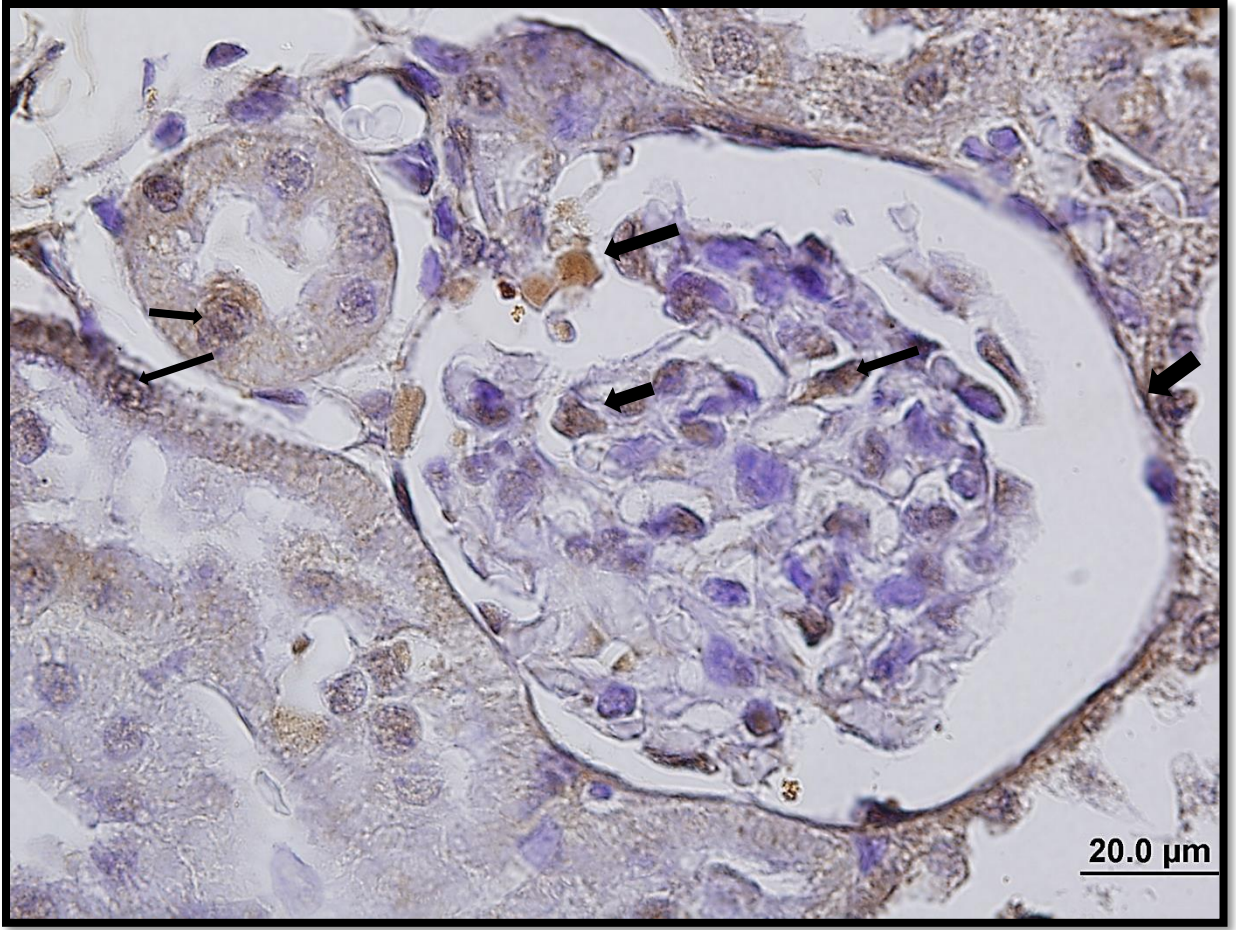
Resim 34: FA grubunda AK3 immunreaktivitesiç.x100



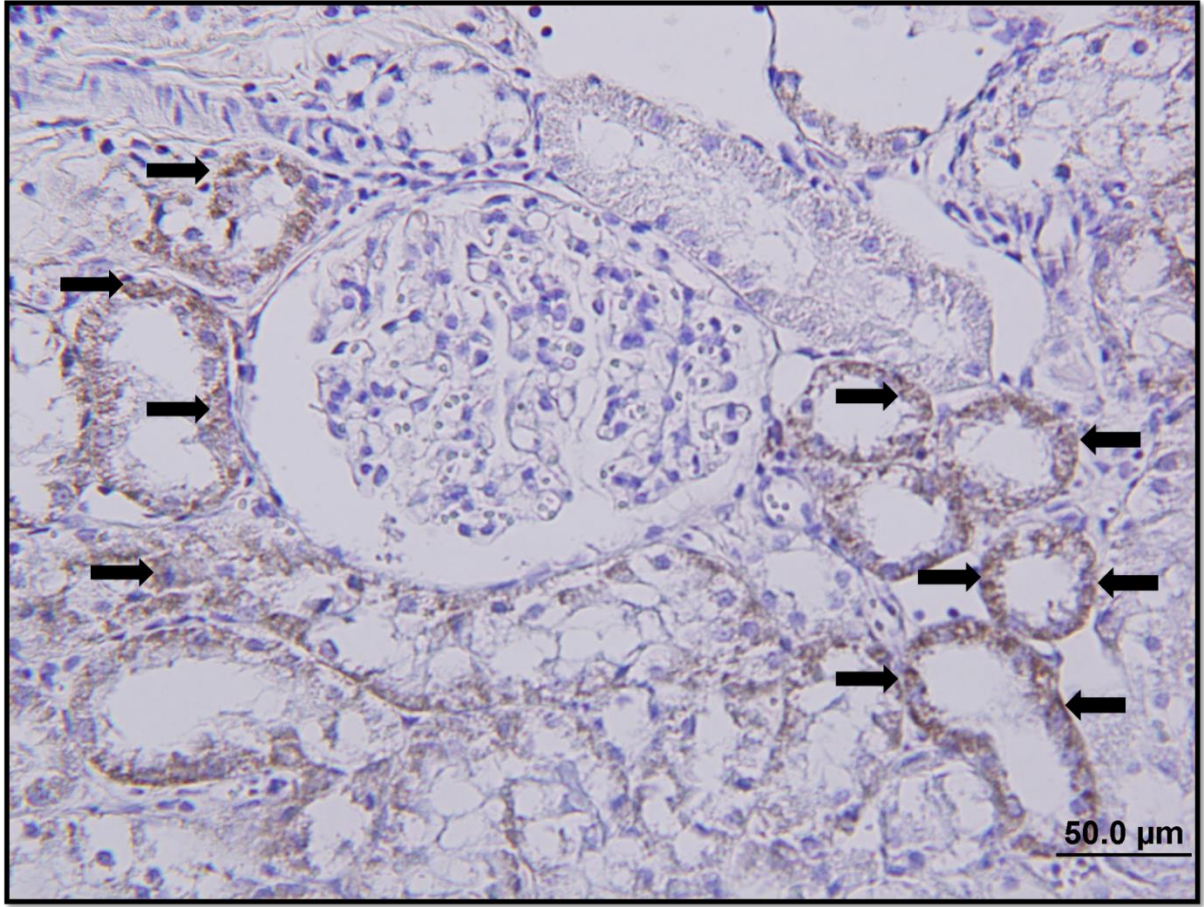
Resim 35:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40



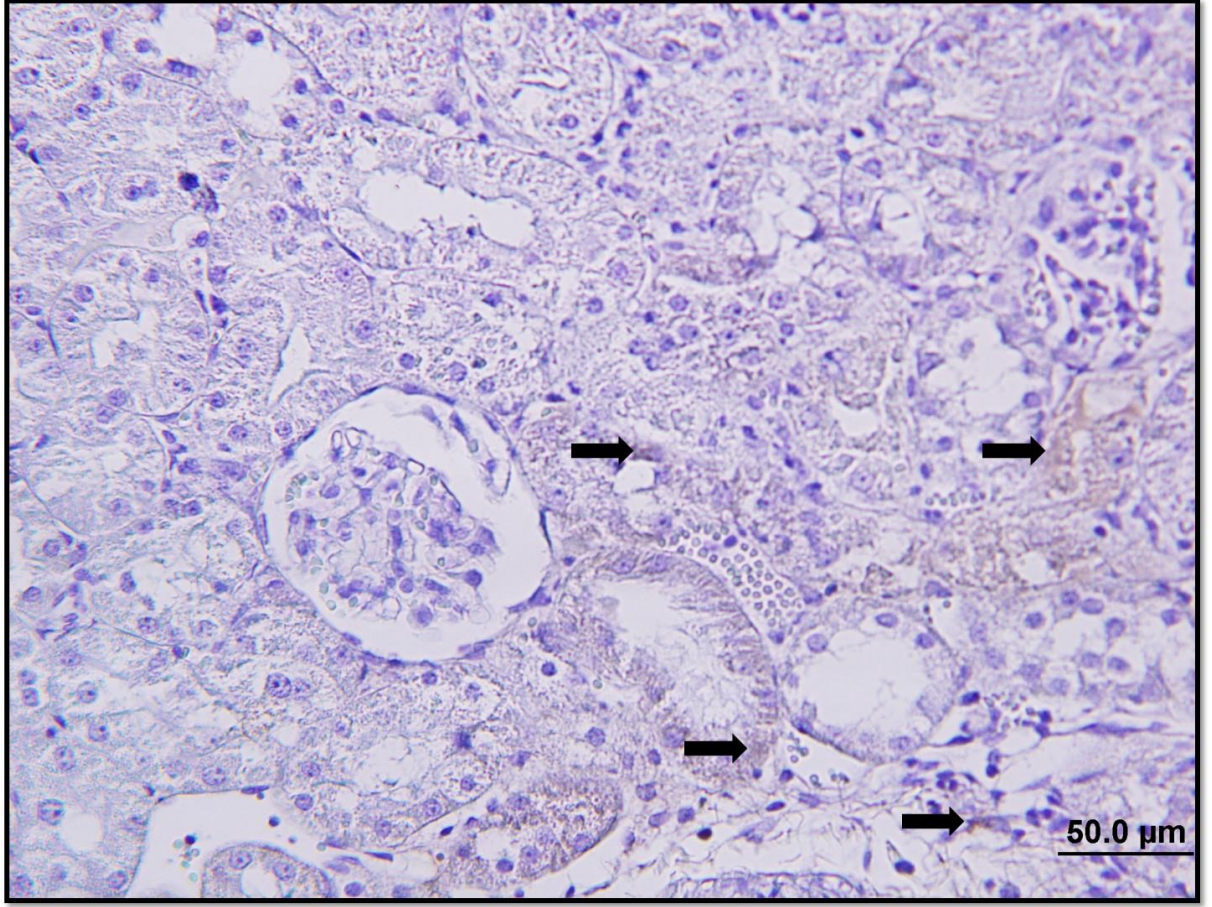
Resim 36:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100



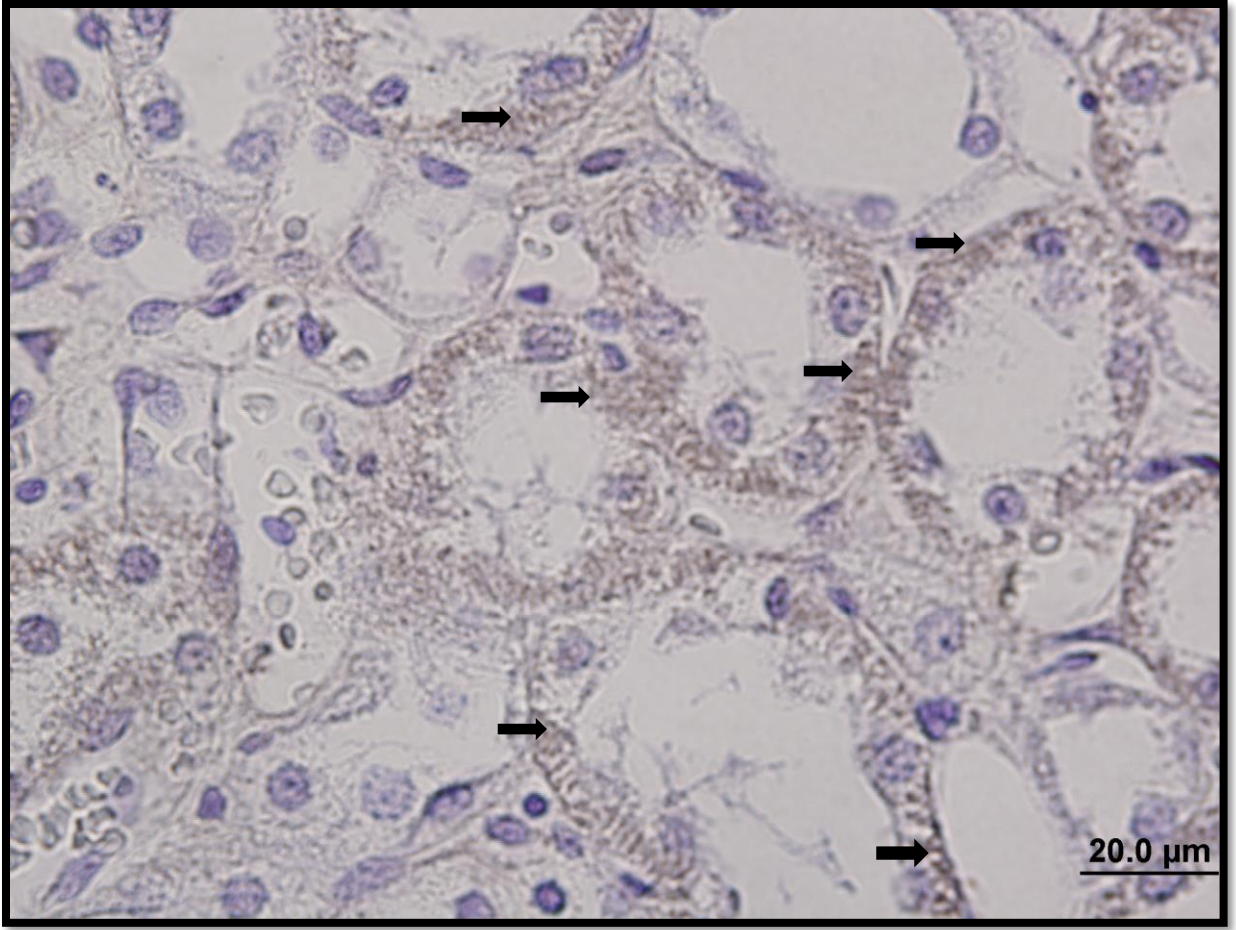
Resim 37:GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100



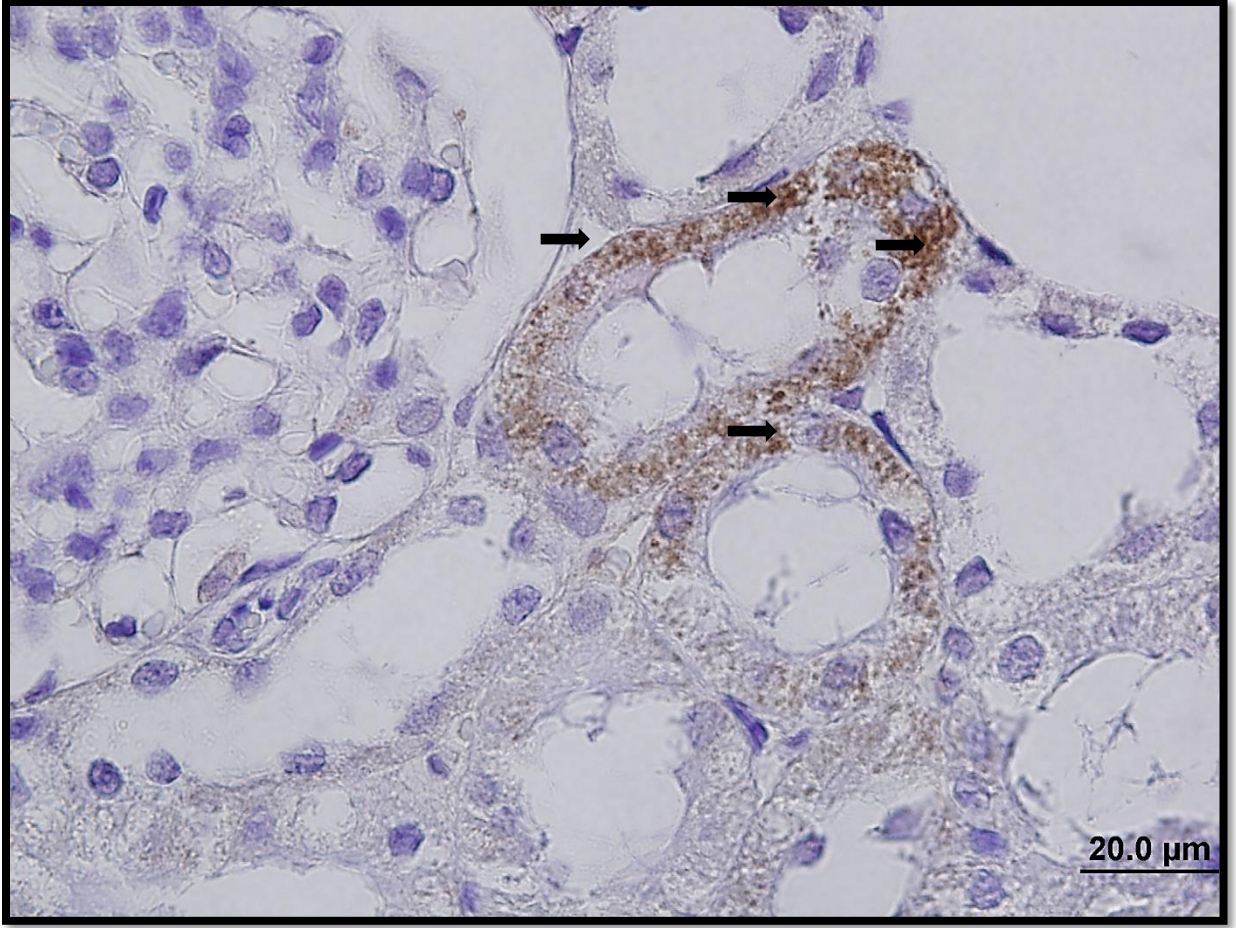
Resim 38: GM grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40



Resim 39: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x40



Resim 40: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x100

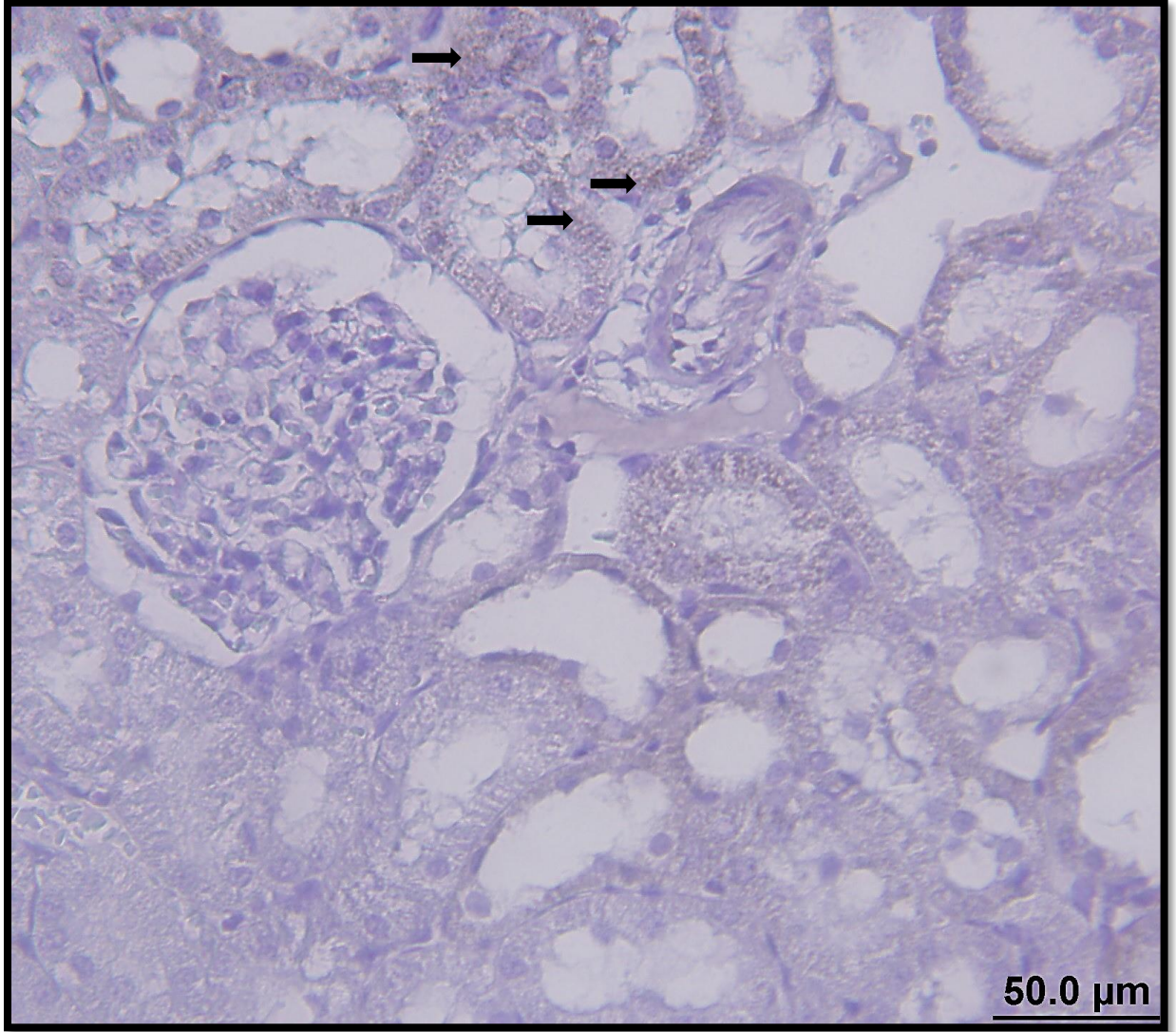


Resim 41: GM+FA grubunda AK3 immunreaktivitesi.x 100

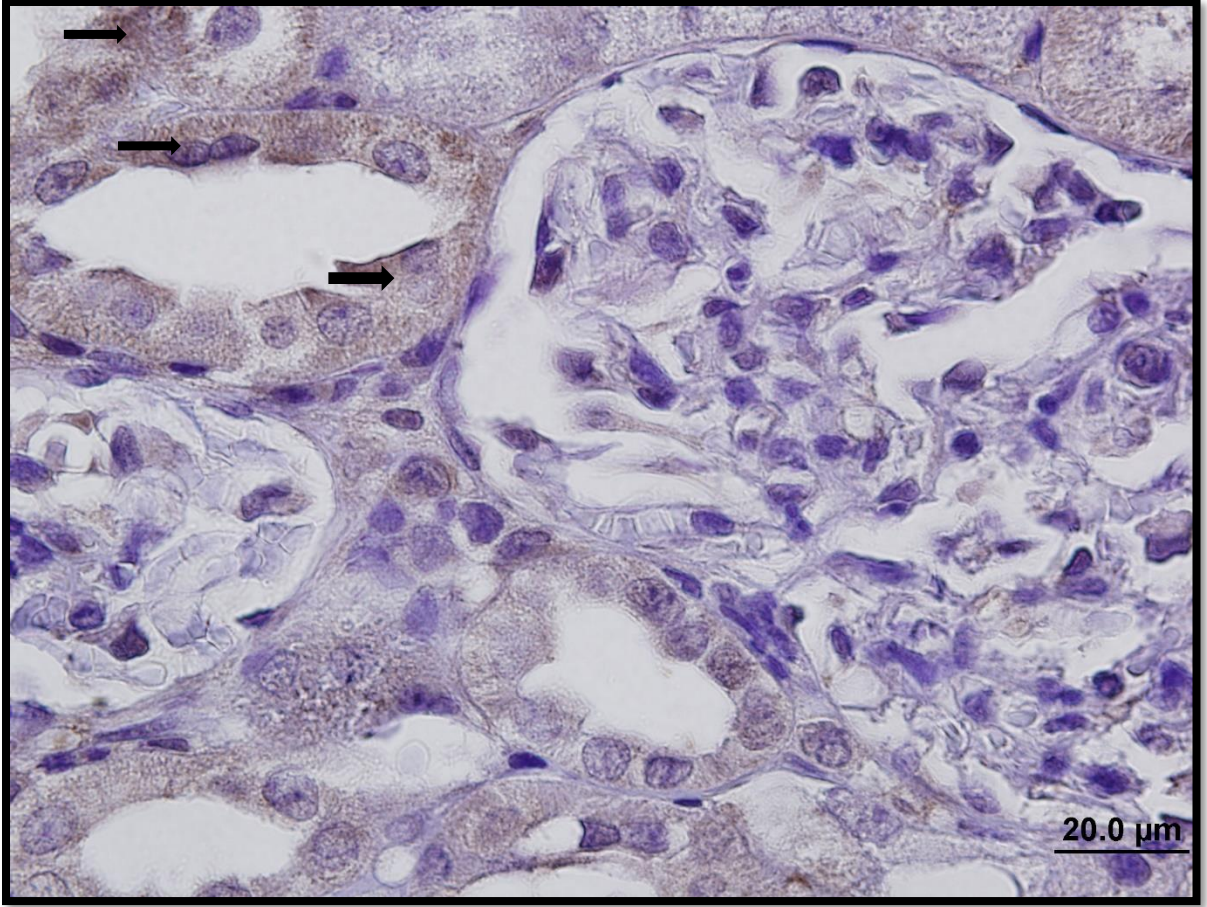
4.6.2. KIM-1 İmmunohistokimyası Sonuçları

Böbrek korteksinde KIM-1 immünoreaktivitesi kontrol ve FA grubunda zayıf immünoreaktivite (Resim42,43,44,45) ; GM grubunda ise, KIM-1 immünoreaktivitesi, kuvvetli pozitif olarak izlenmiştir (46,47). GM+FA grubu incelendiğinde, KIM-1 immünoreaktivitesi belirgin oranda azalmış ve zayıf pozitif ya da pozitif olarak gözlenmiştir (Resim48,49).

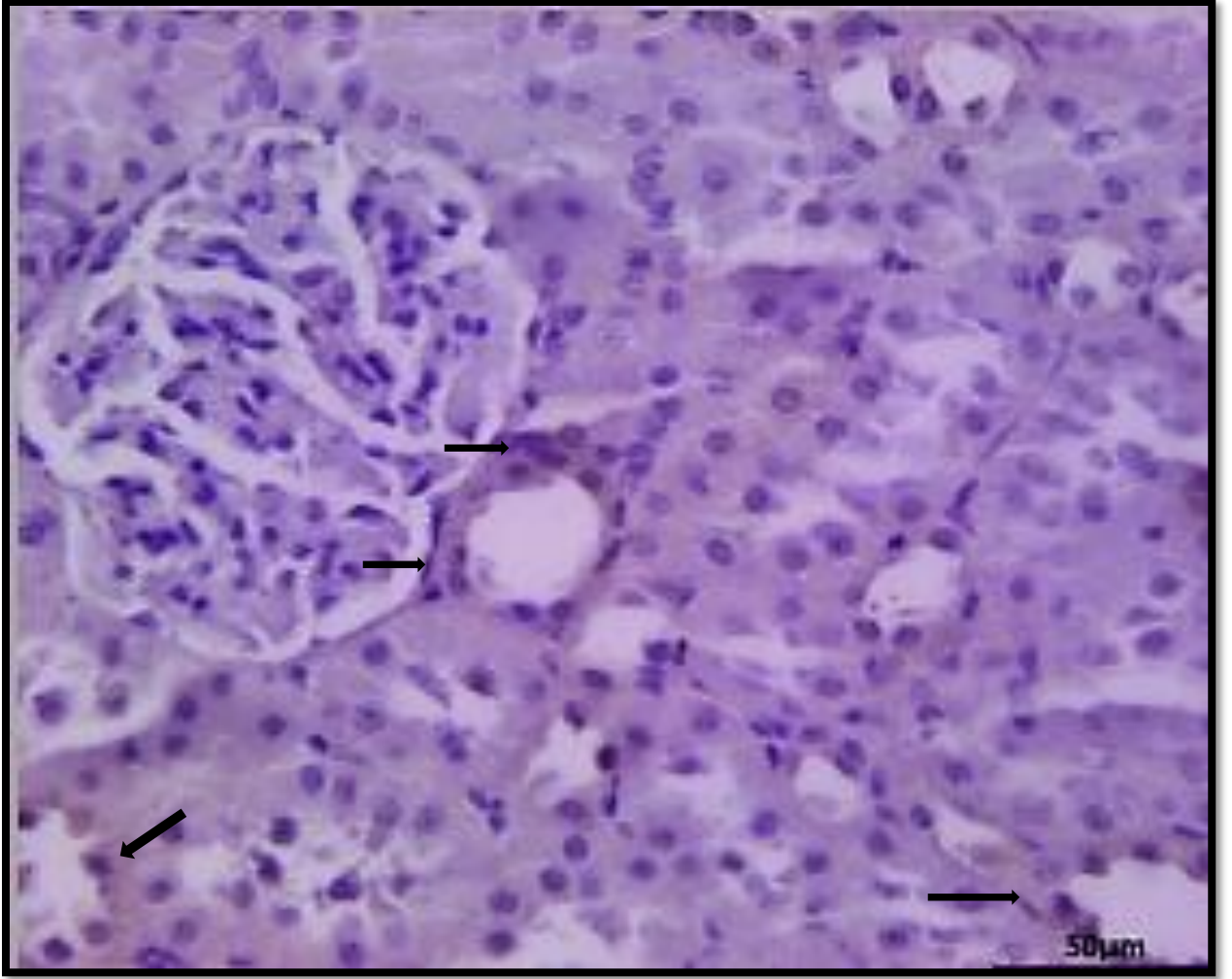
Tüm grupların immünoreaktivitesi incelendiğinde, GM grubundaki KIM-1 immünoreaktivitesinin kontrol ve FA grubuna göre anlamlı derecede arttığı (kuvvetli pozitif), GM+FA grubunda ise GM grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldığı (zayıf pozitif) saptanmıştır.



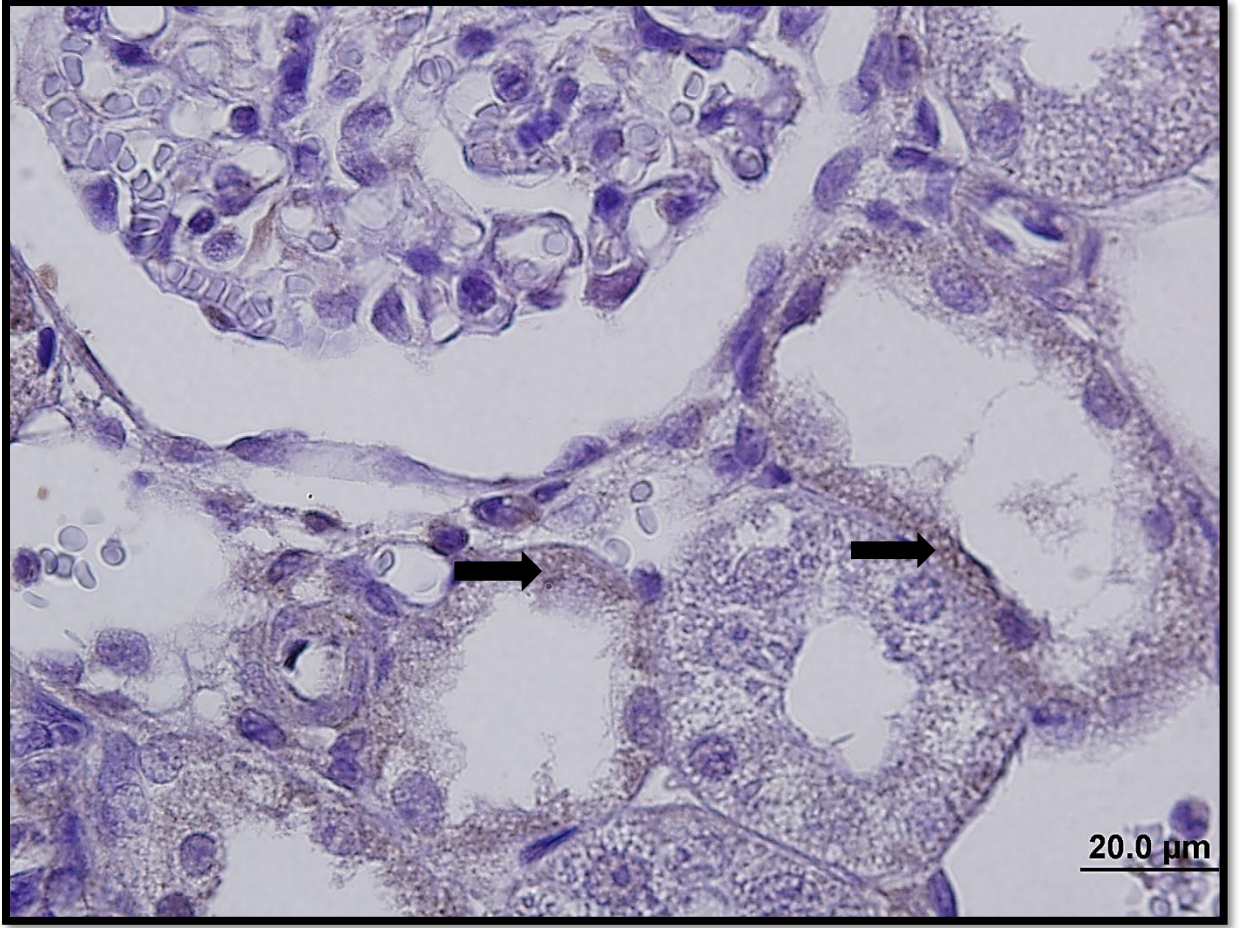
Resim 42: Kontrol grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40



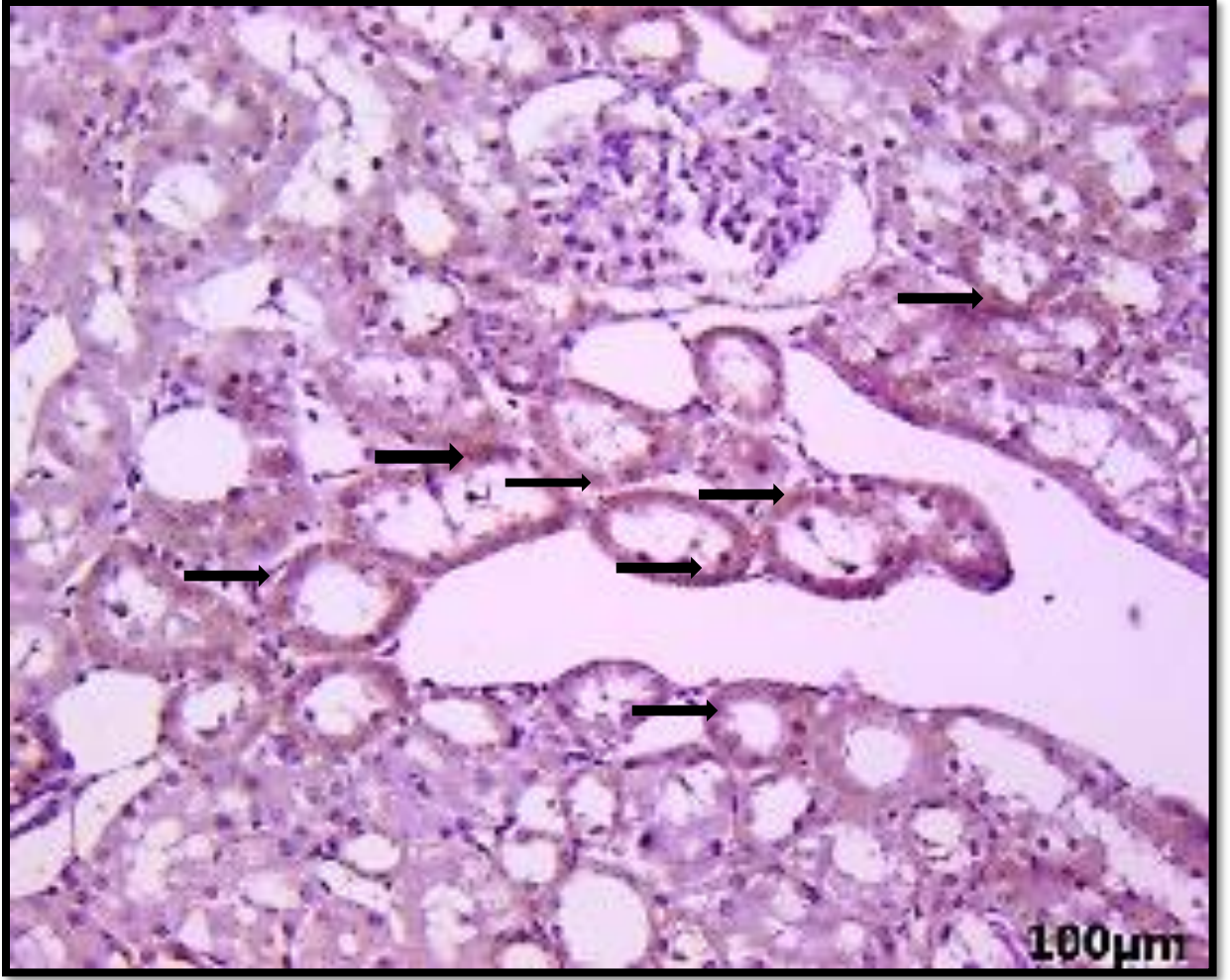
Resim 43: Kontrol grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100



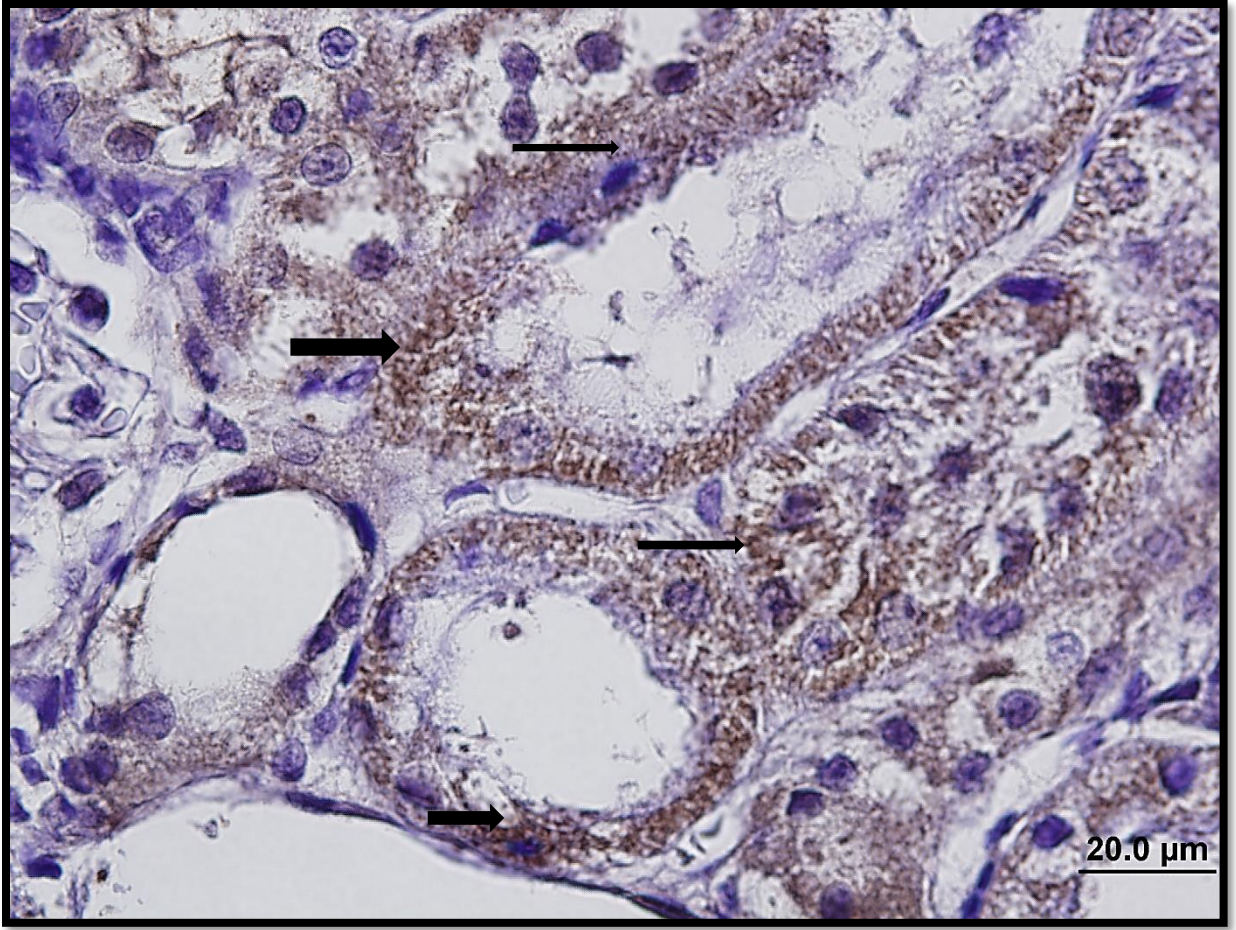
Resim 44: FA grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40



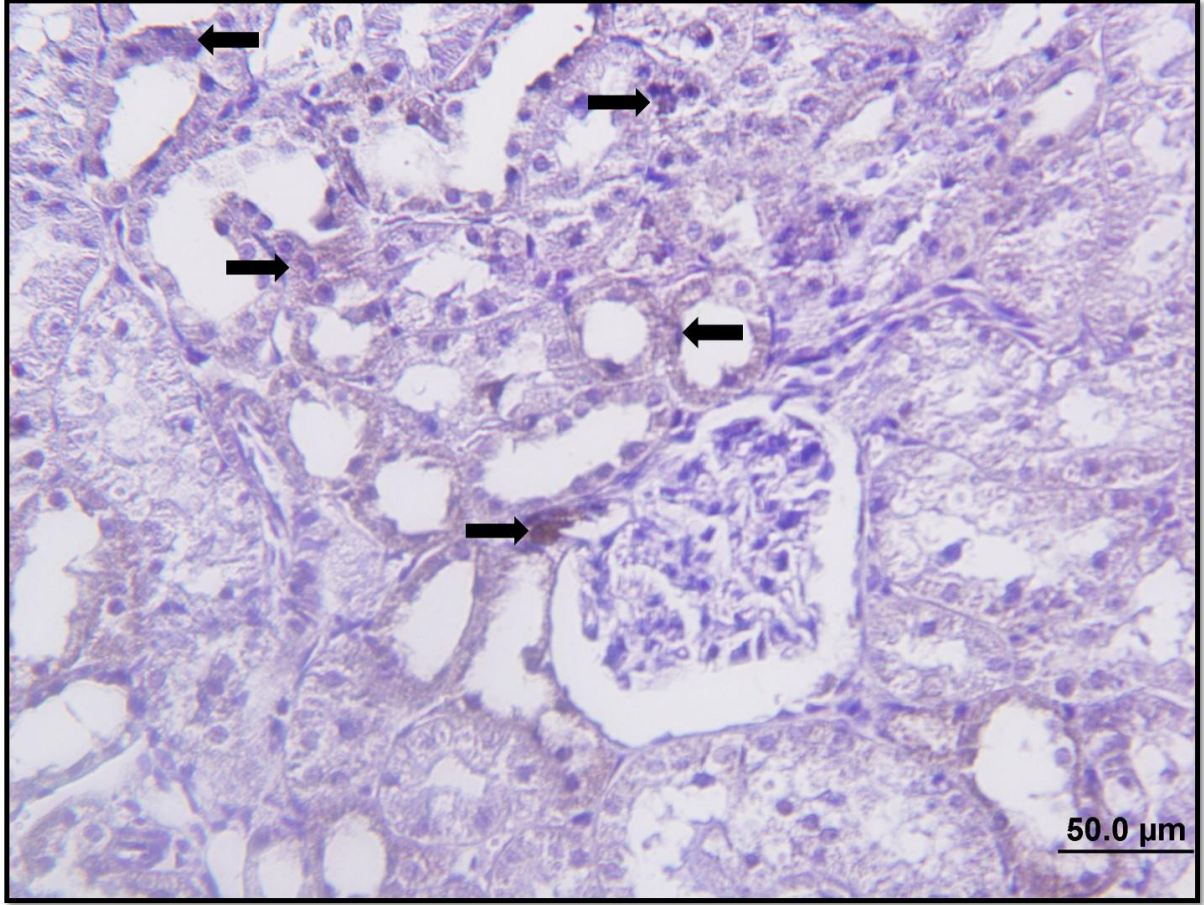
Resim 45: FA grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100



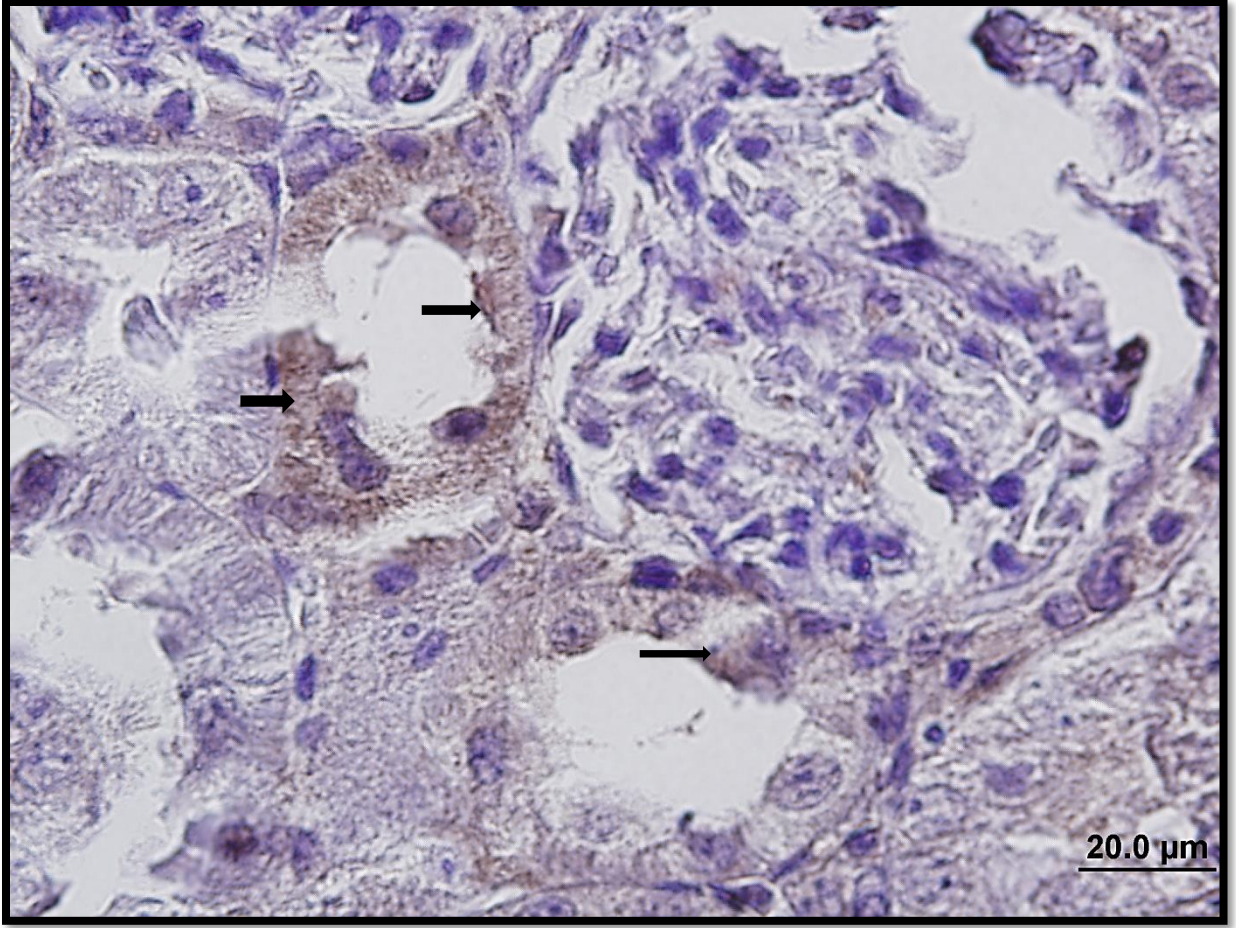
Resim 46: GM grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x40



Resim 47: GM grubunda KIM-1 immünreaktivitesi.x100



Resim 48: GM+FA grubunda KIM-1 immunreaktivitesi.x40

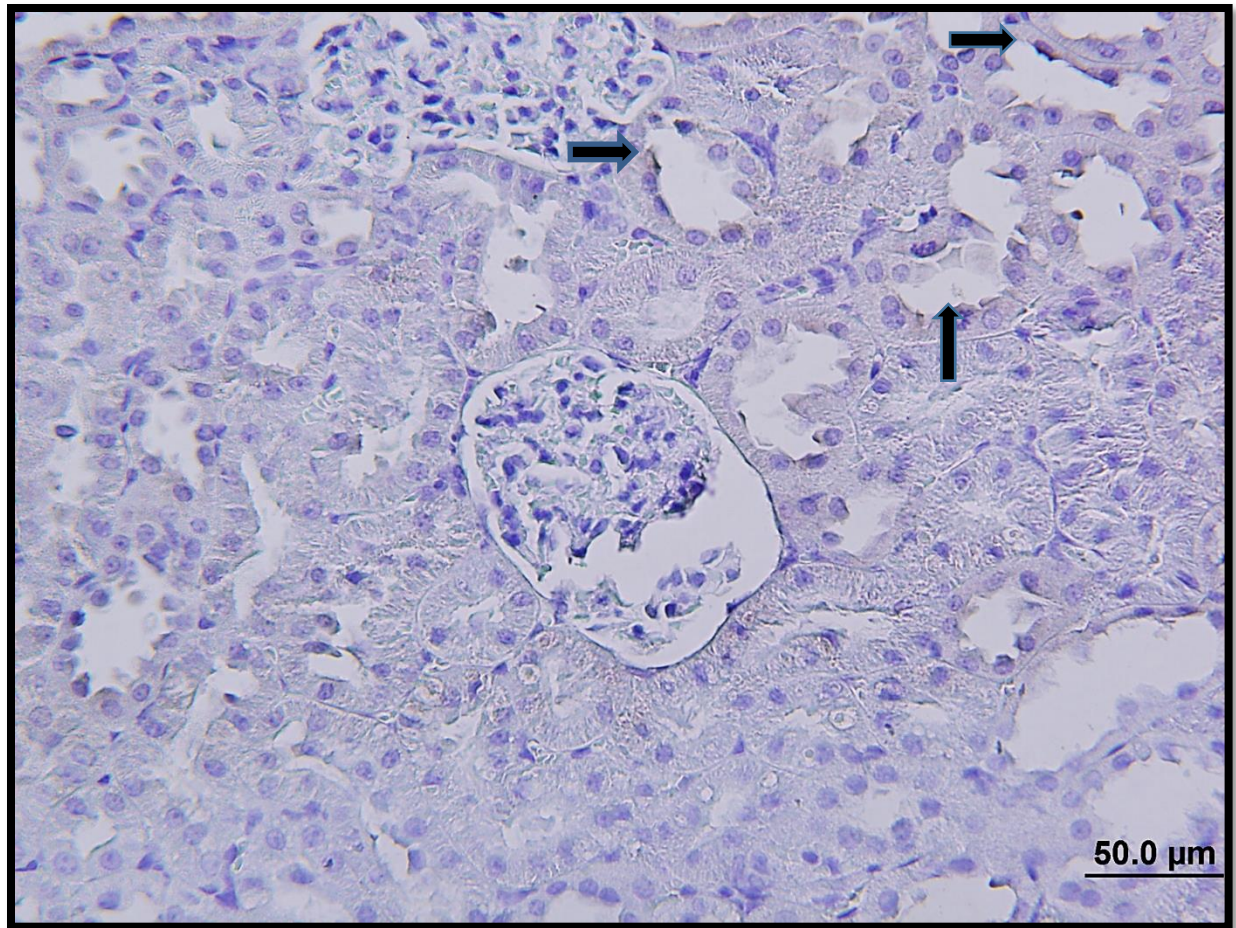


Resim 49: GM+FA grubunda KIM-1 immunreaktivitesi.x100

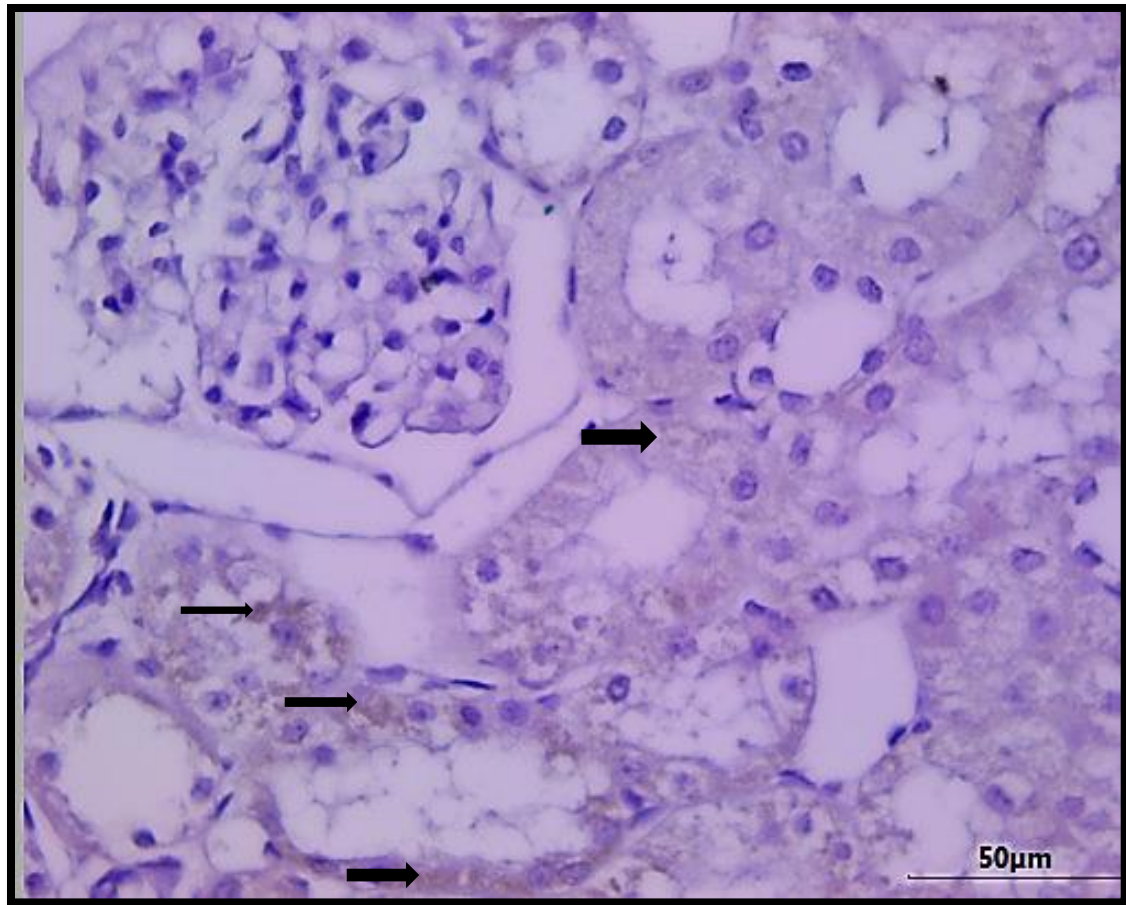
4.6.3. VEGF İmmunohistokimyası Sonuçları

Böbrek korteksinde VEGF immünoreaktivitesi kontrol ve FA grubunda zayıf immünoreaktivite (Resim 50,51,52,53) ; GM grubunda ise, VEGF immünoreaktivitesi, kuvvetli pozitif olarak izlendi(Resim 54,55). GM+FA grubu incelendiğinde, VEGF immünoreaktivitesi belirgin oranda azalmış ve zayıf pozitif ya da pozitif olarak gözlenmekteydi (Resim 56,57).

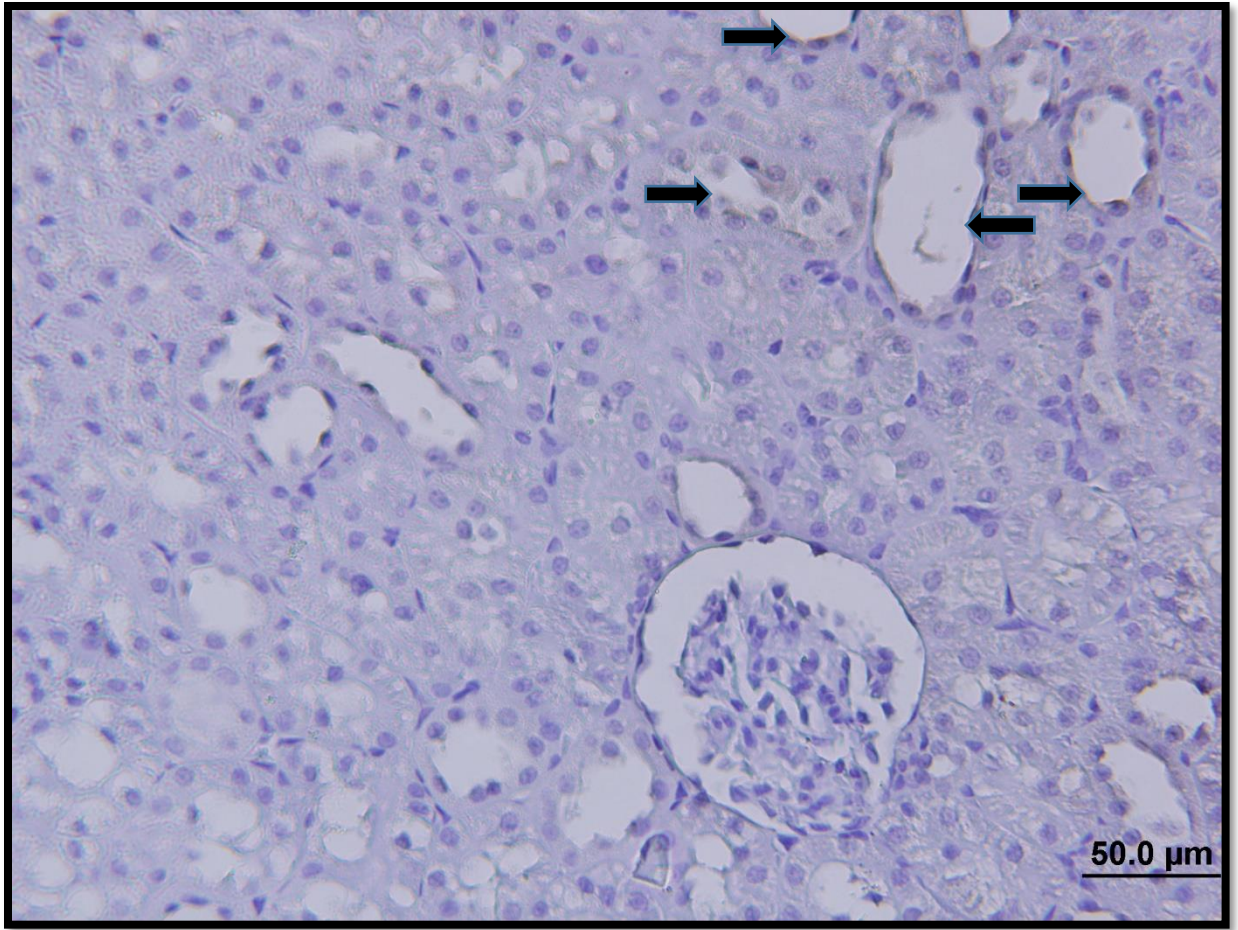
Tüm grupların immünoreaktivitesi incelendiğinde, GM grubundaki VEGF immünoreaktivitesinin kontrol ve FA grubuna göre anlamlı derecede arttığı (kuvvetli pozitif), GM+FA grubunda ise GM grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı (zayıf pozitif) saptandı.



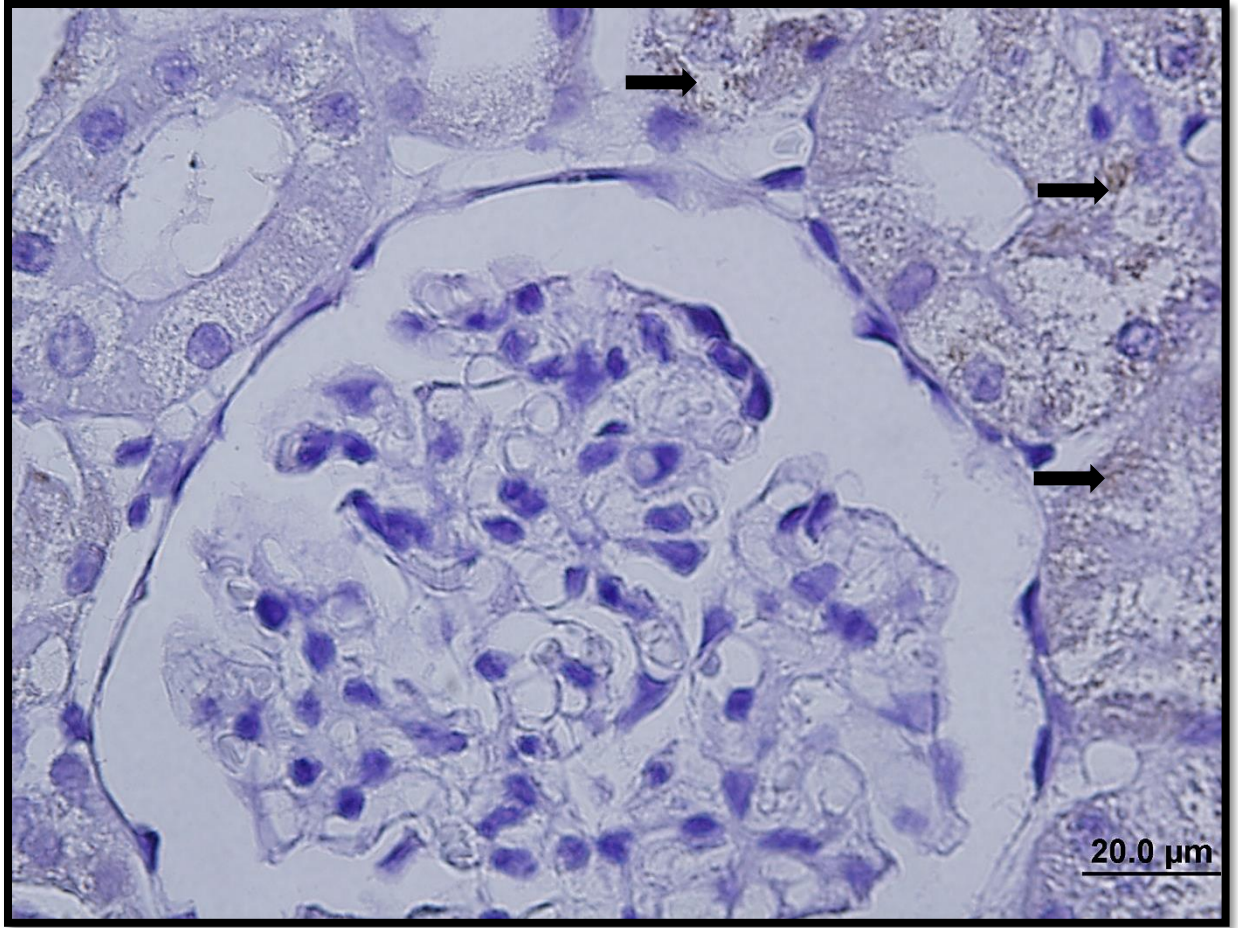
Resim 50: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40



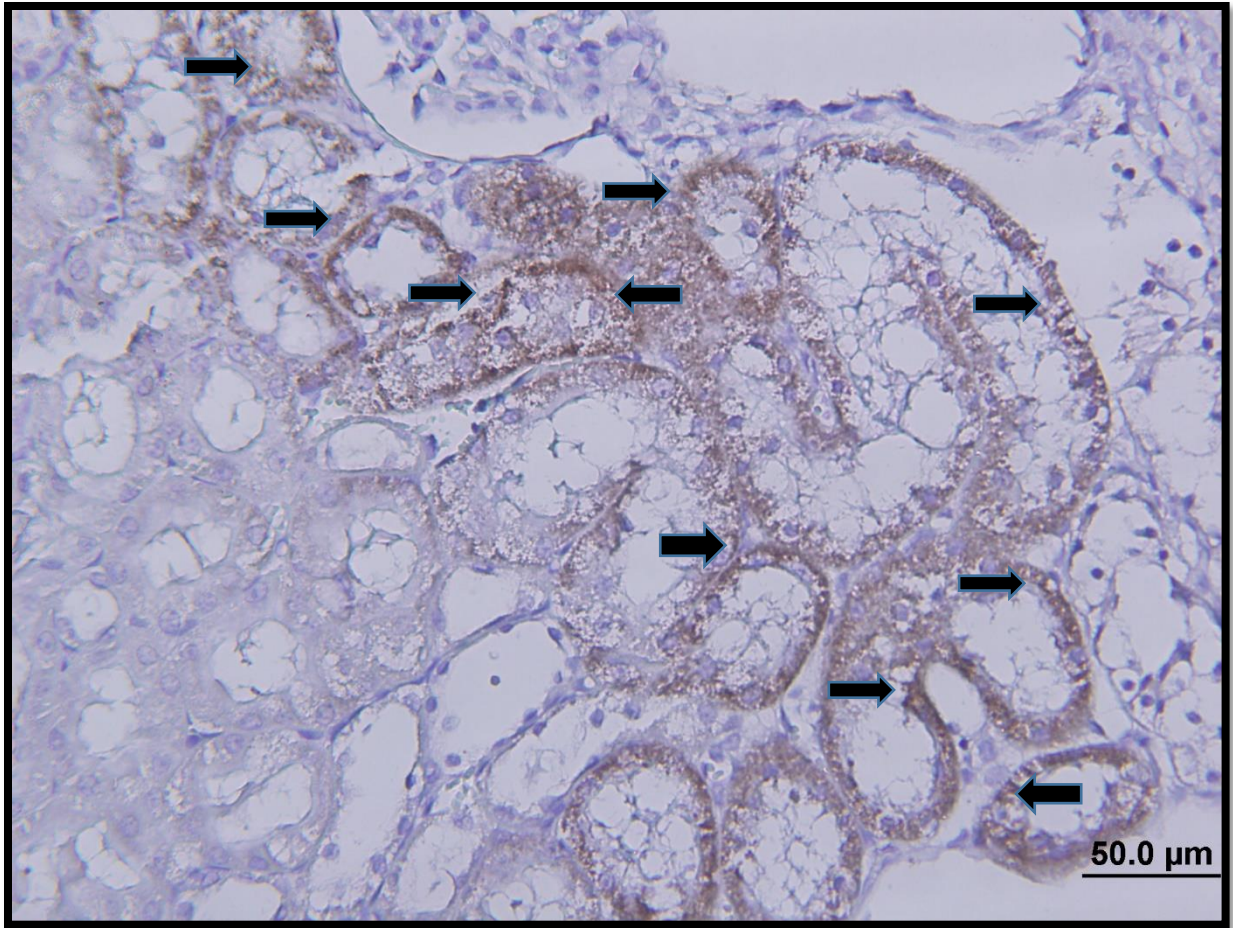
Resim 51: Kontrol grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100



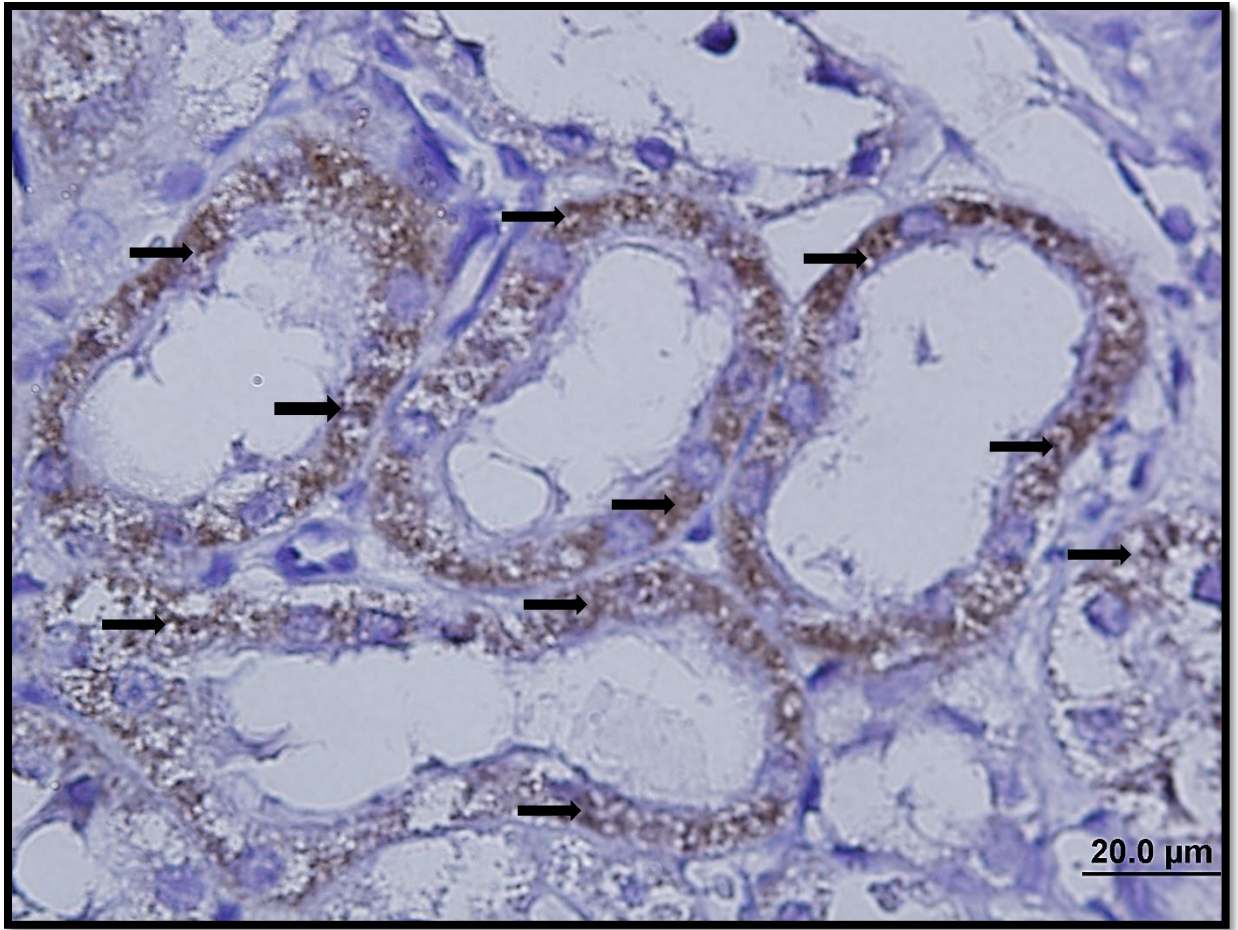
Resim 52: FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40



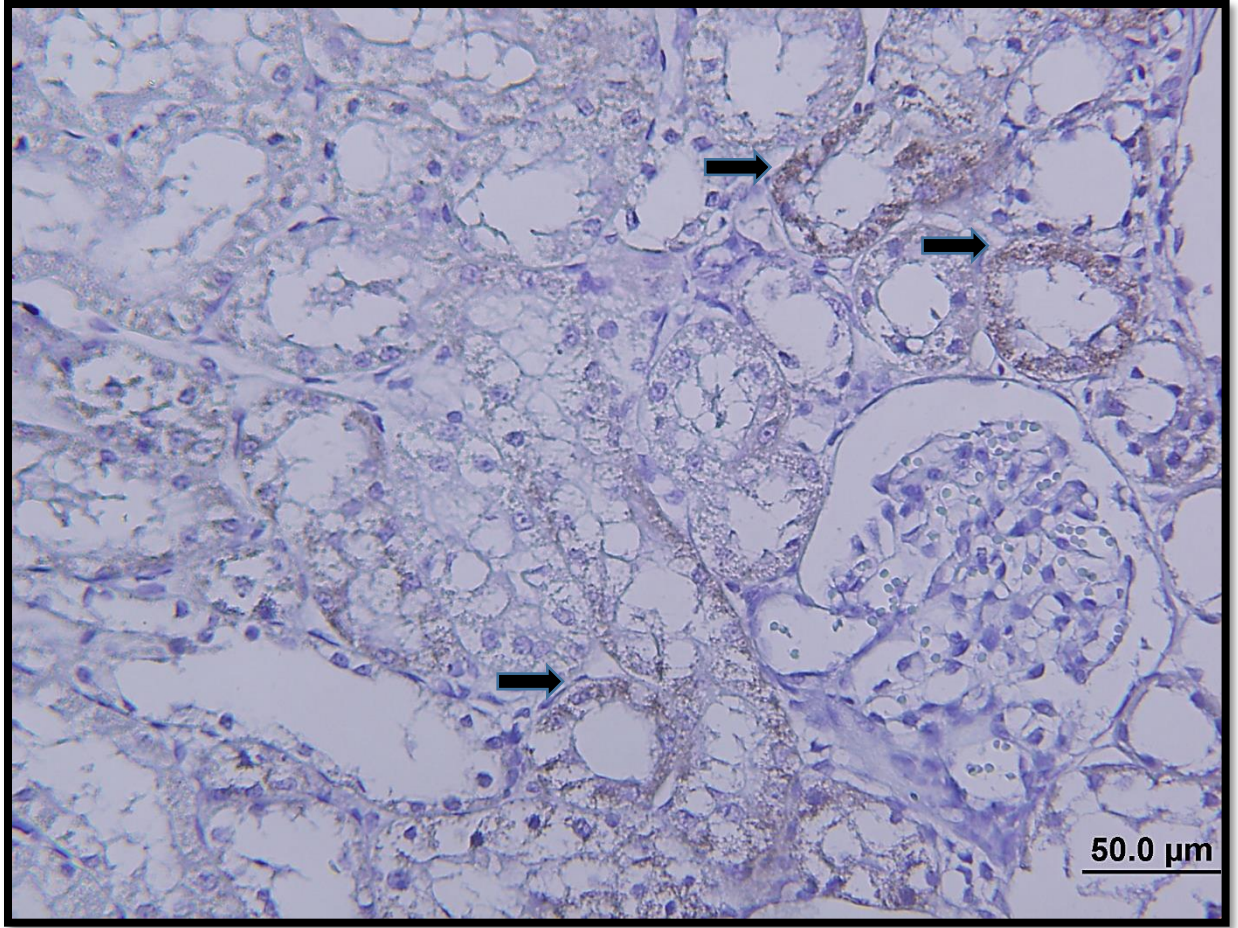
Resim 53: FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100



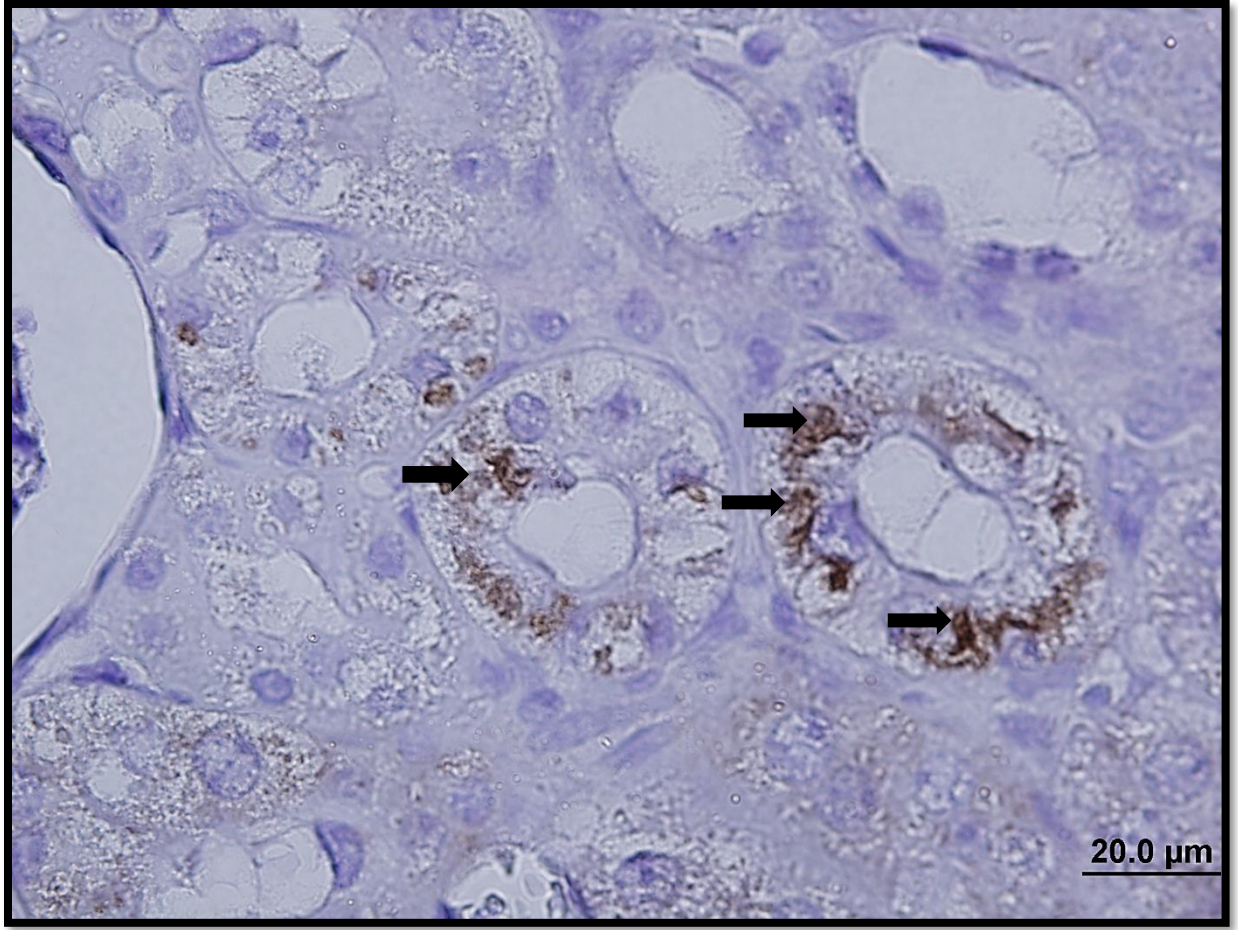
Resim 54: GM grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40



Resim 55: GM grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100



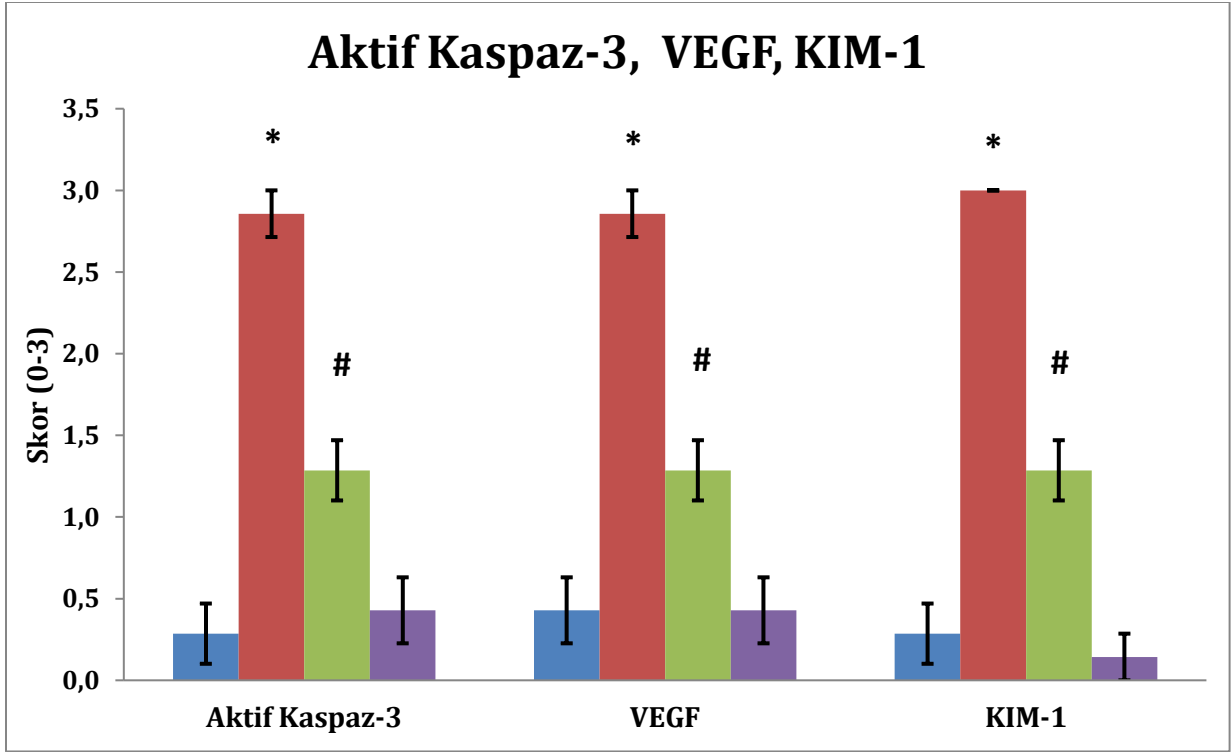
Resim 56: GM+FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x40



Resim 57: GM+ FA grubuna ait VEGF immunreaktivitesi.x100

Tablo 16: Aktif kaspaz-3, VEGF ve KIM-1 immünohistokimya karşılaştırmaları

Gruplar	Aktif Kaspaz-3	VEGF	KIM-1
	Ortalama ± Std. Hata		
Kontrol	0,3±0,2	0,4±0,2	0,3±0,2
Gentamicin	2,9±0,1	2,9±0,1	3,0±0,0
Gentamicin+Ferulik Asit	1,3±0,2	1,3±0,2	1,3±0,2
Ferulik Asit	0,4±0,2	0,4±0,2	0,1±0,1



Grafik 17:Aktif Kaspaz-3, VEGF ve KIM-1 immünohistokimya karşılaştırması

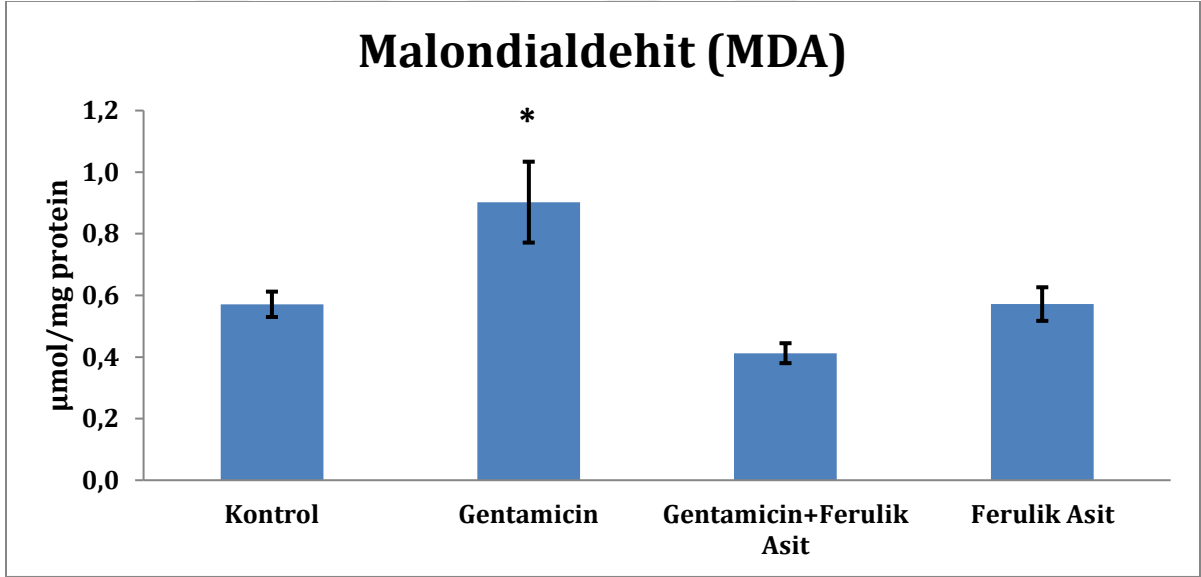
4.7. Biyokimyasal Bulgular

4.7.1 Serum Malondialdehit MDA düzeyi Değerlendirmesi

Malondialdehit (MDA) parametresinde, gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ve gentamicin grubunda anlamlı artış tespit edildi ($p < 0,05$). Bunlara karşılık, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca, gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 17. Oksidatif stres belirteçlerinin karşılaştırılması

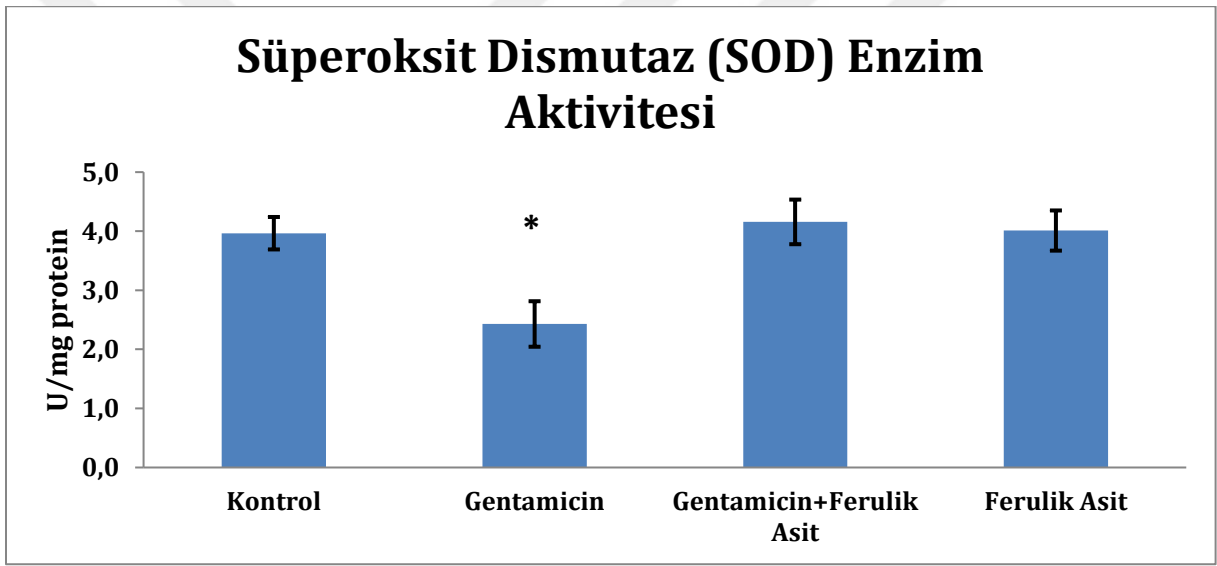
Gruplar	MDA ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}$)	SOD ($\text{U}/\text{mg protein}$)	GPx ($\text{mU}/\text{g protein}$)
	Ortalama $\pm$ Std. Hata		
Kontrol	0,6 $\pm$ 0,0	4,0 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,1
Gentamicin	0,9 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,2
Ferulik Asit	0,4 $\pm$ 0,0	4,2 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,0
Gentamicin+Ferulik Asit	0,6 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2



Grafik 18. Gruplar arasında malondialdehit ölçümünün karşılaştırılması

4.6.2 Serum Süperoksit dismutaz (SOD) düzeyi Değerlendirmesi

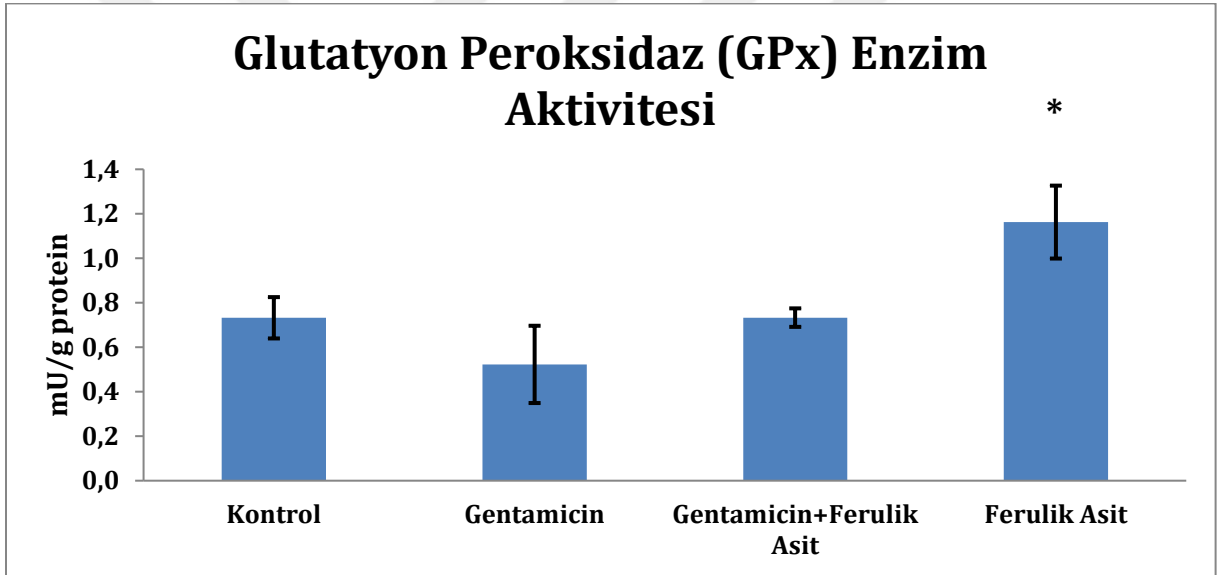
Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi parametresinde, gentamicin ile kontrol, gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ve gentamicin grubunda anlamlı azalış tespit edildi ($p<0,05$). Ancak, kontrol grubu ile gentamicin+ferulik asit ve ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Ayrıca, gentamicin+ferulik asit grubu ile ferulik asit grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).



Grafik 19. Gruplar arasında süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin karşılaştırılması

4.6.3 Serum Glutasyon peroksidaz (GPx) düzeyi Değerlendirmesi

Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi parametresinde, ferulik asit ile kontrol, gentamicin ve gentamicin+ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ve ferulik asit grubunda anlamlı artış olduğu görülmektedir (Grafik 19.; $p<0,05$). Ancak, kontrol grubu ile gentamicin ve gentamicin+ferulik asit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Benzer durum olarak gentamicin ve gentamicin+ferulik asit grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).



Grafik 20. Gruplar arasında glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA Ve SONUÇ

Gentamisin klinikte yaygın olarak kullanılmakta olan ve günümüzde gram negatif enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir antibiyotiktir. Ancak Gentamisinin böbreklerde oluşturduğu toksik etki kullanımını sınırlandırmaktadır (174). Gentamisin doza ve süreye bağlı olarak öncelikle proksimal tübül hücrelerinde olmak üzere böbrekte yaygın bir hasar oluşturur. (94). Proksimal tübül hücrelerine endositoz yolu ile girer ve endoplazmik retikulumda, lizozom ve golgide birikir. Eşik değere ulaştığında ise sitozole geçerek mitokondriyel disfonksiyona neden olur apoptoz ve nekroza yol açar.

Ferulik asit (FA); çeşitli meyve, sebze ve tahıllarda bulunan bir fitokimyasaldır. Yakın zamanda antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojenik ve nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir (175). H₂O₂ ile indüklenmiş inflamasyon modelinde reaktif oksijen moleküllerinin (ROM) üretimini ve hücre apoptozunu azalttığı ve hücre proliferasyonunu indüklediği, nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonunu inhibe ederek ROM üretimini azalttığı, NF- κ B aktivasyonunu inhibe ederek indüklenebilir nitrikoksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu ve IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (175). Yapılan başka bir çalışmada ise sepsisle indüklenmiş sıçanlarda FA tedavisinin malondialdehit (MDA) düzeylerinde anlamlı bir azalmaya, glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ve GSH peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerinde belirgin bir artışa neden olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca karaciğer, böbrek dokularında ve lenfositlerdeki deoksiribonükleik asit (DNA) hasarını anlamlı bir şekilde azalttığı ve böylece sepsisle indüklenmiş oksidatif hasarı önlemede etkili olduğu gösterilmiştir (176).

Biz de çalışmamızda deneysel erişkin sıçan nefrotoksisite modelinde ferulik asitin böbrek dokusundaki etkisini incelemeyi amaçladık.

Gentamisinin neden olduğu nefrotoksisitenin; renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik gibi patolojileri içerdiği ve ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (12).

GM kullanımına bağlı vücut ağırlığı azalmasını, akut böbrek yetmezliğinde oluşan asidozun anoreksiye eşlik ederek hayvanların oral olarak yiyecek alımında bir azalma olmasına bağlı olabileceği, böbrek ağırlığındaki artışın da olasılıkla ilacın neden olduğu akut tübüler nekroz nedeni ile ortaya çıkan ödemden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (9).Hasarlanan böbrek tübüllerine bağlı olarak vücut ağırlığı azalabilmektedir. Hasarlanan

tübül hücrelerindeki suyun geri emilim fonksiyonunun yitilmesi ile dehidratasyon meydana gelir, bunun sonucu olarakda vücut ağırlığı azalabilmektedir (177). Aynı zamanda GM verilmesinden sonra plazma magnezyum konsantrasyonunun azalması ile hipomagnezemi (178) ortaya çıkmakta bu da hayvanlardaki kilo kaybına neden olabilmektedir. Çünkü magnezyum vücutta protein, karbonhidrat ve lipit metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan esansiyel bir mineraldir (179). GM, elektrolitlere direkt etkisinden başka nonspesifik olarak tedavi olan hayvanlara stres etkisi de yapar. Stresin de hipomagnezemiye yol açtığı daha önce gösterilmiştir (180). Ayrıca bu tür kilo kaybının, protein sentezinin inhibisyonuna, gentamisin ile artan katabolizmaya bağlı olarak asidoz ve anoreksi ile sonuçlanmış ve bu da besin alımını azaltmıştır.(181)

Kasap ve arkadaşları Wistar albino cinsi dişi sıçanlar ile yaptıkları çalışmada 100 mg/kg dozunda 8 gün boyunca GM uyguladıkları sıçanlarda deney sonunda vücut ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığını belirlemişlerdir.(182)

Mahmoud Y ve arkadaşları erkek fareler ile yaptıkları çalışmada 100 mg/kg dozunda 8 gün boyunca GM uyguladıkları farelerde deney sonunda vücut ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığını belirlemişlerdir.(183)

Bizim yaptığımız çalışmada da tüm gruplara ait deneklerin deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlık ölçümleri yapıldı. Buna göre, kontrol ve FA grubunda, deney öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında vücut ağırlıklarının arttığı ve aralarında anlamlı bir fark olduğu görüldü. GM grubunda ve GM+FA grubunda ise , kontrol ve FA grubuna göre vücut ağırlıkları artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Böbrek ağırlığı/vücut ağırlığı oranı değerlendirildiğinde, GM grubunda; kontrol ve FA ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artışın olduğu görüldü. GM+FA grubunda ise bu artışın anlamlı olarak değişmediği saptandı.

Serum kreatinin düzeyi , böbreklerin kandan kreatinini uzaklaştırma yeteneğini gösteren bir parametredir. Renal yetmezlikte kreatininin filtre edilme yeteneği azalmakta ve serum kreatinin düzeyi yükselmektedir. Hastalıklı veya hasarlı böbrekler serum üre nitrojen (BUN) seviyesinin yükselmesine neden olur, çünkü böbreklerin kan dolaşımından üreyi temizleme kabiliyeti azalır (184).

Serum kreatinin düzeyindeki artış, glomerüler filtratın azalması, konsantrasyon yeteneğinde azalma ve BUN değerlerindeki artış nefrotoksisite olarak yorumlanmaktadır. Çoğunlukla gelişen nefrotoksisite non-oligüriktir. Nefrotoksisitenin; renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik gibi patolojileri içerdiği ve ilacın renal kortekste birikme özelliğinden kaynaklandığı bilinmektedir (12)

Katary ve arkadaşları 7 gün boyunca 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanların deney sonucunda serum üre ve kreatinin değerlerinde artış olduğunu göstermişlerdir.(185)

Moghadam ve arkadaşları 8 gün boyunca 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanların deney sonucunda serum üre ve kreatinin değerlerinde artış olduğunu göstermişlerdir(186).

Ghaznavi ve arkadaşları ve Balakumar ve arkadaşları 8 gün boyunca 100 mg/kg GM uyguladıkları erkek wistar albino sıçanlarında deney sonucunda serum üre ve kreatinin değerlerinde artış olduğunu göstermişlerdir(187,215).

Bizim çalışmamızda da kontrol ve FA gruplarında serum ve idrardaki üre ve kreatinin düzeyleri normal değerlerde seyrederken, GM verilen grupta serum ve idrar üre kreatinin değerlerinin anlamlı olarak artış gösterdiği saptandı. GM ile birlikte FA verilen grupta ise bu değerler düşüş göstermiştir.

Reaktif oksijen türleri gentamisininden neden olduğu proksimal tübüler nekrozis ve akut böbrek yetmezliğinden muhtemelen sorumludur (17). Reaktif oksijen türleri, oksidatif stres sırasında membran lipidlerinin peroksidasyonuna, çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasına ve çeşitli aldehid ve alkenlerin salınmasına neden olur (17,18). Bu salınım, gentamisine bağlı olarak serbest radikallerden oluşan moleküler oksijen salınımı (O₂⁻) ve oluşumunu şiddetlendirebilir (19). Serbest radikaller vasıtasıyla membranlar, dokular ve biyomoleküllerde oluşan oksidasyonun birçok patolojik vakada önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çok fazla miktarda üretilen serbest oksijen radikallerinin biyomoleküller (nükleik asitler, lipidler, polisakkaritler ve çeşitli proteinler) ile etkileşmesi hücre ve doku hasarına neden olmaktadır. Üretilen serbest radikaller, böbrek glomerüllerinin temel membranlarına zarar verir, tübül fonksiyonunu bozar, kollajen ve diğer matriks bileşenlerini parçalar (20). Ayrıca, serbest oksijen radikalleri ortamda olduğu zaman lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre zarının geçirgenliğini ve akışkanlığını değiştirir.

Lipid peroksidasyonu sırasında oksidatif hasarın belirteci olarak MDA kullanılabilir (188). Gentamisin uygulanan deneysel çalışmalarda serbest radikal oluşumunu yüzünden lipid peroksidasyonun arttığı ve MDA düzeylerinin yükseldiği gösterilmiştir.

Tarek Hamdy ve arkadaşları 8 gün boyunca 100 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda MDA düzeyinin arttığını kullandıkları antioksidan olan ursodeoksikolik asitin MDA düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir.(190)

Abdelsameea ve arkadaşları 8 gün boyunca 80 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda MDA düzeyinin arttığını kullandıkları antioksidan olan cilastazolün MDA düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir(15).

Bami ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 5 gün süre ile 10mg/kg cisplatin uygulayarak nefrotoksisite oluşturmuşlar ve MDA düzeyinin arttığını kullandıkları antioksidan olan bizim de çalışmamızda kullandığımız Ferulik asitin MDA düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir.(191)

Walker ve ark.'larının yaptığı çalışmada gentamisin böbrek kortikal mitokondrisinden demir salınmasına ve reaktif oksijen türleri üretilmesine neden olduğu, bu sebeple de oksidatif stres gelişimine yol açtığı bildirilmiştir (192,7).

Yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar olmakla birlikte genelde oksidatif hasarda antioksidan enzim (GSH-Px, CAT, SOD) düzeylerinin azalma gösterdiği gözlenmiştir.

Karahan ve arkadaşları çalışmalarında gentamisinle oluşturulan nefrotoksisitede gentamisin grubunda GSH-Px ve CAT aktivitesinde azalma göstermişlerdir (193).

Ali ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise circuminin gentamisinin oluşturduğu nefrotoksisiteyi azalttığı bildirilmiş, gentamisin uygulaması ile SOD konsantrasyonu azalmıştır (177).

 elik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada vankomisin ile oluşturulan nefrotoksisitede amrinonun korucuyu etkisi değerlendirilmiştir. Vankomisin grubunda SOD ve GSH-Px aktivitesi düşük bulunmuştur (194).

Yaman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada GM ile oluşturulan nefrotoksisitede nigella sativanın koruyucu etkisini değerlendirmişler ve GM grubunda MDA,SOD ve GPx düzeylerinin düşük olduğunu göstermişlerdir.(195)

Bizim yaptığımız çalışmada da MDA ve SOD değerlerinin Gentamisin grubunda anlamlı olarak artmış olduğu görüldü. Kontrol , Gentamisin +Ferulik Asit ve Ferulik Asit grupları arasında ise MDA ve SOD değerleri için anlamlı bir fark gözlenmedi. Çalışmamızda GPx değerini değerlendirdiğimizde ise GPx değerinin Ferulik Asit grubunda anlamlı olarak artmış olduğu görüldü ancak Kontrol , Gentamisin ,Gentamisin +Ferulik asit grupları arasında ise anlamlı bir fark gözlenmedi.

KIM-1 proksimal tübül epitelinin akut hasarını içeren renal hastalıklarda duyarlı, güvenilir ve erken biyobelirteçleri arasında sayılmaktadır (196). Bu proteinin artan ekspresyonu, iskemik ve nefrotoksik hasar sonrası proksimal tübül hücrelerinin apikal membranında çok yüksek seviyelerde bulunmuştur(197). Gentamisin proksimal renal tübül hücrelerde birikmesi ile fırçamsı kenar hasarına bağlı nefrotoksisite oluşabilir (198).

QH ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 7 gün süre ile 50 ve 100 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda böbrek dokusunda KIM-1 ve NGAL ekspresyonunu göstermişler ve GM verilen sıçanlarda KIM-1 ekspresyonunun doza ve zamana bağlı olarak artış gösterdiğini bildirmişlerdir(199).

Fouad ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 gün süre ile 80 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda böbrek dokusunda KIM-1 ekspresyonunu göstermişler. GM grubunda KIM-1 ekspresyonunun arttığını, antioksidan olarak kullandıkları naringenin KIM-1 ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir (200).

Biz de yaptığımız çalışmada kontrol ve FA grubunda KIM-1 ekspresyonunun olmadığını, GM grubunda KIM-1 ekspresyonunun arttığını, GM +FA grubunda KIM-1 ekspresyonunun GM grubuna göre azaldığını gözlemledik.

Böbrekte, VEGF glomerüller, proksimal ve distal kıvrımlı tübüllerin epitel hücrelerinde tarafından eksprese edilir (201). Nefrojenez ve vaskülojenezi indükleyebilmektedir (202). Ayrıca VEGF iskemik akut böbrek hasarı sırasında endotelial hücre sağkalımı ve onarımı için de gereklidir (203) . Proksimal tübülleri (PT) çevreleyen peritübül kılcal damarlar, vücuttaki en fenestreli ve geçirgen kılcal damarlardandır (204).

Fouad ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 gün süre ile 80 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda böbrek dokusunda VEGF ekspresyonunu göstermişler. GM grubunda VEGF

ekspresyonunun arttığını, antioksidan olarak kullandıkları naringenin VEGF ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir.(200)

Mıcılı ve arkadaşları ratlarda STZ ile oluşturdukları diabet ve hipertansiyon modelinde böbrek dokusunda VEGF ekspresyonunu göstermişler. Hasar grubunda VEGF ekspresyonunun arttığını antioksidan olarak kullandıkları lipoik asitin VEGF ekspresyonunu azalttığını belirtmişlerdir (205)

Öğütmen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 hafta boyunca günde 1 mg / kg intraperitoneal olarak takrolimus verdikleri sıçanlarda böbrek dokusunda VEGF ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir (206).

Jia ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 2 gün boyunca 8 saat ara ile 400mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda böbrek dokusunda VEGF ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir .(207)

Biz de yaptığımız çalışmada kontrol ve FA grubunda VEGF ekspresyonunun oldukça az olduğunuGM grubunda VEGF ekspresyonunun arttığını, GM +FA grubunda VEGF ekspresyonunun GM grubuna göre azaldığını gözlemledik.

Gentamisine bağlı nefrotoksiteye birçok farklı patalojik mekanizmalar neden olmaktadır. Bunlardan bazıları renal korteks ve medullaya monosit/makrofaj infiltrasyonu, artmış oksidatif stres, apoptozis ve nekrozu içermektedir (209-210).

Apoptoz farklı şekillerde uyarılan genler ile hücrelerin, programlanmış bir şekilde ölmesidir. Bu mekanizmada bcl, bax gibi farklı genler aktive olmaktadır. Kaspaz-3, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulmasını takiben sitokrom yapısının artması ve sitozolde düzeyinin artmasıyla aktive olan apoptik yolun en önemli göstergesidir (208)

Jaikumkao ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 15 gün boyunca 100mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda böbrek dokusunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığını, kullandıkları antioksidan olan atorvastatin grubunda ise aktif kaspaz 3 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir.(211)

Kasap ve arkadaşları Wistar albino cinsi dişi sıçanlar ile yaptıkları çalışmada 100 mg/kg dozunda 8 gün boyunca GM uyguladıkları sıçanlarda deney sonunda GM grubunda böbrek dokusunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığını, antioksidan olarak kullandıkları pentoksifilin grubunda ise ise aktif kaspaz 3 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir.(182)

Tarek Hamdy ve arkadaşları 8 gün boyunca 100 mg/kg GM verdikleri sıçanlarda GM grubunda böbrek dokusunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığını, antioksidan olarak kullandıkları ursodeoksikolik asit ile aktif kaspaz 3 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir (190)

Biz de yaptığımız çalışmada kontrol ve FA grubunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun ihmal edilebilir düzeyde olduğunu, GM grubunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun arttığını, GM +FA grubunda aktif kaspaz 3 ekspresyonunun GM grubuna göre azaldığını gözlemledik.

Yapılan birçok çalışmada GM verilmesi ile ortaya çıkan histolojik değişiklikler incelenmiştir.

Soliman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 1-2 hafta süre ile 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda GM grubunda tubulointerstisyel alanda lökosit infiltrasyonu, tubuler vakuolizasyon, tubuler dilatasyon, hiyalin cast oluşumunu göstermişlerdir (212).

AYGÜN ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 gün süre ile 100 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda histolojik olarak GM grubunda tubuler dilatasyon ve vakuolizasyon ile mononükleer hücre infiltrasyonunu göstermişlerdir (189)

Üstüner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 gün süre ile 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda histolojik olarak GM grubunda tubuler nekroz ve hiyalin cast oluşumunu göstermişlerdir(213).

Hegazy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 10 gün süre ile 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda histolojik olarak GM grubunda vakuoler dejenerasyonfırçamsı kenar kaybı tubuler dilatasyon, fokal tubuler deskuamasyon, tubüler nekroz, interstisyel hemoraji ve ödem, mononükleer hücre infiltrasyonunun göstermişlerdir.(214)

Balakumar ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 10 gün süre ile 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda histolojik olarak GM grubunda tubüler nekroz, glomeruler atrofi, hiyalin cast, inflamatuvar hücre infiltrasyonu interstisyel fibrozisi göstermişlerdir(215).

Biz de yaptığımız çalışmada kontrol ve FA grubunda korteks ve medullayı tubüller, glomerul ve renal korpuskül yapısını normal olarak gözlemledik. Ancak GM grubunda belirgin tubuler dilatasyon ve tubuler vakuolizasyonun arttığını ayrıca GM grubunda

proksimal tubullerde fırçamsı kenar kaybı ve tubullerde hiyalin kast formasyonunu tubulointerstisyel alanda mononükleer hücre infiltrasyonunun arttığını gözlemledik.

GM+FA grubunda, böbrek korteksi incelendiğinde GM grubuna göre; genel olarak yapının korunduğu, genişlemiş tübüllerin çaplarının belirgin oranda azaldığı ve hücrelerinin yuvarlak ya da yuvarlağa yakın olduğu, proksimal tübül fırçamsı kenar PAS (+)'nin kısmen korunduğu, yer yer normale yakın görünümlü proksimal tübüllerin olduğunu, lökositik infiltrasyon odaklarının çap ve sayılarının küçüldüğünü gözlemledik. Yine glomerüler küçülmenin gözlemlendiği Malpighi cisimcikleri sayılarının az olduğunu, hyalin cast yapılarının ise özellikle genişlemenin olduğu tübüllerde azalmakla birlikte hala mevcut olduğunu gözlemledik.

Soliman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 1-2 hafta süre ile 80 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda GM grubunda glomeruler atrofiyi göstermişlerdir (40).

Ghaznavi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 8 gün süre ile 100 mg/kg GM uyguladıkları sıçanlarda glomeruler atrofiyi göstermişlerdir.(187)

Biz de çalışmamızda GM grubunda glomeruler atrofiyi gözlemledik. Ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. GM+FA grubunda ise glomeruler çapın kontrol ve FA grubuna yaklaştığını glomeruler değişikliklerin oldukça düzeldiğini tespit ettik.

Qadir ve arkadaşları 15 gün 80mg/kg GM verdikleri farelerde Proksimal tübül çapında artma tespit etmişlerdir.(216)

Biz de çalışmamızda Proksimal tübül çapında GM grubunda artış tespit etmemeye rağmen istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Ölçtüğümüz distal tübül çapları ise tüm gruplarda benzer sonuç vererek normal ölçülerde değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada Gentamisine bağlı nefrotoksisitede Ferulik asitin koruyucu etkisinin olduğunu gözlemledik. Bu etkiyi serbest radikal düzeyini düşürerek, lipid peroksidasyonunu azaltarak ve nefrotoksisite parametrelerinden olan yükselmiş kan ve idrar üre ve kreatinin değerlerinde anlamlı azalma sağlayarak

gösterdiğini belirledik. Aynı zamanda yaptığımız immunhistokimyasal boyamalar ile elde ettiğimiz sonuçlarda KIM-1, VEGF ve Aktif Kaspaz 3 immunreaktivitesinin ferulik asit grubunda oldukça azaldığını tespit ettik. Gentamisine bağlı gelişebilecek olan nefrotoksisitenin şiddetinin azaltılması için gentamisin ile birlikte ferulik asitin kilinikte kullanımının yararlı olabileceğini düşündük ve aynı zamanda Gentamisin nefrotiksisitesinin azaltılması ya da tamamen ortadan kaldırılmasına yönelik yapılacak olan çalışmalarda yaptığımız araştırmanın literatüre katkısı olacağını düşünüyoruz.



6. KAYNAKLAR

1. Albernethy, Liberthal W. Acute renal failure in the critically ill patient. Crit Care Clin 2002;18: 203-212.
2. Humes HD. Acute renal failure prevailing challenges and prospects for the future. Kidney Int1995; 48: 26-32.
3. Foster JE, Harpur ES, Garland HO. An investigation of the acute effect of gentamicin on the renal handling of electrolytes in the rat. J Pharmacol Exp Ther 1992; 261: 38-43.
4. Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. Gen Pharmacol. 1995;26(7):1477-87.
5. Sung JH, Gim SA, Koh PO. Ferulic acid attenuates the cerebral ischemic injury induced decrease in peroxiredoxin-2 and thioredoxin expression; Neuroscience Letters 2014; 566: 88–92.
6. Phil-Ok Koh. Ferulic acid attenuates focal cerebral ischemia-induced decreases in p70S6 kinase and S6 phosphorylation; Neuroscience Letters 2013; 555:7– 11
7. Walker PD, Shah SV. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. J Clin Invest. 1988;81(2):334-41.
8. Paterson DL, Robson JM, Wagener MM. Risk factors for toxicity in elderly patients given aminoglycosides once daily. J Gen Intern Med. 1998;13(11):735-9.
9. Erdem A, Gündoğan NU, Usubütün A, Kiliç K, Erdem SR, Kara A, Bozkurt A. The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. Nephrol Dial Transplant. 2000;15(8):1175-82.
10. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(5):1003-12.
11. Volpini RA, Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM. Increased expression of p38 mitogen-activated protein kinase is related to the acute renal lesions induced by gentamicin. Braz J Med Biol Res, 2006; 39: 817-23

- 12.** Zaske DE. Aminoglycosides. Ewans WE, Schentag JJ, Jusko WJ, Eds. *Applied Pharmacokinetics Principles of Therapeutic Drug Monitoring, Applied Therapeutics*, 1992; 4; 14-
- 13.** Kayaalp OS. Aminoglikozidler. Rasyonel tedavi yönünden Tibbi Farmakoloji. 11. Baskı, Ankara: Hacettepe-Tas. Kitapçılık Ltd. Sti, 2005: 38-54.
- 14.** Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, Colak C, Vardi N, Uscar M, et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta. Histochem.* 2006; 108: 365-71.
- 15.** Yang CL, Du XH, Han YX, Renal cortical mitochondria are the source of oxygen free radicals enhanced by gentamicin. *Ren Fail* 1995; 17: 21–26.
- 16.** Kadkhodae M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of cosupplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Exp Physiol*, 2005; 4: 571 -576.
- 17.** Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Am J Kidney Dis* 1997; 29(3): 465–77
- 18.** Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715–25
- 19.** Moudden M, Laurent G, Leclercq M, Tulkens P. Gentamicin induced apoptosis in renal cell lines and embryonic rat fibroblasts. *Toxicol Sci* 2000; 56: 229–39
- 20.** Johnson JR, Lovett D, Lehrer IR, Couser GW, Klebanoff JS. Role of oxidants and proteases in glomerular injury. *Kidney Int* 1994; 45: 352–9
- 21.** Graf, E., “ Antioxidant potential of ferulic acid”, *Free Radic. Biol. Med.*, 13(4): 435–448 (1992)
- 22.** Paganga, G., “The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute?” *Free Radic. Res.*, 30: 153–162 (1999)
- 23.** Andersons, B., Gravitis, J., Erins, P., “Study of macromolecular models of lignin obtained from ferulic acid”, *Khim. Priir. Soedin.*, 2: 239–245 (1980)

24. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., “Polyphenols: food sources and bioavailability”, *Am. J Clin. Nutr.*, 79 (5): 727–747 (2004).
25. Adam, A., Crespy, V., Levrat-vermy, M.A., “The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats”, *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 132: 1962-1968 (2002).
26. Rukkumani, R., Aruna, K., Suresh Varma, P., Menon, V.P., “Hepatoprotective role of ferulic acid: a dose dependent study”, *J. Med. Food*, 7 (4): 456–461 (2004a).
27. Nomura, E., Kashiwada, A., Hosoda, A., Nakamura, K., Morishita, H., Tsuno, T., Taniguchi, H., “Synthesis of amide compounds of ferulic acid and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro”, *Bioorg. Med. Chem.*, 11: 3807–3813 (2003).
28. Huang, M.T., Smart, R.C., Wong, C.Q., Conney, A.H., “Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate”, *Cancer Res.*, 48: 5941–5946 (1988).
29. Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Pasquale, A.D., Uccella, N., Barbuzzi, T., Donatella, P., Bonina, F., “In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents”, *Int.J. Pharm.*, 199: 39–47 (2000).
30. Srinivasan, M., Rukkumani, R., Ram Sudheer, A., Menon, V.P., “Ferulic acid, a natural protector against carbon tetrachloride-induced toxicity”, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 19: 491–496 (2005).
31. Rukkumani, R., Aruna, K., Varma, P.S., Menon, V.P., “Ferulic acid, a natural phenolic antioxidant modulates altered lipid profiles during alcohol and thermally oxidized sunflower oil induced toxicity”, *Neutraceutic. Funct. Med. Foods*, 4: 119– 132 (2004b).
32. Murakami, A., Nakamura, Y., Koshimizu, K., Takahashi, D., Matsumoto, K., Haihara, K., Taniguchi, H., Nomura, E., Hosoda, A., Tsuno, T., Maruta, Y., H.W. Kim, H.W., Kawabata, K., Ohigashi, H., “FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion: comparison with ferulic acid”, *Cancer Letters*, 180: 121–129 (2002):S159–S161.

33. Moore KL, Dalley AF. Kliniğe yönelik anatomi. 4. Baskı ed. Şahinoğlu PDK, editor: Nobel Tıp Kitabevi; 1999
34. 27 Dere F . a-Anatomi ders kitabı (birinci baskı) .Okullar Pazarı Kitabevi Adana 1989
35. Snell, S. R. (2004). *Klinik Anatomi*. (Çev. M. Yıldırım). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 51-7.
36. Drake, L. R., Vogl, W., Mitchell, M. W. A. (2011). *Gray's Tıp Fakültesi*
37. Sancak, B., Cumhuriyet, M. (2012). Fonksiyonel Anatomi: Baş, boyun ve iç organlar (Üçüncü Baskı), Ankara: Güneş Kitabevi. 261-65. Öğrencileri İçin Anatomi. (Çev. M. Yıldırım). Ankara: Güneş Kitabevi.
38. Yıldırım M. İnsan Anatomisi. 5. Baskı ed: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.
39. Ozan H. Ozan Anatomi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2004.
40. Anundi, I., Lahteenmaki, T., Rundgren, M., Moldeus, P., Lindros, K.O., 1993, Zonation of acetaminophen metabolism and cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal and perivenous hepatocytes, *Biochem Pharmacol*, 45, 6, 1251-1259 p.
41. Pabs R. and Putz R. Sobotta Atlas of Human Anatomy fourteenth Ed. Urban & Fischer, Monchen . Jena; 2006
42. Standrind S. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis Of Clinical Practice, Thirty-Ninth Edition, Elsevier Ltd. London, UK, 2005 s.1269-1284
43. Gövsa Gökmen F Sistemik Anatomi, 1. Baskı, İzmir güven kitabevi, İzmir, 2003. S. 531-539
44. Ovale WK, Nahirney CP, Netter Temel Histoloji, (Çeviri Editörleri Müftüoğlu S., Kaymaz F., Atilla P.), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009, s. 353-372
45. Arıncı, K., Elhan, A. (2001). *Anatomi* (Birinci Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi.
46. Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2009). *Temel Histoloji: Text ve Atlas*. (Çev. S. Solakoğlu, Y. Aytekin). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 332-42.
47. Seçkin I, Oğuz EG. Üriner Sistem. İçinde: Netter'in Temel Histolojisi, Müftüoğlu S,

(Çeviri Editörü). *Netter's Essential Histology*. William KO, Patrick CN. First Ed, Ankara, Güneş Kitabevi, 2009: 353-376.

48. Aşan E. Ürogenital Sistem. İçinde: Langman Medikal Embriyoloji, Başaklar AC, (Çeviri Editörü). Langman's Medical Embryology Sadler TW. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005: 277-313.

49. Schoenwolf GC. *Larsen's Human Embryology*. Philadelphia, Elsevier, 2009: 479-495.

50. Sadler, T.W., Langman Medikal Embriyoloji, 2005, 9. baskı, 292- 293 p.

51. Erdoğan, D., Görgün, M., Hatipoğlu, T., Ilgaz, C. (2007). *Özel Histoloji* (İkinci Baskı). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi. 105-17

52. Abraham, L., Kierszenbaum, M. D. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. (Çev. R. Demir). Ankara: Palme Yayıncılık. 365-90

53. Abraham, L., Kierszenbaum, M. D. (2011). *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* (Third Edition). USA: Elsevier/Mosby. 415-40

54. Ross, M. H., Pawlina, W. (2011). Histology a Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology (Sixth Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 699-721

55. Gartner, L. P., Hiatt, J. L. (2001). *Color Textbook of Histology* (Third Edition). USA: WB Saunders. 435-60.

56. Noyan, A. (2008). *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji* (Onyedinci Baskı). Ankara: Palme Yayınevi. 591-654.

57. Tanagho, E. A. McAninch J. W. (2004). *Smith Genel Üroloji*. (Çev. G. Kazancı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1-570.

58. İşlekel H. Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Türkiye: Palme Yayıncılık, 2002: 37-42.

59. Preuss HG, Podlasek SJ, Henry JB. Evaluation of Renal Function and Water, Electrolyte, and Acid-Base Balance. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Editor: J.B. Henry, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1991; 7: 119-139.

60. Maden M. Deneysel Gentamisin Nefrotoksitesinde Üriner Enzim Aktivitelerinin Önemi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri. Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya, 1994.

- 61.**Kürsat T. *Veteriner Klinik Laboratuvar Teshis*. 2. Baskı. Bahçivanlar Basımsanayi AŞ, Konya, 2000.
- 62.** Ertekin A, Karaca M, Akkan HA, Cemek M ve Ormancı N. Köpeklerde gentamisin nefrotoksikosisinde lipit peroksidasyonu, antioksidan maddeler, antioksidan vitaminler ve bazı hematolojik-biyokimyasal parametre düzeylerinin araştırılması. *Türk J Vet Anim Sci*, 2003; 27: 535-540.
- 63.**Mingeot-Leclercq MP and Tulkens PM. Aminoglycosides: Nephrotoxicity Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1999; 43(5): 1003-1012.
- 64.** Turgut K, Maden M, Sen I and Çiftçi MK. Ultrasonographic evaluation of kidney damage in dog with gentamicin nephrotoxicity. *Tr. J. Vet. Anim. Sci*, 1995; 20: 367-373.
- 65.**Luft FC, Patel V, Yum MN and Kleit SA. (1976). Nephrotoxicity of cephalosporin gentamicin combinations in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1976;9(5): 831-839.
- 66.** Mıstık R. Aminoglikozid antibiyotikler ve günde tek doz kullanımları. *Klinik Dergisi*. 2000; 13(2): 43-45.
- 67.**Evenepoel P. Acute toxic renal failure. *Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*, 2004; 18(1): 37-52.
- 68.** Can C, Sen S, Nese B and Isık T. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *European Journal of Pharmacology*.2000; 390: 327-334.
- 69.** Anderson RJ and Barry DW. Clinical and laboratory diagnosis of acute renal failure.*Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology*. 2004; 18(1): 1-20.87mıstlu.
- 70.**Ghaznavi R, Faghihi M, Kadkhodae M, Shams S and Khastar H. Effects of nitric oxide on gentamicin toxicity in isolated perfused rat kidneys. *J. Nephrol*, 2005; 18:548-552.
- 71.** David J, Aslan D (2005). Basic Prenciples in Clinical Chemistry, Eds. *Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Türkiye, Palme Yayıncılık, 308-722.
- 72.** Arık N, Başkol M, Çağlar K (2001). Nefroloji. İstanbul, Deniz Matbaacılık, 11-15.

73. Cockcroft DW, Gault MH (1976). Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16, 31-41.
74. Mert N (1996). Veteriner Klinik Biyokimya, UÜ Güçlendirme Vakfı, Yayın no: 12.
75. Guignard JP, Dukker A (1999). Clinical neonatal nephrology. In, Barratt TM, Avner ED, Harmon WE, Eds *Pediatric Nephrology* (4th ed), Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins, 1051-1066.
76. Yurdakök M, Erdem G (2003). Böbrek ve İşlevleri. Türk Neonatoloji Derneği, Neonatoloji kitabı, 80, 681-693.
77. Aljama P, Cruz JM, Martin de Francisco AL (2002). New in sights in ESRD. *Kidney Int*, 80,127.
78. Robinson DC, Millares M. Acute and Chronic Renal Diseases. Clinical Pharmacy and Therapeutics, editörler: E.F. Herfindal, DR. Gourley LL. Hart. Williams and Wilkins, Baltimore, 1992; 5: .347-371.
79. Aygün G. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Eriskinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. *Cerrahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri*. 2002; 31:39-54.
80. Gilbert DN, Mandell GL, Benet JE, Dolin R. Aminoglycosides. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5. baskı, Philadelphia: Churchill and Livingstone, 2000; 1:307-336
81. Arman D, Dizbay M. Yeni aminoglikozid antibiyotikler. Antimikrobiyal tedavide yenilikler. *Modern Tıp Seminerleri* 2000: 40-50
82. Willke A. Aminoglikozidler. Willke AT, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*,. 2. Baskı, Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002; 1:214 223.
83. Akata F. Aminoglikozidlerde Farmakokinetik/ Farmakodinamik İlişkiler. *ANKEM Derg* 2003; 3: 232- 236.
84. MacDonald M.G, Mullett M.D, Mary M.K. Neonatology Pathophysiology and management of the newborn. 6th Ed., *Renal Disease* 2000; 42:980-1065.

- 85.** Kayaalp O. Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, 2009:216-24.
- 86.** Dökmeci İ. Farmakoloji temel tavrılar. 1. basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000:883-91.
- 87.** Engineer MS, Bodey GP Sr, Newman RA, Ho DH. Effects of cisplatin-induced nephrotoxicity on gentamicin pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos.* 1987;15(3):329-34.
- 88.** Sanders TW Jr, Reinhard MK, Jollow DJ, Hottendorf GH. Lack of in vivo evidence of a cytochrome P450 metabolite participating in aminoglycoside nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(3):780-2.
- 89.** Weinberg JM, Hunt D, Humes HD. Distribution of gentamicin among subcellular fractions from rat renal cortex. *Biochem Pharmacol.* 1985;34(10):1779-87.
- 90.** Li M, Maderdrut JL, Lertora JJ, Arimura A, Batuman V. Renoprotection by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul Pept.* 2008;145(1-3):24-32.
- 91.** Williams PD, Hottendorf GH. Inhibition of renal membrane binding and nephrotoxicity of gentamicin by polyasparagine and polyaspartic acid in the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1985;47(2):317-20.
- 92.** Tulkens PM. Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicol Lett.* 1989;46(13):10723.
- 93.** Wargo KA, Edwards JD. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *J Pharm Pract.* 2014; 27: 573-577.
- 94.** Walker PD, Barri Y, Shah SV. Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Ren Fail.* 1999; 21: 433-442.
- 95.** Sheppard D, Lampiris HW. Antifungal agents. Katzung BG(eds). *Lange Basic & Clinica Pharmacology* (8 th). Mc Graw –Hill New York 2001; 814-822.
- 96.** Bennet JE. Antimicrobial agents. Molinoff PB, Ruddon RW. (eds). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basic of therapeutics* (9th). Mc Graw –Hill New York 1996; 1175-1190.

- 97.** Coşkun O, Armutçu F, Kanter M, Kuzey GM. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. *J Appl Toxicol*.25(1):8-12,2005.
- 98.** Suru SM. Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats. *Biomaterials* 2008; 3.
- 99.** Hascelik G. İnfeksiyon etkenlerinin temel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Nobel Tıp Kitabevleri, Nobel Matbaacılık İstanbul 2008; 294-303.
- 100.** Serarslan G, Altug E, Konaş T, Atik E, Avcı G. Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress. *Clin Exp Dermatol* 2007; 32(6):709-15.
- 101.** Zhu YJ, Zeng T, Zhu YB, Yu SF, Wang QS, Zhang LP et al. Effects of Acrylamide on the Nervous Tissue Antioxidant System and Sciatic Nerve Electrophysiology in the Rat. *Neurochem Res* 2008;8;10-14.
- 102.** Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:1287-1305.
- 103.** Gutteridge JMC, Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed, Oxford:Clarendon Press 1991; 1-276.
- 104.** Gilbert DL, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. Mc Graw –Hill New York 2002; 856-867.
- 105.** Boyunaga H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. *Bilim Teknik Derg.* 1996;347:98-100.
- 106.** Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;91:31-38.
- 107.** Floyd RA. DNA damage and repair in *Oxidative Damage and Repair*. Davies KJA. Ed.Pergamon Press 1992; 32;175-180.
- 108.** Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidantsin diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005;29;4(1):5.
- 109.** Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterinetkinliğinin araştırılması. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi 2007.

- 110.** De Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of freeradical damage applications in experimental animals and inhumans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26:202-226.
- 111.** Reznick A.Z, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-363.
- 112.** Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 1996; 313: 17-29.
- 113.** Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin Chim Acta* 2006; 365: 30-49.
- 114.** Schirli AO, Sener G, Satrioğlu H, Ayanoglu-Dülger G. Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Nephrol.* 16(1):75-80, 2003.
- 115.** Jerry P, Liu L, Zeng M, Stamler J.S. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000; 39:1040-1047.
- 116.** Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2003; 88: 434-439.
- 117.** Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 459-516.
- 118.** Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.
- 119.** Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82: 747-752.
- 120.** Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer RF, Limson J, Weintraub ST et al. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin transformation. *Free Rad Biol Med* 2000; 29: 1177-85.
- 121.** Meister A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. *Cancer Res Suppl* 1994; 54:1969-1975.
- 122.** Cochrane C.G. Cellular injury by oxidants. *Am J Med* 1991; 56:23-30.
- 123.** Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.

- 124.** Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266: 37-56.
- 125.** Halliwell B. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase: solutions to the problem of lung with oxygen. *New Phyto* 1974; 73: 1075-1086.
- 126.** Burlacu, A., 2003, Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins, *J. Cell.Mol. Med.* 7(3):249-257.
- 127.** Koçtürk, S., Kayatekin, B.,M., Resmi, H., Açıkgoz, O., Kaynak, C., Özer, E.,2008, The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and soleus muscle fibers in rats, *Eur. J. Appl. Physiol.* 102:515-524.
- 128.** Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J.Cell. Mol. Med.*, 8(4):432-444.
- 129.** Gulbins, E., Dreschers, S., Bock, J., 2003, Role of mitochondria in apoptosis, *Experimental Physiology*, 88:85-90.
- 130.** Akşit, H., Bildik, A., 2008, Apoptozis, *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 19(1):55-63.
- 131.** Kültürsay, H., Kayıkçıoğlu, M., 2002, Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar, *Anadolu Kardiyoloji Derg.*, 4:323-9.
- 132.** Sprick, M.,R., Walczak, H., 2004, The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta* 1644:125-132.
- 133.** Aydoğdu, N., Kaymak, K., Yalçın, Ö., 2005, Sıçanlarda Böbrek İskemi/Reperfüzyon Hasarında N-Asetilsisteinin Etkileri, *Fırat Tıp Dergisi* 10(4); 151-155.
- 134.** Orrenius, S., 2007, Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death, *Drug Metabolism Reviews*, 39:443-455.
- 135.** Tomatır, A.,G., 2003, Apoptoz: Programlı hücre ölümü, *T. Klin. Tıp Bilimleri* 23:499-508.
- 136.** Philchenkov, A., 2004, Caspases: potential targets for regulating cell death, *J.Cell. Mol. Med*, 8(4):432-444.
- 137.** (scandinavian journal of immunology,2011;73:401-7) 139
- 138.** Shen, H.,M., Liu, Z.,G., 2006, JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species, *Free Radical Biology & Medicine* 40:928-939

- 139.** Chao, C., L., Hou, Y.,C., Chao, P.,D.,L., Weng, C.,S., Ho, F.,M., 2008, The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells, *Br. J.Nutr.*, 14:1-6.
- 140.** Ishikawa, Y., Kitamura, M., 2000, Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways, *Kidney International*, 58:1078-1087
- 141.** Wang, Y., Pei, D.,S., Ji, H.,X., Xing, S.,H., 2008, Protective effect of a standardized Ginkgo extract (ginaton) on renal ischemia/reperfusion injury via suppressing the activation of JNK signal pathway, *Phytomedicine*, 15(11):923-931.
- 142.** Graf, E., “Antioxidant potential of ferulic acid”, *Free Radic. Biol. Med.* 13(4):435–448 (1992).
- 143.** Paganga, G., “The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidantactivities. What does a serving constitute?” *Free Radic. Res.*, 30: 153–162 (1999).
- Pahl, H.L., Baeuerle, P.A., “Oxygen and the control of gene expression”, *Bioessays*, 16: 497–502 (1994).
- 144.** Prasad, N.R., Srinivasan, M., Pugalendi, K.V., Menon, V.P., “Protective effect of ferulic acid on γ -radiation induced micronuclei, dicentric aberration and lipid peroxidation in human lymphocytes”, *Mutation Research*, 603: 129-134 (2006).
- 145.** Zhao Z, Moghadasian MH. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review: *Food Chemistry* 2008; 109: 691–702.)
- 146** ferulik şekli Potential applications of ferulic acid from natural sources
Naresh Kumar, Vikas Pruthi * Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Roorkee, Roorkee 247667, India
- 147.**Huo W, Zhang K, Nie Z, Li Q, Jin F. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A Novel Kidney-Specific Injury Molecule Playing Potential Double-Edged Functions In Kidney Injury Transplant Rev. 2010;24 (3):143-6.
- 148.** Bailly V, Zhang Z, Meier W et al. Shedding of Kidney Injury Molecule-1, A Putative Adhesion Protein Involved in Renal Regeneration. *J Biol Chem* 2002;277:39739-48.
- 149.** Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S et al. The TIM Gene Family Regulates Autoimmune and Allergic Diseases. *Trends Mol Med* 2005;11: 362-9.

- 150.** Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T et al. Urinary Kidney Injury Molecule-1: A Sensitive Quantitative Biomarker for Early Detection of Kidney Tubular Injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:517-29.
- 151.** Zhang Z, Humphreys BD, Bonventre JV. Shedding of the Urinary Biomarker Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) is Regulated by MAP Kinase and Juxtamembrane Region. *J Am Soc Nephrol* 2007;18: 2704-14.
- 152.** Tumlin J, Stacul F, Adam A et al. Pathophysiology of Contrast-Induced Nephropathy. *Am J Cardiol.* 2006; 98: 14-20.
- 153.** Bartholomew BA, Harjai KJ, Dukkipati S et al. Impact Of Nephropathy After Percutaneous Coronary Intervention and A Method For Risk Stratification. *Am J Cardiol* 2004; 93: 1515-9.

- 154.** Waanders F, Van Timmeren MM, Stegeman CA, Bakker SJ, Van Goor H. Kidney Injury Molecule-1 in Renal Disease. *J Pathol.* 2010;220(1):7-16
- 155.** Haller C, Meyer M, Scheele T, Koch A, Forssmann Wg, Kuebler W. Radiocontrast-Induced Natriuresis Associated With Increased Urinary Urodilatin Excretion. *J Intern Med* 1998;243:155-16
- 156.** Cruz DN, Geus HR, Bagshaws SM. Biomarker Strategies to Predict Need for Renal Replacement Therapy in Acute Kidney Injury. *Seminars in Dialysis* 2011; 24: 124- 31
- 157.** Urbschat A, Obermüller N, Haferkamp A. Biomarkers Of Kidney Injury. *Biomarkers* 2011; 16: 22-30
- 158.** Nielsen SE, Schjoedt KJ, Astrup AS et al. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal) And Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in Patients with Diabetic Nephropathy: A Cross-Sectional Study and The Effects Of Lisinopril. *Diabet Med* 2010; 27(10): 1144-1150.
- 159.** Van Timmeren, Van Den Heuvel MC, Bailly V, Bakker SJ, Van Goor H, Stegeman CA. Tubular Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in Human Renal Disease. *J Pathol.* 2007;212(2): 209-217.
- 160.** Wang F, Li J, Huang B et al. Clinical Survey on Contrast- Induced Nephropathy after Coronary Angiography. *Ren Fail.* 2013; 35 (9): 1255-9.
- 161.** Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2008;241:78-83. doi: 10.1080/00365510802145059
- 162.** Bhisitkul, R.B., (2006), Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments, *Br J Ophthalmol*, 90,1542-1547.
- 163.** Lineaweaver, W.C., Lei, M.P., Mustain, W., Oswald, T.M., Cui, D., Zhang, F., (2004), Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival, *Ann Surg*, 239,866-873; discussion 873-865.
- 164.** Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., (1999), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb Journal*, 13,9-22.

- 165.** Mochida, S., Ishikawa, K., Inao, M., Shibuya, M., Fujiwara, K., (1996), Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver, *Biochem Biophys Res Commun*, 226,176-179.
- 166.** Kim, B.S., Chen, J., Weinstein, T., Noiri, E., Goligorsky, M.S., (2002), VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: Reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures, *Journal of the American Society of Nephrology*, 13,2027-2036
- 167.** Tamanini, C., De Ambrogi, M., (2004), Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum, *Reprod Domest Anim*, 39,206-216.
- 168.** Simon, M., Grone, H.J., Jöhren, O., Kullmer, J., Plate, K.H., Risau, W., Fuchs, E., (1995), Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney, *Am J Physiol*, 268,F240-250.
- 169.** Eremina, V., Baelde, H.J., Quaggin, S.E., (2007), Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier, *Nephron Physiol*, 106,p32-37.
- 170.** Kanellis, J., Fraser, S., Katerelos, M., Power, D.A., (2000), Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 278,F905-915.
- 171.** Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R., (1991), Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 181,902-906.
- 172.** Foster, R.R., Hole, R., Anderson, K., Satchell, S.C., Coward, R.J., Mathieson, P.W., Gillatt, D.A., Saleem, M.A., Bates, D.O., Harper, S.J., (2003), Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes, *Am J Physiol Renal Physiol*, 284,F1263-1273.
- 173.** Kim, B.S., Goligorsky, M.S., (2003), Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease, *Korean J Intern Med*, 18,65-75.

- 174.** Balakumar P, Rohilla A, Thangathirupathi A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res.* 2010; 62: 179-186.
- 175.** Cao YJ, Zhang YM, Qi JP, Liu R, Zhang H, He LC. Ferulic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF- κ B pathway. *International Immunopharmacology.* 2015; 28 (2): 1018-25
- 176.** Bacanlı M, Aydın S, Taner G, Göktaş HG, Şahin T, Başaran AA, Başaran N. The protective role of ferulic acid on sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014; 38(3):774-82.
- 177.** Ali BH, Al-Wabel N, Mahmoud O, Mousa HM, Hashad M. Curcumin has a palliative action on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(4):473-7.
- 178.** Ali B. H, Abdel Gayoum AA, Bashir AA. Gentamicin Nephrotoxicity in Rat: Some Biochemical Correlates. *Pharmacol Toxicol* 1992;70:419-23.
- 179.** Whang R. Magnesium deficiency. Causes and clinical implications. *Drugs.* 1984;28 Suppl 1:143-50.
- 180.** Donoghue DJ, Krueger WF, Donoghue AM, Byrd JA, Ali DH, el Halawani ME. Magnesium-aspartate-hydrochloride reduces weight loss in heat-stressed laying hens. *Poult Sci.* 1990;69(11):1862-8.
- 181.** B.D. Sahu, S. Tatireddy, M. Koneru, R.M. Borkar, J.M. Kumar, M. Kuncha, R. Srinivas, R. Sistla, Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 277 (1) (2014) 8–20.
- 182.** Kasap B, Türkmen M, Kiray M, Kuralay F, Soylu A, Tuğyan K, Kavukçu S. *Ren Fail.* 2013;35(10):1376-81.
- 183.** Mahmoud YI. *Biomed Pharmacother.* 2017 Oct;94:206-218.
- 184.** He L, Shen P, Fu Q, Li J, Dan M, Wang X, JiaW (2009). Nephro-protective effect of Kangqianling decoction on chronic renal failure rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 122,367-373
- 185.** Katary M, Salahuddin A. *Life Sci.* 2017 May 1;176:75-81.

- 186.** Moghadam A, Khozani TT, Mafi A, Namavar MR, Dehghani F. J Korean Med Sci. 2017 Jan;32(1):13-21.
- 187.** Ghaznavi H, Fatemi I, Kalantari H, Hosseini Tabatabaei SMT, Mehrabani M, Gholamine B, Kalantar M, Mehrzadi S, Goudarzi M. J Asian Nat Prod Res. 2017 Oct 5:1-12
- 188.** Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke 1990; 21: 1086-90.
- 189.** Aygün F. Sıçanlarda Deneysel Gentamisin Nefrotoksitesinde Oksidatif Stresin Rolünün Ve Olası Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisinin Araştırılması
- 190.** Abd-Elhamid TH, Elgamal DA, Ali SS, Ali FEM, Hassanein EHM, El-Shoura EAM, Hemeida RAM. Cell Tissue Res. 2018 Nov;374(2):367-387.
- 191.** Bami E, Ozakpınar OB, Ozdemir-Kumral ZN, Köroğlu K, Ercan F, Cıraklı Z, Sekerler T, Izzettin FV, Sancar M, Okuyan B. Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Sep;54:105-111.
- 192.** Upaganlawar A, Farswan M, Rathod S, Balaraman R. Modification of biochemical parameters of gentamicin nephrotoxicity by Coenzyme Q10 and green tea in rats. Indian Journal of Experimental Biology 2006; 44: 416-418
- 193.** Karahan I, Ateşşahin A, Yılmaz S, Çeribaşı A.O, Sakin F. Protective effect of lycopene on gentamicin-induced oxidative stress and nephrotoxicity in rats. Toxicology. 2005;215:198-204.
- 194.** Çelik I, Cihangiroğlu M, İlhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and aminone on vancomycin-induced nephrotoxicity. Basic Clinical Pharmacology Toxicology. 2005;97(5):325-332
- 195.** Yaman I, Balıkcı E. Exp Toxicol Pathol. 2010 Mar;62(2):183-90
- 196.** K. Jin, P.-X. Tian, X.-Z. Wang, W.-J. Xue, X.-M. Ding, J. Zheng, C.-G. Ding, T.-C. Mao, W.-L. Duan, M. Xi, Kidney injury molecule-1 and osteopontin: new markers for prediction of early kidney transplant rejection, Mol. Immunol. 54 (2013) 457–464,
- 197.** Guo L, Takino T, Endo Y, Domoto T, Sato H: Böbrek hasarı molekülü-1'in membran tipi 1 matriks metalloproteinaz ile dökülmesi. J Biochem 2012, 152: 425-432.

- 198.** P. H. Whiting and P. A. J. Brown, “The relationship between enzymuria and kidney enzyme activities in experimental gentamicin nephrotoxicity,” *Renal Failure*, vol.18, no.6, pp.899– 909, 1996.
- 199.** Luo QH, Chen ML, Chen ZL, Huang C, Cheng AC, Fang J, Tang L, Geng Y. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(6):911-918
- 200.** Fouad AA, Albuali WH, Zahran A, Gomaa W. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014 Sep;38(2):420-9.
- 201.** Monakçı WT, Merrill MJ, Oldfield EH (1993) Normal sıçan dokularında vasküler geçirgenlik faktörü / vasküler endotelial büyüme faktörü ifadesi. *Am J Physiol* 264: C995 – C1002
- 202.** Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA (1999) Vasküler endotelial büyüme faktörü nefrojenez ve vaskülojeniz indükler. *J Am Soc Nephrol* 10: 2125–2134
- 203.** Kanellis J, Paizis K, Cox AJ, Stacker SA, Gilbert RE, Cooper ME, Power DA (2002) Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidney Int* 61:1696–17
- 204.** Palade GE, Simionescu M, Simionescu N (1979) Mikrovasküler endotelin geçirgenliğinin yapısal yönleri. *Acta Physiol Scand* 463 [Ek]: 11–32
- 205.** Mıcılı SC, Ergur BU, Ozoğul C, Sarioğlu S, Bağrıyanık HA, Tuğyan K, Pekcetin C, Sonmez U, Tekmen I, Erbil G, Akdoğan GG, Ozyurt D, Buldan Z. *Clin Exp Hypertens.* 2013;35(5):373-81
- 206.** Oğütmen B, Tuğlular S, Cakalağaoğlu F, Ozener C, Akoğlu E. *Transplant Proc.* 2006 Mar;38(2):487-9.
- 207.** Jia P, Teng J, Zou J, Fang Y, Jiang S, Yu X, Kriegel AJ, Liang M, Ding X. *PLoS One.* 2013 May 30;8(5):e64329.
- 208.** TC Saido , H Sorimachi , K Suzuki . Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 1994 Aug;8(11):814-22.
- 209.** B. H. Ali, “Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research,” *General Pharmacology*, vol.26, no.7, pp. 1477–1487, 1995

- 210.** G. Bledsoe, S. Crickman, J. Mao et al., "Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 21, no. 3, pp. 624–633, 2006
- 211.** Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Thongnak LO, Wanchai K, Arjinajarn P, Chatsudthipong V, Chattipakorn N, Lungkaphin A. *PLoS One*. 2016 Oct 11;11(10):e0164528
- 212.** Soliman KM, Abdul-Hamid M, Othman AI. *Med Sci Monit*. 2007 Mar;13(3):BR73-83.
- 213.** Ustuner MA, Kaman D, Colakoglu N. *Tissue Cell*. 2017 Dec;49(6):691-696
- 214.** Hegazy AM, Mosaed MM, Elshafey SH, Bayomy NA. *Tissue Cell*. 2016 Jun;48(3):208-16.
- 215.** Balakumar P, Witness Koe WE, Gan YS, Jemay Pua SM, Kuganesswari S, Prajapati SK, Varatharajan R, Jayachristy SA, Sundram K, Bahari MB. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2017 Mar;84:35-44.
- 216.** Qadir MI, Tahir M, Lone KP, Munir B, Sami W. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2011 Oct-Dec;23(4):53-7.