

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI ROSMARİNİK ASİT'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Dilan ÇETİNAVCI

TRABZON - 2020

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI ROSMARİNİK ASİT'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Dilan ÇETİNAVCI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ**

TRABZON - 2020

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında engin bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmam hocam ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkanlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER'e, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Arş. Gör. Dr. Abdülkadir KUTLU, Biyolog Birgül GÜR KUTLU, Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE, Uzm. Dr. N. Senem ARI, Uzm. Dr. Oğuzhan KESKİN, Uzm. Dr. Tuğba ZENGİN, Uzm. Dr. Tuğba ARICI, Biyolog Ali KULABER, Arş. Gör. Dr. Gülten Aydın, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN ve Biyokimya Anabilim Dalından Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a ve tez çalışmamı TTU-2018-8011 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgileriyle beni kucaklayan, benden desteğini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime, eşime ve canım kızıma teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Dr. Dilan ÇETİNAVCI

ÖZET

Sıçanlarda Siklofosfamid İle İndüklenen Nefrotoksisiteye Karşı Rosmarinik Asit'in Etkileri

Bu çalışmada, siklofosfamid (CP) ile oluşturulan böbrek hasarına karşı rosmarinik asit (RA)'ın koruyucu etkisi araştırıldı. Bu amaçla histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirilmeler yapıldı.

18 adet Spraque Dawley cinsi erkek sıçan, Sham, CP ve CP+RA olmak üzere rastgele 3 gruba ayrıldı. Sham grubuna, deneyin 1. gününden itibaren 8 gün boyunca gavaj ile serum fizyolojik (SF) verildi ve deneyin 8. günü intraperitoneal olarak SF uygulaması yapıldı. CP grubuna 1. günden 8. güne kadar gavaj yoluyla SF verildi ve deneyin 8'inci gününde intraperitoneal olarak tek bir doz 200 mg/kg CP uygulandı. CP+RA grubuna ilk günden itibaren 8 gün süreyle 100 mg/kg RA gavaj ile ve 8. günde intraperitoneal olarak 200 mg/kg CP verildi. Deneyin 9. Günü, sıçanlar sakrifiye edildi ve kan tüplerine sıçanların kanları alındı. Çıkarılan her sol böbreğin yarısı, fiksasyon ve histolojik değerlendirmeler için %10 formalin çözeltisine alındı. Böbrek doku örnekleri, ışık mikroskopik değerlendirme için hematoksilin ve eozin (H&E), Masson trikrom ve periyodik asit-Schiff (PAS) boyama yöntemleri ile boyandı. Sol böbreğin diğer yarısından doku MDA, SOD, CAT değerlendirmeleri yapıldı. Kan serum örneklerinde BUN ve kreatinin ölçüldü.

Histopatolojik değerlendirmelerde CP grubunun böbrek kesitlerinde tübüler atrofi, glomerüler hasar, vasküler konjesyon, interstisyel inflamasyon, vakuolizasyon, tübül epitelinde dökülmeler, lökosit infiltrasyonu ve hiyalin madde birikimi gözlemlendi. Bu bozukluklar, CP+RA grubunda CP grubuna göre önemli ölçüde azaldı. Masson trikrom boyamada, CP grubuna ait böbrek kesitlerinde yer yer hafif düzeyde intertübüler kollajen artışı saptandı; CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda CP grubuna kıyasla, intertübüler alandaki kollajen miktarında azalma belirlendi. PAS boyalı kesitlerde, CP grubunda tübüler epitelde yaygın dökülme, vakuolizasyon gibi patolojik bulgular saptandı ve fırçamsı kenar ve bazal membranın bozulduğu alanlar gözlemlendi. Bu bozukluklar, CP grubuna göre CP+RA grubunda

azaldı. CP grubunda artan BUN değeri CP+RA grubunda azalmış, CP grubunda azalan SOD değeri CP+RA grubunda artmıştır.

Bulgularımız, CP'nin sıçan böbreğinde histopatolojik hasarlar oluşturduğunu ve RA tedavisinin CP'nin oluşturduğu bu bozuklukları nispeten düzelttiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Rosmarinik asit, Siklofosfamid, Toksisite, Böbrek, Oksidatif stres



SUMMARY

Effects of Rosmarinic Acid Against Nephrotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats

In this study, the protective effect of rosmarinic acid (RA) against renal damage caused by cyclophosphamide (CP) was investigated. For this purpose, histopathological and biochemical evaluations were made.

18 Sprague Dawley male rats were randomly divided into three groups: Sham, CP and CP+RA. Sham group was given physiologic serum (PS) by gavage for 8 days from the 1st day of the experiment and PS was administered intraperitoneally on the 8th day of the experiment. CP group was given PS by gavage from the 1st day to the 8th day and a single dose of 200 mg/kg CP was administered on the 8th day of the experiment intraperitoneally. The CP+RA group was given 100 mg/kg RA by gavage for 8 days from first day and 200 mg/kg CP intraperitoneally on the 8th day. On the 9th day of the experiment, the rats were sacrificed and the blood of the rats was taken into the blood tubes. Half of each left kidney removed was taken into a 10% formalin solution for fixation and histological evaluations. Kidney tissue samples were stained using hematoxylin and eosin (H&E), Masson trichrome and periodic acid-Schiff (PAS) staining methods for light microscopic evaluation. Tissue MDA, SOD, CAT assessments were made from the other half of the left kidney. BUN and creatinine in blood serum samples were measured.

In histopathological evaluations, tubular atrophy, glomerular damage, vascular congestion, interstitial inflammation, epithelial vacuolization, desquamation in tubular epithelium, leukocyte infiltration and hyaline material accumulation was observed in the kidney sections of the CP group. These disorders were significantly reduced in the CP+RA group compared to the CP group. In the kidney sections with Masson trichrome staining, when compared with the other groups, a slight increase was observed in the intertubular collagen in the CP group. Compared with CP group, there was decrease in the amount of collagen in the area between the tubules in the kidneys in CP+RA group. In PAS stained sections, histopathological findings such as widespread shedding, vacuolization were detected in the tubular epithelium and

disruption of brush border and basal membrane were observed in CP group. These disorders decreased in CP+RA group compared to CP group. Increased BUN value in CP group decreased in CP+RA group; whereas decreased SOD value in CP group increased in CP+RA group.

Our results show that CP causes histopathological damage in the rat kidney and that RA treatment relatively corrects these disorders caused by CP.

Key Words: Rosmarinic acid, Cyclophosphamide, Toxicity, Kidney, Oxidative stress



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Morfolojisi	3
2.1.1. Böbrek Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Böbrek Anatomisi	7
2.1.3. Böbrek Histolojisi	9
2.2. Oksidatif Stres.....	15
2.3. Siklofosfamid.....	17
2.3.1. Biyokimyasal Özellikleri, Biyoyararlılığı ve Etki Düzenegİ.....	17
2.3.2. Kullanım Alanları	18
2.3.2. Yan Etkileri.....	19
2.4. Rosmarinik Asit	21
3. MATERYAL VE METOD	23
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	23
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı.....	23
3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	24
3.4. Histolojik İşlemler	26
3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı	26
3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması.....	26
3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Kesitlerin Boyanması.....	27
3.4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	27
3.4.3.2. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	28
3.4.3.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	28

3.5. Biyokimyasal Analiz.....	31
3.5.1. Doku SOD, CAT, MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.5.2. Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin Seviyelerinin Belirlenmesi	38
3.6. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Morfolojik Bulgular	40
4.1.1. Deney Gruplarına Ait Histopatolojik Skolama Sonuçları	40
4.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	41
4.1.3. Periyodik Asit - Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	50
4.1.4. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	54
4.2. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	58
4.2.1. Doku Biyokimyası	58
4.2.2. Serum Biyokimyası	59
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	69

KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
µL	: Mikrolitre
a	: Arteria
BCA	: Bisinkoninik asit
BMP	: Kemik morfojenik proteini
BSA	: Bovin serum albümin
BUN	: Kan üre azotu
C	: Karbon
°C	: Santigrad derece
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
Cl	: Klor
CP	: Siklofosfamid
Cu	: Bakır
CuZn-SOD	: Sitozolik SOD yapısında bakır ve çinko
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FGF	: Fibroblast growth factor
GDNF	: Glial kökenli nörotrofik faktör
Gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H	: Hidrojen
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H&E	: Hematoksilen eozin
HGF	: Hepatocyte growht factor
IUPAC	: International union of pure and applied chemistry
i.p.	: İntraperitoneal

kg	: Kilogram
K	: Potasyum
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
L	: Litre
LDL	: Low density lipoprotein
log	: Logaritma
m	: Muskulus
MDA	: Malondialdehid
MET	: Mesenchymal-epithelial transition
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mn-SOD	: Mitokondrial SOD yapısında mangan
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
n.	: Nervus
Na	: Sodyum
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomole
O	: Oksijen
OH	: Hidroksil
OHG	: Hidroksiguanin
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
P	: Fosfor
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PAX	: Paired box gene
PBS	: Phosphate-buffered solution
PCO	: Protein karbonil
pH	: Power of Hydrogen
RA	: Rosmarinik asit
RET	: Rearranged during transfection
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Revolutions per minutes
s	: Saniye

SF	: Serum fizyolojik
SPSS	: Statistical package for the social sciences
SS	: Standart sapma
TBA	: 3- tiyobarbiturik asit
U/L	: Unit/L
v	: Vena
vv.	: Venae
WNT	: Wingless and Int
WT	: Wilms tümör süpressör
µm	: Mikrometre



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. CP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	17
Tablo 2. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları.....	33
Tablo 3. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı.....	35
Tablo 4. MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı.....	36
Tablo 5. Deney Gruplarına Ait Böbrek Dokusu Histopatolojik Skorlaması.....	40
Tablo 6. Doku biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi.....	58
Tablo 7. Serum biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Siklofosfamid aktivasyonu ve DNA ile reaksiyonları	18
Şekil 2. Rosmarinik asitin yapısı.....	21
Şekil 3. Böbrek dokusunda protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği.....	32
Şekil 4: SOD tayininde kullanılan standart grafiği	34
Şekil 5. Böbrek dokusundan elde edilen protein fazlarda MDA tayininde kullanılan standart grafiği.....	37



RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. Sıçanların çalışma süresince barındırıldığı standart Tip III kafesler	22
Resim 2. Sıçanlara orogastrik gavaj uygulaması	23
Resim 3. Sham grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X200).....	42
Resim 4. Sham grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X400).....	43
Resim 5. CP grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X200).....	44
Resim 6. CP grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X400).....	45
Resim 7. CP grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X400).....	46
Resim 8. CP grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X400).....	47
Resim 9. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X200).....	48
Resim 10. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu (H&E, X400).....	49
Resim 11. Sham grubuna ait böbrek dokusu (PAS, X400).....	51
Resim 12. CP grubuna ait böbrek dokusu (PAS, X400).....	52
Resim 13. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu (PAS, X400).....	53
Resim 14. Sham grubuna ait böbrek dokusu (Masson trikrom, X400).....	55
Resim 15. CP grubuna ait böbrek dokusu (Masson trikrom, X400).....	56
Resim 16. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu (Masson trikrom, X400).....	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrekler karın boşluğunun üst ve arka tarafında, columna vertebralis'in her iki tarafında retroperitoneal bulunur. Böbreğin ana görevi, renal arter yoluyla gelen plazmayı filtre ederek ve filtrattan vücudun ihtiyacına göre maddeleri uzaklaştırarak kanın ultrafiltrasyonunu sağlamaktır. Böbrekler glomerüler filtrasyon, tübüler geri emilim ve sekresyon sonucu idrar oluşturur. Böbrekler, idrarla atılan su ve elektrolit miktarını değiştirerek vücut sıvılarının hacmini, konsantrasyonunu, ozmolaritesini, elektrolit içeriğini ve asiditesini düzenler. Vücutta metabolizma sonucu oluşan son ürünleri, yabancı maddeleri, çeşitli toksin ve ilaçları vücuttan uzaklaştırır. Anjiyotensinojenden anjiyotensin oluşumunu katalize eden renin ile arteryel kan basıncı düzenlenir. Eritropoetin ile kemik iliğinde eritrosit olgunlaşması uyarılır ve böylece eritrosit yapımı düzenlenir. Vücudun kalsiyum fosfor dengesini düzenleyen vitamin D3'ün aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D3 ve vazodilatatör etkili prostoglandin sentezi böbreklerde gerçekleştirilir. Böbrek hücreleri yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etmesi ve tübüler epitelde özel taşıyıcılar bulunması nedeniyle toksik hasara oldukça duyarlıdır (1-3).

Kanser; hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan bir hastalıktır; normal doku ve organları istila eder ve sonunda tüm vücuda yayılır. Oral olarak aktif bir alkilleyici ajan olan siklofosfamid, çeşitli malign ve malign olmayan rahatsızlıkları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitotoksik, immünsupresif, antiinflamatuvar ve antineoplastik etkili, alkilleyici bir ajan olan siklofosfamid (CP) küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri, multiple skleroz, mikroskopik polianjit, sistemik lupus eritematozis, Wegener granülomatozisi, romatoid artrit, Behçet hastalığı, glomerulonefrit gibi inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (4-12).

Ancak siklofosfamidin metabolik aktivasyonu için karaciğerde gerçekleşen reaksiyonlar sonunda fosforamid hardalı, akrolein gibi bazı sitotoksik metabolitler de oluşur. Akrolein sıklıkla siklofosfamid tedavisi sırasında görülen yan etkilerden sorumlu iken, fosforamid hardalı antitümör etkilerden sorumludur (13). Oluşan bu toksik metabolitler nedeniyle de bu kadar yaygın kullanım alanı olan siklofosfamidin pek çok istenmeyen yan etkisi görülür. Sıklıkla karşılaşılan yan etkileri arasında

kemik iliği depresyonu, mide bulantısı, kusma, alopesi bulunurken, organ spesifik yan etki olarak üriner sistem toksisitesi (özellikle hemorajik sistit, mesane kanseri), pulmoner ve kardiyak toksisite görülmektedir. Uzun dönem yan etkileri arasında ise reproduktif, onkojenik ve teratojenik etkileri bulunmaktadır (4). Böbrek üzerinde etkilerinde ise tübüllerde dilatasyon, tübüler epitelde diffüz hidropik dejenerasyon ve pıhtılaşma nekrozu, glomerüller ve venlerde şiddetli hiperemi ve Bowman kapsülünde dilatasyona sebep olduğu gösterilmiştir (14).

Rosmarinik asit (RA) *Lamiasae* bitki familyasında bulunan doğal bir fenol karboksilik asittir (15). RA, antioksidan, anti-mutagen, anti-bakteriyel ve anti-viral gibi dikkat çekici biyolojik etkilere sahiptir (16). Yapılan çalışmalarda rosmarinik asitin fokal glomerüler nekrozunu, Bowman kapsülü dilatasyonunu, tübüler epitel dejenerasyonunu, tübüler epiteldeki nekroz ve dilatasyonu önemli ölçüde engellediği gösterilmiştir (17).

Bu çalışmada siklofosfamid ile oluşturulan renal hasara karşı rosmarinik asitin etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Morfolojisi

2.1.1. Böbrek Embriyolojisi

Gastrulasyon sırasında orta hatın her iki tarafında oluşan intraembriyonik mezoderm; paraksiyal mezoderm, intermediate (ara) mezoderm ve lateral mezoderm olmak üzere üçe ayrılır. Intermediate mezoderm, embriyoda böbreklerin, suprarenal bezlerin, gonadların ve genital kanal sisteminin gelişiminde görev alır (18).

Intermediate mezoderm, embriyonun dorsal duvarı boyunca uzar. 4. hafta başında, embriyonun enine kıvrıldığı dönemde, intermediate mezoderm ventrale kayar ve somitlerle ilişkisini keser. İlk aortanın her iki yanında uzanan bu mezoderm kabartısı ürogenital kabartı (ürogenital ridge) olarak adlandırılır. Bu kabartıdan üriner ve genital sistemler meydana gelir. Üriner sistemi meydana getiren üriner kabartı parçasına nefrogenik kordon denir. Nefrogenik kordonun servikal ve yukarı torasik bölgelerinde intermediate mezoderm segmentlenmiştir ve bu segmentlere nefrotom denir. Nefrogenik kordonun aşağı torasik, lumbal ve sakral bölgelerinde ise intermediate mezoderm segmentsizdir. Bu bölgelerde birbirini izleyen üç üriner sistem olan pronefroz, mezonefroz ve metanefroz gelişir (19).

İlk oluşan böbrek sistemi olan pronefrozlar rudimenterdir ve fonksiyonel değildir. İkinci oluşan böbrek sistemi olan mezonefrozlar daha iyi gelişmiştir ve fetal dönemin erken safhalarında kısa bir süre fonksiyon gösterirler. Üçüncü oluşan böbrek sistemi olan metanefrozlar, kalıcı, aynı zamanda esas böbrekleri oluşturmaktadır (20).

Pronefroz dördüncü hafta başında (22. gün civarında) servikal bölgede, ön intermediate mezodermden köken alan 7-10 adet solid hücre topluluğu olan nefrotomlar şeklindedir. Pronefroz nefrotomları laterale doğru büyüyerek lümen kazanıp nefrik tübüleri oluşturur. Nefrik tübüller medialde intraembriyonik söloma açılırlar. Kaudale doğru ilerleyip birbirleri ile birleşerek embriyonun her iki yanında longitudinal uzanan nefrik kanalları oluştururlar. Glomerüller ve nefrik tübüller

primitif nefronları temsil ederler. Dördüncü haftanın başında oluşan pronefroz, dördüncü haftanın sonunda kaybolur (21).

Mezonefrozlar oldukça geniş ve uzamış boşaltım organları olarak dördüncü haftanın sonlarında pronefrozların kaudalinde ortaya çıkarlar. Pronefrik sistem gerilerken mezonefroza ait ilk boşaltım tübüleri ortaya çıkar. Bu tübülerin boyu hızla uzayıp kıvrılarak S şeklinde bir halka haline gelir ve medial uzantılarının ucunda kapiller bir yumaktan oluşan glomerüller oluşur. Tübüller glomerülün etrafında Bowman kapsülünü oluştururlar. Kapsül ve glomerülden oluşan yapıya renal korpuskül denir. Mezonefrik böbrekler, mezonefrik tübül içeren yaklaşık 40 glomerülden oluşur. Tübüller, başlangıçta pronefrik kanallardan köken alan mezonefrik kanallara (Wolff kanalı) açılır. Mezonefrik kanallar da kloakaya açılır. Mezonefroz, kalıcı böbrekler çalışmaya başlayana kadar 6. ila 10. haftalar arasında idrar oluşturur. Mezonefroz 2. ayın ortalarında orta hattın her iki yanında geniş oval birer organ oluşturur. Gelişen gonad ile birlikte oluşturdıkları şişlik ürogenital katlantı olarak isimlendirilir. Mezonefrozlar birinci trimesterin sonuna doğru (3. ay) dejenere olur. Ancak, mezonefrik tübüller testislerin elastik kanalları haline gelir ve erkeklerde birçok yetişkin türevine dönüşmektedir (21-23).

Metanefroz kalıcı böbreklerin primordiyumları olarak beşinci haftada gelişmeye başlar ve yaklaşık 4 hafta sonra fonksiyonel hale gelirler. Kalıcı böbrekler üreter tomurcuğu (metanefrik divertikül) ve metanefrojenik blastem (mezenkimin metanefrik kitlesi) olmak üzere iki farklı kökene sahiptirler. Üreter tomurcuğu mezonefrik kanalın kloakaya giriş yerine yakın, dışa doğru yapmış olduğu bir divertiküldür. Üreter tomurcuğunun çevresinde yoğunlaşan intermediate mezoderm ise metanefrojenik blastemi oluşturur. Üreter, böbrek pelvisi, kalikslar ve her böbreğin toplayıcı kanalları üreter tomurcuğundan gelişir. Nefronun tübül sistemi (proksimal ve distal tübüller, Henle kulbu ve Bowman kapsülü) metanefrojenik blastemden gelişir (20, 21, 24).

Glomerüler filtrasyon, glomerüllerin diferansiyasyonundan sonra yaklaşık fetal yaşamın 9. haftasında başlar. Ama buna rağmen böbreklerin fonksiyonel olgunlaşması ve filtrasyonda artış doğumdan sonra gerçekleşmektedir. Nefronlar doğuma kadar oluşmaya devam eder, doğumdan sonra nefronların sayısında artış

olmaz; yalnızca büyüklükleri artar, bu sayede doğumdaki lobüllü böbrek görünümü süt çocukluğu döneminde kaybolur (20, 23).

Böbrek gelişimi kompleks moleküler olayların etkileşimiyle düzenlenmektedir. Başka organlarda olduğu gibi böbrekte de bu etkileşimler epitelle mezenşimal doku arasında gerçekleşmektedir. Böbrekteki bu karşılıklı etkileşim mezonefroza ayrılan üreter tomurcuğuyla metanefrik blastem mezenşimi arasındadır. Mezenşimal dokudan salgılanan WT1 isimli transkripsiyon faktörü, metanefrik blastemin üreter tomurcuğunun uyarısına yanıt verebilecek hale gelmesini sağlar. WT1 mezenşim dokudan üreter tomurcuğunun dallanıp büyümesini sağlayan GDNF (glial kökenli nörotrofik faktör) ve HGF (hepatosit büyüme faktörü) yapımını da düzenler. Mezenşimal ve epitelyal doku arasındaki etkileşimi sağlayacak sinyalizasyon yollarını, üreter tomurcuğu epiteli tarafından, HGF için MET ve GDNF için RET tirozin kinaz reseptörleri oluşturur. Üreter tomurukları, mezenşimal dokuyu da FGF2 (fibroblast büyüme faktörü 2) ve BMP7 (kemik morfojenik proteini 7) ile uyarır. Bu büyüme faktörleri WT1 yapımının devamını sağlarken, aynı zamanda hem apoptozisi bloke eder, hem de metanefrik mezenşimin proliferasyonunu uyarırlar. Mezenşimal dokunun nefron oluşturmak amacıyla epitelyal bir dokuya dönüşmesi, aynı zamanda metanefrik mezenşimde PAX2 ve WNT4 yapımını artıran WNT9B ve WNT6 ekspresyonu yoluyla üreter tomurcuğu tarafından kontrol edilir. PAX2, mezenşimi tübül oluşumuna hazırlamak amacıyla yoğunlaştırırken, WNT4 yoğunlaşan mezenşimal dokunun epitelize olarak tübülleri oluşturmasını sağlar (20, 23).

İlk başta kalıcı böbrek (metanefrozdan türetilmiş) sakrumun ventralinde bulunur. Daha sonra arka karın duvarının farklı büyümesi ve fetal eğrilik azalması nedeniyle böbrek torakolomber bölgeye (T12 – L3 vertebral seviyelere) ulaşır. İlk başta böbreklerin hilumu ventrale bakmaktadır; fakat böbreğin yükselişi ile hilus medial hatta doğru 90° döner. 9. haftayla birlikte her böbreğin hilumu artık medial olarak karşı karşıya kalır (20, 25).

Böbreklerin göreceli yükselmesi sırasında, L2'de kesin renal arterler gelişinceye kadar, kanlarını atardamarlardan kademeli olarak daha yüksek seviyelerde alırlar. Başlangıçta böbrek pelvis içinde yatarken median sakral arter

tarafından beslenir. Geldiđi son noktada ise aortun lateral splanik dalı tarafından beslenir (25, 26).



2.1.2. Böbrek Anatomisi

Böbrekler karın boşluğunun üst ve arka tarafında, columna vertebralis'in her iki tarafında retroperitoneal olarak bulunur. Fasulye şekline benzeyen böbrekler ortalama 150 gr ağırlığında, 6 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 12 cm uzunluğunda kırmızı-kahverengimsi bir çift organdır. Sağ böbrek karaciğerin, sol böbrek ise dalağın altında bulunur ve sol böbrek orta hatta daha yakındır. Böbreğin üst ucu T12 vertebra, alt ucu L3 vertebra seviyesindedir. Sağ böbrek karaciğer nedeni ile sol böbreğe göre biraz daha aşağıdadır. Böbreklerin iki yüzü, iki kenarı ve iki ucu bulunmaktadır. Öne ve dışa bakan yüzüne facies anterior, içe ve arkaya bakan yüzüne facies posterior, konveks dış kenarına margo lateralis, konkav iç kenarına margo medialis, üst ucuna extremitates superior, alt ucuna extremitates inferior adı verilir. Her böbreğin içbükey medial kenarında renal hilum vardır. Renal hilum, böbrek içindeki renal sinüsün giriş kısmıdır. Böbreklere renal arter, sinirler, üreter, renal ven ve lenfatikler renal hilumdan girer ve çıkarlar (27-31).

Böbreği saran oluşumlar içten dışa doğru capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis (Gerota fasyası) olarak sıralanır. Capsula fibrosa (renal kapsül) ince fakat sağlam kollajen liflerden oluşmuştur; bu kılıfın genişleme yeteneği azdır. Fibröz yapıda ve beyaz renkte olan bu tabaka böbreğe parlaklık verir. Capsula adiposa (perirenal yağ kapsülü) capsula fibrosa'yı saran bir yağ tabakasıdır. Bu tabaka ön yüzde, yan ve arka yüzlere göre daha incedir. Bu yağ dokusu hilum renale'den geçerek sinus renalis'e girer ve burada bulunan yapılar arasındaki boşlukları doldurur. Fascia renalis (Gerota fasyası) böbreği ve gl. suprarenalis'i birlikte saran en dış örtüdür. Karın duvarındaki ekstraperitoneal bağ dokusunun (fascia subserosa) yoğunlaşması sonucu oluştuğu kabul edilir. Fascia renalis'in arkasında corpus adiposum pararenale adı verilen bir yağ tabakası bulunur. Böbreği pozisyonunda tutan en önemli oluşumlardan biri fascia renalis olmakla birlikte böbreğin damarları, komşu organların pozisyonu, capsula adiposa ve pararenal yağ tabakası böbreklerin karın arka duvarında uygun pozisyonunda bulunmasına yardımcı olan diğer yapılardır (32, 33).

Böbrek parenkimasının kapsüle yakın dış bölümü korteks, iç bölümü ise medulla olarak bilinir. Her böbreğin medial tarafında, renal arter ve sinirlerin girdiği;

renal ven, üreter ve lenfatik damarların böbreklerden çıktığı hilum vardır. Hilum, kan damarları, idrar toplama sisteminin bir parçası ve yağ dokusu içeren renal sinüs adı verilen bir boşluğa açılır. Renal pelvis ise dallanarak majör renal kaliksleri oluşturur. Majör kalikslerden minör kaliksler oluşur. Minör kalikslerin uç kısımlarına papilla adı verilir. Papillaların uç bölümü toplama borularının açılması sebebiyle deliklidir ve bu uç bölümlere area cribrosa denir. Vertikal kesitlerde her papillanın, piramidal şekilli medullar piramid adı verilen bir böbrek dokusunun tepe noktasında bulunduğu görülür. İnsan böbreğinde yaklaşık 5-11 piramid vardır. Korteks dokusu medulla piramidleri arasından medullaya ilerleyerek Bertini'nin renal sütunlarını oluşturur (34-36).

Böbreğin kanlanması 1. ve 2. lumbal vertebra'lar arasındaki discus intervertebralis seviyesinde aorta'dan ayrılan a. renalis'ler tarafından sağlanır. A. renalisin dallanmaları sonucunda kortekste radial yönde seyreden, böbrek lopçukları arasında oluşan arterler a. interlobularis adını alır. A. interlobularis'ten çıkan ince dallar arteriola glomerulus afferens adını alır; bu arterler rete capillare glomerulare yumağını oluştururlar. Rete capillare glomerulare tekrar birleşerek arteriola glomerularis efferens oluşturur. Arteriola glomerularis efferens; arterin girmiş olduğu kutuptan çıkar ve vv. interlobularis'e açılır; sırasıyla vv. arcuate, vv. interlobares ve v. renalis'e açılır. V. renalis, a. renalis'in önünde hilum renale'den çıkar ve v. cava inferior'a açılır (30, 37).

Lenfatikleri nodi aortici'ye drene olur. Parasempatik lifler n. vagus'tan gelir. Sempatik lifler, çölyak ve superior mezenterik ganglionları birbirine bağlayan splanchnik sinirlerden gelir (30, 38).

2.1.3. Böbrek Histolojisi

Birleşik tübüler bez olarak kabul edilen böbrekler, ince bir fibröz bağ dokusu kapsülü ile sarılı, fasulye şeklinde organlardır. Kapsülün dış kısmı fibroblast ve kollajen liflerden, iç kısmı ise miyofibroblastlardan zengindir. Böbrek parenkimasının kapsüle yakın dış bölümü korteks, iç bölümü ise medulla olarak bilinir. Böbrek korteksinde renal korpüsküller, nefronun kıvrımlı ve düz tübülleri, toplayıcı kanallar, toplayıcı tübüller ve kan damarları bulunur. Medulla ise renal korpüskül içermez, düz tübülleri ve toplama kanallarını bulundurur (39, 40).

Böbrek korteks dokusu kapsül altında uzanır ve medulla piramidleri arasından medullaya ilerleyerek Bertini sütunlarını meydana getirir. Böbrek cisimcikleri nefronun başlangıç kısmını oluşturur ve glomerül olarak adlandırılan kapiler ağ içerir. Medulladan kortekse uzanan 400-500 tübül demeti uzanır. Dikey çizgiler görünüşleri nedeniyle medüller çizgiler (Ferrein çizgileri) olarak adlandırılır. Her medüller ışın böbreğin fonksiyon gören birimleri olan birkaç nefron ile bir ya da daha çok sayıda toplayıcı kanaldan oluşur. Üriner sistemin fonksiyonel ve yapısal birimleri nefronlardır (40).

Nefron

Her böbrek 1 ile 4 milyon nefron içerir. Nefronlar idrar oluşumundan sorumludur. Nefronu, böbrek cisimciği (renal korpüskül), devamında proksimal kıvrımlı tübül, Henle kulpu, distal kıvrımlı tübül ve renal tübül sistemini toplayıcı kanallara bağlayan bağlantı tübülleri oluşturur. Böbrek cisimciği, çift yapraklı epitelden oluşan Bowman kapsülü ve Bowman kapsülüne invajine olmuş kapiller bir yumak olan glomerülden oluşur. Bowman kapsülü nefronun ilk kısmı olup, bu bölgede, glomerüler ultrafiltrat üretimi için glomerüler kapillerden geçen kan filtrasyona uğrar (41).

Böbrek Cisimciği

Böbrek cisimciği glomerüler yumak ve Bowman kapsülünden oluşur. Bu yapı nefronun başlangıcı olup yaklaşık 200 µm çapındadır.

Bowman kapsülü iki tabakalı bir kapsüldür. Kapsülün iç tabakası olan visseral tabaka glomerülün kapillerlerini örter. Dış tabaka olan parietal tabaka ise dış sınırını oluşturur. Kapsülün iki tabakası arasında, kapiller duvarından ve visseral tabakadan süzülen sıvının toplandığı idrar boşluğu bulunmaktadır. Her böbrek cisimciğinde afferent arteriollerin girdiği ve efferent arteriollerin çıktığı bir damar kutbu (vascular pole), proksimal kıvrımlı tübülün başladığı noktada bir idrar kutbu (urinary pole) bulunur (42).

Bowman kapsülünün parietal tabakası ince bir retiküler lif tabakası ve bazal lamina ile desteklenen tek katlı yassı epitel ile döşeli iken, idrar kutbundaki epitel tabakası tek katlı küboidal epitele dönüşür ve proksimal tübüle bağlanır (43).

Böbreğin Filtrasyon Elemanları

Bowman kapsülünün visseral tabakası hücrelerinden birkaç primer uzantı çıkar; bu özelleşmiş hücreler podosit adını alır. Podositlerin hücre gövdesinden çıkan primer çıkıntılar dallanarak sekonder çıkıntıları oluşturur ve bu çıkıntılar pedisel veya ayaklı çıkıntı olarak adlandırılır. Pediseller kapiller endotel hücrelerinin ve podositlerin ortak olarak oluşturdukları bazal lamina ile doğrudan temas halindedir. Komşu podositlerin birbirleriyle iç içe geçen ayaklı çıkıntıları, aralarında yaklaşık 40 nm genişliğinde boşluk olacak şekilde, kenetlenirler ve bu aralık filtrasyon yarıkları olarak isimlendirilir. Filtrasyon yarığının geçirgenliğini kontrol eden diğer bir faktör de burada bulunan ince bir membrandır. Bu membran filtrasyon yarığı membranı olarak isimlendirilir. Filtrasyon yarığı membranı pencereci kapillerlerin diyaframları gibi ince bir tabakadır. Membrandaki nefrin, podokaliksin, P-cadherin gibi hücre membran proteinleri albümin, gama globülin gibi büyük moleküllerin geçişini engeller. Nefrin, Neph1, Neph2, podosin gibi proteinler, yarık membranının düzgün çalışması için gereklidir (40, 44, 45).

Glomerül kapillerleri pencereci kapiller tipindedir. Endotel hücrelerinde çok sayıda açıklıklar bulunur. Bu hücrelerde diğer pencereci kapillerlerde gözlenen kapiller açıklıkları birbirine tutturucu diyafram yapısı bulunmaz. Bu yüzden pencereler tamamen açıktır (40).

Glomerüler kapillerlerdeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın bir bazal membran bulunur. Glomerüler bazal membran

(300 nm) adı verilen bu tabakanın kapillerlerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir filtrasyon engeli oluşturduğu düşünülmektedir. Glomerüler bazal membran tip 4 kollajen, siyaloglikoprotein, laminin, fibronectin ve heparan sülfattan zengindir. Glomerüler bazal membran, elektrondan yoğun olan kapiller endoteline bitişik lamina rara interna ve Bowman kapsülünün visseral hücrelerine komşu lamina rara eksterna ve bu iki tabaka arasında daha fazla elektron yoğun tip 4 kollajenden zengin lamina densa tabakalarından oluşur. Glomerüler bazal membran 70.000 daltondan veya 3.6 nm'den büyük moleküllerin geçişini engeller. Anyonik partikül ve moleküller lamina raralarındaki polianyonik glikozaminoglikanlar nedeniyle glomerüler bazal membranı geçemezler (39, 40, 43, 46).

Mezangium

Renal korpüskülde glomerüler bazal membran ile kapillerler arasında mezangial hücreler adı verilen bir hücre grubu bulunur. Mezangial hücrelerin sitoplazmik uzantıları kapiller lümenine ulaşacak şekilde endotel hücrelerinin arasına sokulur. Mezangial hücreler ile matriksleri mezangiumu oluşturur. Mezangial hücreler yerleşim yerine göre ikiye ayrılır. İntraglomerüler mezangial hücreler glomerüler kapiller ile podositler arasında bulunan kontraktıl özelliği olan özelleşmiş perisit hücreleri olarak kabul edilirler. Ekstaglomerüler mezangial hücreler (Lacis hücreleri) korpüskül dışında damar kutbu boyunca uzanarak bulunurlar ve jukstaglomerüler aparat olarak adlandırılan yapının bir parçasını oluştururlar (47).

Jukstaglomerüler Aparat

Renin anjiyotensin aldosteron sistemini aktive ederek kan basıncının ve sıvı-elektrolit dengesinin düzenlenmesinde görev alan jukstaglomerüler aparat, makula densa, jukstaglomerüler hücreler ve ekstaglomerüler mezangial hücrelerden oluşur (40).

Makula densa, distal düz tübülün afferent arteriyole komşu kısmındaki epitel hücrelerinin değişikliğe uğrayarak oluşturduğu, glomerulusun damar kutbunda afferent ve efferent arteriyoller arasında uzanan bir yapıdır. Distal düz tübül hücreleriyle karşılaştırıldığında daha uzun boylu epitel hücrelerine ve daha büyük, üst üste konumlanmış çekirdek hücrelerine sahiptir. Makula densa hücreleri, distal

düz tübül lümenindeki sodyum iyonlarının konsantrasyonuna duyarlıdır; sistemik kan basıncında bir azalma, glomerüler filtrat üretiminin azalmasına ve dolayısıyla distal tübüler sıvıda sodyum iyonları konsantrasyonunun azalmasına neden olur (48).

Jukstaglomerular hücreler, afferent arteriyol duvarının modifiye düz kas hücreleri olup, damar kutbuna yakın afferent ve efferent arteriyoller arasında bulunurlar. Bunlar geniş, yuvarlağımsı (epitelioid) ve küresel çekirdeklere sahiptir. Sitoplazmaları PAS pozitif boyanabilen granüller içerir. Jukstaglomerular hücreler salgıladığı renin enzimiyle, kan basıncındaki düşüşe tepki gösteren baroreseptör olarak görev yapar (49).

Ekstraglomerüler mezangial hücreler (Lacis, Polkissen hücreleri) laterali afferent ve efferent arteriyol arasında sınırlanıp, tabanı makula densaya dayanarak konik bir kütle oluşturur; bazal membranda biriken debris partikülleri fagosite ederek ortadan kaldırırlar. Bu hücreler, makula densadaki Na^+ konsantrasyonundaki değişikliklerin, glomerüler kan akışını doğrudan kontrol eden sinyallere yol açtığı tubuloglomerüler geri bildirim mekanizmasına katılır. Ekstraglomerüler mesangial hücrelerin, makula densada ortaya çıkan bir sinyalin intraglomerüler mesangial hücrelere iletilmesinden sorumlu olduğu düşünülür; bu daha sonra kılcak halkaları daha dar veya daha geniş yapmak için büzülür veya gevşer (40, 50).

Böbrek Tübülleri

Renal tübülün temel fonksiyonu, glomerüler filtrattan su, inorganik iyon ve diğer moleküllerin reabsorpsiyonu ve bazı inorganik iyonların kandan tübül lümenine direkt olarak sekresyonudur. Renal tübül, nefronun tübülleri ve toplama tübülleri ile toplama kanallarını içerir. Her bölgedeki tübüler fonksiyon ve histolojik görünüm farklıdır (51).

Proksimal Tübül

Belirgin bir asidofilik sitoplazmaya, fırçamsı kenara, hücre içi sıkı bağlantılardan olan zonula okludense, apikal endositik veziküllere, lateral iç içe geçişlere, çok sayıda mitokondriye ve bazal girintilere sahip olan basit küboidal epitel hücrelerinden oluşur. Nefronun en uzun ve geniş bölümü olan proksimal tübül iki çeşittir. Proksimal kıvrımlı tübül, kortekste bulunurken proksimal düz tübül

medullaya doğru inerek Henle'nin kalın inen parçasını oluşturur. Proksimal kıvrımlı tübül, proksimal düz tübüle göre daha uzundur; bu yüzden kortekste daha sık görülür (52, 53).

Genellikle bir proksimal tübülün enine kesitinde, 6 ila 12 arasında koyu nükleus ve bol mitokondri sebebiyle asidofilik sitoplazmalı epitel hücresi görülür. Hücrelerin apikal yüzeyinde yer alan geri emilimi kolaylaştıran, lümen içinde belirgin bir fırçamsı kenar oluşturan, çok sayıda uzun mikrovillusa sahiptir. Fırçamsı kenar, mikrovillus üstünde yer alan kalın glikokaliks tabakası nedeniyle PAS pozitif boyanır (40).

Henle Kulpu

Proksimal tübül daha sonra Henle kulpu (kangalı) ile devam eder. İnen kalın kol, inen ince kol, çıkan ince kol ve çıkan kalın koldan oluşur. İnen kalın kol proksimal tübülün düz parçasıyla benzerlik gösterirken, çıkan kalın kol ise distal tübülün düz parçasıyla benzerdir. İnce kollar tek katlı yassı epitel ile döşeli iken, kalın kollar alçak kübik epitel ile döşelidir (39, 54).

İnen ince parçaya gelen ultrafiltrat izoozmotik özellikteyken, çıkan ince parçayı terk eden ultrafiltrat plazmaya göre hipoozmotiktir (40).

Distal Tübül

Henle kulpuna bağlı çıkan kolunun devamı olan düz bir kısım ve kortekste uzanan kıvrımlı bir kısımdan oluşmaktadır. Distal kıvrımlı tübüller proksimal kıvrımlı tübüllerden daha kısadır. Distal tübülün hücreleri proksimal tübülün hücrelerinden daha kısadır. Bu hücrelerde fırçamsı kenar bulunmaz; bu nedenle lümen daha net ve daha geniştir. Distal düz tübül ile kıvrımlı tübül arasında hücreler özelleşerek damar kutbunda jukstaglomerular aparatın yapısına katılan makula densayı oluşturur (55).

Toplama Tübülleri ve Toplama Kanalları

Distal kıvrımlı tübüller sırasıyla toplama tübülleri (toplayıcı tübüller) ve kanalları olarak devam eder. Toplama tübülleri ve korteksin toplama kanalları tek katlı kübik epitelle döşeliyken, medullanın toplama kanalları tek katlı kübik veya tek

katlı prizmatik epitelle döşelidir. Işık mikroskopunda, toplama kanallarında hücreler arası sınırın belirgin olması nedeniyle, proksimal ve distal tübülerden kolayca ayırt edilir.

Toplama kanallarında iki çeşit hücre tipi vardır.

Esas hücreler (açık hücreler), soluk boyanan hücrelerdir. Bu hücrelerde bazal plazma membran katlantıları, bir adet monosilyum, birkaç adet mikrovillus ve küçük, yuvarlak mitokondriler içerir.

Esas hücreler arasında dağılmış olarak bulunan koyu hücreler (interkalat hücreler) daha az sayıdadır. Daha bol mitokondri içerirler. Apikallerinde mikrovillus ve mikropalikalar bulunur (40).



2.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş tek bir elektron yer alan kimyasal maddelerdir. Bunlar reaksiyona girdikleri moleküllerin diğer tip serbest radikallere dönüşmesine yol açarak hücre hasarının meydana gelmesine ve hasarın yayılmasına neden olurlar (56).

Reaktif oksijen türleri (ROS) hücre hasarındaki rolleri iyi tanımlanmış, bir çeşit oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. ROS tüm hücrelerde mitokondri solunumu ve enerji üretimi sırasında gerçekleşen redüksiyon oksidasyon (redoks) reaksiyonları ile lökositlerin fagozom ve fagolizozomlarında, mitokondri solunumundakine benzeyen ve respiratuar patlama (ya da oksidatif patlama) olarak adlandırılan mekanizmalarla üretilir. ROS üretimi, hipoksi ve özellikle de reoksijenasyon için karakteristiktir. ROS, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit (O_2^-), hem demirle katalizlenmiş Fenton reaksiyonu, hem de lipooksijenazlar, peroksidazlar, NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi çeşitli enzimler tarafından bir dizi hücrel reaksiyonda üretilir. Serbest radikaller, lipidleri, proteinleri ve DNA'yı olumsuz olarak değiştirebilir; yaşlanma ve bazı insan hastalıklarına neden olabilir. Lipitler, olumsuz değişikliklere yol açabilecek lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan serbest radikal hasarlarına eğilimlidir. Proteinlerde oluşan serbest radikal hasarı enzimlerin aktivitesinde kayba neden olabilir. DNA'nın yol açtığı hasar, mutagenез ve karsinogenез ile sonuçlanabilir (56-58).

Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır. Oksidatif stres ile hücrel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikali, süperoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artışı meydana gelir. ROS ölçümü, kısa yarı ömürlü olmaları, yüksek reaktiviteleri ve düşük konsantrasyonda olmaları sebebiyle zordur. Bu nedenle ROS'un neden olduğu hasarın değerlendirilmesi için indirekt belirteçler kullanılır. Serbest radikallerin etkileri ile makromoleküllerin oksidatif hasarı sonucunda açığa çıkan lipid peroksidasyonu sonucu oluşan bir ürün olan malondialdehit (MDA), protein karbonil (PCO), 8-hidroksiguanin (8-OHG) gibi

ürünlerin vücut sıvıları ve dokularda biyokimyasal yöntemlerle ölçülmesi ile oksidatif hasar varlığı tespit edilir (59-61).

Peroksidize çoklu doymamış yağ asitlerinin önemli ikincil bir oksidasyon ürünü olan MDA mutajenik ve sitotoksik etkilere sahiptir ve muhtemelen aterosklerozun başlangıcına katılmaktadır. MDA, serbest radikal hasarına bağlı olduğu düşünülen çeşitli hastalıklarda yüksek olarak tespit edilmesi nedeniyle, biyobelirteç olarak kullanılmaktadır; biyoloji ve tıp bilimlerinde lipoperoksidasyonun değerlendirilmesinde en yaygın yaklaşım olarak uygulanmaktadır (62-65).

Hücre içinde süperoksit ve hidrojen peroksit aracılı hasara karşı ilk savunma, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile olur (66-69).

SOD aerobik hücrelerde oksijen radikalinin zararına karşı intraselüler savunmada büyük rol oynar ve aktivitesinde yaşlanmaya bağlı olarak bir azalma olmaktadır. Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Süperoksit, oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak üretilir ve düzenlenmezse, birçok hücre hasarına neden olur. Bu nedenle SOD, oksijene maruz kalan hemen hemen tüm canlı hücrelerde önemli bir antioksidan savunmadır. Yaygın olarak bulunan sitozolik SOD yapısında bakır ve çinko (CuZn-SOD), mitokondrial SOD yapısında mangan (Mn-SOD) bulunmaktadır. Çinko stabiliteyi sağlamakta ve bakır da aktiviteden sorumludur (70-74).

SOD enziminin canlılardaki dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik ürünlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (75).

Katalaz, sıklıkla hidrojen peroksitin daha az reaktif gaz halinde oksijen ve su moleküllerine ayrışmasını hızla katalize etmek için hücreler tarafından kullanılır (76).

Katalaz tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Katalaz hücre içinde büyük çoğunlukta peroksizomlarda bulunur, ama mitokondrilerde de az miktarda bulunmaktadır (77, 78).

2.3. Siklofosfamid

Siklofosfamid (2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro2H-1,3,2-oxazophosphorine 2-oxide) en sık kullanılan alkilleyici antineoplastik ilaçlardan biridir (79, 80). Aşağıda CP'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri özetlenmiştir (81).

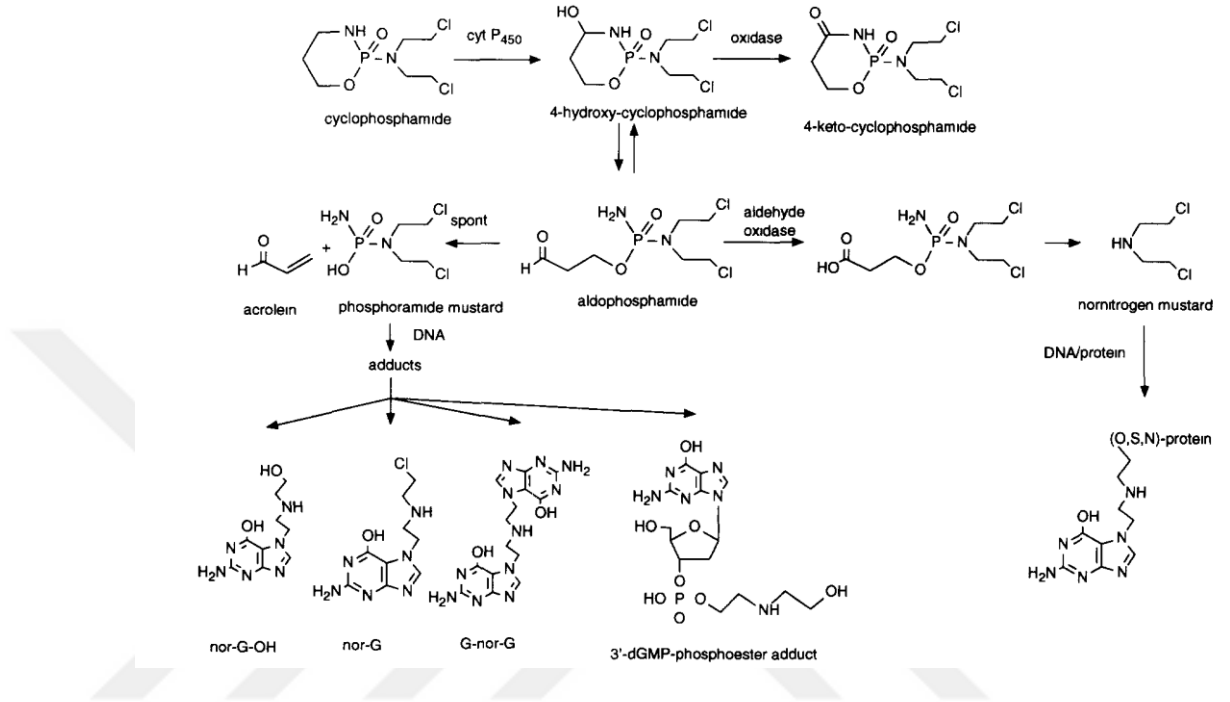
Tablo 1. CP'nin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri (81)

Molekül formülü	C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P
Molekül ağırlığı	261,09
Fiziksel özellikler	Kokusuz, ince, beyaz kristal toz
Erime noktası	49,5 – 53 °C
Kaynama noktası	336 °C
Yoğunluk	1,479 g/cm ³
Çözünürlük	Kloroform, dioksan ve glikoller içinde çözülür, benzen, karbon tetraklorürde hafifçe çözünür, eter ve asetonda çok az çözünür
Bölüm katsayısı	0,63
pKa	4,5-6,5
pH	7.5–8.0
N–NH₃ (mg/L)	2-5
Stabilite	30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda klor atomlarının ayrışmasıyla hidroliz meydana gelir. Oksidasyon, nem ve ışığa duyarlıdır

2.3.1. Biyokimyasal Özellikleri, Biyoyararlılığı ve Etki Düzenneği

İntravenöz ve oral yolla uygulanabilir. CP gastrointestinal sistemden ve parenteral bölgeden absorbe edilir. Karaciğerde metabolize olur ve 48 saat içinde en az % 80'i metabolizma ile elimine edilir. Uygulanan dozun % 25'ine kadar ilk 24 saat içinde değişmeden atılır. Kan plazmasında yarılanma ömrü 6.5 saate yakın olup; parenteral olarak verildiğinde ilacın aktif metabolitlerinin kan plazma konsantrasyon doruk noktasına ulaşma süresi 2-3 saattir. Oral uygulamadan 1 saat sonra plazmadaki

maksimum konsantrasyonlar elde edilir. CP, karaciğerde sitokrom P-450 enzimleri ile 4-hidroksi-siklofosfamid'e aktiflenir ve bu da aldofosfamid'e izomerize edilir. Aldofosfamid, alkilleyici ajan olan fosforamid mustardına ve sitotoksik etkileri olan akroleine dönüştürülür (80, 82-85).



Şekil 1: Siklofosfamid aktivasyonu ve DNA ile reaksiyonları (85).

DNA'da N7 guaninin alkilasyonu yanlış kodlamaya, guaninin purin halkası yapısının tahrip olmasına veya depürinasyona ve DNA'nın çapraz bağlanmasına veya replikasyon blokajına neden olur. Bunun sonucunda oluşan sitotoksik etkileri önlemek veya ortadan kaldırmak için CP, tipik olarak çeşitli detoksifikasyon ve koruyucu ajanlarla birlikte kullanılır (86).

2.3.2. Kullanım Alanları

CP hem hematolojik ve hem de solid tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Lösemi, meme kanseri, serviks kanseri, Hodgkin lenfoma, non-Hodgkin lenfoma, akut lenfositik lenfoma, koryokarsinoma, testis kanseri, akciğer kanseri vakalarında, yumuşak doku sarkomlarında, nöroblastomlarda, rhabdomyosarkomlarda tedavi amacıyla kullanılmıştır. Siklofosfamid immunosupresif etkinliği nedeniyle romatoid

artrit, Behçet hastalığı, nefrotik sendrom, trombositopenik purpura, sistemik lupus eritematozis ve Wegener granülomatozisi gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılır. Ayrıca CP organ transplantasyonu sonrasında doku reddinin kontrolünde de yaygın olarak kullanılmaktadır (80, 83, 87-93).

2.3.2. Yan Etkileri

CP'in en sık görülen yan etkileri bulantı, kusma, diğer gastrointestinal bozukluklar ve kemik iliği baskılanmasıdır. Bulantı ve kusma ilacın verilisinden en az 6 saat sonra başlar ve 4 saat kadar sürer. Kemik iliği baskılanmasına bağlı lökopeni ve trombositopeni oluşur ve ilaca başladıktan 1-2 hafta sonra en düşük değere iner. Alopesi ve gonadal hasar gibi toksik etkilerinin yanı sıra siklofosfamid insanlarda kanserojen potansiyele sahiptir. Bununla birlikte CP tedavisi geçici veya kısmen kalıcı steriliteye neden olabilir. Kromozom hasarı, mikronukleus ve kardeş kromatid değişimi ve bu sayede genotoksi oluşturarak, DNA iplikçik kırıkları üretebilir (5, 80, 94-97).

Kullanımında önemli bir sınırlayıcı faktör olan ürolojik yan etkiler, idrar sıklığı, dizüri, aciliyet, suprapubik rahatsızlık ve mikrohematüri ile birlikte durma gibi geçici irritatif boşalma semptomlarından hayatı tehdit edici hemorajik sistite kadar değişir. Mesane fibrozisi, nekroz, kontraktür ve vezikoüreteral reflü de bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli çalışmalarda nefrotoksik olduğu da bildirilmiştir. Bununla birlikte, siklofosfamidin, renal tübüller üzerinde doğrudan bir etkiye neden olduğu ve uygun olmayan bir su tutma durumuna neden olduğu belirtilebilir. Bu nedenle aşırı hidrasyon hastayı aşırı sıvı yüklenmesi ve olası hiponatremi, nöbet ve ölüm riski altında bırakabilir. Siklofosfamidin ürotelyal toksisitesini azaltma girişimleri, mesanede akroleini inaktive eden tiyol bileşiklerinin gelişmesine neden olmuştur. En faydalı ajan sodyum 2-merkaptöetan-sülfonattır (mesna). Mesna oral veya parenteral olarak verilebilir ve dakikalar içinde stabil bir inaktif disülfite oksitlenir. Akroleini bağladığı idrarla atıldığında aktif hale gelir. Mesna, idrarda 4-hidroksisiklofosfamid'den akrolein salınımını inhibe eder (4, 96, 98-101).

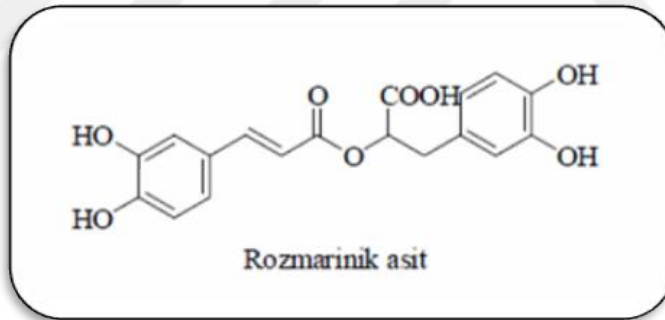
Akroleini glutatyon ile bağladıktan sonra hücresel hasar yapabilir. Glutatyon bağımlı doku antioksidan savunma sistemine müdahale ederek yüksek oranda serbest oksijen radikali oluşuma yol açar ve bu hücreler için mutajenik etkiye sahiptir (102).



2.4. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit (RA) [((R)-O-(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid, 3,4-Dihydroxycinnamic acid (R)-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethyl ester], bir kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit esteridir. RA ilk olarak saf bir bileşik olarak iki İtalyan kimyacı olan Scarpati ve Oriente tarafından izole edildi ve *Rosmarinus officinalis*'ten izole edildiği için bu bileşiğe rosmarinik asit adı verildi. Kafeik asit kısmı sadece fenilalaninden ve 3,4-dihidroksifenillaktik asit kısmı ise sadece tirozinden oluşur. Kırmızı-turuncu renkteki RA'nın moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$ 'dır ve IUPAC ismi (2R)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enoil] oksipropanoik asittir (103-106).

RA, her ikisi de orta konumda hidroksil grubu içeren iki fenolik halkadan oluşan hidroksillenmiş bir bileşiktir. İki halka arasında karbonil grubu, bir karboksilik asit ve doymamış bir çift bağ grubu bulunur (Şekil2) (107).



Şekil 2. Rosmarinik asitin yapısı (107)

Lamiaceae'nin Nepetoideae alt familyası ile Boraginaceae türlerinde yaygın olarak bulunur. Yaygın olarak; melisa (*Melissa officinalis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), adaçayı (*Salvia officinalis*), nane (*Mentha piperita*), kekik (*Thymus vulgaris*), mercanköşk (*Origanum majorana*) bitkilerinde bulunmakla birlikte perilla (*Perilla frutescens* L.), fesleğen (*Ocimum basilicum* L.), Holy fesleğen (*Ocimum tenuiflorum*) gibi pek çok bitkide bulunmaktadır (103, 108, 109).

Yüksek biyolojik aktivitesi, kimyasal yapısındaki özellikle iki katekol kısmı ile ilgilidir. Katekol, fenolik antioksidanların güçlü antioksidan aktivitesi için önem

taşımaktadır. Fenolik bileşikler serbest radikalleri nötralize edebilmek için elektronları veya hidrojen atomlarını kolayca bağlarlar ve elde edilen fenoksil radikalleri ana fenolü enzimatik olarak geri dönüştürülürler. Fenol, OH ve diğer gruplar (katekol, fenolik asitler), H-bağışlayıcı aktiviteleri nedeniyle RA'nın antioksidan aktivitesini oluştururlar. Aynı zamanda RA'nın fenolik asit olması sebebiyle serbest radikalleri yakalayarak etkili bir antioksidan işlevi gösterir. Fenoliklerin antioksidan kapasitesi, büyük ölçüde hidroksil gruplarının sayısına ve hatta daha fazlasına bağlıdır. RA'da olduğu gibi aromatik halkanın orto pozisyonundaki hidroksil grupları, antioksidan kapasitesini büyük ölçüde artırır. Suda çözünür bir polifenolik bileşen olan RA için çok sayıda biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Bunlar arasında antiinflamatuvar, antioksidan, antitümör, antiviral, antibakteriyel ve antimikrobiyal özellikler bulunmaktadır (110-119).

RA'nın iyileştirici etkileri deneysel ve klinik araştırmalarla kanıtlanmıştır. Tedavi etmek amacıyla Alzheimer, iskemik kalp rahatsızlığı, hiperglisemi, hepatotoksisite, depresyon, katarakt, ateroskleroz, atopik dermatit, alerjik iltihaplanma, peptik ülser, artrit, katarakt, romatoid artrit ve bronşiyal astım hastalıklarında kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda diyabetik nefropatiyi düzelttiği ve renal protektif etkilerinin olduğu, deneysel Alzheimer modellerinde düzelme olduğu gözlenmiştir (103, 120-129)

Rosmarinic asit gibi fenolik bileşikler; kansere karşı da koruma sağlarlar ve biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve maydanozgillerden sanikel (*Sanicula europaea*) gibi kozmetik endüstrisinde kullanılan bitkilerin anti-oksidan aktivitesine katkıda bulunurlar (130).

RA'nın antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri içeren çeşitli biyolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. RA, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunun önlenmesi ve murin hücre proliferatif, siklooksijenaz ve anti-alerjik aktivitenin inhibisyonu gibi çeşitli farmakolojik aktiviteleri vardır. Siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandin sentezini bloke etmesi sebebiyle anti-inflamatuvar aktivite gösterir (131-134).

RA'nın iskemi-reperfüzyon gibi oksidatif strese bağlı patolojilerde prooksidan durumu azaltmak için etkili bir ajan olduğu da gösterilmiştir (135).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak başlandı (Tarih: 15/10/2018; Protokol No: 2018/36). Bu Çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2018-8011).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırma için ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Sprague Dawley tipi 18 erkek sıçan kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, sınırsız beslenme şartlarında muhafaza edildi. İçme suyu olarak çeşme suyu, beslenmesi için standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş., Erzurum, Turkey) verildi. Sıcaklık $22\pm2^{\circ}\text{C}$, nem $\% 50\pm5$ olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar çalışma süresince standart Tip III kafeslerde barındırıldı (Resim 1). Sıçanların bakımı, deneyin bütün uygulamaları ve sıçanların sakrifiye edilmesi KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkez'inde yapılarak çevresel stres ve uyum problemi yaşanmaması amaçlandı.



Resim 1. Sıçanların çalışma süresince barındırıldığı standart tip III kafesler

Sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi 3 gruba ayrıldı. Bu çalışmada uygulanan siklofosfamid (Endoxan, 1 g IV infüzyonluk çözelti tozu içeren flakon, Eczacıbaşı) ve rosmarinik asit (536954-5 g, 96% Sigma-Aldrich Chemie GmbH) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (136, 137).

1. Grup (Sham): 6 adet erkek sıçana deneyin 1. gününden itibaren 8 gün boyunca oral gavaj yoluyla serum fizyolojik, deneyin 8. günü ip. olarak serum fizyolojik uygulandı.

2. Grup (CP): 6 adet erkek sıçana deneyin 1. gününden itibaren 8 gün boyunca oral gavaj yoluyla serum fizyolojik, deneyin 8. günü tek doz CP (200 mg/kg) intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı.

3. Grup (CP+RA): 6 adet erkek sıçana, deneyin 8. günü tek doz CP ip. olarak (200 mg/kg) ve 1. günden itibaren 8 gün boyunca oral gavaj yolu ile RA (100 mg/kg) uygulandı.



Resim 2. Sıçanlara orogastrik gavaj uygulaması

3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması

Deney süresinin bitiminde CP uygulamasından 24 saat sonra, sıçanlar anestezi altındayken (ketamin 90 mg/kg) periumblikal bölgeden vertikal kesi

uygulanıp, kesi torasik bölgeye uzatıldı; sternum kesilip toraks açıldı ve kalp çıkartılarak kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildiler. Kan almayı takiben biyokimyasal parametrelerin çalışılması için hemen vakumlu-seperatör jelli tüplere her bir sıçandan 2 cc kan örneği alındı. Alınan kan örnekleri 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Plazma kısmı eppendorf tüpüne konularak biyokimyasal analizler için -80°C’de muhafaza edildi. Ardından abdominal alt bölgeden, orta hat kesisi yapılarak böbrekler çıkarıldı. Çıkarılan sol böbrekler serum fizyolojikle yıkandıktan sonra, her bir sol böbreğin yarısı histolojik değerlendirmeler için %10’luk formalin solüsyonunda tespit edildi. Sol böbreğin diğer yarısı ise biyokimyasal değerlendirmeler için serum fizyolojik ile yıkanıp, eppendorf tüp içerisine alınarak -80 °C’lik derin dondurucuda saklandı. Tespit solüsyonlarına konulan dokular, gruplarına göre, her bir hayvana ait dokular ayrı kavanozda olacak şekilde, gruplandı.

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Formalin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak formalin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- Formaldehit (% 40) 25 ml
- Distile su 75 ml (138, 139)

Dokular formalin tespitinde 5 gün

3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Formaline alınan böbrek dokuları üç gün ışık almayan kuru ve oda sıcaklığındaki ortamda (yaklaşık 22-24°C'de) saklandı. Daha sonra aşağıdaki gibi sırası, süresi ve dereceleri verilen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen serilerinde saydamlaştırıldı; ardından parafin bloklar haline getirildi (138, 139).

Dokuların takibi:

1. % 70'lik etanol ile 1 gün inkübasyon
2. % 90'lık etanol ile 1 gün inkübasyon
3. % 96'lık etanol ile 1 gün inkübasyon
4. % 100'lük etanol ile 1 gün inkübasyon
5. % 100'lük etanol ile 1 saat inkübasyon
6. Ksilen ile 5 dakika inkübasyon (3 kez)
7. Eritilmiş parafin içerisinde etüvde, 58 °C'de 3 kez 15 dakika bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular doku gömme cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) 58 °C'de bloklandı.
9. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

10. Doku blokları, kesit almaya uygun hale gelmesi için +4 °C’de buzdolabında soğutuldu.

11. Parafin bloklar, tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, USA) yardımıyla önce dokuya ulaşana kadar 20 µm’ lik kesitlerle trimlendi ve dokuya ulaşılınca dokudan 5 µm’ lik ince kesitler alındı.

12. Kesitler 37 °C’ de benmari içindeki sıcak su üzerinde kırışıkların açılması için bekletilerek lam üzerine alındı.

3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Kesitlerin Boyanması

3.4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Bu uygulama otomatik lam boyacı (LEICA AutoStainer XL, Almanya) yardımı ile yapıldı. Lam üzerine alınan dokular zembil ile birlikte cihaza yerleştirildi. Kesitlerin boyama prosedürü aşağıdaki gibidir:

1. Deparafinizasyon için 58 °C’ de 45 dakika bekletildi
2. Ksilen ile 5 dakika inkübasyon
3. Ksilen ile 5 dakika inkübasyon
4. % 100’lük etanol ile 5 dakika inkübasyon
5. %96’lık etanol ile 5 dakika inkübasyon
6. %70’lik etanol ile 5 dakikalık inkübasyon
7. Distile suda 3 dakika bekleme
8. Hematoksilen ile 2 dakika inkübasyon
9. Distile suda 5 dakika bekleme
10. Asit alkole 1 kez batırıp çıkarma
11. Distile suda 1 dakika bekleme
12. Amonyaklı suda 10 saniye inkübasyon
13. Distile suda 1 dakika bekleme
14. Eozin ile 50 saniye inkübasyon
15. Distile suda 1 dakika bekleme
16. % 70’lük etanol ile 2 dakika inkübasyon
17. %96’lık etanol ile 5 dakika inkübasyon

18. %100'lük etanol ile 5 dakika inkübasyon

19. Ksilen ile 5 dakika inkübasyon

20. Ksilen ile 5 dakika inkübasyon

Boyanan preparatlar entellan ile kapatıldı (139, 140).

3.4.3.2. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

PAS boyaması için hazırlanan preparatlar 58 °C'lık etüvde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. PAS boyama için ChemBio PAS Stain Kit (CB6125) kullanıldı. Kesitlerin boyama prosedürü üreticinin protokolüne uygun olarak aşağıdaki gibidir;

1. 10 damla A-periyodik asit çözeltisi 10 dakika
2. Ayıraç uzaklaştırılması
3. Distile su 2 dakika yıkama
4. 10 damla B-Schiff's reagent çözeltisi 20 dakika
5. Ayıraç uzaklaştırılması
6. Distile su 2 dakika yıkama
7. C-Metabisülfid çözeltisi 2 dakika
8. Ayıraç uzaklaştırılması
9. D- Tespit çözeltisi 2 dakika
10. Ayıraç uzaklaştırılması
11. Distile su 2 dakika yıkama
12. 10 damla E-Mayer's hematoksilen çözeltisi 3 dakika
13. Ayıraç uzaklaştırılması
14. Distile su 5 dakika yıkama
15. % 70'lik etanol 3 dakika
16. % 96'lık etanol 3 dakika
17. % 100'lük etanol 3dakika
18. Ksilen 3 dakika

Boyanan preparatlar entellan ile kapatıldı.

3.4.3.3. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson Trikrom boyama için ChemBio Masson Trichrome boyama kiti (CB6095) kullanıldı. Doku kesitleri deparinizasyon işlemi için 58°C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Kesitlerin boyama prosedürü üreticinin protokolüne uygun olarak aşağıdaki gibidir;

1. %100'lük etanol 5 dakika
 2. %96'lık etanol 5 dakika
 3. %70'lik etanol 5 dakika
 4. Distile su ile yıkama
 5. A-Bouin's fiksatif çözeltisi 1 saat 56°C'de bekletme
 6. Çeşme suyu ile 5 dakika yıkama
 7. 5 damla B-Weigert's demirli hematoksilin A ve 5 damla C-Weigert's demirli hematoksilin B ile örtülme 10 dakika
 8. Boyaların karışması için küçük salınımlar yapılabilir.
 9. Ayıraç uzaklaştırılması
 10. Suda yıkama yapılmadan kurutma 5 dakika
 11. 10 damla D- gelincik kıızılı-asit fuksin 4 dakika
 12. Ayıraç uzaklaştırılması
 13. Distile su 1 dakika
 14. 10 damla E-fosfotungstik asit çözeltisi 10 dakika
 15. Ayıraç uzaklaştırılması
 16. Suda yıkama yapılmadan kurutma 5 dakika
 17. 10 damla F- anilin mavisi çözeltisi 5 dakika
 18. Ayıraç uzaklaştırılması
 19. Distile su ile yıkama 1 dakika
 20. %70'lik etanol 1 dakika
 21. %96'lık etanol 1 dakika
 22. %100'lük etanol 1 dakika
- Boyanan preparatlar entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Mikroskopi Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Olympus DP 71, Tokyo, Japan) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Tokyo, Japan)

değerlendirildi; fotoğraflar çekildi ve bütün dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Hazırlanan kesitlerde ışık mikroskobu ile böbrekte, hematoxilen & eozin boyaması ile tübüler atrofi, tübüler vakuoler değişiklikler, glomerüler hasar, vasküler konjesyon, interstisyel inflamasyon şiddeti ve yaygınlığı; PAS (periodik asit-Schiff) boyaması ile glikojen birikimi, böbrek tübülleri epitel hücrelerinin fırçamsı kenarları (mikrovillusları) ve bazal membranları; Masson trikrom boyaması ile interstisyel bağ dokusunda fibrozis (kollajen sentezi) değerlendirildi. Değerlendirmeler farklı büyütmelelerde yapıldı; çoğunlukla da 200X büyütmede 5 farklı alanda gerçekleştirildi (138, 141, 142).



3.5. Biyokimyasal Analiz

3.5.1. Doku SOD, CAT, MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Böbrek Dokusunda Homojenizasyon Aşaması

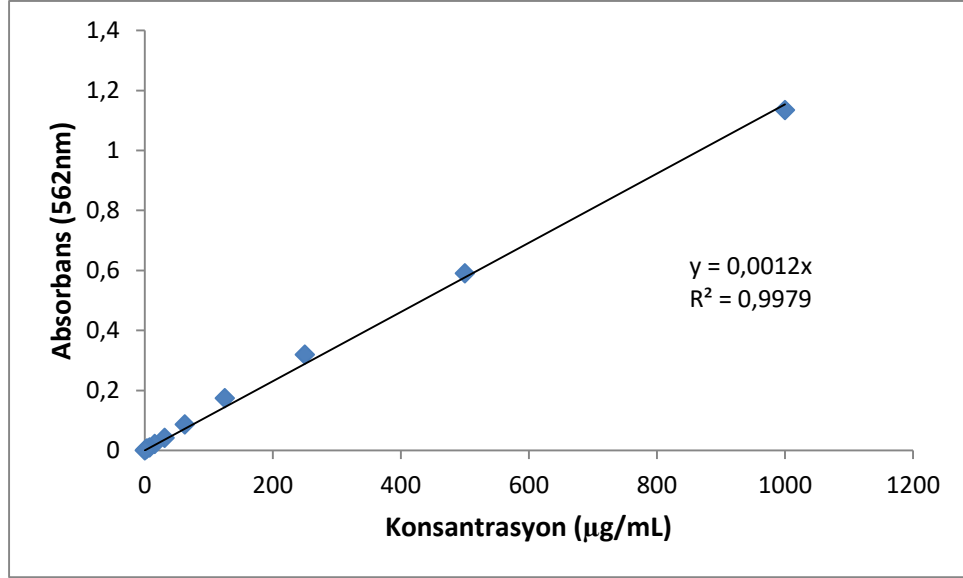
Böbrek dokusu homojenizasyonu için yaklaşık 100 mg böbrek dokusu 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde, dokular tamamen parçalanıncaya dek buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. 2 mL'lik ependorfa 1 mL süpernatant koyuldu. Üzerine 800 µL etanol-kloroform (2/3) olan karışımdan ilave edildi. +4 °C'de 10000 g'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonunda ependorfun üst kısmında protein faz elde edildi. Protein fazlarda protein tayini, SOD ve CAT aktivitesi ölçüldü.

Böbrek dokularının homojenizasyonunda kullanılan homojenizasyon tamponunun hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

İzolasyon tamponu (10 mM PBS): 1.08 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.02 g NaCl ve 0.18 g KCl 900 ml saf suda çözülür, pH 7.4'e ayarlanıp hacim 1 L'ye tamamlandı.

Protein Miktar Tayini

Böbrek dokusunda protein tayini, katalog numarası 71285-3 olan bisinkoninik asit (BCA) protein ölçüm kiti (Novagen, Merck Millipore, Almanya) protokolüne uygun olarak yapıldı. Kit prosedürünün esası Cu^{+2} 'nin alkali çözeltide bulunan protein tarafından Cu^{+1} 'e indirgenmesi olan Biüret reaksiyonuna ve oluşan Cu^{+1} 'in konsantrasyona bağımlı ölçümüne dayanır. BCA, indirgenmiş Cu ile şelat yapan renkli bir reaktiftir. Bu şelatlaşma sonucu oluşan mor kompleksin 562 nm'de ölçümü yoluyla protein miktarı belirlenmektedir. Çalışmada stok standart olarak 2 mg/ml'lik sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Böbrek dokusundan elde edilen protein fazın konsantrasyonu aşağıdaki Şekil 3 standart grafiklerine göre µg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 3. Böbrek dokusunda protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği

SOD Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley'in (143) geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi. Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan O_2 'lerinin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir.

SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Kullanılan Çözeltiler:

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na_2CO_3 , 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 ml'ye tamamlandı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$ Çözeltisi: 2.64 g $(NH_4)_2SO_4$ 10 ml saf suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM $CuCl_2$ Çözeltisi: 6.82 mg $CuCl_2$ alındı ve 50 ml deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 4.59 U/ ml'lik orijinal şişeden 72,6 µL alınıp 2 ml' ye $(NH_4)_2SO_4$ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 ml deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

SOD standart çözeltileri: 100 U/mL'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/ml' lik SOD standartları PBS tamponu kullanılarak hazırlandı. Böbrek dokusunda 10 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 2'ye göre gerçekleştirildi.

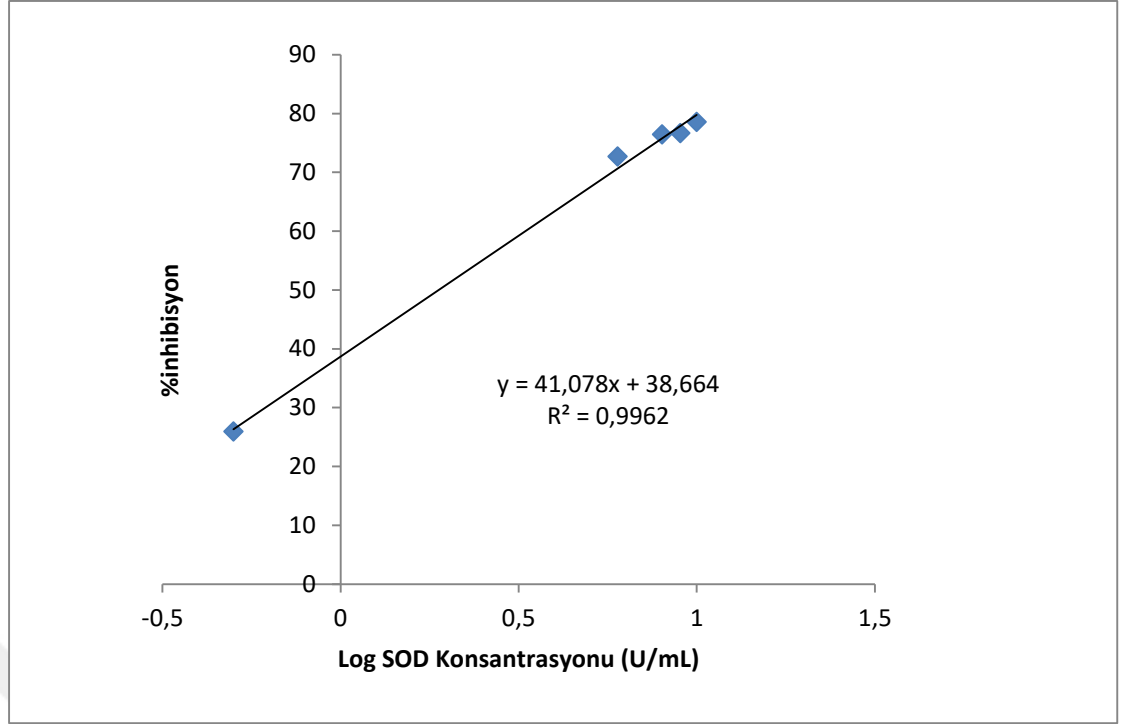
Tablo 2. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, standart, kör	200
SOD reaktif karışımı	796
Nitroblue tetrazolium	204
Ksantin oksidaz	20
25 °C'de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör}) \times 100$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek Şekil 4'de gösterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD konsantrasyonlarının logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD konsantrasyonu hesaplandı; seyreltme faktörü ile çarpıldı. Belirlenen SOD konsantrasyonu, toplam protein miktarına bölünerek SOD aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 4. SOD tayininde kullanılan standart grafiği (143)

Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Böbrek dokusunda CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi yöntemi kullanıldı (144). Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan çözeltiler:

Fosfat Tamponu (pH: 7.0; 50 mM): 6,81 mg KH_2PO_4 deiyonize suda çözüldü; son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8,9 g $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ deiyonize suda çözüldü; son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve pH: 7'ye ayarlandı.

H_2O_2 : 240 μL %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL'ye tamamlandı (günlük hazırlandı).

Doku homojenatları fosfat tamponu ile 10 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 3'e göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 3. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (µL)	Numune (µL)
Numune	750	750
Fosfat tamponu	375	-
H ₂ O ₂	-	375

240 nm’de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’de 30 s süreyle her 10 s’de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır.

CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s’lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1} \text{ (143)}$$

Burada;

A1 = Başlangıç absorbansı

A2 = 10 s sonraki absorbans

Yukarıda bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından böbrek dokularında g protein başına CAT aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar k/g protein olarak verildi (144).

MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Böbrek dokularının homojenizasyonu için yaklaşık 100 mg böbrek dokusu, 2 mL soğuk homojenizasyon tamponu ile deney tüpünde dokular tamamen parçalanıncaya dek buz içerisinde homojenize edildikten sonra 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve MDA seviyesi belirlendi. Bu yöntem MDA’nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm’deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan metod modifiye edilerek yapıldı (145). MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Kullanılan çözeltiler:

Homojenizasyon tamponu: % 1,15’lik KCl çözeltisine % 0,05’lik TritonX100 koyularak hazırlandı.

% 1'lik H₃PO₄ Çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA 50 mL saf suda manyetik bar yardımıyla 30° C'de yaklaşık 20 dakika karıştırıldı. TBA çözeltisi tamamen soğuduktan sonra üzerine 50 mL asetik asit ilave edildi ve iyice karıştırılarak çalışmada kullanılan nihai çözelti elde edildi.

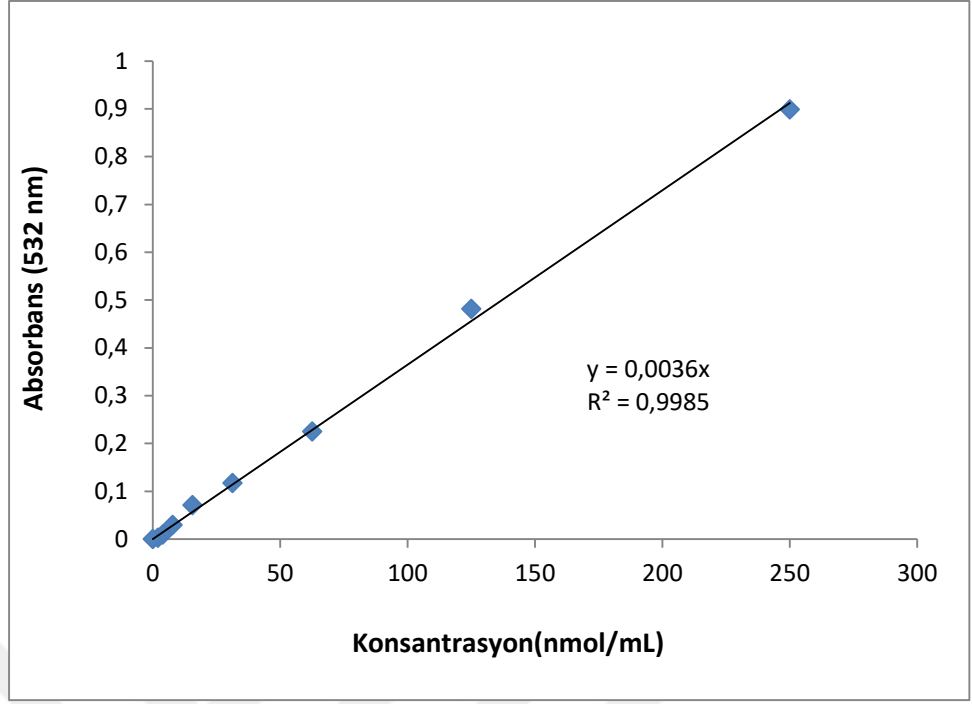
Standart çözeltiler: 82.5 µL tetrametoksipropan 50 mL 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan 10000 nmol/mL'lik stok MDA standardından 100 nmol/mL'lik ara stok çözelti hazırlandı. Ara stok çözeltiden 10 nmol/ml'lik çözelti elde edildi ve bu çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.91, 1.95 nmol/ml'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 4'te, standart grafikleri Şekil 5'de verilmiştir.

Tablo 4. MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (mL)
Numune, standart, kör	0,5
% 1'lik H ₃ PO ₄ çözeltisi	3
Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi	1
100 °C'de 45 dakika inkübasyon	
532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

Şekil 5'deki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 5. Böbrek dokusundan elde edilen protein fazlarda MDA tayininde kullanılan standart grafiği (145)

3.5.2. Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin Seviyelerinin Belirlenmesi

Hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde kreatinin, üre ölçümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarındaki otoanalizörlerde (Beckman Coulter AU5800) gerçekleştirildi.



3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 23.0, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Her bir gruba ait biyokimyasal ve diğer sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verildi ve grupların normal dağılımının uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uyan gruplar ANOVA testi (anlamli grupların ikili karşılaştırmalarında post hoc test olarak Bonferroni testi ile), normal dağılıma uymayan gruplar ise Kruskal Wallis (anlamli grupların ikili karşılaştırmalarında post hoc test olarak Mann-Whitney U testi ile) ile karşılaştırıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda, istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p < 0.05$; düzeltme testlerinde ise anlamlılık düzeyi $p < 0.016$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Morfolojik Bulgular

4.1.1. Deney Gruplarına Ait Histopatolojik Skorumlar

Deney gruplarına ait böbrek dokusunda hasar değerlendirmesi için, histopatolojik skor değerleri kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapıldı. İstatistik değerlendirmelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 5’te verildi. Histopatolojik skorumlarda, Sham grubuna kıyasla CP grubunda tübüler atrofi, tübüler vakuolizasyon (tübülovakuoler değişiklik, tübül epitel hücrelerindeki vakuolizasyon), glomerüler hasar; vasküler konjesyon ve interstisyel inflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı, belirgin bir artış gözlemlendi ($p<0,017$). CP grubuna kıyasla, CP+RA grubunda ise tübüler vakuolizasyon, glomerüler hasar, vasküler konjesyon ve interstisyel inflamasyonda istatistiksel olarak anlamlı, belirgin bir azalma ($p<0,017$) gözlemlenmesine rağmen, tübüler atrofideki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 5. Deney gruplarına ait böbrek dokusu histopatolojik skorumları

	Sham	CP	CP+RA
Tübüler atrofi	0,33±0,51	1,83±0,98 a	0,83±0,4
Tübüler vakuolizasyon	0±0	1,83±0,75 b	0,66±0,51 c
Glomerüler hasar	0,16±0,4	2,33±0,81 d	0,5±0,83 e
Vasküler konjesyon	0,16±0,4	2,16±0,98 f	0,33±0,81 g
İnterstisyel inflamasyon	0,5±0,83	2,66±0,51 h	1,16±0,4 ı

a: CP grubunda, Sham grubuna göre tübüler atrofi anlamlı arttı.

b: CP grubunda, Sham grubuna göre tübüler vakuolizasyon anlamlı arttı.

c: CP+RA grubunda, CP grubuna göre tübüler vakuolizasyon anlamlı olarak azaldı.

d: CP grubunda, Sham grubuna göre glomerüler hasar anlamlı arttı.

e: CP+RA grubunda, CP grubuna göre glomerüler hasar anlamlı olarak azaldı.

f: CP grubunda, Sham grubuna göre vasküler konjesyon anlamlı arttı.

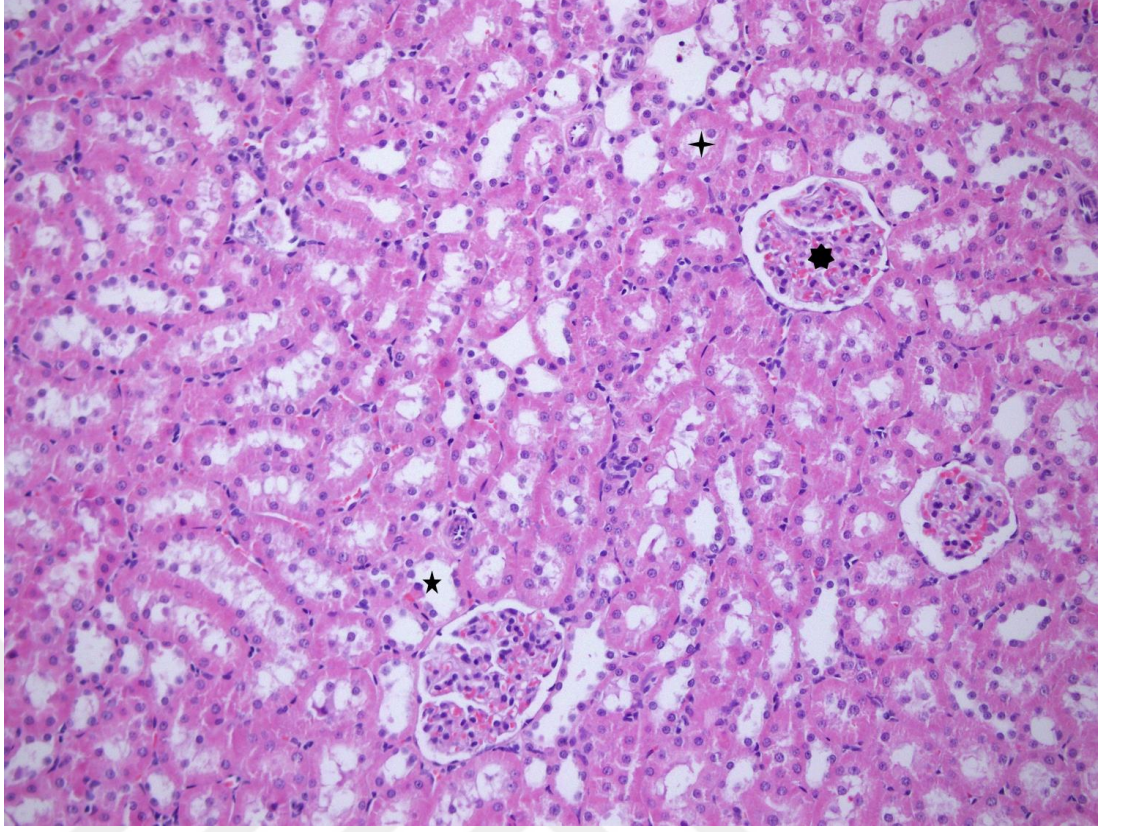
g: CP+RA grubunda, CP grubuna göre vasküler konjesyon anlamlı olarak azaldı.

h: CP grubunda, Sham grubuna göre interstisyel inflamasyon anlamlı arttı.

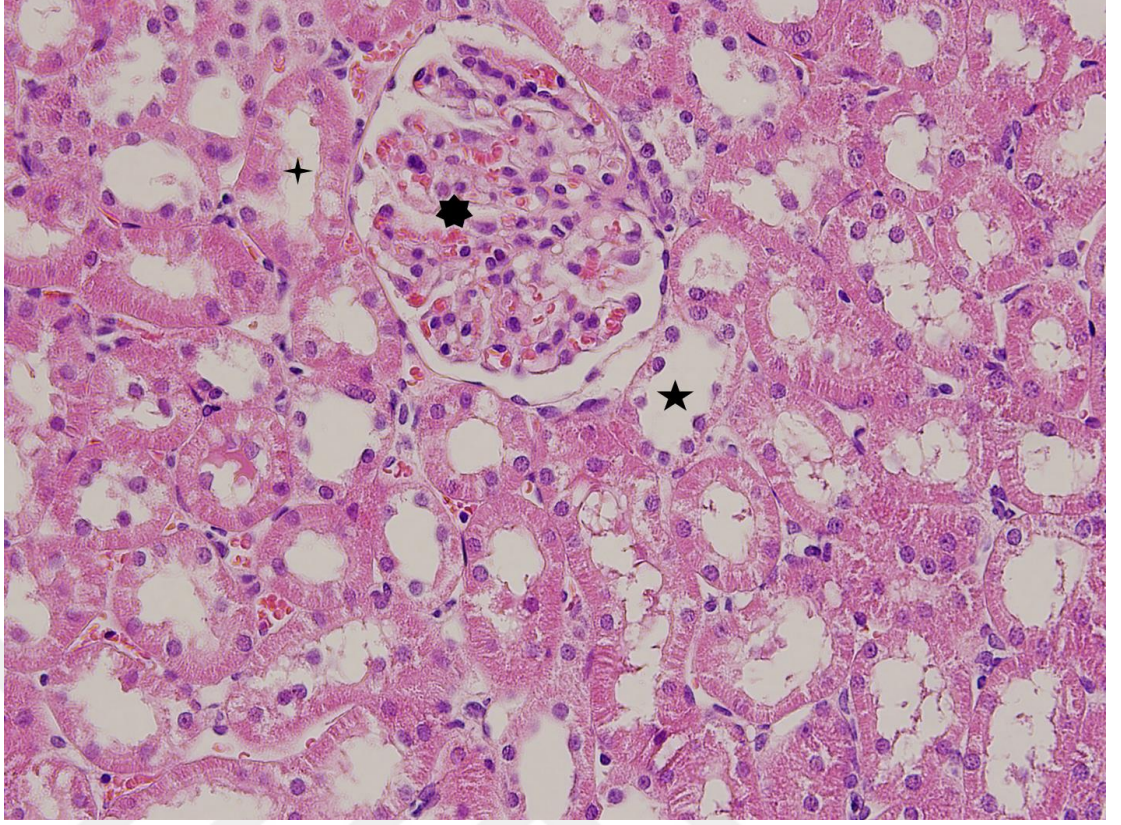
ı: CP+RA grubunda, CP grubuna göre interstisyel inflamasyon anlamlı olarak azaldı.

4.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

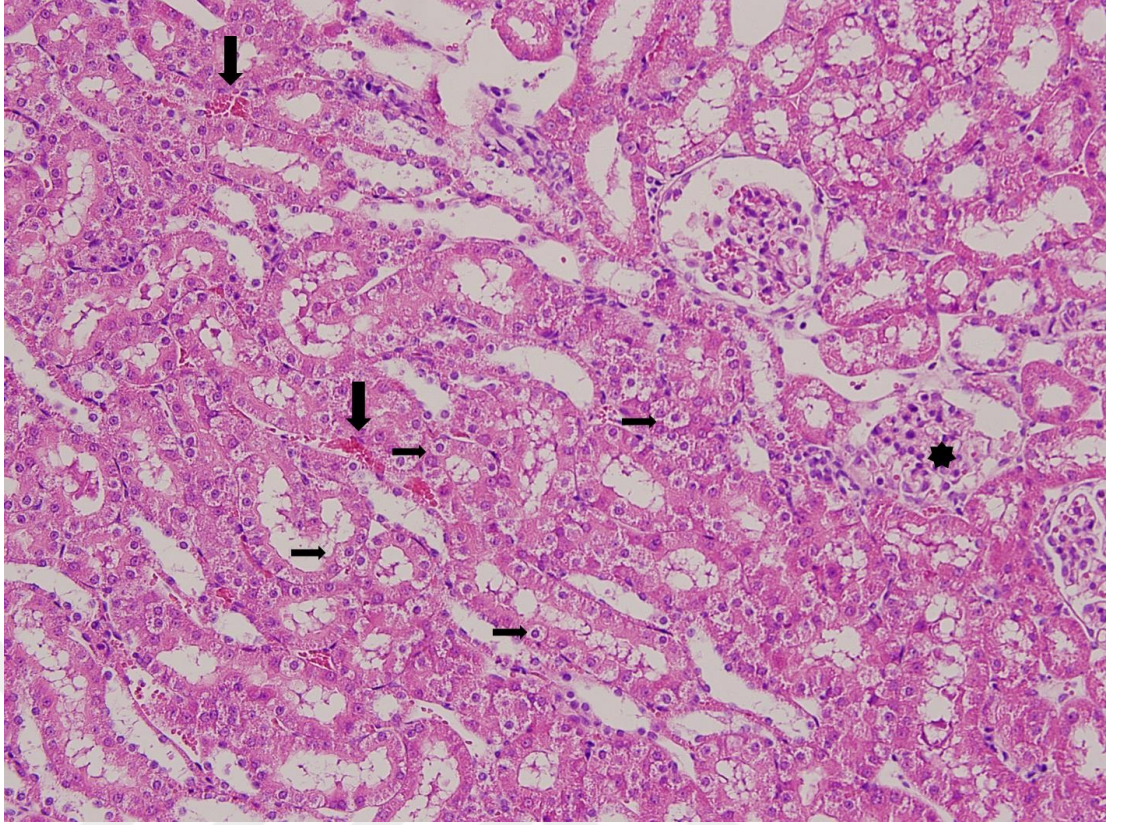
Böbrek dokusunun histolojik incelemesinde; Sham grubuna ait böbrek kesitlerinde, Bowman kapsülü, glomerül, proksimal ve distal tübül normal yapıda izlendi ve herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 3,4). CP grubuna ait böbrek kesitlerinde Sham grubuna kıyasla tübüler atrofi, tübüler vakuolizasyon, glomerüler hasar, vasküler konjesyon ve interstisyel inflamasyonda belirgin bir artış izlendi. Epitelde dökülme, lökosit infiltrasyonu, hemoraji ve hiyalin madde birikimi bulguları gözlemlendi (Resim 5-8). CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda, hafif tübüler atrofi dışında patolojik bulgu gözlenmedi (Resim 9,10).



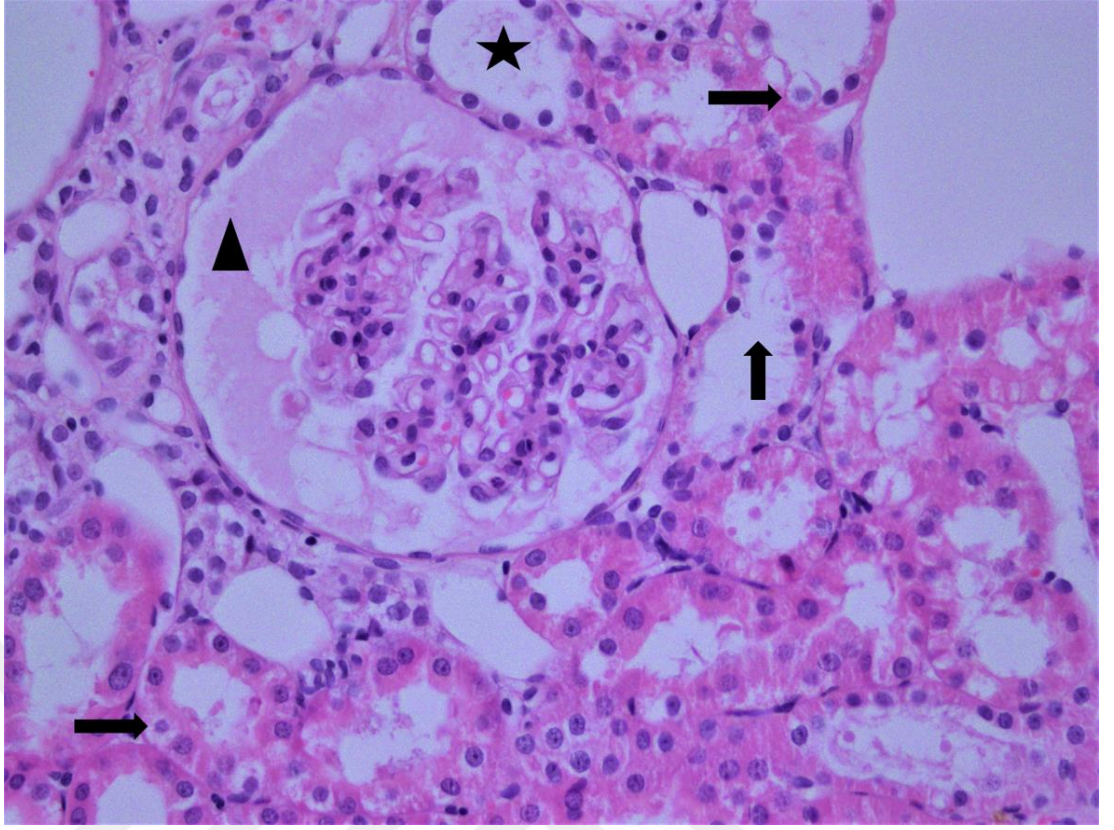
Resim 3. Sham grubuna ait böbrek dokusu. Böbrek cisimciği (yedi uçlu yıldız), distal tübül (beş uçlu yıldız) ve proksimal (dört uçlu yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X200).



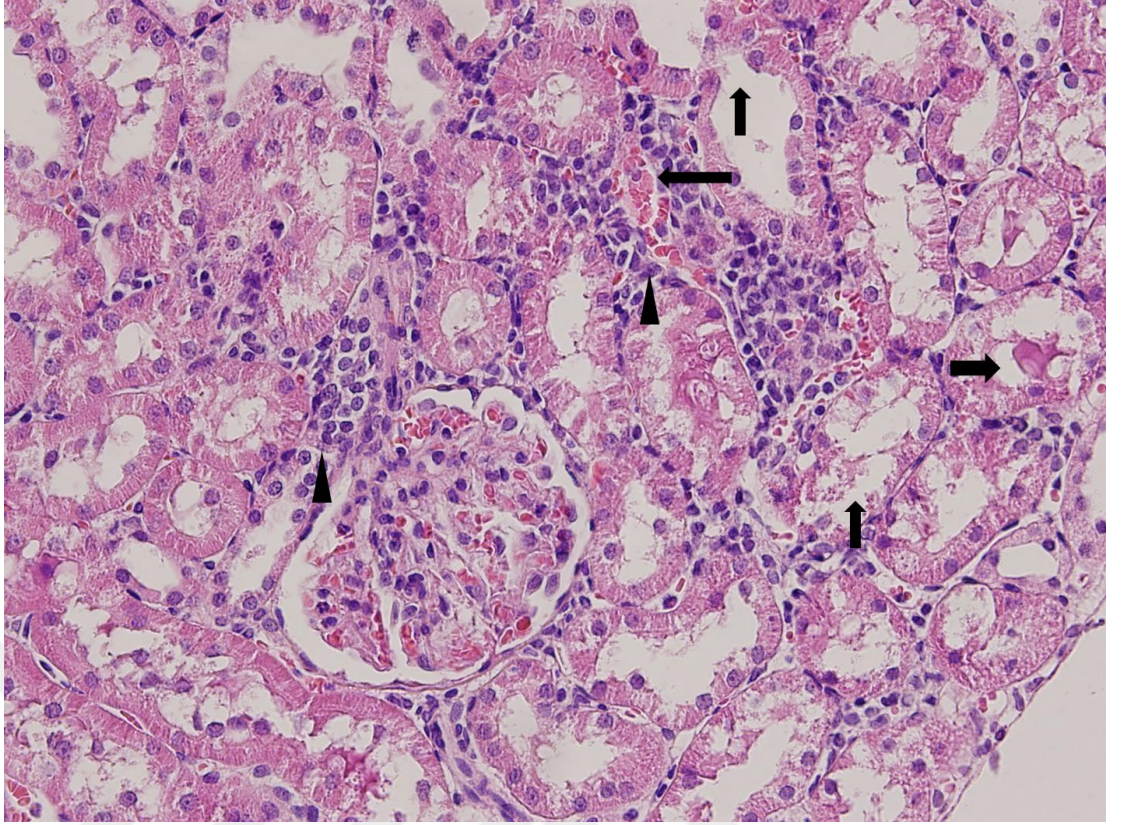
Resim 4. Sham grubuna ait böbrek dokusu. Glomerül (yedi uçlu yıldız), distal tübül (beş uçlu yıldız) ve proksimal (dört uçlu yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X400).



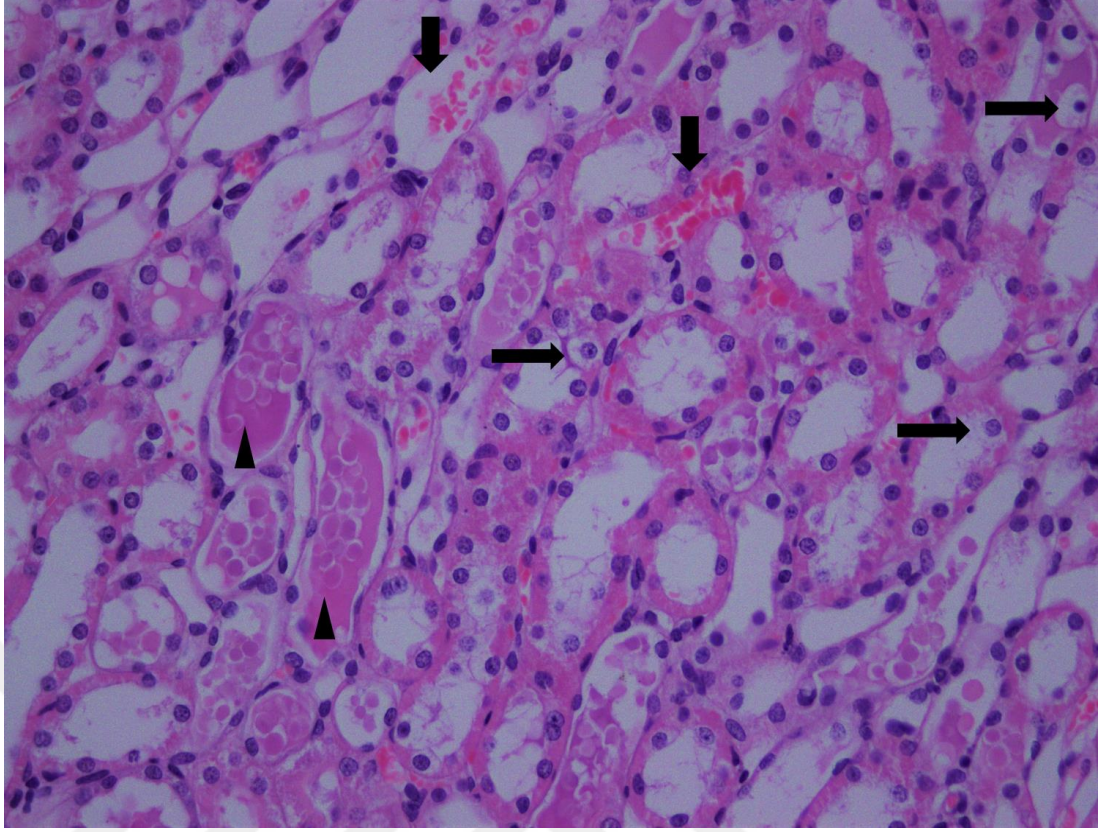
Resim 5. CP grubuna ait böbrek dokusu. Yaygın tübüler vakuolizasyon (sağa ok), intertübüler vasküler konjesyon (aşağı ok), glomerüler dejenerasyon (yedi uçlu yıldız) gözlenmektedir (H&E, X200).



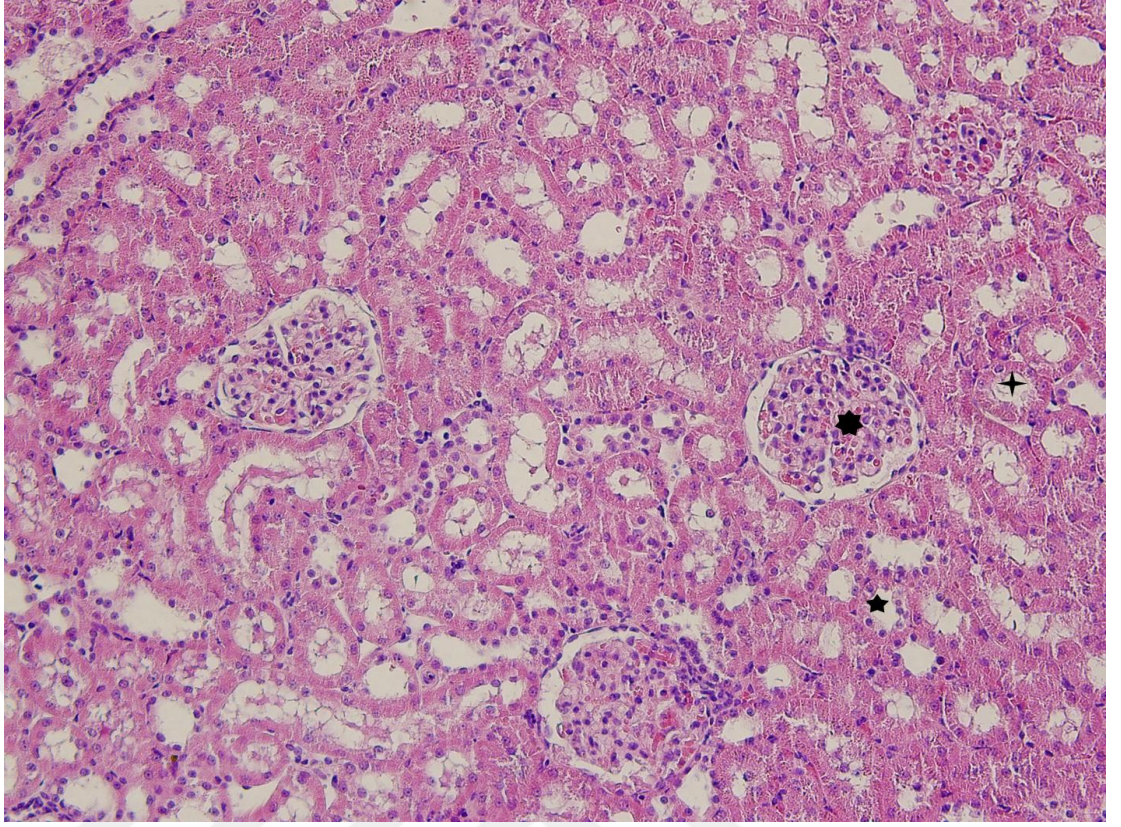
Resim 6. CP grubuna ait böbrek dokusu. Tübüler dilatasyon (yıldız), yaygın tübüler vakuolizasyon (sağ ok), tübül epitelinde kesinti (yukarı ok) ve hiyalin madde birikimi (üçgen) izlenmektedir (H&E, X400).



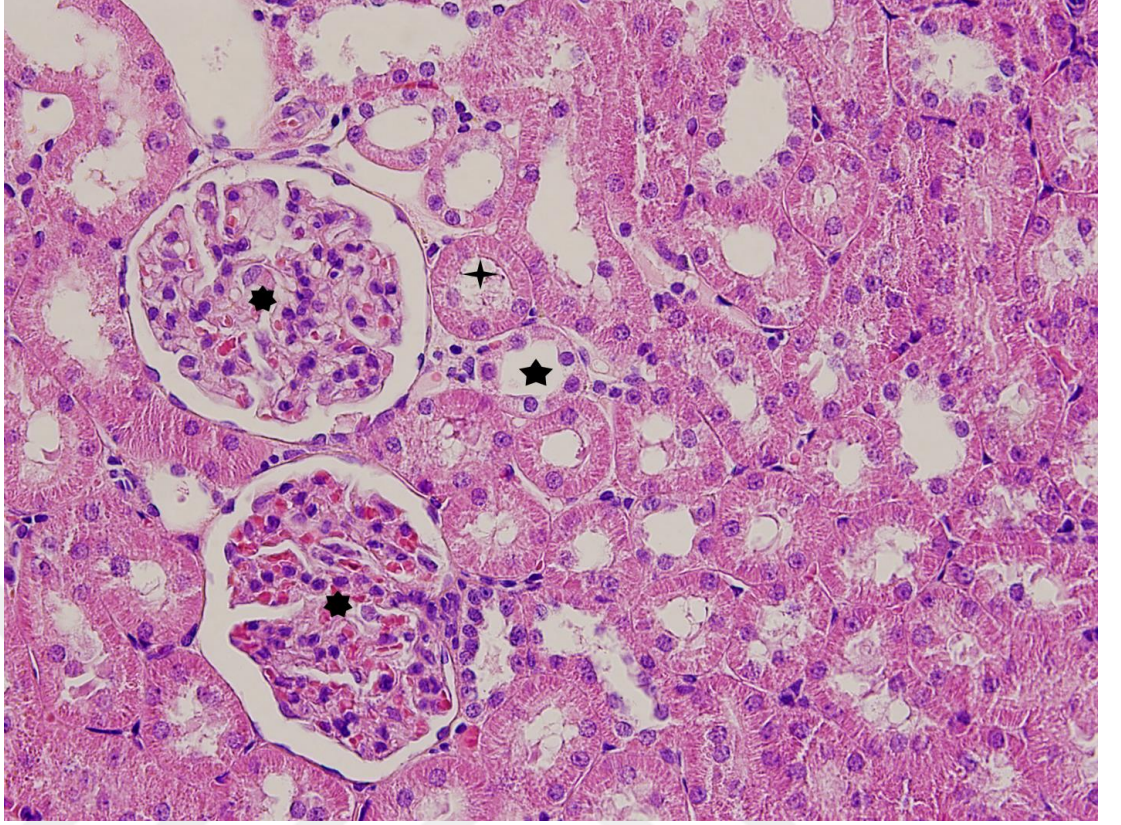
Resim 7. CP grubuna ait böbrek dokusu. Yer yer epitelde dökülmeler (yukarı ok), hemoraji (sol ok), yaygın lökosit infiltrasyonu (üçgen), hiyalin madde birikimi (sağ ok) gözlenmektedir (H&E, X400).



Resim 8. CP grubuna ait böbrek dokusu. Yaygın sitoplazmik vakuolizasyon (sağ ok), yer yer intertübüler vasküler konjesyon (aşağı ok) ve yer yer yaygınlaşan hiyalin madde birikimi (üçgen) gözlenmektedir (H&E, X400).



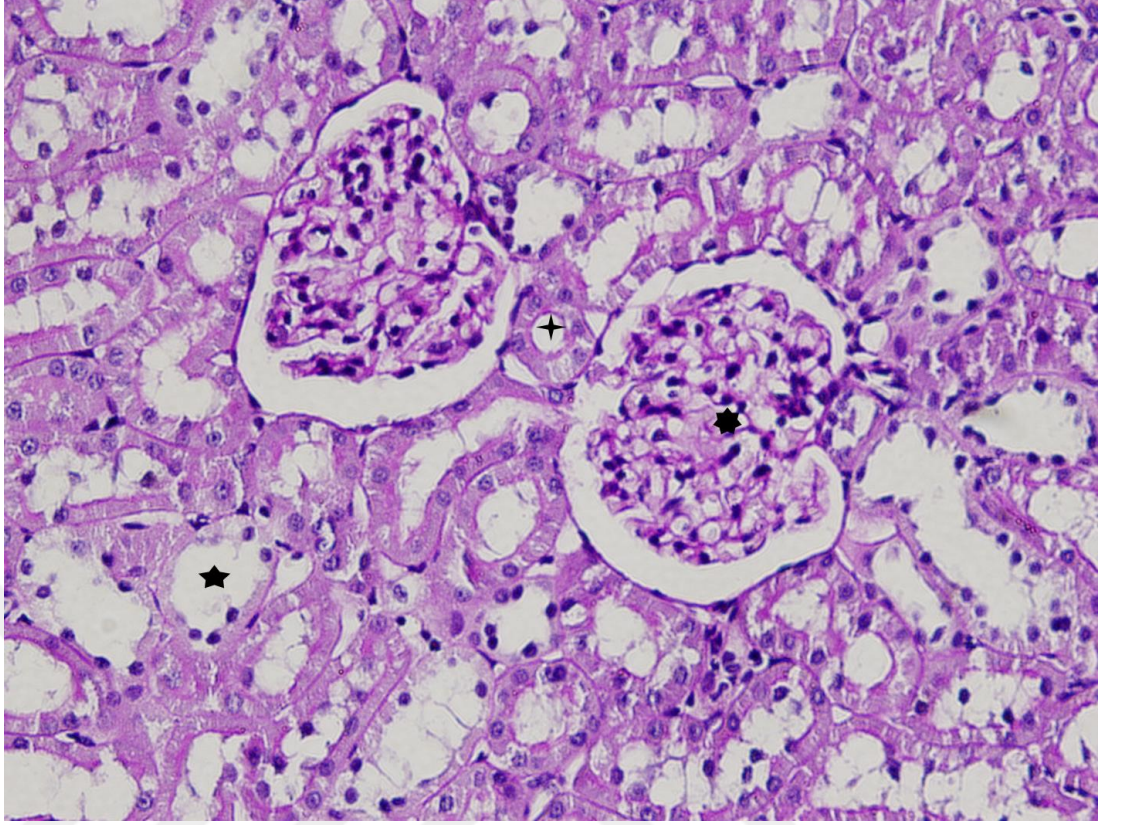
Resim 9. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu. Normal glomerül yapısı (yedi uçlu yıldız), normale benzer distal tübül (beş uçlu yıldız) ve proksimal (dört uçlu yıldız) tübül izlenmektedir (H&E, X200).



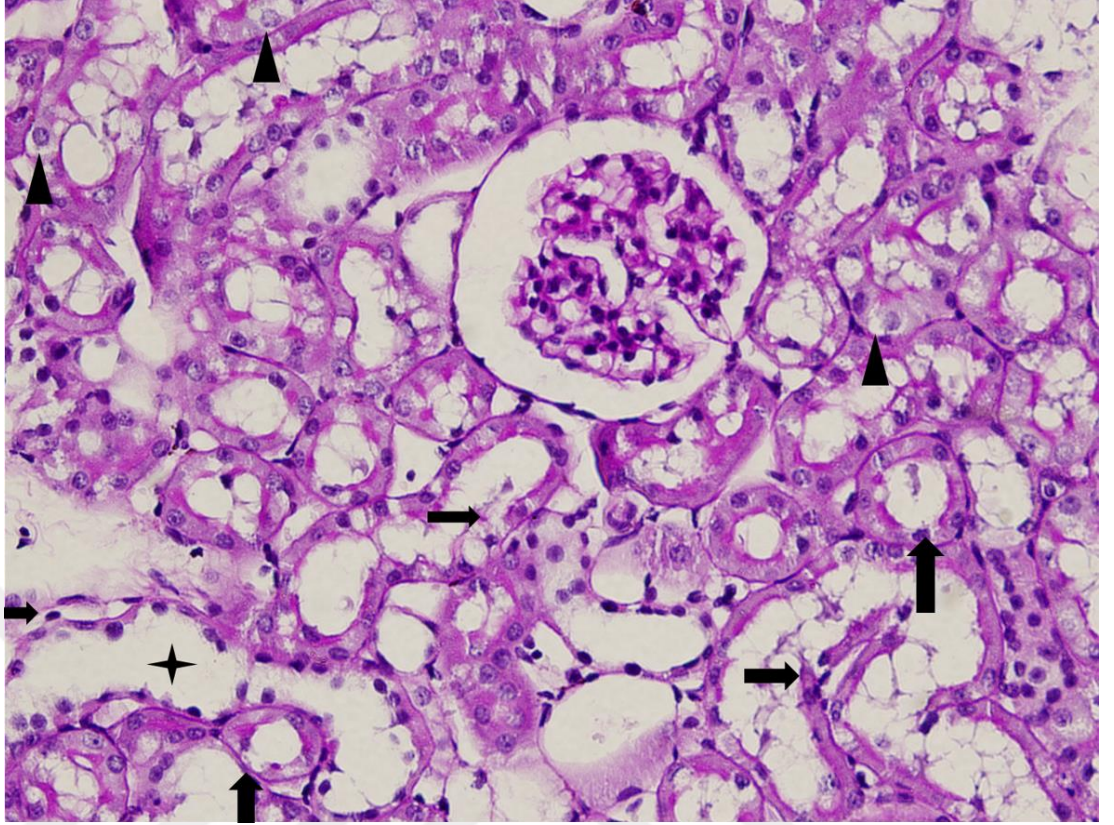
Resim 10. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu. Normal glomerül yapısı (yedi uçlu yıldız), normal proksimal (dört uçlu yıldız) ve normal distal tübül (beş uçlu yıldız) yapısı izlenmektedir (H&E, X400).

4.1.3. Periyodik Asit - Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

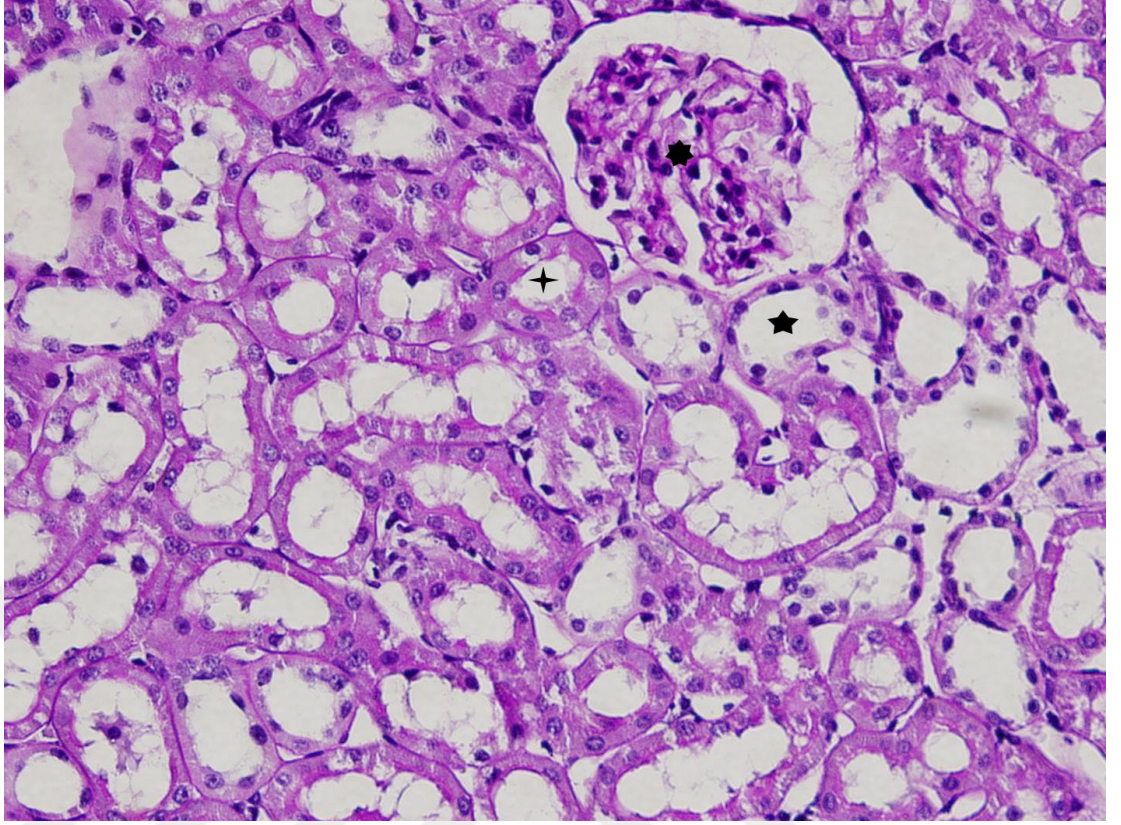
Böbrek dokusunun periyodik asit - Schiff yöntemi ile boyalı kesitlerinde yapılan histolojik incelemede, Sham grubuna ait böbrek kesitlerinde, glomerül, proksimal ve distal tübül normal yapıda izlendi (Resim 11). CP grubuna ait böbrek kesitlerinde ise bazal membranda yer yer kesintiler, proksimal tübülde fırçamsı kenar kayıpları, tübül epitelinde yaygın dökülme, tübüler vakuolizasyon gibi patolojik bulgular saptandı (Resim 12). CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda, tübül epitelinde dökülme ve vakuolizasyon gibi bulgular, CP grubuna göre azalmakla birlikte az da olsa görüldü (Resim 13).



Resim 11. Sham grubuna ait böbrek dokusu. Böbrek cisimciği (yedi uçlu yıldız), distal tübül (beş uçlu yıldız) ve proksimal (dört uçlu yıldız) normal olarak izlendi (PAS, X400).



Resim 12. CP grubuna ait böbrek dokusu. Tübüler epitelde dökülme (sağ ok), fırçamsı kenarda kayıplar (yukarı ok), tübüler vakuolizasyon (üçgen) ve tübüler dilatasyon (dört uçlu yıldız) izlenmektedir (PAS, X400).

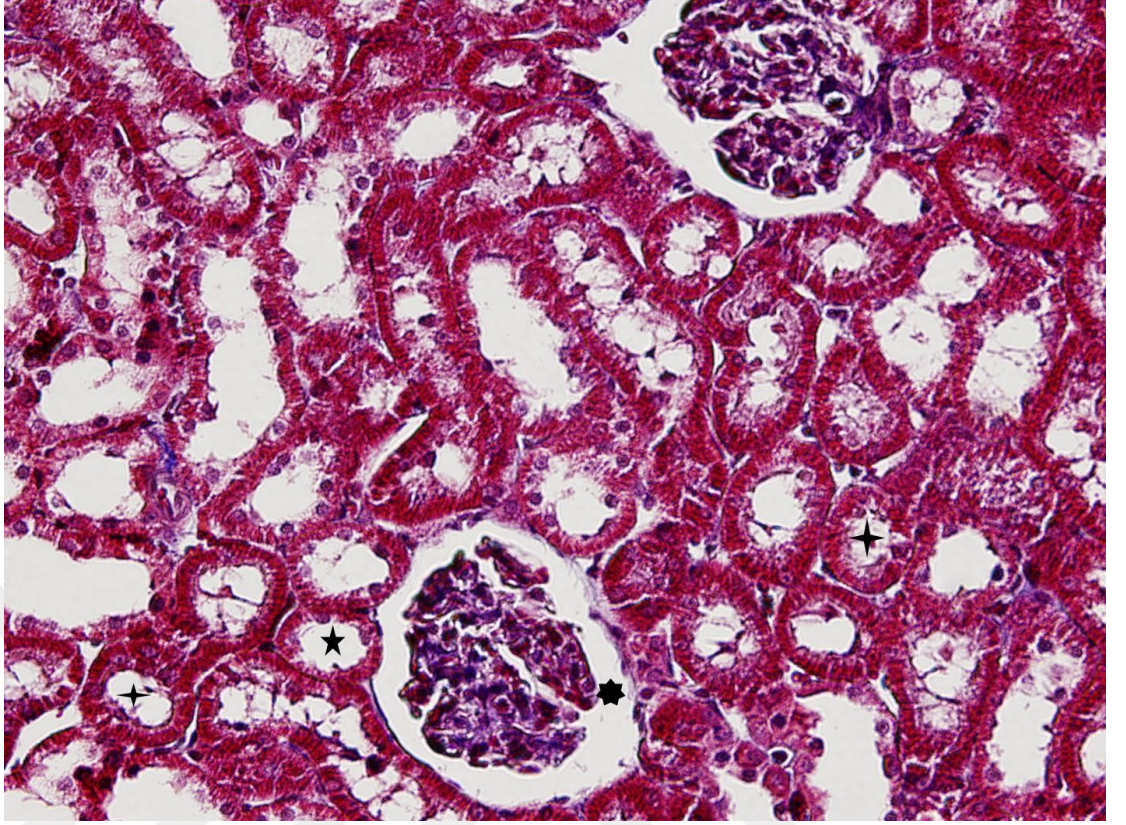


Resim 13. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu. Glomerül (yedi uçlu yıldız), proksimal tübül (dört uçlu yıldız), distal tübül (beş uçlu yıldız) normale benzer gözlendi (PAS, X400).

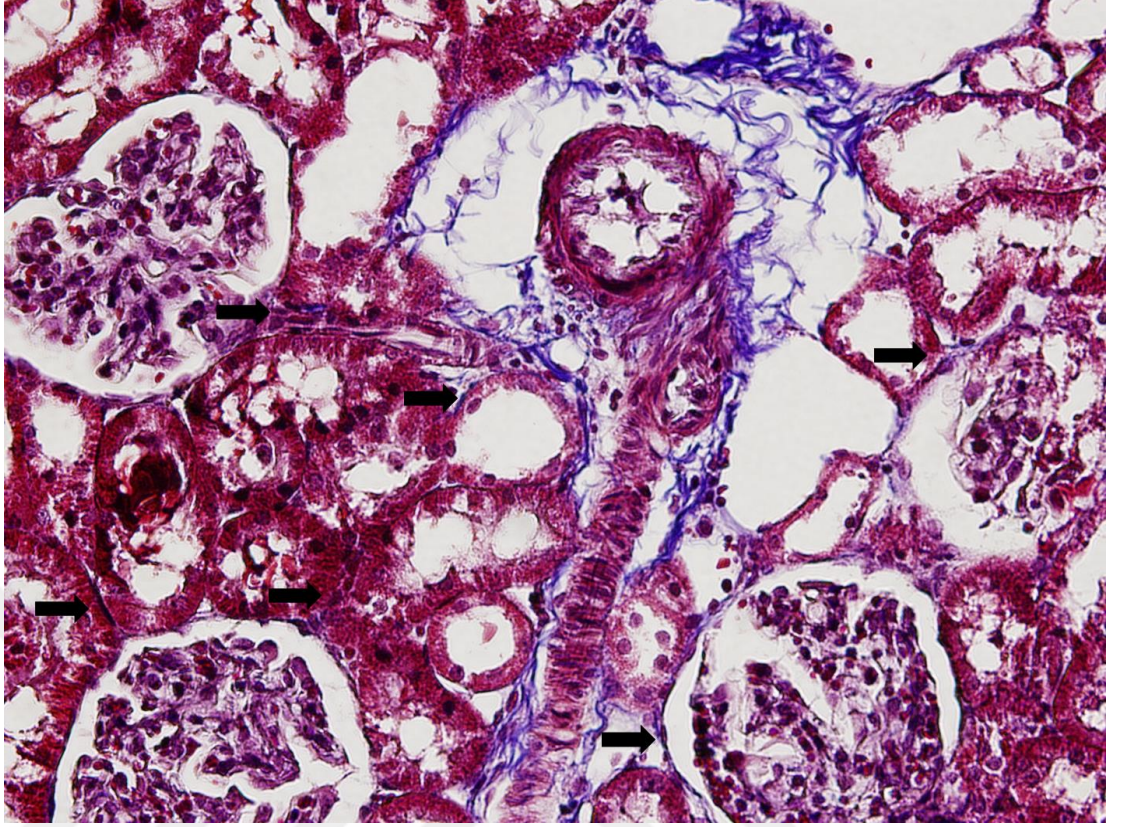
4.1.4. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Böbrek dokusunun Masson trikrom ile yapılan histolojik incelemesinde; Sham grubuna ait böbrek kesitlerinde, glomerül, proksimal ve distal tübül normal olarak gözlendi (Resim 14). CP grubuna ait böbrek kesitlerinde yer yer hafif düzeyde intertübüler kollajen artışı saptandı (Resim 15). CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda intertübüler alanda kollajen artışı, CP grubuna göre azalmıştı ancak yine de bazı alanlarda görüldü (Resim 16).

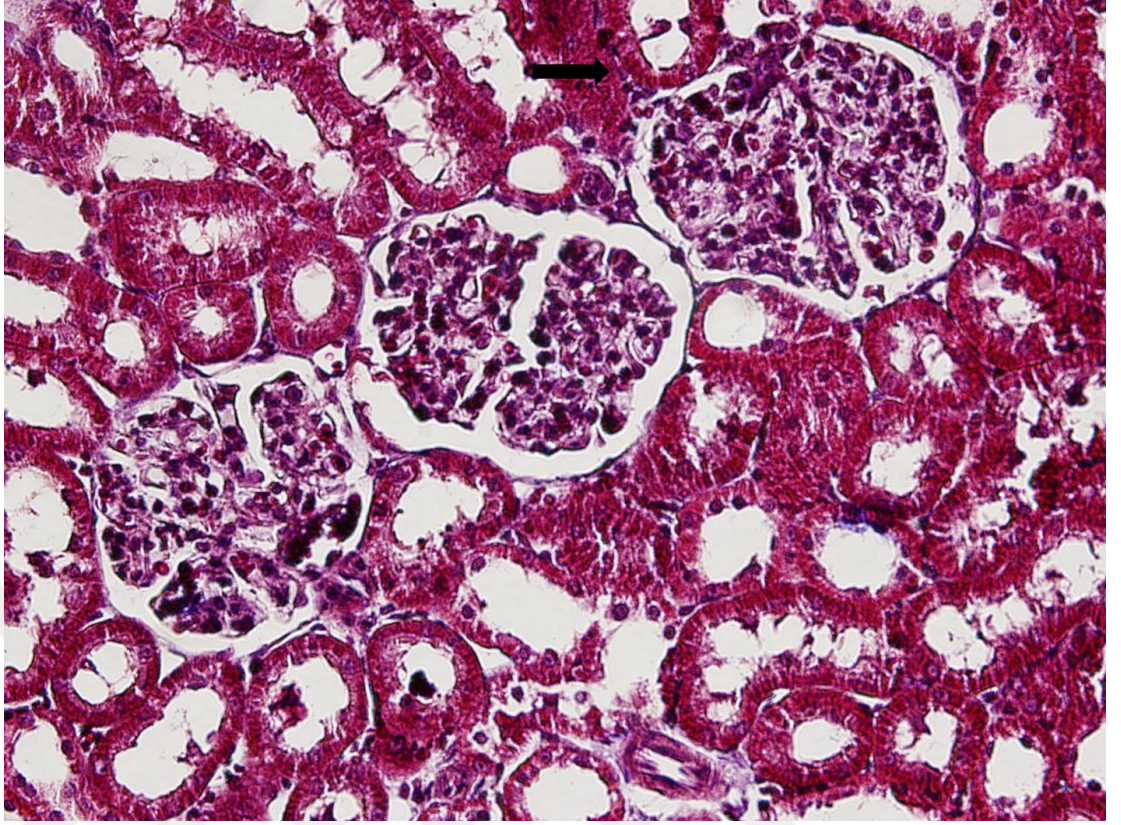




Resim 14. Sham grubuna ait böbrek dokusu. Glomerül (yedi uçlu yıldız) ve proksimal tübül (dört uçlu yıldız) ve distal tübül (beş uçlu yıldız) normal gözlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



Resim 15. CP grubuna ait böbrek dokusu. Yer yer hafif derecede intertübüler kollajen artışı (sağ ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



Resim 16. CP+RA grubuna ait böbrek dokusu. CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda intertübüler alanda kollajen artışı, CP grubuna göre azalmakla birlikte sadece bazı alanlarda (sağ ok) belirlendi (Masson Trikrom, X400).

4.2. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

4.2.1. Doku Biyokimyası

Çalışmamızdaki deney gruplarından alınan doku örneklerinden elde edilen doku SOD, CAT ve MDA sonuçlarına ilişkin bilgiler Tablo 6’da verilmiştir.

Doku MDA değeri CP+RA grubunda Sham ve CP gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,017$). SOD ve CAT değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 6. Doku biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi

	Sham	CP	CP+RA
MDA	322,04±14,01	331,21±36,55	408,30±34,96 a,b
SOD	40,15±3,86	38,17±4,39	41,74±1,58
CAT	1,84±1,19	2,29±1,67	0,51±0,35

a: MDA, CP+RA grubunda, Sham grubuna göre anlamlı olarak arttı.

b: MDA, CP+RA grubunda, CP grubuna göre anlamlı olarak arttı.

4.2.2. Serum Biyokimyası

Çalışmamızda deney gruplarından alınan serum örneklerinde, üre ve kreatinin sonuçlarına ilişkin bilgiler Tablo 7’de verilmiştir.

Gruplar BUN değeri açısından değerlendirildiğinde, CP grubunun BUN değeri, Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,017$). CP+RA grubunun BUN değeri, CP grubuna göre düşmüş olmasına rağmen, istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Gruplar kreatinin değeri açısından karşılaştırıldığında, CP ve CP+RA grubunda Sham grubuna göre artmış olmasına rağmen, yalnızca CP+RA grubunda Sham grubuna kıyasla anlamlı artış belirlendi ($p<0,017$).

Tablo 7. Serum biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi

	Sham	CP	CP+RA
BUN	17,17±2,13	45,67±13,86 a	35±13,56
Kreatinin	0,21±0,03	0,32±0,05	0,33±0,08 b

a: BUN değeri, CP grubunda, Sham grubuna göre anlamlı olarak arttı.

b: Kreatinin değeri, CP+RA grubunda, Sham grubuna göre anlamlı olarak arttı.

5. TARTIŞMA

Alkilleyici, güçlü bir immünosüpressif bir ajan olan siklofosfamid, kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaçtır. Siklofosfamid (CP), mesane, meme, deri, lenfoid ve pediatrik maligniteler dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde; kan ve kemik iliği transplantasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (146, 147).

Tümörlerin kemoterapötik ilaçlara karşı oluşturduğu direnç veya bu ilaçların kullanım dozlarının yetersiz kaldığı durumlarda başta CP olmak üzere birçok kemoterapötik ilacın yüksek dozda kullanımları gerekmektedir. Bu kimyasal ajanlardan CP'nin yüksek terapötik etkinliğinin artırılmasını kısıtlayan en önemli etken ise oluşturduğu toksik etkidir. Bu ilaç, karaciğerde sitokrom p450 tarafından aktivasyon adımı gerektiren bir ön ilaçtır. İlk olarak 4-hidroksi-siklofosfamid'e aktiflenir ve ardından aldofosfamide izomerize edilir. Daha sonra aldofosfamid, fosforamid hardalı ve akrolein olmak üzere iki bileşiğe dönüştürülür. CP'nin toksik etkisi aktif metaboliti olan akrolein ile ilgilidir. CP'nin bu toksik etkisinin ise metabolize olması sonucu ortaya çıkan akroleinin yüksek miktarda serbest radikal oluşumlarına neden olması ile ortaya çıktığı belirtilmiştir (85,148-150).

Akrolein, siklofosfamid tedavisinde başta hemorajik sistit olmak üzere nefrotoksisite, kemik iliği supresyonu, kardiyotoksisite, gonadal toksisite gibi bir çok toksisitenin ana sebebidir (96, 147).

CP'nin DNA molekülü üzerinde sıklıkla bağlandığı yer, guaninin 7 numaralı azot atomudur ve bu yerin alkilenmesi, DNA molekülünde aşağıdaki üç önemli değişiklikten birine yol açar: İlk olarak guaninin 7'inci azottan alkilenmesi, bu maddenin bir numaralı azot atomunun asiditesini artırır. Molekülde oluşan söz konusu değişme, onun sitozin yerine timin ile baz çifti yapmasını teşvik eder. Alkilleyicilerin bağlanması sonucu anormal baz çiftinin oluşması, genetik kodun yanlış okunmasına yani replikasyon ve transkripsiyon sırasında guaninin, adenin gibi işlem görmesine veya okunmasına neden olur. Bu olay, yeni DNA zincirinde ve mRNA moleküllerinde önemli bozukluklara yol açar, guaninin imidazol halkası açılır ve böylece guanin parçalanır ve ortadan kalkar. Sonuçta DNA zinciri buradan kırılmış olur; son olarak da oluşan reaktif metabolit, iki ayrı zincirdeki guanin

arasında köprü (çaprazbağlanma) yapar ve bu durumda DNA'nın replikasyonu ve transkripsiyonu gerçekleşemez (151, 152).

CP'nin toksisiteye neden olduğu hücresel / biyokimyasal mekanizmalar iyi anlaşılamamakla birlikte, çok sayıda çalışma CP maruziyetinin hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırdığını göstermiştir. ROS, aşırı miktarlarda üretildiğinde, DNA fragmantasyonunu ve mitokondri ile plazma zarını peroksidatif olarak hasara uğratar ve toksisite oluşturur (153-155).

Liu ve arkadaşları tek doz 200 mg/kg, i.p siklofosfamid kullanarak siklofosfamidin renal toksisitesine karşı paeoniflorinin koruyucu etkisini gözlemlemek istedikleri çalışmada, CP uygulanan farelerin böbreklerinde nekroz ve inflamatuvar hücre göçü gözlenmiş, serum ürik asit ve kreatinin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir (136). Bizim çalışmamızda, aynı doz CP uygulaması yaptığımız grupta, sıçanların böbreklerinde yaygın lenfosit infiltrasyonuna rastladık.

BUN ve kreatinin, böbreklerden atılan metabolik artık ürünlerdir. Böbrek hastalıklarında, protein yıkımının göstergesi olan üre ile kas yıkımının göstergesi olan kreatininin kandaki seviyeleri artmaktadır (156). Siklofosfamid, değişik bilimsel araştırmalarda, sıçan ve farelere değişik dozlarda i.p olarak uygulanmıştır. Sabry ve arkadaşları tarafından propolis'in farelerde siklofosfamidin neden olduğu değişikliklere karşı koruyucu etkilerini ortaya koymak amaçlı yapılan bir çalışmada, i.p. 100 mg/kg CP verilen farelerde glomerüllerin büzüldüğü, tübüllerin dejenere olduğu ve tübül epitel hücrelerinde vakuolizasyon olduğu, üre ve kreatinin değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu bulguların propolis ile azaldığı ve renal korteks doku mimarisinin düzeldiği gözlenmiştir (157). Biz de çalışmamızda glomerüllerin ve tübüllerin dejenerasyonuna ve vakuolizasyonuna sıklıkla rastlarken, glomerüler büzülmeyi nispeten daha az tespit ettik; ayrıca üre ve kreatinin değerlerinin siklofosfamid uygulanan grupta arttığını gözlemledik.

Premila ve arkadaşlarının siklofosfamid nefrotoksitesinin lizozomal enzimler üzerinde etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, 150 mg/kg tek doz i.p. uygulanan sıçanların böbreklerinin histopatolojik incelemesinde, glomerüler nefrit, kortikal tübüler vakuolizasyon ve interstisyel ödem gözlenmiş, kreatinin arttığı tespit edilmiştir (158). Biz de CP grubunda tübüllerde vakuolizasyonu sıklıkla gözlemlemize rağmen interstisyel ödeme rastlamadık; yer yer tübüler dilatasyon bulgularımız

mevcuttu; kreatinin seviyesi Premila ve arkadaşlarının çalışmalarına paralel olarak bizim çalışmamızda da artmıştı.

Sibel ve arkadaşlarının siklofosfamidin oluşturduğu nefrotoksisiteye karşı selenyumun koruyucu etkilerinin araştırdıkları bir çalışmada Sprague-Dawley cinsi sıçanlara 150 mg/kg siklofosfamid uygulandığında Bowman boşluğunun daraldığı ve bazı tübüllerde hiyalin madde biriktiği gözlenmiştir (159). Çalışmamızda CP grubunda, hiyalin madde birikimi rastlanan çok sayıda tübül görmekle birlikte Bowman boşluğunun daralmasına da yer yer rastladık.

Oksidatif stresin biyokimyasal önemli belirteçlerinden biri MDA'dır. Antioksidan savunma sisteminin önemli belirteçlerinden ikisi CAT ve SOD'dur (160).

Elias ve arkadaşlarının siklofosfamid hasarına karşı çeşitli antioksidan bileşikler denediği çalışmada sıçanlara 150 mg/kg CP uygulanmış, sonucunda tübüler nekroz ve inflamatuvar hücre göçü gözlenmiş; üre, kreatinin ve MDA'nın arttığı, SOD'un azaldığı belirlenmiştir (161). Yaptığımız çalışmada CP grubunda inflamatuvar hücreler gözlenirken tübüler nekroz gözlenmedi; ayrıca MDA'nın arttığı ve SOD'un azaldığı da tespit edildi.

Supriya ve arkadaşlarının siklofosfamidin ardışık iki gün 200 mg/kg i.p. verilerek oluşturduğu böbrek toksisitesine karşı Picrorhiza kurroa rizomundan alınan iridoid glikozitlerle zenginleştirilmiş fraksiyonun denendiği bir çalışmada, proksimal tübüllerde dilatasyon, tübül epitel hücrelerinde sitoplazmik granülasyonların arttığı, tübüllerin lümeninde hiyalin madde birikimi, Bowman boşluğunda daralma ve glomerüllerde dejenerasyon gözlenmiştir (162). Çalışmamızda CP grubunda, hiyalin madde birikimine sıklıkla rastlarken, yer yer Bowman boşluğunun daralmasına ve daha az sıklıkla da proksimal tübüllerin dilatasyonuna rastladık.

Amr ve arkadaşlarının i.p. 200 mg/kg siklofosfamid ile fare böbreklerinde oluşturduğu olumsuz etkiye karşı hesperidinin etkilerini gözlemeyi amaçladıkları çalışmada, siklofosfamid enjekte edilen farelerde serum kreatinin, sistatin C ve doku MDA düzeylerinin arttığı; renal mimarinin bozulduğu, dilate tübüller, renal tübüllerin nekrozu ve tübüler epitelde dökülmeler, interstisyel ödem ve pıhtılaşma nekrozu gibi belirgin bir histopatolojik böbrek dokusu hasarı izlenmiştir (163). Aynı doz siklofosfamid uyguladığımız sıçanlarımızda kreatinin ve MDA değerlerinin

arttığını ve tübüler dilatasyon, tübül epitelinde dökülmeler gibi bulguları biz de çalışmamızda gözlemledik.

Patel ve arkadaşlarının 7 gün süreyle i.p. 200 mg/kg siklofosfamid uygulayarak oluşturduğu nefrotoksisiteye karşı *Muraya koenigii* ekstraktının nefroprotektif etkilerini inceledikleri çalışmada, siklofosfamid uygulanan grupta tübüler dejenerasyon, mononükleer / polimorfonükleer hücre infiltrasyonu ve Bowman kapsülünün daralması gözlemlendi; BUN ve kreatinin değerlerinin arttığı, doku SOD ve GSH düzeylerinin azaldığı belirlendi (164). Aynı doz tek sefer i.p. siklofosfamid uygulanan deney grubumuzun sıçanlarında, benzer histopatolojik bulgular gözlenirken, SOD'un da azaldığı tespit edildi.

Maryam ve arkadaşlarının tek doz i.p. 200 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonu sonrası n-asetilsisteinin onarıcı etkilerini inceledikleri çalışmalarında, histopatoloji preparatlarının incelenmesi sonucu, siklofosfamidin sıçanların böbreklerinde yaygın hemorajik odaklar yanı sıra inflamatuvar hücre odakları da oluşturduğu; bunun inflamasyona neden olduğu yönünde değerlendirme yapılmıştır (165). Çalışmamızda siklofosfamid verilen sıçanlarda, bazı böbrek kesitlerinde lökosit infiltrasyonu ve yer yer hemorajik odaklar gözlemlendi.

Mehdi ve arkadaşlarının farelerde siklofosfamid ile oluşacak renal hasar ve oksidatif strese karşı melatoninin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada, hemoraji, tübüler nekroz, tübüler dejenerasyon ve lökosit infiltrasyonu gözlenmiş; BUN, kreatinin ve MDA'nın arttığı, SOD'un azaldığı belirlenmiştir (166). Bizim çalışmamızda tübüllerde dejeneratif bulgular, hemoraji, lökosit infiltrasyonu bulguları gözlemlendi; biyokimyasal olarak incelenen doku örneklerimizde ise MDA'nın arttığı ve SOD'un azaldığı gözlemlendi.

Mustafa ve arkadaşlarının siklofosfamid hasarına karşı Borik asidin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, Sprague Dawley erkek sıçanlara 200 mg/kg siklofosfamid uygulanmış; BUN, kreatinin ve doku MDA'sının arttığı, CAT' ın azaldığı; histopatolojik olarak kanama odakları, vasküler konjesyon ve Bowman kapsülü aralığının daraldığı gözlenmiştir (167). Bizim çalışmamızda CP grubunda MDA artışı belirlendi; bununla birlikte CAT aktivitesi de artmıştı; fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. CAT'ın yüksek çıkmasının, önemli bir diğer antioksidan enzim olan glutatyon peroksidaz enziminin (GSH-Px) aktivitesindeki

artışın devreye girmiş olabileceğinden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i parçalayan CAT ve GSH-Px aynı görevi üstlenmelerine rağmen bunların afiniteleri farklılık göstermektedir. GSH-Px'ın H_2O_2 'e olan afinitesi ve hızı CAT'a göre çok daha fazladır. CP grubunda CAT aktivitesindeki bu artmanın sebebi GSH-Px enziminin devreye girmiş olmasından kaynaklanabilir (168).

Çeşitli çalışmalarda antioksidan etkisi saptanan rosmarinik asit, klinik ve deneysel çalışmalarda koruyucu ve tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (124-127).

Robert ve arkadaşlarının rosmarinik asidin sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı terapötik aktivitesini araştırmak amaçlı yaptığı çalışmada, sisplatin enjeksiyonundan 48 saat sonra 2 gün boyunca 1 mg/kg, 2 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarda oral gavaj ile RA uygulanmış; sisplatin uygulaması tübüler epitelde hasar, tübüler dilatasyon gibi histopatolojik değişikliklere yol açmış; artan rosmarinik asit dozlarıyla bu bulguların düzeldiği gözlenmiştir (169). Bizim çalışmamızda CP grubuna ait böbrek kesitlerinde, Sham grubuna kıyasla, tübüler atrofi, tübüler vakuolizasyon gözlenirken CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda, hafif tübüler atrofi dışında patolojik bulgu gözlenmedi.

Majid ve arkadaşlarının alloxan monohidrat ile oluşturduğu deneysel diyabetik nefropati modelinde oluşan böbrek inflamasyonu ve oksidatif stres bozukluklarını 100 mg/kg ve 200 mg/kg rosmarinik asit ile tedavi etmenin etkileri araştırılmış; diyabetik nefropati modellerinde oluşan glomerüloskeroz ve lökosit infiltrasyonunun artan rosmarinik asit dozlarına paralel olarak düzeldiği bulunmuştur (137). Bizim çalışmamızda, CP grubunda lökosit infiltrasyonuna sıklıkla rastlarken, CP+RA grubunda lökosit infiltrasyonun azaldığını gözlemledik.

Renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı rosmarinik asitin vasküler klempten 1 saat önce 50 mg/kg, 100 mg/kg ve 200 mg/kg uygulanması şeklinde yapılan çalışmada , iskemi reperfüzyon grubunda tübüler nekroz, lökosit infiltrasyonu, tübüler kast oluşumu, glomerüloskleroz, tübüler dilatasyon gözlemlenmiş, artan rosmarinik asit dozları ile düzelmeler gözlenmesine rağmen, sham grubunda gözlenen tübüler histolojinin korunamadığı belirlenmiştir (170). CP hasarına karşı RA'in koruyucu etkisini araştırdığımız çalışmamızda, histopatolojik olarak tübüler

nekroz, lökosit infiltrasyonu, tübüler dilatasyon bulgularını RA'nın düzelttiğini tespit ettik.

Hülya ve arkadaşlarının renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı rosmarinik asidin koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada, RA 25mg/kg iskemi indüksiyonundan 30 dakika önce intraperitoneal olarak uygulanmış, iskemi reperfüzyon sonucu oluşan fokal glomerüler nekroz, Bowman kapsülü dilatasyonu, tübüler epitel dejenerasyonu, tübüler epiteldeki nekroz ve dilatasyonun rosmarinik asit uygulanması ise engellendiği gösterilmiştir (17). Çalışmamızda, rosmarinik asidin, siklofosfamidin tübül epitelinde oluşturduğu dejenerasyon ve atrofi oluşumunu rosmarinik asitin koruyabileceğini tespit ettik.

Naglaa ve arkadaşlarının gentamisin sığın böbreklerinde oluşturduğu hasara karşı, gentamisin uygulaması öncesi çeşitli antioksidanların denendiği çalışmalarında, gentamisin uygulanan grubun böbreklerinde glomerüllerin küçülmesi ve Bowman boşluğunun genişlemesiyle karakterize glomerüler hasar, tübül epitel kaybı, tübül duvarlarında epitelyal dökülmeler, piknotik çekirdekli hücre miktarında artış, interstisyel kanamalar, mononükleer hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada gentamisin grubunda serum kreatinin, BUN ve MDA değeri artmış, GSH, GSH-Px ve SOD değerleri düşmüştür. Her gentamisin uygulamasından 1 saat önce oral 50 mg/kg rosmarinik asit uygulaması, histopatolojik bulguları düzeltmiş, artan BUN, kreatinin ve doku MDA değerini azaltmış; azalan GSH, GSH-Px ve SOD değerini de artırmıştır (171). Bizim çalışmamızda CP grubuna ait böbrek kesitlerinde Sham grubuna kıyasla tübüler atrofi, tübüler vakuolizasyon, glomerüler hasar, vasküler konjesyon ve interstisyel inflamasyonda belirgin bir artış izlendi; epitelde dökülmeler, lökosit infiltrasyonu ve hiyalin madde birikimi bulguları gözlemlendi. CP+RA grubuna ait böbrek dokusunda, hafif tübüler atrofi dışında patolojik bulgu gözlenmedi. BUN değeri CP grubunda Sham grubuna göre anlamlı artarken, CP+RA grubunda CP grubuna göre düşüş mevcuttu. Kreatinin değeri CP grubunda Sham grubuna göre artış gösterdi; fakat CP+RA grubunda CP grubuna göre anlamsız minimal bir yükseliş belirlendi. CP+RA grubunda gözlenen kreatinin artışı CP grubuna göre anlamlı değildi. MDA, CP grubunda artarken, CP+RA grubunda yalnızca Sham grubuna göre artış gösterdi. Daha önce yapılan çalışmalarda MDA'nın RA verilen gruplarda artması peroksidaz etkisi ile H₂O₂ ve serbest radikal

oluşumu sebebiyle oluşmuş olan prooksidan etkiden dolayı olabileceği bildirilmiştir (172, 173).

Swarnalata ve arkadaşlarının kadmiyuma bağlı oluşturulan nefrotoksisiteye karşı rosmarinik asidin koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında, kadmiyum ile oluşan tübüler dejenerasyon, Bowman kapsülü genişlemesi, vakuolizasyon gibi bulguların kadmiyumun 14 gün boyunca her uygulamasından 1 saat önce verilen gavaj ile 50 mg/kg rosmarinik asit uygulanması ile düzeldiği gözlemlenmiş, kadmiyumun tek uygulanmasında düşen SOD ve CAT değerinin rosmarinik asit ile uygulanan grupta yükseldiği gözlenmiştir (173). Çalışmamızda, siklofosamid uygulaması öncesinde 8 gün 100 mg/kg rosmarinik asit uygulanan sıçanlarda vakuolizasyon, glomerüler hasar, hiyalin madde birikimi ve tübüler atrofi gibi bulgular, yalnız CP grubuna göre düzelme gösterdi. CP grubunda azalan SOD değeri, öncesinde CP+RA uygulanan grubumuzda yükselirken, CP grubunda yükselen CAT değeri CP+RA grubunda azalma göstermiştir. Bu durumun, daha önce de açıkladığımız gibi, glutatyon peroksidazın (GSH-Px) aktivitesindeki değişiklik ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. CP grubunda CAT aktivitesindeki artışın ve CP+RA grubunda CAT aktivitesindeki bu azalmanın sebebi GSH-Px enziminin devreye girmiş olmasından kaynaklanabilir (174). SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i parçalayan CAT ve GSH-Px aynı görevi üstlenmelerine rağmen GSH-Px'ın H_2O_2 'e olan afinitesi ve hızı CAT'a göre çok daha fazla olması sebebiyle CAT nispeten düşmüş olsa da, GSH-Px ölçümünün yapılması ile bu durumun açıklığa kavuşturulacağını düşünüyoruz.

Histopatolojik verilerimiz CP'in sıçan böbrek doku hasarını artırdığını, RA'nın ise CP'e bağlı oluşan hasarı büyük ölçüde düzelttiğini göstermektedir. Ancak oksidan-antioksidan dengedeki değişimlerin çalışmanın biyokimyasal sonuçlarını etkilemesi nedeniyle, CP uygulanan dokulara RA'yı farklı dozlarda uygulayarak, daha fazla parametrelerin kullanıldığı araştırmalarla, daha detaylı sonuçlar elde edilebileceğini düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

CP'nin böbrek dokusundaki toksik etkilerine karşı RA'nın koruyucu etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmamızın sonucunda,

- CP sıçan böbreklerinde:
 - Glomerüler hasara yol açmıştır.
 - Tübüler atrofiye neden olmuştur.
 - Tübül epitellerinde dökülmelere ve düzensizliklere yol açmıştır.
 - Tübüler epitelde vakuolizasyonda artışa neden olmuştur.
 - Tübüler dilatasyona sebep olmuştur.
 - İnterstisyel inflamasyon meydana gelmiştir.
 - İnterstisyel alanda vasküler konjesyona sebep olmuştur.
 - Hiyalin madde birikimine neden olmuştur.
 - Fırçamsı kenarlarda kayıp gözlenmiştir.
 - BUN artışına yol açmıştır.
 - SOD düzeyinin düşmesine sebep olmuştur.
- CP+RA uygulanan sıçan böbreklerinde:
 - Glomerüler hasarda azalma meydana gelmiştir.
 - Tübüler atrofinin azaldığı gözlemlenmiştir.
 - Tübül epitellerinde dökülmeler ve düzensizliklerin düzeldiği tespit edilmiştir.
 - Tübüler vakuolizasyonda azalma izlenmiştir.
 - Tübüler dilatasyonun düzeldiği belirlenmiştir.
 - İnterstisyel inflamasyon azalmıştır.
 - İnterstisyel alanda vasküler konjesyon azalmıştır.
 - Hiyalin madde birikiminin düzeldiği gözlenmiştir.
 - Fırçamsı kenar kaybı azalmıştır.
 - BUN düzeyinin düşmesine yol açmıştır.
 - SOD seviyesinin arttığı gözlenmiştir.

Siklofosfamid sebepli böbrek hasarına karşı rosmarinik asitin etkilerinin araştırıldığı bu çalışmanın bulguları ve sonuçlarının, deneysel ve klinik çalışmalara yol gösterici olacağı kanaatindeyiz. Bu çalışma siklofosfamidin böbrek toksisitesine

karşı rosmarinik asitin etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. O nedenle bu çalışma, bu konuda yapılacak olan yeni çalışmalara kaynaklık edecek; literatürde bu konudaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacak; toplumda sık kullanılan bu ilacın komplikasyonlarına karşı elde edilebilecek bir koruyucu etkiyle, insan sağlığı ve tedavi maliyeti bakımından olumlu sonuçlar doğurabilecektir.

Bu konuda yeni çalışma yapacak araştırmacılara, bulguların zenginleştirilebilmesi açısından immunohistokimya, elektron mikroskobu, hücre kültürü çalışmaları, flow sitometri, moleküler biyoloji gibi daha ileri teknoloji ve teknikler kullanarak çalışma ile ilgili daha ayrıntılı veriler elde edebileceklerini ve çalışmayı daha ileri düzeye taşıyabileceklerini önerebiliriz. RA'nın doku üzerindeki etkilerini gözlemlemek için tek başına RA grubu oluşturulabilir. CP'nin kullanıldığı bir hastalık modellemesi yapıp CP kullanılarak RA'nın hem hastalık üzerine hem CP ile birlikte hastalık üzerindeki etkileri gözlemlenebilir. CP ve RA'nın farklı doz ve farklı sürelerde kullanılması ile yapılacak yeni araştırmaların, en etkili tedavi dozu ve iyileşme süresinin belirlenmesini sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13. Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2016. 371-387.
2. Bailey M A and Unwin R J. Renal Physiology in Feehally J, Floege J, Tonelli M and Johnson R J. Comprehensive Clinical Nephrology 6. Edition. Elsevier: Philadelphia; 2019. 14-28.e1
3. Eaton DC, Pooler JP. Vanderin böbrek fizyolojisi. 6.basımdan çeviri. Çeviri editörleri: Süleymanlar G, Sifil A. Ankara: Palme Yayınevi ; 2005. 1-23.
4. Fraiser LH, Kanekal S, Kehrler JP. Cyclophosphamide toxicity. Drugs. 1991 Nov 1;42(5):781-95.
5. Ahmed AR, Hombal SM. Cyclophosphamide (Cytosan): a review on relevant pharmacology and clinical uses. Journal of the American Academy of Dermatology. 1984 Jan 1;11(6):1115-26.
6. Gershwin ME, Goetzl EJ, STEINBERG AD. Cyclophosphamide: use in practice. Annals Of Internal Medicine. 1974 Apr 1;80(4):531-40.
7. Goldberg MA, Antin JH, Guinan EC, Rapoport JM. Cyclophosphamide cardiotoxicity: an analysis of dosing as a risk factor. Blood. 1986; 68(5): 1114-1118.
8. Chrystal K, Cheong K, Harper P. Chemotherapy of small cell lung cancer: state of the art. Current Opinion In Oncology. 2004 Mar 1;16(2):136-40.
9. Cartei G, Cartei F, Cantone A, Causarano D, Genco G, Tobaldin A, Interlandi G, Giraldi T. Cisplatin-cyclophosphamide-mitomycin combination chemotherapy with supportive care versus supportive care alone for treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 1993 May 19;85(10):794-800.
10. Makhani N, Gorman MP, Branson HM, Stazzone L, Banwell BL, Chitnis T. Cyclophosphamide therapy in pediatric multiple sclerosis. Neurology. 2009 Jun 16;72(24):2076-82.

11. Joy MS, Hogan SL, Jennette JC, Falk RJ, Nachman PH. A pilot study using mycophenolate mofetil in relapsing or resistant ANCA small vessel vasculitis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2005 Dec 1;20(12):2725-32.
12. Richmond R, McMillan TW, Luqmani RA. Optimisation of cyclophosphamide therapy in systemic vasculitis. *Clinical Pharmacokinetics*. 1998 Jan 1;34(1):79-90.
13. Kayaalp, S. Oğuz. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık Limited Şti., 2002: 395-396.
14. Caglayan C, Temel Y, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*. 2018 Jul 1;25(21):20968-84.
15. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi T, Takano H, Yoshikawa T, Terao J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal of Nutrition*. 2005 Jan 1;44(1):1-9.
16. Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacology*. 2011;2011.
17. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Ozgen U, Duran A, Uygun I. Protective effects of rosmarinic acid against renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *J Pak Med Assoc*. 2014 Mar 1;64(3):260-5.
18. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francist-West PH. Larsen's Human Embryology. Fifth Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2015. 375-393.
19. Şeftalioğlu A. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. Üçüncü Baskı. Ankara: Tıp & Teknik Yayıncılık; 1998.328-342.
20. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human; Clinically Oriented Embryology. 10th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2016. 241-282.
21. Eşrefoğlu M. Embriyoloji. 1. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevleri; 2017. 126-130.

22. Moore KL, Persaud TV, Torchia MG. Before We Are Born: Essentials Of Embryology and Birth Defects. 9th. Philadelphia ,Elsevier Health Sciences; 2016. 161-188.
23. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 12th Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins;; 2012. 232-259.
24. Cochard LR. Netter's Atlas of Human Embryology: updated edition. Chicago : Elsevier Health Sciences; 2012. 157-184.
25. Singh V. Textbook of Clinical Embryology [electronic resource]. Elsevier Health Sciences; 2014. 233-246.
26. Dudek Ronald W. Embryology BRS. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2016. 155-168.
27. Arıncı K, Elhan A. İnsan Vücudunun Yapısı. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi;1987. 94-99.
28. Chung KW and Chung HM. Gross Anatomy. 7. edition. Lippincott Williams & Wilkins:USA 2012;213-243.
29. Drake RL, Vogl AW and Mitchell AWM. Gray's Basic Anatomy. 2. edition. Elsevier: Philadelphia;2018. P. 133-207.
30. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi: Baş-Boyun ve İç organlar. 10. Baskı. Ankara: ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık; 2016. 261-267.
31. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins:USA;2014. 290-301.
32. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 4. Baskı. Güneş Kitabevi: Ankara; 1995. 311-321.
33. Rizzo DC. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 4. Edition. Cengage Learning;Boston;2016. 436-437.
34. VanPutte C, Regan J, Russo A. Seeley's Essentials of Anatomy & Physiology. 9.edition. McGraw-Hill Education: New York;2016. 500-505.
35. Kelly CR and Landman J. Netter Collection of Medical Illustrations: Urinary System. 2. edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2012. 2-29.
36. Dudek RW, Louis TM. High-yield Gross Anatomy. 5. edition. Lippincott Williams & Wilkins:USA;2015. 138-156.

37. Patton KT and Thibodeau GA. Anthony's Textbook of Anatomy and Physiology. 20. edition. Mosby, Elsevier: Missouri;2013. 970-1002.
38. El-Galley RE, Keane TE. Embryology, Anatomy, And Surgical Applications of The Kidney and Ureter. Surgical Clinics. 2000 Feb 1;80(1):381-401.
39. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas.14. Edition. McGraw-Hill Education:USA ;2013. 393-412.
40. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık: İstanbul; 2016. 205-220.
41. Gartner LP. Textbook of Histology. 4. edition. Elsevier: Philadelphia;2017. 499-527.
42. Cui D, Daley WP, Fratkin JD, Haines DE, Lynch JC, Naftel JP, Yang G. Atlas of Histology: With Functional and Clinical Correlations. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2011.220-241.
43. Ovalle WK and Nahirney PC. Netter's Essential Histology. 2nd Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia;2013. 357-380.
44. Gartner LP, Hiatt JL. Concise Histology E-Book. Elsevier Health Sciences; 2010. 260-272.
45. Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 7. edition. Wolters Kluwer: Philadelphia; 2016. 698-728.
46. Kierszenbaum AL and Tres LL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 4. Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia;2016. 439-467.
47. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. 6. Baskı. Çeviri Editörü: Baykal B. Palme Yayıncılık; 2014. 699-722.
48. Peckham M. Histology at A Glance. John Wiley & Sons; 2011. 72-77.
49. Mishra S and Vasudeva N. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology with Colour Atlas and Practical Guide. 7. Edition. Jaypee Brothers Medical Publishers: New Delhi; 2014. 303-321.
50. Young B, Woodford P and O' Dowd G. Wheater's Functional Histology. A Text and Colour Atlas. 6. edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia; 2014. 292-317.
51. Katz RL, Krishnamurthy S. Kidneys, Adrenals, and Retroperitoneum. In Comprehensive Cytopathology 2015. 667-725.

52. Dudek RW. High-Yield Histopathology. 2. edition. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 2011. 196-222.
53. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Eleventh Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008; 355-382.
54. Gartner LP, Hiatt JL. Cell Biology and Histology. 7. Edition., Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore; 2015. 309-327.
55. Zhang G, Fenderson BA. Lippincott's Illustrated Q&A Review of Histology. Lippincott Williams & Wilkins; 2015 ; 201-218.
56. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Temel Patoloji. In: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U, editör. Dokuzuncu basım. İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri; 2013. 14-15.
57. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*. 2003 Jan 2; 91(2):179-94.
58. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*. 2004 Oct;52(794804):4.
59. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Invest*. 2015; 6(3): 331-6.
60. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1997 Dec 31;1362(2-3):116-27.
61. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991 Apr 1;40(4):405-12.
62. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000 Jun 9; 742(2): 315-25.
63. Suttar J, Čermák J, Dyr JE. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Analytical Biochemistry*. 1997 Jun 15;249(1):20-3.

64. Sutttnar J, Mášová L, Dyr JE. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001 Feb 10; 751(1): 193-7.
65. Bird RP, Draper HH. [35] Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. Academic Press. In *Methods in Enzymology* 1984 Jan 1 (Vol. 105, pp. 299-305).
66. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YS, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010; 3(1): 91-100.
67. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*. 2008 Jun; 4(2): 89.
68. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2011; 1083: 1-37.
69. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007 Jan 1; 39(1): 44-84.
70. Ciriolo MR, Fiskin K, De Martino A, Corasaniti MT, Nistico G, Rotilio G. Age-related changes in Cu, Zn superoxide dismutase, Se-dependent and-independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1991 Dec 31; 61(3): 287-97.
71. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Johnson MJ, Boissinot M, Hallewell RA, Lepock JR, Cabelli DE, Tainer JA. Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface. *Biochemistry*. 1996 Apr 9; 35(14): 4287-97.
72. Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chemical Reviews*. 2016 Feb 15; 116(5): 3029-85.

73. Radak Z, Radák Z. Free radicals in exercise and aging. *Human Kinetics*; 2000: 1-35.
74. Deby C, Goutier R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases. *Biochemical Pharmacology*. 1990 Feb 1; 39(3): 399-405.
75. Breckta A, Greenstock CL, Tambo M. Advances on oxygen radicals, and radioprotectors: Mavelli, I: Ratilio. G: Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes. 1984:65-80.
76. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*. 1996 Feb 15; 87(4): 1595-9.
77. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2004 Jan 1; 61(2): 192-208.
78. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004 Apr 1; 37(4): 277-85.
79. Bernacki RJ, Bansal SK, Gurtoo HL. Combinations of mesna with cyclophosphamide or Adriamycin in the treatment of mice with tumors. *Cancer Research*. 1987 Feb 1; 47(3): 799-802.
80. Kayaalp SO. Akılcıl Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 12. baskı. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. 315-343.
81. Wang L, Albasi C, Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, Dorandeu C, Marion B, Causserand C. Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane. *Water Research*. 2009 Sep 1; 43(17):4115-22.
82. Grochow LB, Colvin M. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. *Clinical Pharmacokinetics*. 1979 Oct 1; 4(5): 380-94.
83. Bertram G. Basic Clinical Pharmacology. 12th Edition. 2012. 1345-1386.
84. Goodman LS. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. Edited by Laurence L. Brunton New York: McGraw-Hill; 2006.1356-1360.

85. Povirk LF, Shuker DE. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*. 1994 Dec 1; 318(3): 205-26.
86. Johns DG, Sartorelli AC, editors. *Antineoplastic and Immunosuppressive Agents*. Springer; 1975.
87. Pass GJ, Carrie D, Boylan M, Lorimore S, Wright E, Houston B, Henderson CJ, Wolf CR. Role of hepatic cytochrome p450s in the pharmacokinetics and toxicity of cyclophosphamide: studies with the hepatic cytochrome p450 reductase null mouse. *Cancer Research*. 2005 May 15;65(10): 4211-7.
88. Papaldo P, Lopez M, Marolla P, Cortesi E, Antimi M, Terzoli E, Vici P, Barone C, Ferretti G, Di Cosimo S, Carlini P. Impact of five prophylactic filgrastim schedules on hematologic toxicity in early breast cancer patients treated with epirubicin and cyclophosphamide. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Oct 1;23(28):6908-18.
89. Morandi P, Ruffini PA, Benvenuto GM, Raimondi R, Fosser V. Cardiac toxicity of high-dose chemotherapy. *Bone Marrow Transplantation*. 2005 Feb;35(4):323.
90. Chamorro-Cevallos G, Garduño-Siciliano L, Barrón BL, Madrigal-Bujaidar E, Cruz-Vega DE, Pages N. Chemoprotective effect of Spirulina (Arthrospira) against cyclophosphamide-induced mutagenicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2008 Feb 1;46(2): 567-74.
91. Glode LM, Robinson J, Gould S. Protection from cyclophosphamide-induced testicular damage with an analogue of gonadotropin-releasing hormone. *The Lancet*. 1981 May 23; 317(8230): 1132-4.
92. Thatcher N, Smith DB, Lind MJ, Anderson H, Barclay J, Chopra MP, Fitzgerald MD. Double alkylating agent therapy with ifosfamide and cyclophosphamide for advanced non-small cell lung cancer. From the Manchester Lung Tumour Group. *Cancer*. 1988 Jan 1; 61(1): 14-8.
93. Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Research*. 1989 Apr 1; 49(7): 1660-4.
94. Meistrich ML, Wilson G, Brown BW, Da Cunha MF, Lipshultz LI. Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with

- combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. *Cancer*. 1992 Dec 1; 70(11): 2703-12.
95. Franke SI, Prá D, da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2005 May 2; 583(1): 75-84.
 96. Rehman MU, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, Quaiyoom A, Sultana S. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2012 Jun 1; 365(1-2): 119-27.
 97. Zhang QH, Wu CF, Duan L, Yang JY. Protective effects of ginsenoside Rg 3 against cyclophosphamide-induced DNA damage and cell apoptosis in mice. *Archives of Toxicology*. 2008 Feb 1; 82(2): 117-23.
 98. Bennett AH. Cyclophosphamide and hemorrhagic cystitis. *The Journal of Urology*. 1974 May; 111(5): 603-6.
 99. DeFRONZO RA, Braine H, COLVIN OM, Davis PJ. Water intoxication in man after cyclophosphamide therapy: Time course and relation to drug activation. *Annals of Internal Medicine*. 1973 Jun 1; 78(6): 861-9.
 100. De Vries CR, Freiha FS. Hemorrhagic cystitis: a review. *The Journal of Urology*. 1990 Jan; 143(1): 1-9.
 101. Levine LA, Richie JP. Urological complications of cyclophosphamide. *The Journal of Urology*. 1989 May; 141(5): 1063-9.
 102. Senthilkumar S, Devaki T, Manohar BM, Babu MS. Effect of squalene on cyclophosphamide-induced toxicity. *Clinica Chimica Acta*. 2006 Feb 1; 364(1-2): 335-42.
 103. Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 2003 Jan 1; 62(2): 121-5.
 104. Scarpati ML, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ric Sci*. 1958; 28: 2329-33.

105. Ellis BE, Towers GH. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochemical Journal*. 1970 Jun 1; 118(2): 291-7.
106. Swamy, M. K., Sinniah, U. R., & Ghasemzadeh, A. (2018). Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(18): 7775-7793.
107. Furtado, M. A., de Almeida, L. C. F., Furtado, R. A., Cunha, W. R., & Tavares, D. C. (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657(2): 150-154.
108. Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., & Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70(15-16): 1663-1679.
109. Abdullah Y, Schneider B, Petersen M. Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Marantaceae species. *Phytochemistry Letters*. 2008 Dec 12; 1(4): 199-203.
110. Fadel O, El Kirat K, Morandat S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2011 Dec 1; 1808(12): 2973-80.
111. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. 2002 Aug 1; 177(1): 67-80.
112. Brewer MS (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 10(4): 221–247.
113. Sroka, Z., & Cisowski, W. (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6), 753-758.

114. Bulgakov VP, Inyushkina YV, Fedoreyev SA. Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2012 Sep 1;32(3): 203-17.
115. Wu, W. Y., & Wang, Y. P. (2012). Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* depside salt and its active components. *Acta Pharmacologica Sinica*. 33(9): 1119-30.
116. Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, Duarte CM, Serra AT, Pinto R, Freitas M, Fernandes E. Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2015 May; 116(5): 398-413.
117. Ge L, Zhu M, Li X, Xu Y, Ma X, Shi R, Li D, Mu C. Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities. *Food Hydrocolloids*. 2018 Oct 1; 83: 308-16.
118. Ferreira LG, Celotto AC, Capellini VK, Albuquerque AA, Nadai TR, Carvalho MT, Evora PR. Does rosmarinic acid underestimate as an experimental cardiovascular drug?. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2013; 28: 83-7.
119. Hajhosseini L, Khaki A, Merat E, Ainehchi N. Effect of rosmarinic acid on sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2013; 10(6): 477-80.
120. Nunes, S., Madureira, A. R., Campos, D., Sarmiento, B., Gomes, A. M., Pintado, M., & Reis, F. (2017). Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid—Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(9), 1799-1806.
121. Fazel Nabavi, S., Carlo Tenore, G., Daglia, M., Tundis, R., Rosa Loizzo, M., & Mohammad Nabavi, S. (2015). The cellular protective effects of rosmarinic acid: from bench to bedside. *Current Neurovascular Research*, 12(1), 98-105.
122. Alagawany M, El-Hack ME, Farag MR, Gopi M, Karthik K, Malik YS, Dhama K. Rosmarinic acid: Modes of action, medicinal values and health benefits. *Animal Health Research Reviews*. 2017 Dec; 18(2): 167-76.

123. Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A., & Brantner, A. (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, 19(1), 767-782.
124. Karthik, D., Viswanathan, P., & Anuradha, C. V. (2011). Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 58(5), 514-521.
125. Jang, A. H., Kim, T. H., Kim, G. D., Kim, J. E., Kim, H. J., Kim, S. S., Jin, Y.H., Park, Y.S., & Park, C. S. (2011). Rosmarinic acid attenuates 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology*, 11(9), 1271-1277.
126. Sanbongi, C., Takano, H., Osakabe, N., Sasa, N., Natsume, M., Yanagisawa, R., Inoue, K.I., Sadakane, K., Ichinose, T., & Yoshikawa, T. (2004). Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clinical & Experimental Allergy*, 34(6), 971-977.
127. Jiang WL, Xu Y, Zhang SP, Hou J, Zhu HB. Effect of rosmarinic acid on experimental diabetic nephropathy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012 Apr; 110(4): 390-5.
128. Gok DK, Ozturk N, Er H, Aslan M, Demir N, Derin N, Agar A, Yargicoglu P. Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2015; 53(4): 283-93.
129. Min J, Chen H, Gong Z, Liu X, Wu T, Li W, Fang J, Huang T, Zhang Y, Zhao W, Zhu C. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Rosmarinic Acid in Rat Cholestatic Liver Injury. *Molecules*. 2018 Sep 7; 23(9): 2287.
130. D'Amelio Sr FS. *Botanicals: A phytocosmetic desk reference*. CRC Press; 1998 Dec 21.
131. Moon, D. O., Kim, M. O., Lee, J. D., Choi, Y. H., & Kim, G. Y. (2010). Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF- α -induced

- NF- κ B activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. *Cancer Letters*, 288(2), 183-191.
132. Chu, X., Ci, X., He, J., Wei, M., Cao, Q., Guan, M., Xie, X., Deng, X., & He, J., (2012). Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Molecules*, 17(3), 3586-3598.
 133. Park, D. H., Park, S. J., Kim, J. M., Jung, W. Y., & Ryu, J. H. (2010). Subchronic administration of rosmarinic acid, a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, enhances cognitive performances. *Fitoterapia*, 81(6), 644-648.
 134. Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2012). *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy*, 58(1), 70-77.
 135. Ramalho LN, Pasta ^AA, Terra VA, Augusto M, Sanches SC, Souza-Neto FP, Cecchini R, Gulin F, Ramalho FS. 2014. Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 74: 270-278.
 136. Liu Q, Lin X, Li H, Yuan J, Peng Y, Dong L, Dai S. Paeoniflorin ameliorates renal function in cyclophosphamide-induced mice via AMPK suppressed inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016 Dec 1; 84: 1899-905.
 137. Tavafi M, Ahmadvand H, TAMJIDIPOOR A. Rosmarinic acid ameliorates diabetic nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 275-283.
 138. Bancroft JD, Cook HC, Turner DR *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. 2nd. Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. 425-427.
 139. Demir R, Yilmazer S. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. 1-50.
 140. Bancroft JD, Layton C. The Hematoxylin and eosin. In: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, editors. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7 th. ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2011. 173-186.

141. Yağmurca M, Orhan BA, Şahin Ö, Nacar A, Yüksel Ş, Narci A. Ratlarda sisplatin ile indüklenmiş böbrek hasarına karşı melatonin ve ginkgo bilobanın koruyucu etkileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 2007; 8(2): 29-34.
142. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine. *Urological Research*. 2006 Feb 1; 34(1): 41-6.
143. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*. 1988 Mar 1; 34(3): 497-500.
144. Aebi HE. Catalase. In; Bergmeyer, HU *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III, Verlagchemie Gmbh. 1987. 273-285.
145. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*. 1978 May 1; 86(1): 271-8.
146. Kado R, McCune WJ. Ovarian protection with gonadotropin-releasing hormone agonists during cyclophosphamide therapy in systemic lupus erythematosus. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2020 Apr 1; 64: 97-106.
147. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2009 Nov; 6(11): 638.
148. Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F. Comparison of reduced glutathione with 2-mercaptoethane sulfonate to prevent cyclophosphamide-induced urotoxicity. *Cancer Letters*. 1986 Jul 1; 32(1): 1-6.
149. Schimmel KJ, Richel DJ, van den Brink RB, Guchelaar HJ. Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*. 2004 Apr 1; 30(2): 181-91.
150. McCarroll N, Keshava N, Cimino M, Chu M, Dearfield K, Keshava C, Kligerman A, Owen R, Protzel A, Putzrath R, Schoeny R. An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study: Cyclophosphamide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008 Mar;49(2):117-31.

151. Maccubbin AE, Caballes L, Riordan JM, Huang DH, Gurtoo HL. A cyclophosphamide/DNA phosphoester adduct formed in vitro and in vivo. *Cancer Research*. 1991 Feb 1; 51(3): 886-92.
152. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*. 2006 Jan 5; 217(1): 71-8.
153. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian Journal of Andrology*. 2002 Sep 1; 4(3): 201-8.
154. Ghosh D, Das UB, Ghosh S, Mallick M, Debnath J. Testicular gametogenic and steroidogenic activities in cyclophosphamide treated rat: a correlative study with testicular oxidative stress. *Drug and Chemical Toxicology*. 2002 Jan 1; 25(3): 281-92.
155. Manda KL, Bhatia AL. Prophylactic action of melatonin against cyclophosphamide-induced oxidative stress in mice. *Cell biology and Toxicology*. 2003 Nov 1; 19(6): 367-72.
156. Dabla PK. Renal function in diabetic nephropathy. *World Journal of Diabetes*. 2010 May 15; 1(2): 48.
157. El-Naggar SA, Alm-Eldeen AA, Germoush MO, El-Boray KF, Elgebaly HA. Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*. 2015 Feb 1; 53(2): 235-41.
158. Abraham P, Indirani K, Sugumar E. Effect of cyclophosphamide treatment on selected lysosomal enzymes in the kidney of rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2007 Oct 17; 59(2): 143-9.
159. Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R. Protective effects of selenium on cyclophosphamide-induced oxidative stress and kidney injury. *Biological Trace Element Research*. 2018 Sep 1; 185(1): 116-23.
160. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of The Turkish Nephrology*. 3-4: 92-95.

161. Adikwu E, Nelson EC, Yambozibe AS. Comparative protective assessments of some antioxidants against cyclophosphamide-induced kidney toxicity in albino rats. *Journal of Nephropharmacology*. 2019 Jan 13; 8(2): 22.
162. Sharma S, Sharma P, Kulurkar P, Singh D, Kumar D, Patial V. Iridoid glycosides fraction from *Picrorhiza kurroa* attenuates cyclophosphamide-induced renal toxicity and peripheral neuropathy via PPAR- γ mediated inhibition of inflammation and apoptosis. *Phytomedicine*. 2017 Dec 1; 36: 108-17.
163. Fouad AA, Abdel-Gaber SA, Abdelghany MI. Hesperidin opposes the negative impact of cyclophosphamide on mice kidneys. *Drug and Chemical Toxicology*. 2019 Mar 16: 1-6.
164. Mahipal P, Pawar RS. Nephroprotective effect of *Murraya koenigii* on cyclophosphamide induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pacific journal of Tropical Medicine*. 2017 Aug 1; 10(8): 808-12.
165. Saqib M, Khan BT, Gul M, Yaseen S, Zaidi SU, Shareef M. Restoration of renal glutathione levels and histoarchitecture by N-acetylcysteine post cyclophosphamide exposure in rats. *Pakistan Journal of Physiology*. 2019 Jun 30; 15(2): 33-7.
166. Goudarzi M, Khodayar MJ, Hosseini Tabatabaei SM, Ghaznavi H, Fatemi I, Mehrzadi S. Pretreatment with melatonin protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2017 Dec; 31(6): 625-35.
167. Cengiz M. Boric acid protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Mol. Biol. (Noisy le Grand)*. 2018; 64(12): 11-4.
168. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature Protocols*. 2010 Jan; 5(1): 51.
169. Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević-Orlić Ž, Škoda M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2014 Apr 1; 66: 321-8.

170. Tavafi M, Sameni HR, Tamjidipour A, Hasanvand A, Ashoory H. Antioxidant effect of rosmarinic acid against renal ischemia reperfusion injury in rat; a histopathological study. *Annals of Research in Antioxidants*. 2016 Jun 6; 1(2).
171. Bayomy NA, Elbakary RH, Ibrahim MA, Abdelaziz EZ. Effect of lycopene and rosmarinic acid on gentamicin induced renal cortical oxidative stress, apoptosis, and autophagy in adult male albino rat. *The Anatomical Record*. 2017 Jun; 300(6): 1137-49.
172. Muñoz-Muñoz JL, Garcia-Molina F, Ros E, Tudela J, García-Canovas F, Rodriguez-Lopez JN. Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid. *Journal of Food Biochemistry*. 2013 Aug; 37(4): 396-408.
173. Murakami K, Haneda M, Qiao S, Naruse M, Yoshino M. Prooxidant action of rosmarinic acid: transition metal-dependent generation of reactive oxygen species. *Toxicology In Vitro*. 2007 Jun 1; 21(4): 613-7.
174. Joardar S, Dewanjee S, Bhowmick S, Dua TK, Das S, Saha A, De Feo V. Rosmarinic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress, apoptosis, inflammation and fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019 Jan; 20(8): 2027.