



T.C.

ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**TİMOKİNONUN SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE İNDÜKLENEN
BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ**

Hatice İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN

2022

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TİMOKİNONUN SIÇANLARDA METOTREKSAT İLE İNDÜKLENEN
BÖBREK HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Hatice İLHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN

ERZİNCAN

2022

Bu tez Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından TYL-2021-774 proje numarası ile desteklenmiştir

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uygunluğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılamadığını, tezin herhangi bir kısmının başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Hatice İLHAN



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL SAYFASI	i
TEZ BEYANI	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Anatomisi Ve Fizyolojisi	3
2.2. Akut Böbrek Hasarı	6
2.3. Böbrek Fonksiyon Testleri	8
2.3.1. Kan Üre Azotu	8
2.3.2 Kreatinin	9
2.3.3. Böbrek Hasarı Molekül-1 (KIM-1)	11
2.3.4. Miyo-inositol oksijenaz (MIOX)	12
2.4. Glutatyon	13
2.5. Böbrek Toksisitesi	14
2.6. Metotreksat	15
2.6.1. Metotreksatın Etki Mekanizması	16
2.6.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri	18
2.6.3. Metotreksatın Endikasyonları	18
2.6.4. Metotreksatın Yan Etkileri	19
2.7. Oksidatif Stres	20
2.7.1. Serbest Radikaller	21
2.7.2. Antioksidanlar	23
2.8. Timokinon	25

2.8.1. Çörek Otu Tohumu ve Geleneksel Kullanımı	25
2.8.2. Timokinonun Fizikokimyasal Etkileri	26
2.8.3. Timokinonun Farmakolojik Etkileri	27
3.MATERYAL VE METOT	30
3.1. Deney Hayvanları	31
3.2. Grupların Oluşturulması Ve Uygulamalar	31
3.2.1. Deney Planı	31
3.2.2. Doku Homojenizasyonu	33
3.3. Kullanılan Aletler, Cihazlar Ve Kimyasal Maddeler	34
3.3.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar	34
3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.4. Biyokimyasal Analizler	36
3.4.1. Serum Üre Analizi	36
3.4.2. Serum Kreatinin Analizi	36
3.4.3. Serum ve Doku GSH Analizi	36
3.4.4. Serum ve Doku KIM-1 Analizi	37
3.4.5. Serum ve Doku MIOX Analizi	38
3.5. Histopatolojik Yöntem	39
3.6. İstatistiksel Analiz	39
4.BULGULAR	41
4.1. Biyokimyasal Bulgular	41
4.1.1. Serum Üre Ölçüm Bulguları	41
4.1.2. Serum Kreatinin Ölçüm Bulguları	42
4.1.3. GSH Ölçüm Bulguları	44
4.1.4. MIOX Ölçüm Bulguları	47
4.1.5. KIM-1 Ölçüm Bulguları	50
4.2. Histopatolojik Bulgular	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	62
EKLER	81
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde hiçbir zaman desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. T. Abdulkadir ÇOBAN'a,

Tez çalışmalarım süresince bana bilgileriyle katkıda bulunan ve yönlendiren değerli hocalarım Dr.Öğr. Üyesi Mehmet AKTAŞ'a, Doç. Dr. Cuma MERTOĞLU'na, Dr.Öğr. Üyesi Nezahat KURT'a, Dr.Öğr. Üyesi NERGİS AKBAŞ'a ve Dr.Öğr. Üyesi M. Taha HUYUT'a,

Tez sürecinde katkılarından dolayı Farmokoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Halis SÜLEYMAN'a, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Murat ÇANKAYA'ya, Cumhuriyet Üniversitesi Veterinerlik Patolojisi A.B.D. Öğr. Üyesi Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya,

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, çok değerli arkadaşım Tıbbi Biyokimya yüksek lisans öğrencisi Rabia YILMAZ'a,

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Oğuzhan İLHAN'a, oğullarım Yusuf Alper İLHAN ve Halil Türker İLHAN'a,

Tezin desteklenmesine katkı sunan Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine,

Teşekkürlerimi sunarım.

Hatice İLHAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	:Yüzde
°C	:Santigrad
ml	:Mililitre
dL	:Desilitre
µm	:Mikrometre
nm	:Nanometre
kg	:Kilogram
g	:Gram
mg	:Miligram
µg	:Mikrogram
ng	:Nanogram

Kısaltmalar

ABH	:Akut böbrek hasarı
BUN	:Kan üre azotu
GFH	:Glomerüler filtrasyon hızı
Cre	:Kreatinin
NGAL	:Nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin
GSH	:Glutatyon
KIM-1	:Böbrek hasarı molekülü-1
MIOX	:Miyo-inositol oksijenaz
KBH	:Kronik böbrek hasarı
ER	:Endoplazmik retikulum

MTX	:Metotreksat
DNA	:Deoksiribo nükleik asit
RNA	:Ribonükleik asit
ATP	:Adenozin tri fosfat
IL	:İnterlökin
DHFR	:Dihidrofolat redüktaz
THF	:Tetrahidrofolat
MPO	:Miyeloperoksidaz
MDA	:Malondialdehit
ROS	:Reaktif oksijen türleri
RSN	:Reaktif nitrojen türleri
NS	:Nigella sativa
TQ	:Timokinon
NK	:Doğal öldürücü
AUD	:Alkol kullanım bozuklukları
SOD	:Süperoksit dismutaz
CAT	:Katalaz
IL-6	:İnterlökin-6
TNF-α	:Tümör nekrozis faktör- alfa
AK	:Amikasin
ELISA	:Enzime bağlı immünosorbent testi
HRP	:Horseradish Peroksidaz
OD	:Optik dansite

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 2.1.	Reaktif oksijen türleri	23
Tablo 2.2.	Reaktif nitrojen türleri	23
Tablo 2.3.	Antioksidanların işlevleri	25
Tablo 2.4.	Antioksidan sistemleri	26
Tablo 3.1.	Deney planı	33
Tablo 4.1.	Sıçanların gruplarına göre serum üre değerleri	42
Tablo 4.2.	Sıçanların gruplarına göre serum kreatin değerleri	44
Tablo 4.3.	Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu GSH değerleri	45
Tablo 4.4.	Sıçanların gruplarına göre serum GSH değerleri	47
Tablo 4.5.	Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu MIOX değerleri	48
Tablo 4.6.	Sıçanların gruplarına göre serum MIOX değerleri	50
Tablo 4.7.	Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu KIM-1 değerleri	51
Tablo 4.8.	Sıçanların gruplarına göre serum KIM-1 değerleri	53
Tablo 4.9.	Sıçanlarda gruplara göre histopatoloji değerleri	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. İnsanda üriner sistem. İnsan böbreğinin kesiti	3
Şekil 2.2. İdrar oluşumu	5
Şekil. 2.3. Ürenin Kimyasal Formülü	9
Şekil.2.4. Kreatin sentezi	11
Şekil 2.5. Glutatyonun yapısı	14
Şekil 2.6. Glutatyon döngüsü	15
Şekil 2.7. Folik Asitin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.8. Metotreksatın kimyasal yapısı	16
Şekil 2.9. Dihidrofolatın molekül yapısı	17
Şekil 2.10. Folik asitin tetrahidrofolata (FH ₄)'e dönüşümü	18
Şekil 2.11. İlaça bağlı nefrotoksisite riskini artıran böbrek faktörleri.....	18
Şekil 2.12. Oksidatif stres	21
Şekil 2.13. Nigella sativa L. bitkisi ve tohumu	27
Şekil 2.14. Timokinon'un kimyasal yapısı	28
Şekil 2.15. Timokinonun biyotransformasyonu	29
Şekil 2.16. Timokinonun kansere karşı mekanizmaları	30
Şekil 4.1. Sıçanların gruplarına göre serum üre değerleri grafiği	43
Şekil 4.2. Sıçanların gruplarına göre serum kreatinin değerleri grafiği	44

Şekil 4.3. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu GSH değerleri grafiği.....	46
Şekil 4.4. Sıçanların gruplarına göre serum GSH değerleri grafiği	47
Şekil 4.5. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu MIOX değerleri grafiği.....	49
Şekil 4.6. Sıçanların gruplarına göre serum MIOX değerleri grafiği	50
Şekil 4.7. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu KIM-1 değerleri grafiği.....	52
Şekil 4.8. Sıçanların gruplarına göre serum KIM-1 değerleri grafiği	53
Şekil 4.9. Sıçanlarda gruplara göre histolojik görünüm	55
Şekil 4.10. Sıçanlarda gruplara göre histolojik görünüm	56

ÖZET

Timokinonun Sıçanlarda Metotreksat ile İndüklenen Böbrek Hasarı Üzerine Etkisinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi.

Giriş ve Amaç: Metotreksat hücre bölünmesini inhibe etmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılan antimetabolit kemoterapötiklerden biridir. Yüksek dozda kullanılan metotreksatın akut böbrek hasarına neden olduğu bilinmektedir. Timokinonun antioksidan antiinflamatuvar, ilaç yan etkilerini azaltıcı etkileri bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelinde güçlü bir antioksidan olan timokinonun etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Gruplar; I.Kontrol, II. MTX, III. MTX + TQ (20 mg/kg) ve IV. MTX + TQ (50 mg/kg) şeklindedir. Kontrol grubu sıçanlara 20 mg/kg gavaj yoluyla 5 gün boyunca tek doz mısır yağı verildi. II, III ve IV. gruba deneyin 2. günü tek doz 20 mg/kg i.p. olarak MTX verildi. III. Gruba 20 mg/kg ve IV. Gruba 50 mg/kg TQ 5 gün boyunca gavaj yoluyla verildi. Tüm hayvanlar 6. gün sonunda sakrifiye edilerek alınan böbrek dokusu ve kan örnekleri biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda ölçülen böbrek dokusunda KIM-1, MIOX ve serum örneklerinde üre, kreatinin, KIM-1 ve MIOX değerlerinde MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlendi ve bu artışın TQ kullanımına bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Böbrek dokusu ve serum GSH değerlerinde MTX grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken, TQ kullanımının GSH değerini arttırdığı gözlemlendi. Histopatolojik incelemelerde MTX grubuna ait böbrek dokularında oksidatif hasarın göstergesi olabilecek bulgular gözlemlendi. MTX ve kontrol grubu karşılaştırıldığında her iki grupta bu bulgular anlamlı ($p<0.05$) iken, TQ alan gruplarda bu histopatolojik değişikliklerin anlamlı ölçüde azaldığı görüldü.

Sonuç: Sıçanlarda metotreksatın oluşturduğu böbrek hasarına karşı timokinon kullanımının antioksidan ve diğer özellikleri ile koruyucu olarak bu hasarı önlediği saptandı. Buna bağlı olarak timokinonun kemotropik ilaçlarla birlikte kullanımı için klinik olarak daha ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akut Böbrek Hasarı, KIM-1, MIOX, Metotreksat, Timokinon.

ABSTRACT

Biochemical and Histopathological Investigation of the Effect of Thymoquinone on Methotrexate-Induced Kidney Injury in Rats.

Introduction and Aim: Methotrexate is one of the most widely used antimetabolite chemotherapeutics because it inhibits cell division. High doses of methotrexate are known to cause acute kidney injury. Antioxidant, anti-inflammatory and reducing effects of drug side effects of thymoquinone have been reported. The aim of this study is to biochemically and histopathologically investigate the effect of thymoquinone, a powerful antioxidant, in the acute kidney injury model induced by methotrexate in rats.

Materials and Methods: In our study, male Wistar albino rats were used. The rats were divided into 4 groups, 6 in each group. Groups; I. Control, II. MTX, III. MTX + TQ (20 mg/kg) and IV. It is MTX + TQ (50 mg/kg). A single dose of corn oil was given to rats in the control group by gavage at 20 mg/kg for 5 days. A single dose of 20 mg/kg i.p. as MTX was given to second, third and fourth group on the second day of the experiment. 20 mg/kg TQ was given to the third group and 50 mg/kg TQ was given to the fourth group by gavage for five days. All animals were sacrificed at the end of the 6th day, and kidney tissue and blood samples were examined biochemically and histopathologically.

Results: As a result of the biochemical analyses, it was observed that there was a significant increase in the urea, creatinine, KIM-1 and MIOX values in the KIM-1, MIOX and serum samples of the kidney tissue of the MTX group compared to the control group, and this increase decreased due to the use of TQ. While kidney tissue and serum GSH values decreased significantly in the MTX group compared to the control group, it was observed that the use of TQ increased the GSH value. Histopathological examinations revealed findings that may indicate oxidative damage in the kidney tissues of the MTX group. When the MTX and control groups were compared while these findings were significant ($p < 0.05$) in both groups, it was observed that these histopathological changes significantly reduced in the groups receiving TQ.

Conclusion: It was determined that the use of thymoquinone against kidney damage caused by methotrexate in rats prevented this damage with its antioxidant and other properties. Accordingly, clinically advanced studies are needed for the use of thymoquinone with chemotropic drugs.

Keywords: Acute Kidney Injury, KIM-1, MIOX, Methotrexate, Thymoquinone.

1. GİRİŞ

Metotreksat DNA sentezi için gerekli folik asiti antagonize eden ve tümör tedavilerinde kullanılan bir ajandır (1). Hücre döngüsünün S döneminde sitotoksik etki yaparak, hücre bölünmesini inhibe eder. Yapılan çalışmalar metotreksatın, antioksidan enzim sisteminin etkinliğini azaltarak, hücreleri reaktif oksijen radikalleri (ROS)'a karşı hassas duruma getirip hasara neden olduğunu göstermektedir (2). Metotreksat kullanımını takiben başta nefrotoksisite ve hepatoksisite olmak üzere birçok yan etki meydana gelmektedir. Bu ilacın nefrotoksisite ve hepatotoksisite yan etkisinde çoğunlukla ROS'un meydana getirdiği oksidatif stres hasarı sorumlu tutulmaktadır. Bu da ilacın ya kesilmesi ya da sınırlandırılması yönünde kullanımına sebep olmaktadır. (3).

Çörek otunda (*Nigella sativa* L.) bulunan, farmakolojik olarak en aktif bileşen olan timokinonun, içerik olarak diğer bileşenlerden daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği çok sayıda bulgularla desteklenmiştir (4). Yapılan çalışmaya göre ratlara cisplatinin tek doz olarak verilmesinden 5 gün önce ve 5 gün sonra verilen timokinonun serum üre ve kreatinin düzeylerinde önemli bir azalmaya ve kreatinin klirensi ve poliüride belirgin iyileşmeyi sağladığı böylece timokinonun nefrotoksiteyi iyileştirdiği belirlenmiştir (5). Ayrıca çeşitli deneysel patolojik koşullar altında timokinonun, süperoksit dismutaz (SOD)'un aktivitesini arttırdığı ve glutatyon (GSH)'ı indükleyerek hücrel oksidatif stresi azalttığı görülmüştür (6-7).

Böbrek hasar molekülü- 1 (KIM-1), yapılan çalışmalarda, iskemik sıçan böbreklerinde belirgin olarak artmış bir gen olarak tanımlanmıştır (8). Sabbisetti ve ark. yaptığı çalışmada ratlarda iskemik böbrek hasarı oluşturularak plazma ve idrar

KIM-1 düzeyleri ölçülmüş, 3. saatte KIM-1'in plazma düzeylerinde anlamlı olarak arttığı ve 96. saate kadar yüksek kaldığı görülmüştür. Böbrek hasarı olan bireylerde plazma KIM-1 düzeyinin idrar KIM-1 düzeyi ile korele olduğu, sağlıklı bireylerle kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (9).

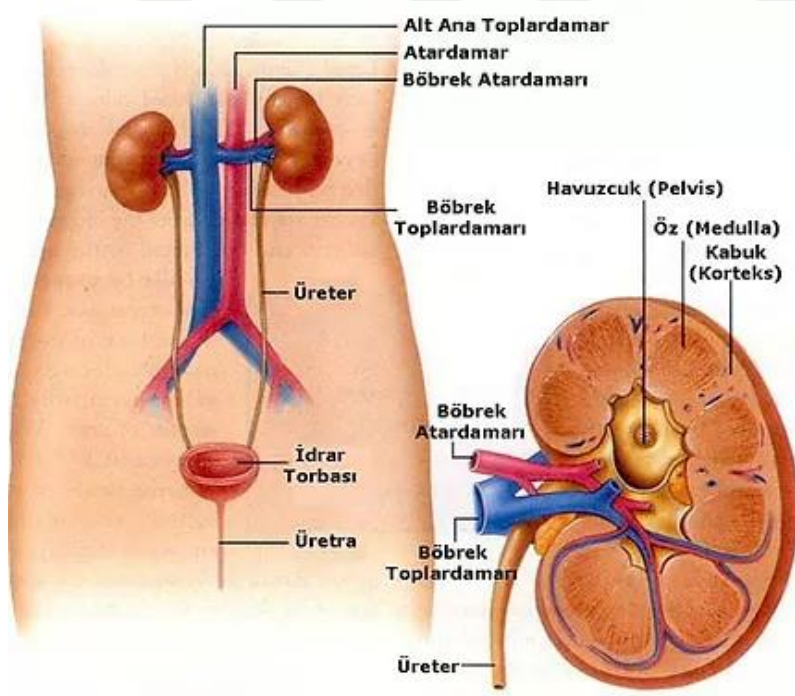
Böbrek proksimal tübüllerden salınan Miyo-inositol oksijenaz (MIOX) molekülünün Gaut ve ark. yaptıkları deneysel çalışmalarda böbrek hasarı açısından belirteç olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (10). Benzer bir çalışmada bunu desteklemiştir. Buna göre MIOX molekülünün akut böbrek hasarını göstermekte tanısal duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla % 53.8 ve % 81.5 olduğu açıklanmıştır. Buna göre MIOX molekülünün akut böbrek hasarında belirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (11).

Bu tezin amacı ratlarda metotreksat ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelinde antioksidan bir molekül olan timokinonun etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmasıdır. Çalışmamızda, literatür bilgilerine dayanılarak metotreksatın böbrek hasarını oksidatif hasar ile oluşturduğu ve timokinon kullanımının ise bu hasarı antioksidan özelliği ile giderebileceği öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Anatomisi Ve Fizyolojisi

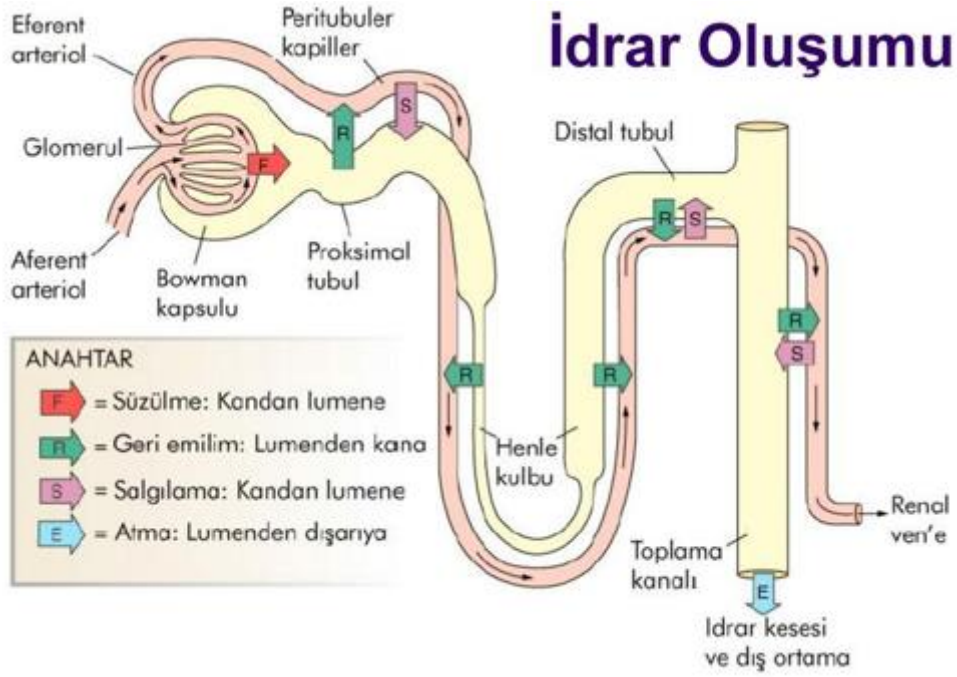
Böbrekler, retroperitoneal bölgede bulunan karın arka duvarına yaslanmış olup kolumna vertebralisin iki yanında ve psoas kasının lateralinde yerleşen büyük kuru fasulye şeklinde kahverengi görünümde olan organlardır '(Şekil 2.1.) (12).' Sağ böbrek, üst komşuluğunda bulunan karaciğer nedeniyle 12mm biraz daha aşağı yerleşimlidir (13,14). Böbrekler bazı durumlarda bir miktar hareket edebilir ve yer değiştirebilirler. Capsula fibrosa denilen sağlam yapılı bir kapsül ile kuşatılmıştır. Böbreğin yetişkin bir insandaki boyutları kişinin vücut yüzey alanıyla değişebilmektedir ve her biri yaklaşık olarak 4.5 inç (11 cm) uzunluğunda, 2.5 inç (6 cm) genişliğinde ve 1.5 inç (4 cm) kalınlığındadır (14).



Şekil 2.1. İnsanda üriner sistem. İnsan böbreğinin kesiti

Böbreklerin çalışan yapıları nefronlar ve nefronların döküldüğü toplayıcı tübülüslerdir. Her böbrek yaklaşık bir milyon nefron içerir. Nefron glomerül, proksimal tübülüs, distal tübülüs, henle kulpu, kollektor kanallardan meydana gelmektedir. Kan glomerulusa aferent arteriol ile gelir ve eferent arteriol ile de ayrılmaktadır. Glomerulusta kapiller ağ Bowman kapsülü ile çevrelenmiştir. Kanın filtrasyonu glomerulusta olur. Sağlıklı bir insanda glomerulusta oluşan filtratta su, suda çözünen maddeler plazmada bulunan diğer küçük moleküller bulunur. Plazma proteinlerin filtrata geçememesinin nedeni glomeruler kapiller duvarın plazma proteinlerinin geçişini önleyen bir bariyer oluşturmaktır. Böbrek hasarı durumunda glomeruler membran yapısı bozulur. Bunun sonucunda filtrata ve idrara protein ve hücreler geçer. Filtrasyon, kandaki su ve solütlerin glomerüler kılcal damardan terk edip Bowman kapsülüne süzülmesidir. Salgılama, glomerulustan Bowman kapsülüne geçemeyen maddelerin nefronun duvarlarını oluşturan epitel hücrelerin sitozollerinden tübüler lümene doğru aktif taşıma ile olan hareketidir. Salgılama çoğunlukla distal tüpte olmakla birlikte proksimal tüpte de bir miktar olur. Geri emilim, Bowman kapsülüne geçen süzüntünün nefron kanalcıklarında ilerlerken burada bulunan yararlı maddelerin epitel hücre tabakasını geçerek çevreleyen interstisyuma doğru hareketidir. Geri emilen maddeler interstisyumdan çevredeki kan damarlarına doğru ilerleyerek tekrar dolaşıma katılır. Geri emilim kanaldan uzaklaşma ve sonrasında kana geçişten oluşan iki basamaklı bir olaydır. Atılım, böbrekler tarafından üretilen maddelerin vücuttan dışarı atılmasıdır '(Şekil 2.2.) (15).' Herhangi bir maddenin böbrekte tutulumu yukarıda belirtilen olayların bazı birleşimlerinden oluşur. Herhangi bir maddenin vücuttaki miktarı normalin üzerinde veya altında ise filtrasyon, geri emilim ve atılım hızları değişir, bu mekanizmalar ile atılım ayarlanır böylece vücutta denge

korunur. Hormonal ve nötral sinyaller ve böbrek içi kimyasal mesaj ileticileri vücudun ihtiyaçlarına göre temel böbrek işlevlerini ayarlarlar (16,17).



- Glomerular filtrasyon → Tubüler reabsorbsiyon
- Tubüler sekresyon → Ekskresyon

Şekil 2.2. İdrar oluşumu

Böbrekler kanda bulunan metabolik atıkların ve yabancı maddelerin atılmasının yanı sıra böbrekler vücudun su-elektrolit ve kan asit-baz dengesinin ayrıca glutamik asitten glutamin üreterek hidrojen iyon homeostazisinin oluşmasını sağlar. Ayrıca kan basıncını düzenleyen renin, alyuvar üretiminde görev alan eritropoetin ve vitamin D'nin en aktif formu olan 1.25-dihidroksi vitamin D₃ hormonları gibi hormon ve plastoglandinlerin salgılanmasını sağlayan çok önemli fonksiyonları olan, karmaşık yapılı bir organdır (16,18).

2.2. Akut Böbrek Hasarı

Akut böbrek hasarı (ABH), böbreğin hasar görmesi sonucu vücudun sıvı ve elektrolit dengesini bozacak ve azotlu atıkların (üre) vücuttan atılmasını engelleyecek kadar böbrek fonksiyonlarının aniden kaybı olayıdır. Bu durumda idrar atımı başarısızlıkla sonuçlanır ve buna bağlı olarak serum kreatinin miktarı ve kan üre azotu (BUN) da artar. Yetişkin bir insanda günlük idrar miktarı en az 400 mL olmalıdır. Ayrıca, ABH günlük idrar miktarının aniden 400 ml'nin altına düşmesi ve kandaki üre miktarı ile serum kreatinin artması, böbreğin glomerüler filtrasyon hızındaki (GFH) ani düşme, olarak da tanımlanır (19). GFH'deki düşüş, kronik böbrek yetmezliğinde aylar hatta yıllar içerisinde gerçekleşmekte, ABH'de ise günler ile haftalar içerisinde gelişmektedir (20).

Genel olarak ABH nedenleri 3 başlık altında incelenebilir;

1. Pre-renal akut böbrek hasarı: ABH'nin yaklaşık % 60-70'ini oluşturan pre-renal faktörler, böbreğin yeterince kanlanması engelleyip filtrasyon hasarına sebep olarak pre-renal akut hasarına neden olmaktadır. Pre-renal faktörlerin oluşturduğu ABH'de, aferent arteriyoller daralma-genişleme, glomerüler hidrostatik basıncın düşmesi, renal perfüzyon basıncının düşmesine bağlı kanamalar, kusmalar, akut pankreatit, yanıklar, peritonit, glukozüri, kardiyovasküler yetersizlik, hipotansiyon, sepsisler, kanın pompalama gücünde yetersizlik gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir.

2. Renal akut böbrek hasarı: Böbrek dokusunun çeşitli böbrek hastalıkları veya nefrotoksik nedenlerle hasarlanmasıdır. Bu hasara neden olan faktörler arasında glomerulonefrit, nefrotoksinler, anestezikler, küçük ve büyük damarların iltihaplanması, ağır metaller, antibiyotikler, travma ateroskleroz bulunmaktadır.

3. Postrenal akut böbrek hasarı: Böbrekte proteinlerin veya çözilemeyen kristal maddelerin tübüllerde çökmesi, intratübüler iyon hızının düşmesine sebep olmaktadır. Bundan dolayı renal pelvis, üreter ve üretrada oluşan tıkanmalar post-renal ABH'na sebep olur. Postrenal akut böbrek hasarı nedenleri arasında; üretra tıkanması, prostat hipertrofisi, üretra ağzının tıkanmasına sebep olan mesane tümörü, bilateral böbrek ve üreter taşlarını sayabiliriz (19).

ABH hastanede yatan hastaların %5'inde, yoğun bakım hastalarının ise %30-50'sinde görülebilmekte ve ABH oluşan yoğun bakım hastalarının mortalitesi oluşmayan hastalara göre 5 kat daha fazladır. Bundan dolayı ABH'nın erken evrede teşhisi çok önemlidir (21). ABH tanısında zorluk yaşanan noktalardan biri artmış serum kreatinin ya da kan üre azot değerinin böbrek hasarının kronik ya da akut olup olmadığı konusunda bilgi vermemesidir. Böyle durumda yapılması gereken hastanın daha önceki kayıtlarının gözden geçirilmesidir. Önceki kayıtların bulunmaması halinde ise akut ve kronik böbrek hasarını belirleyen bazı kriterlere bakılması uygundur. Serum kalsiyum, fosfor düzeyleri, hemogram, idrar sedimetisi gibi. ABH tanısında en önemli faktörlerden biri böbreğin GFH düşmeden önce böbrekte meydana gelen hasarın belirlenebilmesidir. Bundan dolayı erken hasar belirteçleri adı verilen biyobelirteçler kullanılmaktadır (22). Bunlardan idrar ve plazmada bulunanlardan bazıları nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL), KIM-1, İnterlökin-6 (IL-6), IL-18, karaciğer - yağ asiti bağlayıcı protein (L-FABP), Sistatin-C, N-asetil- β -glukozaminidaz (NAG) ve α/π glutatyon S transferaz (GST). Son zamanlarda, doku metalloproteinaz inhibitörü-2 (TIMP-2) ve idrar insülin benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini-7 (IGFBP-7) de ön plana çıkan hücre döngü proteinleridir (23). Özellikle NGAL düzeyleri böbrek hasarının oluşumundan 2 saat sonra, IL-18 düzeyi

ise 12 saat sonra idrarda artar ve ABH'nın erken tespit edilmesini sağlar (24,25). Bu biyobelirteçlerden serum Sistatin C 13-kD büyüklüğünde endojen sistein proteinazı “housekeeping” bir proteindir. Sistatin C'ye dayalı bulgular, serum kreatininin düzeyinde oluşan değişikliklerin monitarizasyonu ile karşılaştırıldığında 1-2 gün daha önce ABH oluşum riskinin belirlenmesini sağlamaktadır (26,27).

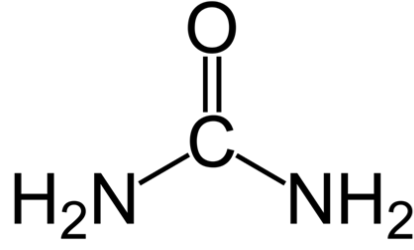
Elbette bu biyobelirteçlerin bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar yeterli validasyonların yapılmamış olması, standardize edilmiş analizlerin bulunmaması, farklı ABH için biyobelirteçlerin özelleştirilememiş olması, tek merkezde, küçük hasta gruplarında ve daha çok dondurulan örneklerde çalışılmasıdır. Bu biyobelirteçlerle ilgili yapılan çalışmalar devam etmekte böylece ABH tanısı için gelecek vaat etmektedir (22,28).

2.3. Böbrek Fonksiyon Testleri

Çağımızda teknolojinin gelişmesi ile birlikte tıp alanında da birçok test ve tanı aracı gelişmiştir. Bu yeni araçlar yardımıyla hekimler karmaşık tıbbi sorunlardan kesin tanıya ulaşabilmektedir. Böbrek fonksiyon testleri böbrek hastalığının şiddetini değerlendirme ve ilerlemesini izleme açısından yararlıdır. Böylece hekimlerin tedavi etkinlikleri artmaktadır (29). Böbrek hastalıklarının teşhisinde kullanılan belirteçlerden bazıları; üre, kreatin, KIM-1, MIOX değerleridir.

2.3.1. Kan Üre Azotu

Kandaki üre, kan üre azotu (BUN) olarak adlandırılır. Üre karaciğerdeki protein katabolizmasının son ürünü olan 60 dalton ağırlığında bir moleküldür ‘(Şekil 2.3.) (30).’



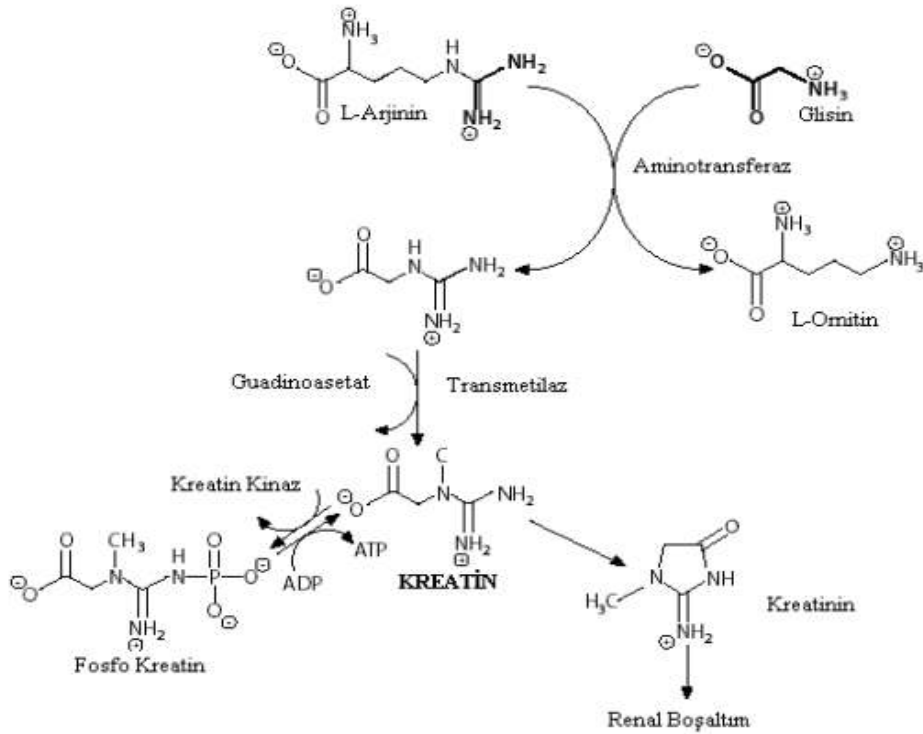
Şekil 2.3. Ürenin Kimyasal Formülü

Üre, glomerüllerden serbestçe filtre olur, proksimal ve distal tübülde pasif geri emilime uğrar. Atılımı temel olarak böbrekler tarafından yapılır ve serum düzeyi GFH için ana değerlerden biridir. Kullanımını kısıtlayan iki ana faktör; üre yapım hızının ve tübüler emilim oranının GFH'dan bağımsız değişkenliğidir. Protein sindirimi sonucu olduğundan BUN; aşırı protein ile beslenme, gastrointestinal kanama sonrası artarken aksine enfeksiyon, malnütrisyon, malignite gibi katabolik durum veya karaciğer hastalığında azalır. Serum değeri değişkenlik gösterir. Yüksek protein içeren beslenme sonrasında artmaktadır. Proksimal tübülde geri emilerek elde edilen üre filtre edilen ürenin yaklaşık %40–50' sini oluşturur. Bundan dolayı sodyum ve suyun böbrekte geri emilimini arttıran her türlü uyarı BUN'u arttıracaktır. Bu durum da serum kreatinin ve GFH'de fazla bir değişiklik olmadan üre arttığından dolayı bu durum üre/kreatinin oranının artması ile tanısız olarak desteklenen böbrek perfüzyon defektinin belirtisidir (31).

2.3.2 Kreatinin

Kreatin arginin, glisin ve metiyonin amino asitlerinden oluşan vücudun bütün hücrelerinde bulunan böbrek, karaciğer, beyin ve pankreasta üretilen doğal bir moleküldür '(Şekil 2.4.) (32).' Et ve balık yiyen kişilerde diyet yoluyla da vücuda kreatin alınır (33,34). Moleküler ağırlığı 113 dalton olan kreatin, kasların öncelikle

kullandığı metabolik yakıttır. Kaslar kreatin fosfat içerirler. Kreatinin (Cre), kas hücrelerinde kreatin molekülünün parçalanmasıyla oluşan biyolojik bir atık üründür (Şekil 2.4.). Kan yoluyla böbreklere taşınır ve idrarla vücuttan atılır. Serum Cre seviyeleri kas hastalığı yokluğunda böbrek fonksiyonlarının bir göstergesi olarak kullanılabilir. Serum kreatinin, glomerüllerden filtre edilir ve tübüllerden reabsorbsiyonu yoktur, klirensi GFH ile ters orantılıdır. Bu sebeple üretimi ve metabolizması gözönüne alındığında serum kreatinin klirensi GFH'nin yararlı bir göstergesidir. Her gün kas kreatinin % 20 kadarı dehidrate olup dolaşıma girer ve kreatinin atık ürününü oluşturur. Bu sebeple Cre düzeyleri kas kütlesine göre değişebilir ve kas kütlesinde değişiklik oluncaya kadar yaklaşık olarak aynı düzeyde kalır. GFH'si normal erkeklerde serum Cre klirensinin üst sınırı 1.2 mg/dL (110 $\mu\text{mol/L}$), kadınlarda 1 mg/dL (90 $\mu\text{mol/L}$)'dir (35).



Şekil.2.4. Kreatinin sentezi

Serum kreatinin değerleri akut böbrek hasarında kullanılan yaygın biyobelirteçlerden biridir. Fakat plazma kreatinini, hasardan günler sonrasına kadar ve böbrek fonksiyonunun % 50'si kayboluncaya kadar artmayabilir. Bu da akut böbrek hasarına erken dönemde müdahalesini geciktirmektedir. Bundan dolayı kreatinin artışı ABH'nın gecikmiş ve güvenilmez bir göstergesidir (36). Plazma kreatinini GFH'nı doğru olarak belirleyememektedir. En önemli kısıtlama, glomerüler filtrasyon hızındaki reel azalmadan sonra olan gecikmiş serum kreatinin yükselmesidir (37). Ayrıca plazma kreatinini; ilaç kullanımı, kas kitlesi, hidrasyon durumu, karaciğer fonksiyonları, yaşı, cinsiyet, protein alımı gibi faktörlerden etkilenmektedir. ABH'nın erken tanısı için kreatinden daha güvenilir biyobelirteçlerin kullanılması gerekmektedir (22).

2.3.3 Böbrek Hasarı Molekül-1 (KIM-1)

KIM-1, akut ve kronik böbrek hasarında proksimal tübüler epitelde en yüksek oranda yukarı regüle edilen apoptotik hücreleri tanıyan ve onları lizozoma yönlendiren fosfatidil serin p reseptörüdür (38).

Çeşitli böbrek hastalıklarının teşitisi için geleneksel kan ve idrar belirteçleri duyarsızdır ve spesifik değildir. KIM-1, bir immünoglobulin ve msin alanına sahip bir tip 1 transmembran proteinidir ve ekspresyonu normal proksimal tübül hücrelerinde ölçülemez fakat iskemik sonrası sıçan böbreğinde proksimal tübülde belirgin şekilde yukarı regüle edilir. KIM-1 ektodomain hücrelerden dökülür (39). KIM-1, idrarda böbrek hasarı belirteci olarak kullanılmakla beraber, böbrek hasarını tespit etmek için KIM-1'in kanda da saptanabileceği belirtilmiştir (40).

KIM-1'in sıçanlarda böbrek hasarının olağanüstü bir göstergesi olduğu kanıtlanmıştır. Birçok toksik maddeye veya patofizyolojik duruma yanıt olarak proksimal tübüldeki histopatolojik değişikliklerin öngörücüleri olarak BUN ve serum kreatinininden daha üstündür. İnsanlarda yapılan alışmalar, KIM-1'in ektodomaninin

doku ekspresyonunun ve idrarla atılımının, sonucun tahmin edicileri kadar hassas ve spesifik yaralanma belirteçleri olduğunu göstermektedir (41).

2.3.4 Miyo-inositol oksijenaz (MIOX)

MIOX, miyo-inositol (MI)'un d-glukuronik aside oksidatif dönüşümünü katalize eden 33-kDa hema içermeyen bir demir proteinidir (42). Miyo-inositol oksijenaz enzimi, miyo-inositolü glukuronik aside katalize eder. Bir proksimal tübüler enzim olan miyo-inositol oksijenazın aşırı ekspresyonu, akut böbrek hasarı hücresel redoks hasarını şiddetlendirir (43).

Muhtemelen, MIOX, mitokondriyal dinamikleri bozan ve sürdürülürse nihayetinde kronik böbrek hastalığı (KBH)'na neden olan metabolik sensörlerin ekspresyonunu/aktivitesini azaltarak böbrek hasarını vurgular (44).

MIOX'un akut tübüler yaralanmadaki yukarı regülasyonuna oksidan ve ER stresinin aracılık ettiğini göstermektedir (45).

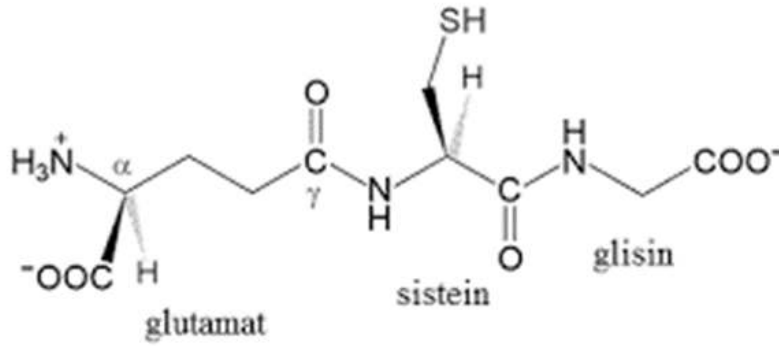
Ferroptoz, lipid hidroperoksidasyonu ile ilişkilendirilen yeni bir terimdir ve ABH'nın patogenezinde kritik bir rol oynamaktadır. Sisplatin kaynaklı ABH patogenezinde ayrılmaz bir süreç olan ferroptozun, MIOX'un ekspresyon profili tarafından düzenlendiğini göstermektedir (46).

MIOX geni, 22q13.3 bandında 22. kromozomun üzerinde bulunan ve 858 nükleotidinli bir DNA kodlama sekansından (CDS) oluşur. Gaut ve ark. MIOX'un proksimal renal tübüllere özgüllüğünü Western blot tekniği kullanılarak doğrulamış ve ilk kez bu enzimin bir marker olarak ABH erken teşhisi için kullanılabileceğini belirtmişlerdir (47,48). Serum kreatinin düzeyindeki yükselmeden plazma MIOX'un yükselmesi yaklaşık 2 gün önce oluşmaktadır ve bundan dolayı ABH için potansiyel bir erken tanı işareti olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır (49).

2.4. Glutasyon

Düşük moleküler ağırlıklı tiyol içeren bileşikler, oksitlenmelerinin kolay olması ve yeniden oluşturulabilmelerinin hızı nedeniyle birçok biyokimyasal ve farmakolojik reaksiyonda önemli bir role sahiptir (50).

Glutasyon (GSH), çok küçük molekül ağırlığına sahip bir tiyol bileşiğidir (51). Glisin, glutamat ve sisteinden türemiştir '(52) (Şekil 2.5.) (53).'

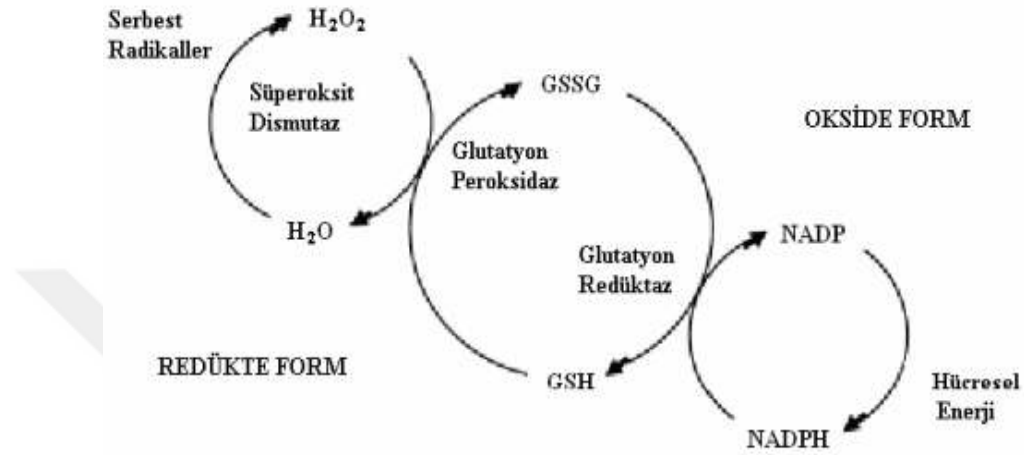


Şekil 2.5. Glutasyonun yapısı

GSH; detoksifikasyon, antioksidan savunma, tiyol durumunun korunması ve hücre proliferasyonunun modülasyonunu içeren çeşitli fonksiyonlara sahip her yerde bulunan bir hücre içi tripeptittir. GSH, tüm memeli hücrelerinin sitozolünde sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir şekilde sentezlenir. GSH sentezinin düzensizliğinin, birçok patolojik durumun patogeneze katkıda bulunduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir (54).

Redükte GSH antioksidan özelliği olan formdur. Serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırarak kendisi yükseltgenir ve okside forma dönüşür (GSSG). GSSG; glutasyonun antioksidan özelliğini yitirmiş formudur. Okside glutasyon kendini yenileyerek tekrar redükte forma dönüşebilir. Redoks döngüsü dediğimiz bu döngünün

ölçümü yani GSH/GSSG oranı ölçümü hücrenin savunma ve yenilenme kapasitesini yansıtan çok iyi bir göstergedir. Glutasyon redüktaz enzimi indirgenmiş yükseltgenmiş GSH oranını korur ‘(Şekil 2.6.) (52).’



Şekil 2.6. Glutasyon döngüsü

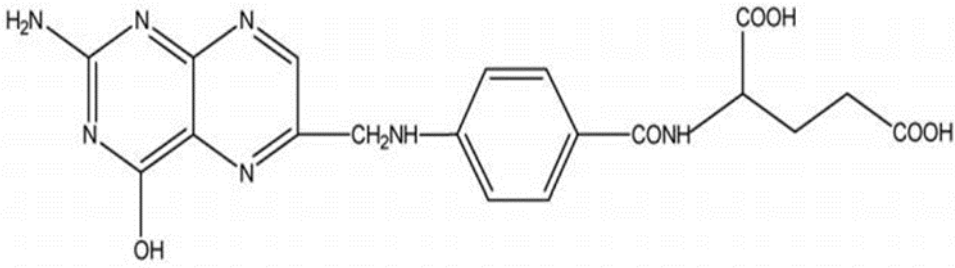
2.5. Böbrek Toksisitesi

Böbrekler hem fonksiyonları hem de fizyolojisi nedeniyle toksik riski en fazla olan organlardan biridir. Nefrotoksisite böbrekte toksik kimyasal maddeler ve ilaçların neden olduğu zehirli etki olarak tanımlanır (55). Kanser ilaçlarının çeşitine ve miktarına bağlı olarak serum kreatinin değerlerinin hafif artmasından ileri derece böbrek yetmezliğine kadar böbrek hasarı ciddi boyutta oluşabilmektedir (56).

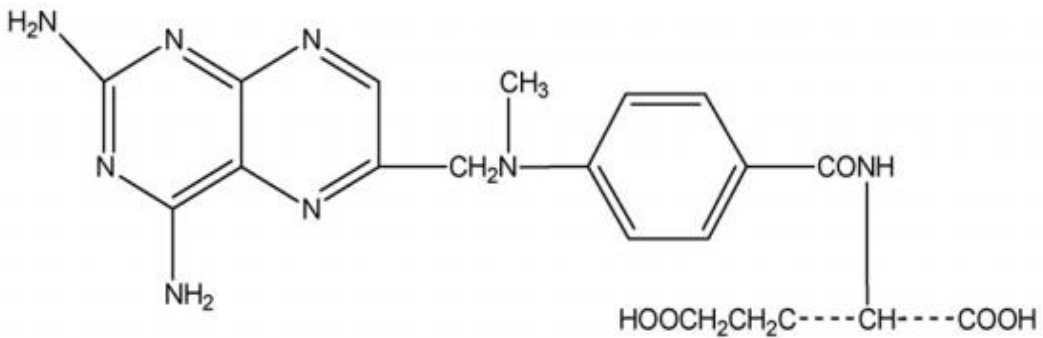
Kanser ilaçları vücutta patolojik olarak çoğalan kanser hücrelerini öldürür aynı zamanda hızla çoğalan normal hücreleri de öldürürler. Bundan dolayı çoğu kanser ilacının hızlı çoğalan hücreler, kan hücreleri ve kemik iliği üzerine de yan etkileri bulunmaktadır. Böbrek hücrelerinin bölünme hızı yüksek değildir fakat toksinleri konsantre etme özelliği ve çok özel taşıyıcılara sahip olması ayrıca kan akımının yüksek olması nedeniyle böbreğin toksik zedelenmeye duyarlılığı yüksektir (57).

2.6. Metotreksat

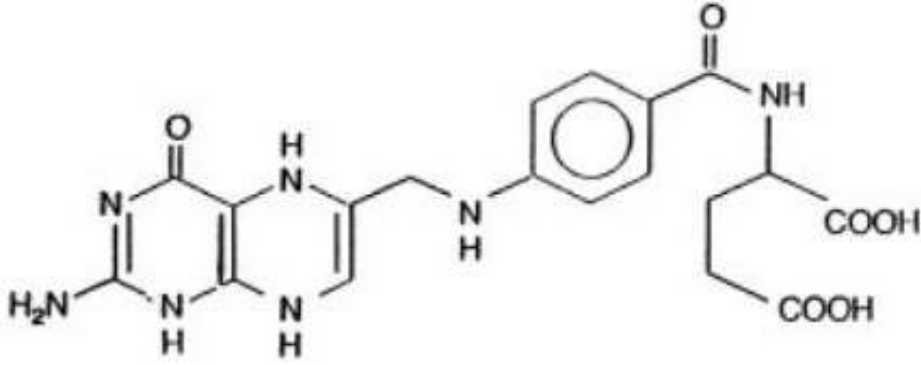
Bir folik asit “(Şekil 2.7.) (58).” antogonisti olan metotreksat “(Şekil 2.8.) (58).” kemoterapik tedavilerde yaygın olarak kullanılan başlıca antimetabolitlerden olup; dihidrofolik asit “(Şekil 2.9.) (59)”analoğudur (60). İlk kez çocuk lösemisi tedavisinde 1948 yılında kullanılmıştır (61).



Şekil 2.7. Folik Asitin Kimyasal Yapısı



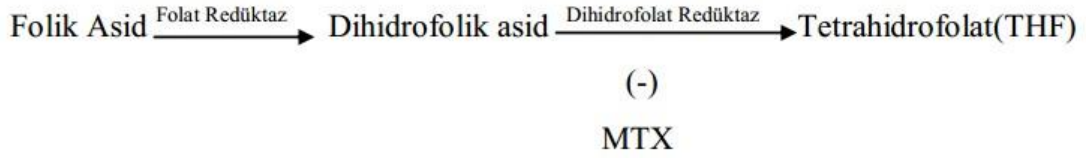
Şekil 2.8. Metotreksatın Kimyasal Yapısı



Şekil 2.9. Dihidrofolatın molekül yapısı

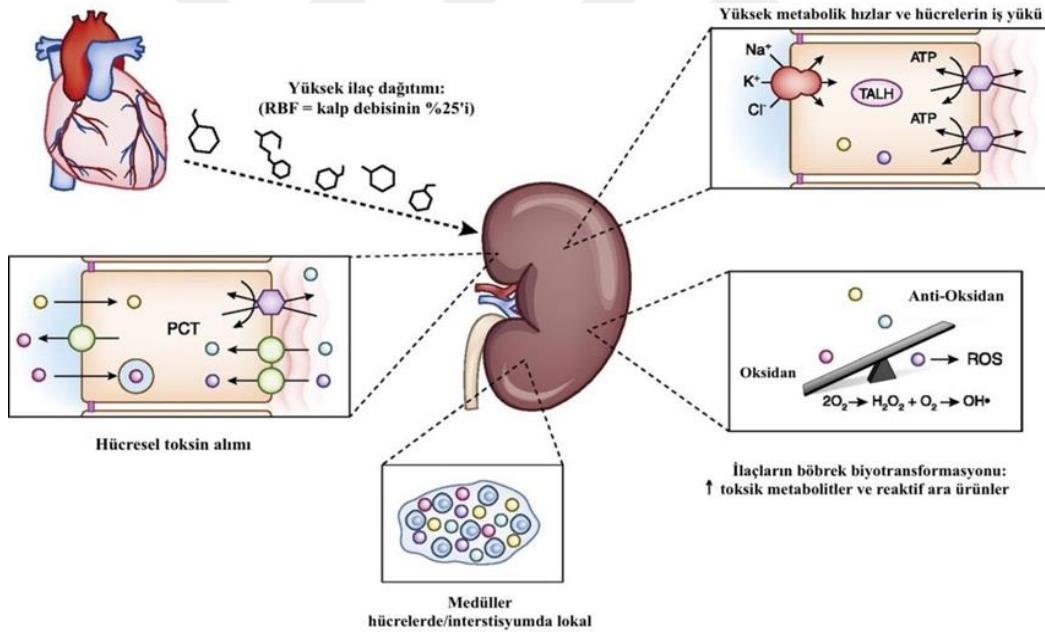
2.6.1. Metotreksatın Etki Mekanizması

Bir folik asit analogu olan metotreksat (MTX) dihidrofolat redüktaza bağlanarak “(Şekil 2.10.) (58).” enzimi geri dönüşlü bir şekilde inhibe ederek timidilat, purin sentezini ve hücre proliferasyonu azaltır. Bu maddelerin azalması nedeniyle DNA, RNA ve ATP yapımı inhibe olur (62). Aynı zamanda 5-aminoimidazole4-karboksiamide ribonükleotide transformilaz gibi folat bağımlı diğer enzimleride baskılayarak adenozin birikimi ile lenfosit proliferasyonu, IL-1, interferon- γ ve tümör nekrozu faktörü- α (TNF- α) gibi enflamatuvar sitokinlerin sekresyonu, polimorfonükleer hücrelerden serbest radikal oluşumu, bu hücrelerin nötrofil kemotaksisini ve adezyonunu inhibe ederek anti-enflamatuvar etkiye neden olur. Ayrıca IL-22 düzeylerini düşürerek keratinosit proliferasyonu ve dermal enflamatuvar infiltrasyonu inhibe eder. Doku hasarına sebep olan poliaminlerin (spermin ve spermidin) inhibisyonu da anti-enflamatuvar nedenden sorumlu olan başka bir işleyiştir (63).



Şekil 2.10. Folik asitin tetrahidrofolata (FH₄)’e dönüşümü

MTX’in böbrek toksikasyonunun mekanizması; ilacın direk toksikasyonu, nötrofil infiltrasyonu, DNA sentezi aksaklığının getirdiği enzim inhibisyonları, ve oksidatif strestir “(Şekil 2.11.) (64).” Nötrofillerin kümeleşmesi ve aynı zamanda aktifleşmesi miyeloperoksidaz (MPO) ve serbest radikallerin oluşumunu sağlamaktadır (65).



Şekil.2.11. İlaça bağlı nefrotoksisite riskini artıran böbrek faktörleri

Ratlarla yapılan çalışmalarda intraperitoneal (i.p) MTX uygulaması sonucu malondialdehid (MDA), MPO artışı ile birlikte GSH düzeyinde azalma ve oksidatif stres ile ilgili anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (66). Ayrıca, MTX’in sebep olduğu böbrek hasarının, adenozin plazma konsantrasyonunun indüklenmesi ve ardından

böbrek parankimindeki A1 reseptörlerinin aktivasyonu ile böbrek kan akışını azaltarak ve bundan dolayı böbrek fonksiyonunu azaltarak olabileceği öngörülmüştür (67).

2.6.2. Metotreksatın Farmakokinetik Özellikleri

Metotreksat oral, intramuskuler, intravenöz veya subkutan yolla kullanılır. Hastaların birçoğu tarafından oral kullanım alımı kolay olduğu için tercih edilir. MTX gastrointestinal sistemden emilimi hızlı olur. Oral ve parenteral kullanımın biyoyararlılığı eşdeğerdir. Gastrointestinal sistemde intolerans oluştuğunda ya da tedaviye uyum sağlanamadığında kolay tolere edilebilen parenteral uygulamaya geçilir. Oral alımdan 45 dakika 2 saat sonra maksimum kan seviyesine ulaşır. Serum yarılanma ömrü 6-8 saattir. Dolaşımında albümine bağlanarak ilk 12 saat içinde % 65-80 oranında idrarla atılır. MTX eritrosit ve hepatositlerde birikir. Klinik etki 2-3 haftada başlayarak, 8. haftada maksimum değere ulaşır (68,69).

MTX ile birçok ilaç etkileşime girebilir. Böylece yapısı, emilimi ve vücuttan uzaklaştırılması etkilenmektedir. Antifolat ajanlardan olan trimetoprim-sulfametoksazol ile kullanımı aşırı folat yetersizliğine, salisilatlarla kullanımı ise kan serumundaki serbest ilaç oranını artırdığından dolayı toksik etkilerde yükselmeye sebep olabilmektedir. Ayrıca non-steroid antiinflamatuvar ilaçlarla birlikte alındığında böbreklerle atılımının etkilendiği doğrultuda çelişkili yayınlar mevcuttur, fakat renal fonksiyonları iyi olan hastalarda rahatlıkla kombine edilebilmektedir (70,71).

2.6.3. Metotreksatın Endikasyonları

Metotreksat, otoimmün hastalıklar, kemoterapi ve immünosupresanda en sık kullanılan bir anti-metabolittir (72). Lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri gibi kanser tiplerinde kemoterapötik ajan

olarak kullanıldığı gibi psöriasis, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıklarda da kullanımı yaygındır (73) .

2.6.4. Metotreksatın Yan Etkileri

MTX'in hepatoksisite, nefrotoksisite, kemik iliği süpresyonu, pulmoner değişiklikler, enfeksiyon lenfoproliferatif hastalıklar ciddi yan etkiler olup en sık görülen yan etkiler ise gastrointestinal sistem bozuklukları, ateş, karaciğer fonksiyonlarında bozukluk, santral sinir sistemi bozuklukları, ağızda yara, ekstremitelerde döküntü, saçkıran, hemotolojik değişiklikler sayılabilir. MTX'in kullanımında ciddi yan etkilerden olan hepatik ve renal toksik etki MTX kullanımını kısıtlamaktadır. Çalışmalar sonucunda, ilacın başta hepatotoksisite ve nefrotoksisite olmak üzere gelişen yan etkilerinde, çoğunlukla ROS'un meydana getirdiği oksidatif hasarın sebep olduğu belirtilmiştir. Ratlarla yapılan çalışmalarda MTX verilmesinin; kan, karaciğer, böbrek ve ince barsakta glutatyon değerlerini azalttığı, inflamatuvar yanıtın göstergesi olan myeloperoksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA, serum üre ve kreatinin değerlerinde artışa ve hematüriye sebep olmaktadır (74-76,79). Yüksek doz MTX kullanımının ABH'ne sebep olduğu bilinmektedir (77). Metotreksat, böbrek ile vücuttan uzaklaştırılır ve uygulanan dozun % 60-90'ı değişmeden idrarla atılır (78).

Düşük dozlarda (0.5-1 gr/m²) MTX'e bağlı renal toksisite görülmez. Yüksek doz (1-15gr/m²) tedavide ise; Uygunsuz anti diüretik hormon (ADH) sendromu, afferent arteriolde konstrüksiyon sonucu glomerüler kapiller perfüzyonda düşme, tübüllerde çökerek renal tübüler hasar görülebilir (47).

Köse ve ark. Yaptıkları çalışmada metotreksata bağlı olarak proksimal tübüllerde fırçamsı kenar hasarı, tübüllerde deskuamasyon oluştuğunu, Vardı ve ark.

yaptıkları çalışmada ise metotreksatın apoptozis ve böbreklerde glomeruloskleroz gibi önemli yapısal hasara neden olduğunu bildirmişlerdir (80,81).

Renal fizyolojide meydana gelen hasarlar nedeniyle metotreksat kullanımının endike olduğu vakalarda doz ayarlamasının dikkatli ve kontrollü yapılması gerekmektedir (82).

2.7. Oksidatif Stres

Oksijenli solunum yapan canlılarda antioksidan savunma sistemleri serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak için gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda serbest radikallerin etkisini antioksidan savunma sistemi tamamen önleyemez ve oksidatif stres ortaya çıkmaktadır “(Şekil 2.12.) (83).”

Serbest radikal oluşumu birçok nedene bağlı olarak oluşmaktadır. Sigara, alkol, UV ışınları, radyasyon, ilaçlar, immunolojik reaksiyonlar, yağ oksidasyonu, stres ve biyokimyasal redoks reaksiyonları bu nedenlerden bazılarıdır (84).



Şekil 2.12. Oksidatif Stres

2.7.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran atom, molekül veya iyonlardır. Bu eşleşmemiş elektronlar genelde son derece reaktivite gösterirler (85). Serbest radikaller, radyasyona, çevresel kirleticilere ve metabolize ilaçların yan ürünlerine maruz kalma nedeniyle üretilir, doğada antioksidan olan moleküller tarafından da antagonize edilir (86).

Serbest radikaller oksijen (Tablo 2.1.) ve nitrojen kaynaklı olabilir (Tablo 2.2.). Oksijen kaynaklı olanlar reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrojen kaynaklı olanlar reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak isimlendirilir.

ROS arasında hidroksil ($\text{OH}\cdot$), süperoksit ($\text{O}_2\cdot^-$), lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$), peroksil ($\text{ROO}\cdot$), alkoksil ($\text{RO}\cdot$) ve hidroperoksi ($\text{HOO}\cdot$) radikallerini sayabiliriz. Oksidanlar olarak genelde adlandırılan hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl), lipid peroksit (LOOH), serbest radikaller arasında gösterilmez. RNS ise nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$) ve nitrojen dioksit ($\text{NO}_2\cdot$) türlerinden oluşur. Nitrik asit (HNO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3), peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen tetraoksit (N_2O_4), nitril klorid (NO_2Cl), alkilperoksi nitritler (ROONO), serbest radikaller arasında gösterilmezler. ROS ve RNS nonradikal reaktif türlere kolayca dönüşebilmektedir Nonradikal türleri patolojik ve fizyolojik durumlarda canlılar tarafından üretilir ve canlıda kolaylıkla serbest radikal reaksiyonlarına sebep olabilirler (87).

Tablo 2.1. Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Süperoksit	$O_2 \cdot^-$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH\cdot$	Ozon	O_3
Peroksil	$ROO\cdot$	Singlet oksijen	1O_2
Lipit peroksil	$LOO\cdot$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Alkoksil	$RO\cdot$	Lipit peroksit	$LOOH$
Hidroperoksi	$HOO\cdot$		

Tablo 2.2. Reaktif nitrojen türleri

Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Nitrik oksit	$NO\cdot$	Nitrik asit	HNO_2
Nitrojen dioksit	$NO_2\cdot$	Peroksinitrit	$ONOO^-$
		Peroksinitroz asit	$ONOOH$
		Dinitrojen trioksit	N_2O_3
		Dinitrojen tetraoksit	N_2O_4
		Nitrozil katyonu	NO^+
		Nitroksil anyonu	NO^-
		Nitronyum katyonu	NO_2^+
		Alkilperoksi nitritler	$ROONO$
		Nitril klorid	NO_2Cl

Aşırı serbest radikal oluşumu oksidatif strese neden olarak moleküler ve hücresel düzeyde hasara neden olur. Vücutta hücreleri parçalayıp, hücrelerde büyük değişimlere neden olan, tahrip eden bu moleküller çok saldırgandır. Reaktif oksijen türleri in vitro kimyasal modifikasyonların yanı sıra proteinler (agregasyon, denatürasyon), lipidler (peroksidasyon), karbonhidratlar ve nükleotidler (DNA yapısındaki değişiklikler) üzerinde zararlı etkilere neden olur. Bu değişiklikler, birçok serbest radikal kaynaklı hastalığın gelişimine sebep olmaktadır (88).

Oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp, kanser, serebrovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, akut böbrek hasarı, akciğer ve alkolik karaciğer hastalıkları, anfizem, bronşit gibi yaşlanma sonucu oluşan dejeneratif bozuklukların da içinde olduğu patolojik durumların oluşumuna neden olurlar (83).

Serbest radikal oluşumu birçok nedene bağlı oluşabilir. Bunlar eksojen ve endojen kaynaklardır.

Ekzojen kaynaklar: doğal zararlı gazlar (oksijen, hiperbarik oksijen ve ozon), iyonize ve non-iyonize radyasyon, patojenik bakteri, ilaçlar, virüsler, alkoldür (89).

Endojen kaynaklar ise araşidonik asit metabolizması siklooksijenaz (COX) sistemi, mitokondrial elektron transport sistemi, redoks döngüsü, ER fonksiyonları, fagositik hücreler (monosit, makrofajlar, nötrofil, eozinofil), otooksidasyon ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, XO, NOX gibi oksidan enzimlerdir (90).

2.7.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyen, bu maddelerin oluşturduğu hasarları önleyen veya geciktirebilen maddelere “antioksidan savunma sistemleri”

veya “antioksidanlar” denir. Antioksidanlar, radikallerle çok hızlı reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini engelleyen maddelerdir. Antioksidanların etkileri arasında, serbest radikallerin toksik etkilerinden hücreleri korumak, serbest radikallerin fazlasını etkisiz hale getirmek ve hastalıkları önlemek sayılabilir (90) “(Tablo 2.3.) (91)”.

Antioksidanlar eksojen ve endojen kaynaklıdır “(Tablo 2.4.)(92)”.

Tablo 2.3. Antioksidanların İşlevleri

Antioksidanların İşlevleri		
Primer Antioksidanlar	Sekonder Antioksidanlar	Tersiyer Antioksidanlar
Yeni ROS oluşumunu önler	Zincir kırıcı reaksiyonlarıyla serbest radikalleri uzaklaştırır	Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onarır.
Ferritin Serüloplazmin Haptoglobulin Hemopeksin gibi	Vitamin C Vitamin E Bilirubin β karoten Ürik asit gibi	

Tablo 2.4. Antioksidan Sistemleri

Antioksidan Sistemler

Endojen Antioksidanlar		Eksojen Antioksidanlar
Enzimatik	Non enzimatik	
-Glutasyon transferaz	-Bilirubin	-C vitamini
-Glutasyon redüktaz	-Albumin	-E vitamini
-Mitokondriyal oksidaz sistemi	-Ürik asit	-Folik asit
	- α - tokoferol	-Asetilsistein
	-Serüloplazmin	-Allopurinol
	-Transferrin	-Mannitol
	-Ferritin	-Demir şelatörleri
	-Glutasyon	

2.8. Timokinon

2.8.1. Çörek Otu Tohumu ve Geleneksel Kullanımı

Nigella sativa L., Ranunculaceae ailesinin bir türü olup ülkemizde de yetiştirilen bir bitkidir “(Şekil 2.13.) (93).” Tıbbi kullanımının yanında kozmetik, gıda, boya endüstrisinde 2000 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır (94-95). Vücut yapı taşı bozmadan kimyasal bileşenleri sayesinde vücuttaki toksinleri atarak dünyada tüm kültürlerde sağlıklı yaşam için kullanılmaktadır. Etken olarak %38 karbonhidrat, %23 protein, %35 bitkisel yağlardan oluşur. Timokinon (TQ), nigellon, linoleik asit, oleik asit, kalsiyum, palmitik asit, sodyum, fosfor, çinko, potasyum, selenyum, demir, magnezyum, bakır, A vitamin, B vitamini ve C vitamini içerir. (96-97). Klinik çalışmalarda, *N. sativa* ve bileşenlerinde, antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobial ve analjezik, antioksidan, antifungal, gastroprotektif, hepatoprotektif, antidiyabetik özelliklerinin yanı sıra metabolik sendrom ve gastrointestinal, nöronal, kardiyovasküler, solunum, üriner ve üreme bozuklukları üzerindeki terapötik etkileri

bulunmuştur (95,98,99). Çörek otunda esansiyel yağında en çok bulunan bileşenin timokinon olduğu ve faydalı etkilerinde en aktif bileşen olduğu gösterilmiştir. N. sativa'nın kanser hücrelerine karşı doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitotoksik aktivitesini arttırdığı rapor edilerek vurgulanmıştır (100).

Şekil 2.13. Nigella sativa L. bitkisi ve tohumu

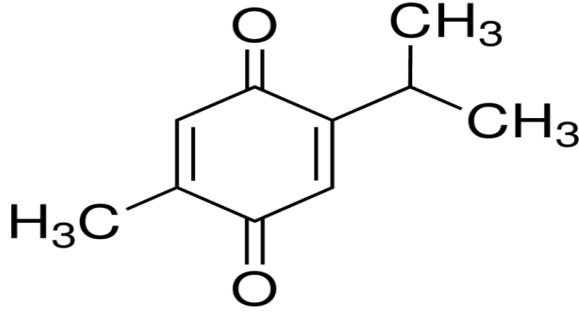


2.8.2. Timokinonun Fizikokimyasal Etkileri

Meyveler, otlar, baharatlar ve sebzeler biyoaktif bileşiklerin varlığı nedeniyle insan kanserlerini tedavi etmek için çok fazla tüketilmektedir (101). TQ, Nigella sativa'dan izole edilen aktif bir bileşendir ve ilk olarak 1959'da sentezlenmiş ve rapor edilmiştir (102). İlk ekstraksiyonundan bu yana hem in vitro hem de in vivo modellerde antioksidan, antienflamatuar ve antikanser aktiviteleri araştırılmaktadır (103).

Timokinon ($C_{10}H_{12}O_2$, 2-izopropil-5-metil 1, 4-benzokinon), N. Sativa'nın esansiyel yağında % 18.4-24 oranında bulunan fenol halkası taşıyan ve kinon yapısı barındıran “(Şekil 2.14.) (104)” en önemli biyoaktif içeriktir (105,106). İlaç formülasyonlarında kullanımı ve biyoyararlanımı hidrofobik özelliği nedeniyle kısıtlamaktadır (107). Oral, İntravenöz, subkütan ve intraperitoneal olarak uygulanabilir (108). Timokinonun, yapılan çalışmalarda oral yoldan alınan 10-100 mg/kg

aralığındaki doz miktarının güvenli, toksik etkisinin olmadığı bildirilmektedir (109).

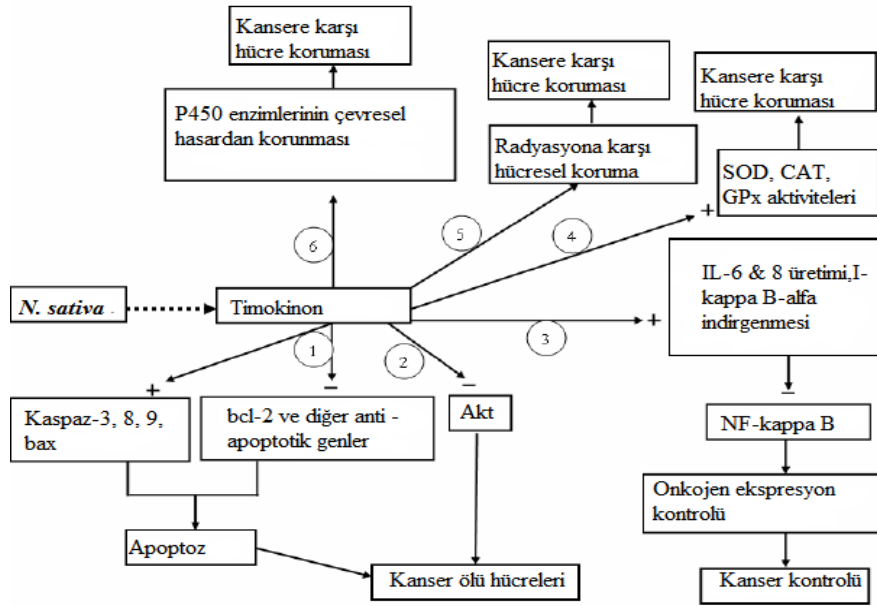


Şekil 2.14. Timokinon'un Kimyasal Yapısı

2.8.3. Timokinonun Farmokolojik Etkileri

Timokinonun oksidatif stresi azaltarak, antioksidan savunmayı artırıp bağışıklık sistemini güçlendirdiği belirlenmiştir (110). Çeşitli çalışmaların sonuçları, *N. sativa*'daki yağın, özlerin ve bunların aktif bileşenlerinin, özellikle timokinonun, antinosiseptif ve anti-inflamatuar etkilere sahip olduğunu ve *N. sativa*'nın güçlü bir analjezik ve anti-inflamatuar ajan olarak halk arasındaki algısını desteklediğini göstermiştir. Koruyucu birçok özelliği, yeniden üretilebilir radikal süpürücü aktiviteye sahip olması ayrıca proinflamatuar enzimler ve sitokinler dahil olmak üzere inflamasyonda yer alan çok sayıda moleküler hedefle etkileşime girmesi olarak belirlenmiştir (111).

Timokinonun antioksidan etkisinin timokinonun fizyolojik bariyerlerden ve subselüler kompartmanlara kolay geçmesi ayrıca molekül yapısındaki kinonun redoks özellikleriyle ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (108). Timokinonun antioksidan özellikleri özetle şu şekilde sıralanabilir; toplam tiyol bileşeni ve GSH seviyesini artırması, demir ilişkili lipid peroksidasyonunu engellemesi, radikal süpürücü olması, iNOS ekspresyonunu engellemesi, karaciğer CYP1A1/A2 izozimlerinin aktivitesini engellemesi, hepatositlerde lipogenezi engellemesi, kinon redüktaz, CAT, SOD ve glutatyon transferaz aktivitelerini artırmasıdır (112) “(Şekil 2.15.) (113).”



Şekil 2.16. Timokininin kansere karşı mekanizmaları

Yapılan çalışmalar, TQ'nun hayvan modellerinde ve kültür tümörlerinde antikanser etkisine/etkilerine, anti-proliferasyon, apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü durması, ROS üretimi ve anti-metastaz/anti-anjiyogenez dahil olmak üzere farklı etki modları aracılık eder (116,117). Ek olarak, bu kinonun, STAT3, p53, p73, PPAR- γ , PTEN, kaspazların aktivasyonu ve ROS üretimi dahil olmak üzere çoklu moleküler hedeflerin modülasyonu yoluyla antikanser aktivite sergilediği bulundu (118).

Karaciğer hastalıklarının tedavisi için uzun süredir TQ ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Karaciğer hastalıklarını baskılamak için TQ'nun hepatositlerde yağ asidi birikimini önleyen hipolipidik etkiler gösterdiği, böylece hepato-koruyucu özelliği vurgulanmıştır (118).

TQ, hastalardan izole edilen bir SARS-CoV-2 suşuna karşı kayda değer bir antiviral aktivite göstermiştir. Böylece TQ'nun reseptör bağlama alanına bağlanarak COVID-19 gelişimini potansiyel olarak engelleyebileceğini göstermiştir (119).

Timokinon, beyin patolojilerinin akut ve kronik formlarının olumsuz etkilerini azaltmıştır (120).

Timokinon, alkol kullanım bozuklukları (AUD) tedavisi için potansiyel bir ilaç adayı olarak kabul edilebilir. Düzensiz moleküler mekanizmayı kontrol etmek, AUD terapötiklerinin önemli bir özelliğidir. Timokinonun tüm bu potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir (121).

Hayvanlar üzerinde yapılan bir araştırmada kemoterapinin neden olduğu nefrotoksisite (sisplatin kaynaklı nefrotoksisite 8; metotreksat kaynaklı nefrotoksisite 1; doksorubisin kaynaklı nefrotoksisite 2; ifosfamide bağlı nefrotoksisite 1) üzerinde TQ'nun koruyucu etkisine bakılmış ve hayvanların böbrek dokusunda lipid peroksidasyonunun azalması ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin artması kaydedilmiştir (122).

Raghep A. ve ark. yaptığı çalışmada farklı hayvan modellerinde Cisplatinin neden olduğu nefrotoksisiteyi hafifletmek için TQ'nun klinik etkileri, Vitamin E, vitamin C, selenyum, kurkumin, likopen gibi bilinen antioksidan ajanlarla karşılaştırılarak antioksidanlarla tedavi kullanılmış ve TQ verilen hayvan modelinde nefrotoksisitenin ortaya çıkan en iyi klinik etkilere ulaştığını gözlenmiştir. Ayrıca bu grupta üre ve kreatininde en yüksek azalma yüzdesi ve kreatinin klirensinde artış sağlanmıştır. Sonuç olarak TQ'un oksijen radikallerini nötralize eden bir anyon temizleyici görevi gördüğü ROS oluşumu yoluyla olumsuz etkilerini gösteren ilaçların neden olduğu nefrotoksisiteyi iyileştirmede TQ'nun yararlılığını kanıtlamıştır. (123).

3.MATERYAL VE METOT

Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 29.12.2020 tarihli ve 14/198-2020 sayılı onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Araştırmamız Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Komitesi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2021-774).

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 24 adet, ağırlıkları 350-400 gr arasında değişen, Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Bir hafta süresince sıçanların deney ortamına ve çalışmayı yapan araştırmacıya alışmaları sağlandı. Hayvanlar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, ısı (21-23°C) kontrollü odalarda uygun kafeslerde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresince standart sıçan yemi ve yeteri kadar su (ad libitum) ile beslendi. Gün aşırı kafes temizliği yapıldı ve içme suları değiştirildi. Tüm hayvanların çalışma başlangıcında ve sakrifiye edilmeden önce tartılarak ağırlıkları kayıt edildi.

3.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

3.2.1. Deney Planı

Çalışmamız 6'şar adet rat içeren 4 gruptan oluşturuldu. Gruplara yapılan uygulamalar aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1.) ilgili başlıklar altında ayrıntılı olarak verildi.

Gruplar; I. Sağlıklı (kontrol), II. Metotreksat (MTX), III. Metotreksat + Timokinon 20 mg/kg (MTX+TQ 20 mg/kg) ve IV. Metotreksat + Timokinon 50 mg/kg (MTX+TQ 50 mg/kg) şeklindedir.

Tablo 3.1. Deney planı

Deney Grupları	1. GÜN	2. GÜN	3. GÜN	4. GÜN	5. GÜN
I (Kontrol)	Mısır yağı	Mısır yağı	Mısır yağı	Mısır yağı	Mısır yağı
II (MTX)	-	20 mg/kg, i.p, tek doz MTX	-	-	-
III MTX+TQ (20mg/kg)	20 mg/kg, oral TQ	20 mg/kg, i.p, tek doz MTX + 20 mg/kg, oral TQ	20 mg/kg, oral TQ	20 mg/kg, oral TQ	20 mg/kg, oral TQ
IV MTX+TQ (50mg/kg)	50 mg/kg, oral TQ	20 mg/kg, i.p, tek doz MTX + 50 mg/kg, oral TQ	50 mg/kg, oral TQ	50 mg/kg, oral TQ	50 mg/kg, oral TQ

Grup I (kontrol): MTX+TQ gruplarına TQ verildiği zaman kontrol grubu sıçanlara da 20 mg/kg 5 gün boyunca tek doz mısır yağı gavaj yoluyla verildi (124).

Grup II (MTX): Hazır sıvı formda olan metotreksat, çalışmanın ikinci günü, 20mg/kg olacak şekilde i.p olarak tek doz insülin enjektörü kullanarak uygulandı (125).

Grup III (MTX+TQ 20 mg/kg): Timokinonun stok çözeltileri mısır yağında çözülerek hazırlandı. Hayvan başına 20 mg/kg olacak şekilde TQ 1. günden itibaren 5 gün gavajla uygulandı. Metotreksat uygulanması ise sadece çalışmanın 2. gün grup II' deki gibi uygulandı (126).

Grup IV (MTX+TQ 50 mg/kg): Timokinonun stok çözeltileri mısır yağında çözülerek hazırlandı. Hayvan başına 50 mg/kg olacak şekilde TQ 1. günden itibaren 5 gün gavajla uygulandı Metotreksat uygulanması ise sadece çalışmanın 2. gün grup II'deki gibi uygulandı (127).

Tüm hayvanlar 6. gün sonunda i.p. olarak uygulanan ketamin (90 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) anestezi uygulanarak kan örneği ve iki böbrekleri alınarak sakrifiye edildi. Hayvanların böbrekleri tartıldı ve komşu dokulardan temizlendi. Hayvanların sağ böbrekleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit fiksasyon solüsyonu içine atıldı. Sol böbrekten elde edilen dokular -80 °C'de biyokimyasal analizler yapıncaya kadar saklandı. Vena kava inferior dan alınan kan örnekleri (3 cc) 4000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve biyokimyasal incelemeler yapılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2.2. Doku Homojenizasyonu

Sıçan böbrek dokuları GSH, MIOX ve KIM-1 analizi için sıvı nitrojen ile hızlı bir şekilde dondurulup havanda havaneli ile homojenize edildi ve 2-8 °C'de bekletildi. PBS (fosfat tamponu); Na₂HPO₄ (14.4 gr), NaCl (80 gr), KCl (2 gr), KH₂PO₄ (2.4 gr) ultra saf suda çözündürülüp 1lt'ye tamamlanıp pH: 7,4'e ayarlanarak hazırlandı.

Parçalanmış dokular tartılarak (0.3 gr) üzerine 1/10 (ağırlık/volüm) oranında PBS eklendi. Homojenizatlar 10 saniye vortekslendi ve 10 dk 4000 rpm’de 4 °C’de santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Süpernatant kısmı ependorflara alınarak -20°C’de analiz edilecek zamana kadar saklandı.

3.3. Kullanılan Aletler, Cihazlar Ve Kimyasal Maddeler

3.3.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Deney esnasında kullanılan tüm cihazlar aşağıda gösterilmiştir.

Kullanılan Cihazlar	Modeli ve Firması
Mikroplaka Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, USA
Mikroplaka Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph Titramax 1000
Derin Dondurucu (-80°C)	Haier
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter Allegra x-12
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Hassas Terazî	Shimadzu ATX224, USA
Vorteks	IKA-MS 3 basic, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Pipet seti	Eppendorf Research Plus
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro, 20-300µ
Otoanalizör	Beckman Coulter au5800
Biyokimya Tüpleri (sarı kapak)	

İntragastrik gavaj

Steril Enjektörler

Filtre Kâğıtları

Cam Malzeme (Erlen, huni, mezür,
balon vs.)

3.3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Uygulamalarda kullanılan kimyasallar analitik düzeyde olup aşağıda verilmiştir.

Kimyasal Maddeler	Firma
Timokinon	Sigma
Metotreksat	Med-ilaç
MIOX ELISA kiti	CK-bio-15027, Çin
KIM-1 ELİSA kiti	CK-bio-14897, Çin
GSH ELISA kiti	CK-bio-14708, Çin
Ketamin	Sigma
Ksilazin	Sigma
% 10'luk Formaldehit	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
NaCl	Merck
Na ₂ HPO ₄	Merck
KCl	Merck
Sıvı nitrojen	
Serum fizyolojik	

Saf su

3.4. Biyokimyasal Analizler

3.4.1. Serum Üre Analizi

Üre ölçümleri Beckman Coulter au5800 otoanalizöründe Beckman Coulter test kitleri kullanılarak spektrofotometrik olarak saptandı.

3.4.2. Serum Kreatinin Analizi

Kreatinin ölçümleri Beckman Coulter au5800 otoanalizöründe Beckman Coulter test kitleri kullanılarak spektrofotometrik olarak saptandı.

3.4.3. Serum ve Doku GSH Analizi

Deneyimizdeki rat GSH kiti (CK-bio-14708) çift-antikör sandwich ELISA metodu kullanılarak yapıldı. Rat GSH ELISA (enzime bağlı immünosorbent testi) kiti 96 kuyucuklu plaklardan oluşmaktadır. ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı, plazma ve doku örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Deney ELİSA kitinde bulunan deney prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Rat GSH ELİSA kit için, sensitivite 1.0 mmol / L, ölçüm aralığı 10 - 400 mmol / L ve CV < %10 olarak belirtilmiştir.

Deney prosedürü:

1. Standart çözelti kuyusu hazırlamak için 50µL standart ve 100µL streptavidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) eklendi.

2. Test edilecek numune kuyucuklarına 10µL numune ve daha sonra 40µL numune dilüsyon çözeltisi, 100µL streptavidin-HRP eklendi.

3. Plak sızdırmazlık plakası membranı ile kaplanıp, 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi.

4. 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçildi. Plak, yıkama solüsyonu (20x + 380 mL saf su) ile 5 kez yıkandı. (x: yıkama solüsyonu)

5. Her kuyucuğa önce 50µL kromojen A solüsyonu ve sonra 50µL kromojen B solüsyonu eklendi. Karıştırmak için hafifçe sallandı.

6. Karanlık ortamda 37 °C’de 15 dk inkübe edildi.

7. Plakta her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 50µL durdurma solüsyonu eklenip reaksiyon durduruldu.

8. Plak Optik dansite (OD) 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucusunda okundu.

3.4.4. Serum ve Doku KIM-1 Analizi

Deneyimizdeki rat KIM-1 kiti (CK-bio-14897) çift-antikör sandwich ELISA metodu kullanılarak yapıldı. Rat ELISA KIM-1 kiti 96 kuyucuklu plaklardan oluşmaktadır. ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı, plazma ve doku örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Deney ELISA kitinde bulunan deney prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Rat KIM-1 ELISA kit için, sensitivite 1.0 pg / mL, ölçüm aralığı 10 - 400 pg / mL ve CV < %10 olarak belirtilmiştir.

Deney prosedürü:

1. Standart çözelti kuyusu hazırlamak için 50µL standart ve 100µL streptavidin-HRP eklendi.
2. Test edilecek numune kuyucuklarına 10µL numune ve daha sonra 40µL numune dilüsyon çözeltisi, 100µL streptavidin-HRP eklendi.
3. Plak, sızdırmazlık plakası membranı ile kaplanıp, 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi.
4. 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçildi. Plak, yıkama solüsyonu (20x + 380 mL saf su) ile 5 kez yıkandı. (x: yıkama solüsyonu)
5. Her kuyucuğa önce 50µL kromojen A solüsyonu ve sonra 50µL kromojen B solüsyonu eklendi. Karıştırmak için hafifçe sallandı.
6. Karanlık ortamda 37 °C’de 15 dk inkübe edildi.
7. Plakta her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 50µL durdurma solüsyonu eklenip reaksiyon durduruldu.
8. Plak OD 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucusunda okundu.

3.4.5. Serum ve Doku MIOX Analizi

Deneyimizdeki rat MIOX kiti (CK-bio-15027, ÇİN) çift-antikör sandwich ELISA metodu kullanılarak yapıldı. Rat MIOX ELISA kiti 96 kuyucuklu plaklardan oluşmaktadır. ELISA kitinde bulunan standart dilüsyon tamponu, standart, 96 kuyucuklu ELISA plağı, plazma ve doku örnekleri, çalışmaya başlamadan en az 1 saat önce dolaptan çıkartılarak oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı ve deney oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Deney ELİSA kitinde bulunan deney prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Rat MIOX ELİSA kit için, sensitivite 1.0 pg / mL, ölçüm aralığı 50 - 1200 pg / mL ve CV < %10 olarak belirtilmiştir.

Deney prosedürü:

1. Standart çözelti kuyusu hazırlamak için 50µL standart ve 100µL streptavidin-HRP eklendi.
2. Test edilecek numune kuyucuklarına 10µL numune ve daha sonra 40µL numune dilüsyon çözeltisi, 100µL streptavidin-HRP eklendi.
3. Plak sızdırmazlık plakası membranı ile kaplanıp, 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi.
4. 1 saatlik inkübasyon aşamasını takiben plağın yıkama aşamasına geçildi. Plak, yıkama solüsyonu (20x + 380 mL saf su) ile 5 kez yıkandı (x: yıkama solüsyonu).
5. Her kuyucuğa önce 50µL kromojen A solüsyonu ve sonra 50µL kromojen B solüsyonu eklendi. Karıştırmak için hafifçe sallandı.
6. Karanlık ortamda 37 °C’de 15 dk inkübe edildi.
7. Plakta her kuyucuğa reaksiyonu durdurmak için 50µL durdurma solüsyonu eklenip reaksiyon durduruldu.
8. Plak OD 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucusunda okundu.

3.5. Histopatolojik Yöntem

Sıçanların nekropsileri yapılarak alınan böbrek dokuları %10’luk nötral formalin solüsyonunda tespit edildi. Dokular rutin alkol-ksilol takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklara alındı. Lamlara alınan 4 µm’ lik kesitler hematoksil-eosin ile boyanarak tübüler dejenerasyon, hemoraji ve intersitisyel nefritis yönünden yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasak analizlerden elde edilen sonuçlarda "ortalama değer ± standart sapma" ($\bar{x} \pm St S$) olarak ifade edildi. Grup ortalamaları karşılaştırılırken öncelikle parametrik testlerin varsayımları kontrol edildi. Normallik varsayımı Shapiro-wilk

testi ile varyansların homojenliği ise Levene testi ile incelendi. Varsayımları sağlayan grup karşılaştırmalarında gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA testi kullanılarak belirlendi. Varsayımların sağlanamadığı grup karşılaştırmalarında gruplar arasındaki farklar ise Kruskall-wallis testi ile incelendi. Anlamlı farkın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için Tukey ve Dunnet post-hoc testleri kullanıldı. Post-hoc testleri sonucunda gruplar arasındaki farklılıklar harfler ile simgelendi. Aynı harf/harflere sahip gruplar arasında fark yokken farklı harf/harflere sahip gruplar arasında anlamlı fark görülmüştür. Tüm istatistik hesaplamalarda $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Verilerin istatistiksel analizi için SPSS (versiyon 20.0, SPSS Inc, Chicago) programı kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Serum Üre Ölçüm Bulguları

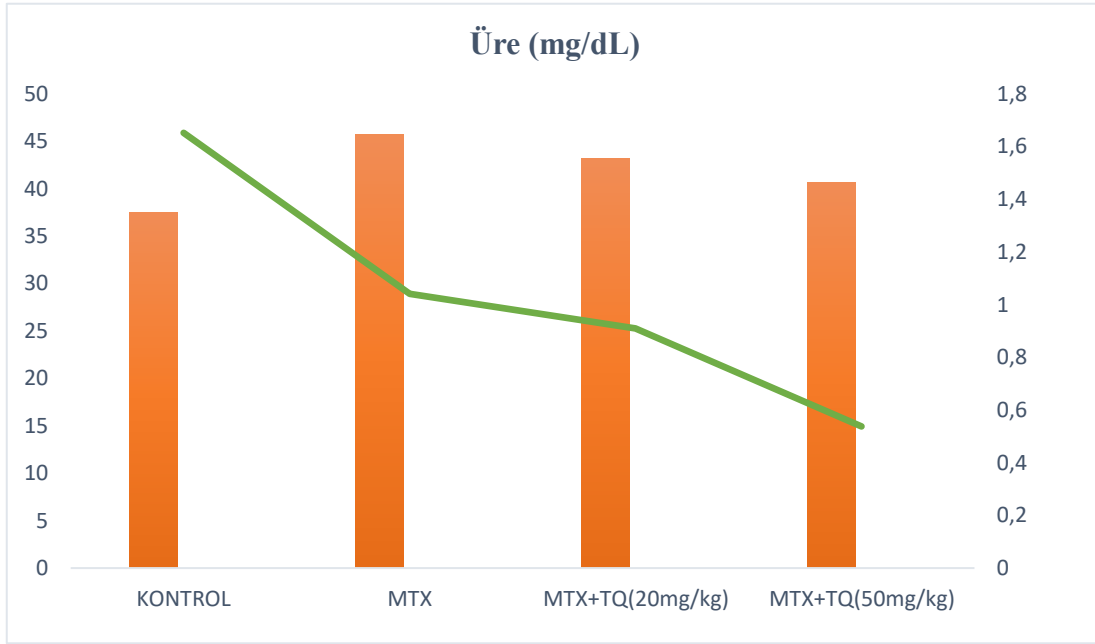
Tablo 4.1 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama serum üre değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.000$). Kontrol grubuna göre, MTX, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarının serum üre değerleri anlamlı olarak değişti. MTX grubunun serum üre değeri ortalaması, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Ayrıca, MTX grubuna göre, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında artan TQ dozu ortalama üre değerini azalttığı görüldü (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Sıçanların gruplarına göre serum üre değerleri (mg/dL)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQ)
Üre	Kontrol	37.500 ^a	1.652	35.750 (34.750- 37.000)
	MTX	45.750 ^b	1.041	45.750 (45.000- 46.500)
	MTX+TQ(20)	43.200 ^c	.909	43.400 (42.500- 43.900)
	MTX+TQ(50)	40.675 ^d	.538	40.750 (40.250- 41.100)

*p .000

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.1. Sıçanların gruplarına göre serum üre değerleri grafiği

— Standart Sapma

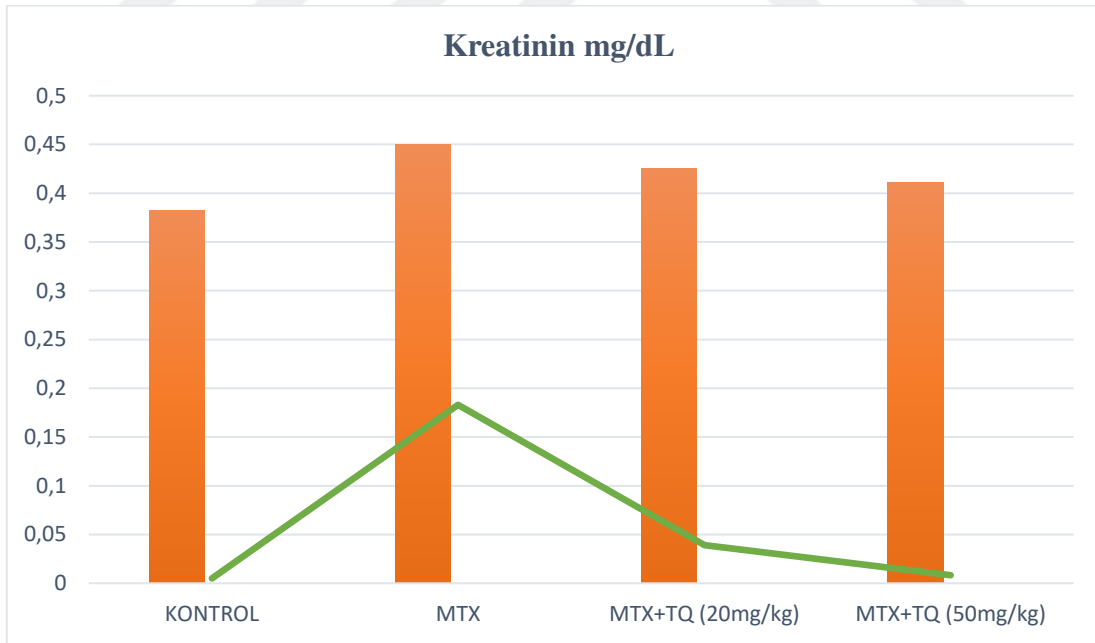
4.1.2. Serum Kreatinin Ölçüm Bulguları

Tablo 4.2 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama serum kreatinin değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.003$). Kontrol grubuna göre, MTX, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX +TQ(50 mg/kg) gruplarının serum kreatinin değerleri anlamlı olarak değişti. Kontrol grubuna göre, MTX grubunda serum kreatinin değerinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Ayrıca, TQ verilen gruplarda MTX grubuna göre serum kreatinin değerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Ancak, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarının serum kreatinin değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Şekil 4.2).

Tablo 4.2. Sıçanların gruplarına göre serum kreatinin değerleri (mg/dL)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
Kreatinin	Kontrol	.383 ^a	.005	.380 (.380 - .385)
	MTX	.450 ^c	.018	.450 (.435 - .465)
	MTX+TQ(20)	.425 ^b	.004	.426 (.423 - .428)
	MTX+TQ(50)	.411 ^b	.008	.413 (.405 - .417)
	*p	.003		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.2. Sıçanların gruplarına göre serum kreatinin değerleri grafiği

— Standart Sapma

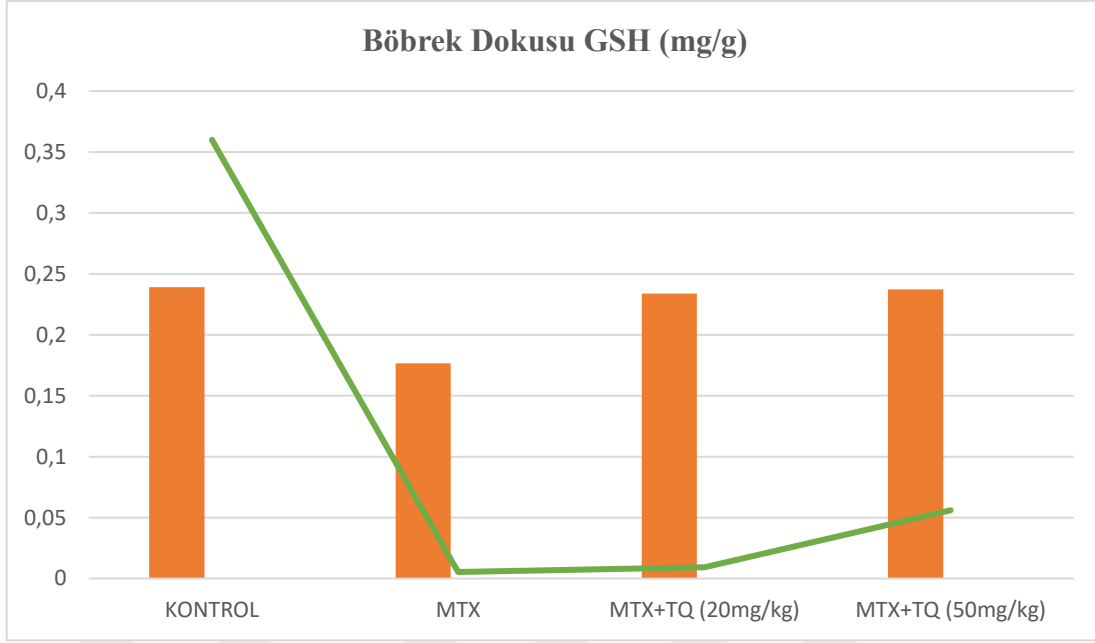
4.1.3. GSH Ölçüm Bulguları

Tablo 4.3 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama böbrek dokusu GSH değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.046$). Böbrek dokusu GSH değerleri kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak değişirken, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında anlamlı olarak değişmediği görüldü. Kontrol grubuna göre, MTX grubunda böbrek dokusu GSH değerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Ayrıca, TQ verilen gruplarda MTX grubuna göre böbrek dokusu GSH değerinin anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu GSH değerleri (mg/g)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
GSH	Kontrol	.239 ^a	.036	.226 (.217 - .261)
	MTX	.177 ^b	.005	.178 (.173 - .181)
	MTX+TQ(20)	.234 ^a	.009	.234 (.228 - .240)
	MTX+TQ(50)	.237 ^a	.056	.209 (.201 - .302)
	*p	.046		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.3. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu GSH değerleri grafiği

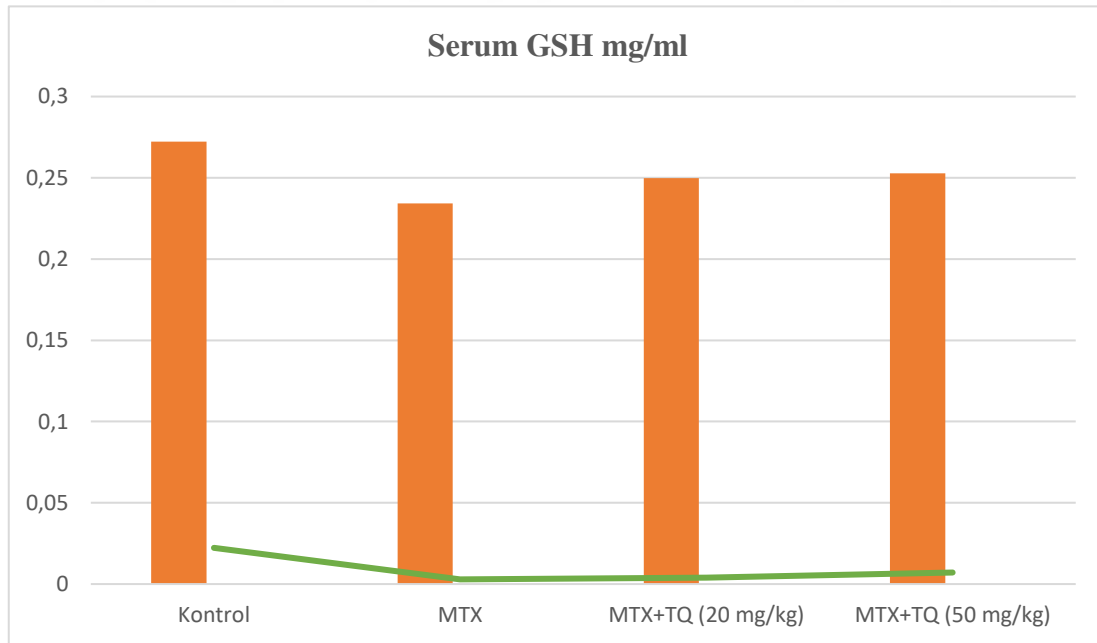
— Standart Sapma

Tablo 4.4 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama serum GSH değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.029$). Kontrol grubuna göre, MTX ve MTX +TQ (20 mg/kg) gruplarının serum GSH değerleri anlamlı olarak değişirken, MTX+TQ (50 mg/kg) grubunda anlamlı değişmediği görüldü. Kontrol grubuna göre, MTX grubunda serum GSH değerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. MTX +TQ (20 mg/kg) grubunun serum GSH değeri MTX grubuna göre artmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı görülmedi. MTX+TQ (50 mg/kg) grubunda MTX ve MTX +TQ (20 mg/kg) grubuna göre serum GSH değerinin anlamlı olarak arttığı görüldü (Şekil 4.4).

Tablo 4.4. Sıçanların gruplarına göre serum GSH değerleri (mg/ml)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
	Kontrol	.272 ^a	.022	.266 (.257 - .288)
GSH	MTX	.234 ^b	.003	.245 (.222 - .247)
	MTX+TQ(20)	.250 ^b	.004	.249 (.247 - .253)
	MTX+TQ(50)	.253 ^a	.007	.254 (.248 - .258)
	*p	.029		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.4. Sıçanların gruplarına göre serum GSH değerleri grafiği

— Standart Sapma

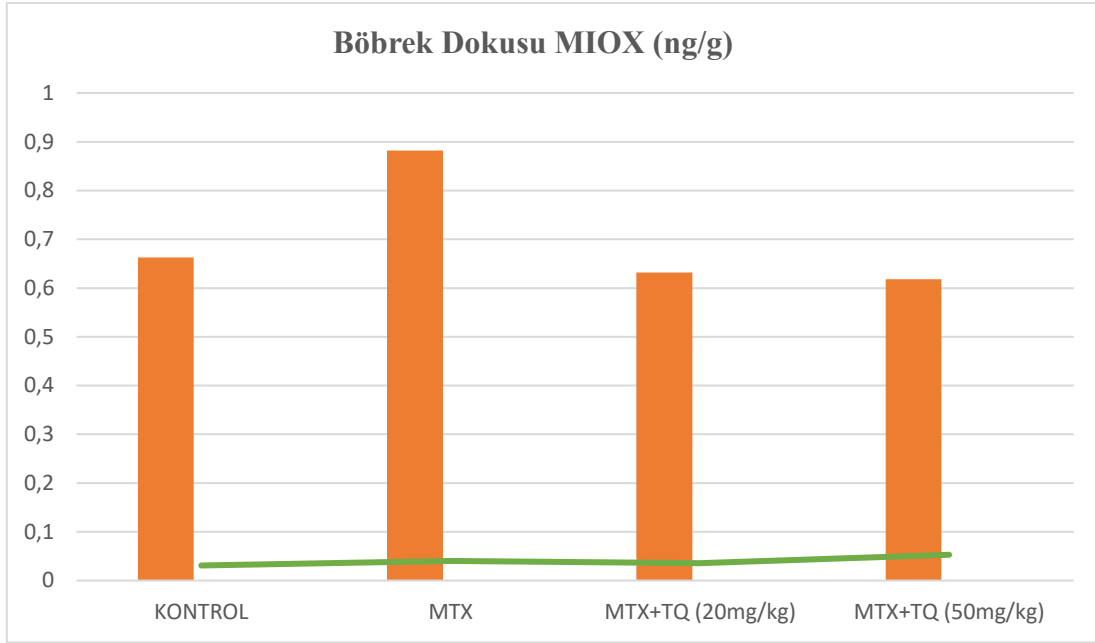
4.1.4. MIOX Ölçüm Bulguları

Tablo 4.5 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama böbrek dokusu MIOX değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.000$). Böbrek dokusu MIOX değerleri kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak değişirken, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında anlamlı olarak değişmediği görüldü. Kontrol grubuna göre, böbrek dokusu MIOX değerinin en yüksek MTX grubunda olduğu görüldü. Ayrıca, TQ verilen gruplarda MTX grubuna göre böbrek dokusu MIOX değerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Ancak, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarının böbrek dokusu MIOX değerleri arasında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.5).

Tablo 4.5. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu MIOX değerleri (ng/g)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
MIOX	Kontrol	.663 ^a	.031	.670 (.640 - .685)
	MTX	.882 ^b	.040	.886 (.856 - .909)
	MTX+TQ(20)	.632 ^a	.036	.638 (.607 - .656)
	MTX+TQ(50)	.618 ^a	.053	.622 (.584 - .652)
	*p	.000		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.5. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu MIOX değerleri grafiği

— Standart Sapma

Tablo 4.6 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama serum MIOX değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.000$). Serum MIOX değerleri kontrol grubuna göre, MTX, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında anlamlı olarak fark olduğu görüldü. Ayrıca kontrol grubu ile MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarının serum MIOX değerleri arasında anlamlı fark görülmedi. Kontrol grubuna göre, MTX grubunda serum MIOX değerinin anlamlı olarak arttığı görüldü. MTX grubuna göre, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında TQ dozuna bağlı olarak böbrek dokusu serum MIOX değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Ancak, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarının serum MIOX değerleri arasında anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.6).

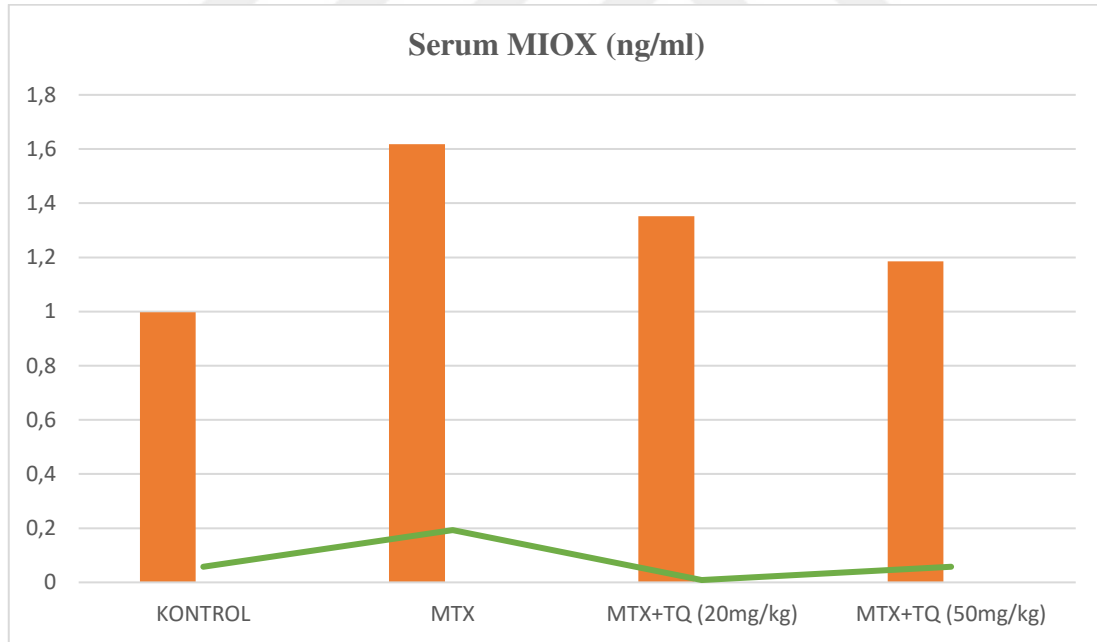
Tablo 4.6. Sıçanların gruplarına göre serum MIOX değerleri (ng/ml)

Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
Kontrol	.998 ^a	.058	1.013 (.957- 1.038)
MTX	1.618 ^c	.193	1.679 (1.482- 1.755)
MTX+TQ(20)	1.352 ^b	.009	1.353 (1.345- 1.358)
MTX+TQ(50)	1.185 ^{ab}	.058	1.190 (1.145- 1.225)

MIOX

*p .000

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.6. Sıçanların gruplarına göre serum MIOX değerleri grafiği

— Standart Sapma

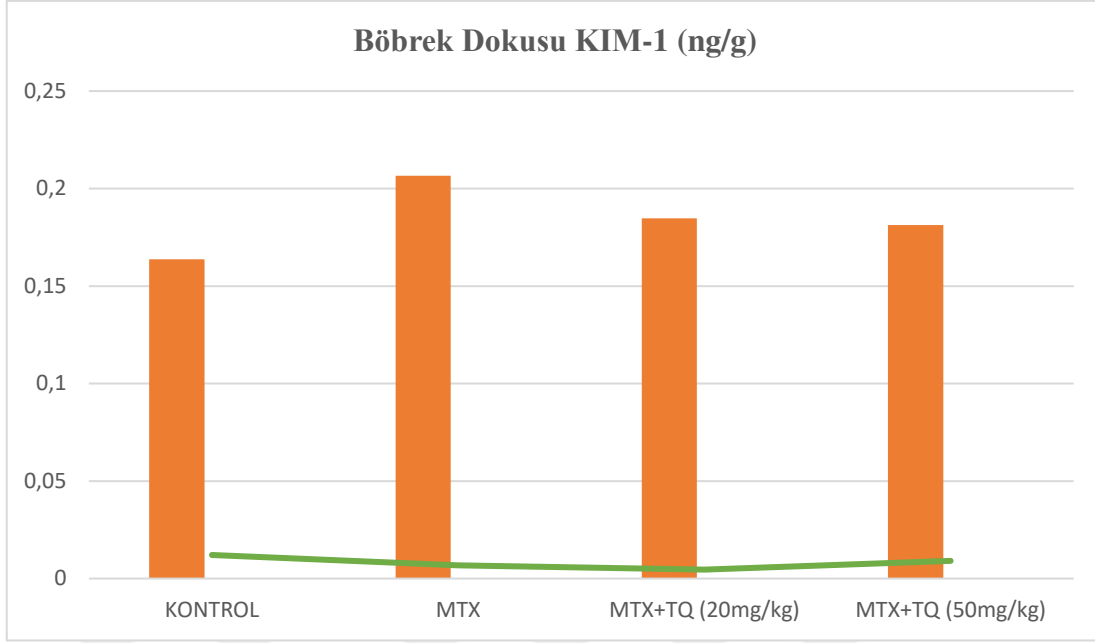
4.1.5. KIM-1 Ölçüm Bulguları

Tablo 4.7 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama böbrek dokusu KIM-1 değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.001$). Böbrek dokusu KIM-1 değerleri kontrol grubuna göre, MTX, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında anlamlı olarak değiştiği görüldü. Ayrıca kontrol grubu ile MTX+TQ (50 mg/kg) grupları arasında ve MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) grupları arasında ortalama böbrek dokusu KIM-1 değerlerinde anlamlı olarak fark olmadığı görüldü. MTX grubunun böbrek dokusu KIM-1 değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. MTX grubuna göre, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında TQ alımına bağlı olarak ortalama böbrek dokusu KIM-1 değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.7).

Tablo 4.7. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu KIM-1 değerleri (ng/g)

Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
Kontrol	.164 ^a	.012	.162 (.156 - .172)
MTX	.207 ^c	.007	.207 (.202 - .212)
MTX+TQ(20)	.185 ^b	.005	.184 (.182 - .188)
MTX+TQ(50)	.181 ^{ab}	.009	.183 (.174 - .189)
*p	.001		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.7. Sıçanların gruplarına göre böbrek dokusu KIM-1 değerleri grafiği

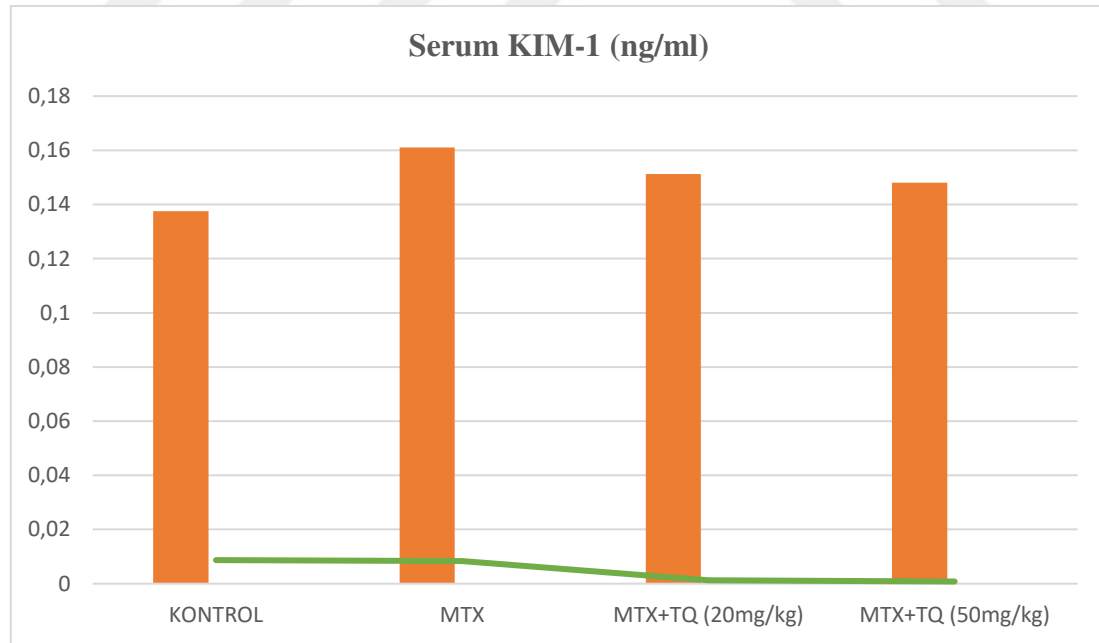
— Standart Sapma

Tablo 4.8 incelendiğinde, biyokimyasal analiz sonucunda grupların ortalama serum KIM-1 değerleri arasında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.001$). Serum KIM-1 değerleri kontrol grubuna göre, MTX, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX +TQ(50 mg/kg) gruplarında anlamlı olarak değişti. MTX grubunun serum KIM-1 değeri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu MTX grubuna göre, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX +TQ(50 mg/kg) gruplarında TQ alımına bağlı olarak serum KIM-1 değerlerinde anlamlı azalma görüldü. MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarında ortalama serum KIM-1 değerlerinde anlamlı fark görülmedi (Şekil 4.8).

Tablo 4.8. Sıçanların gruplarına göre serum KIM-1 değerleri (ng/ml)

	Gruplar	Ortalama	St S	Median (IQR)
KIM-1	Kontrol	.138 ^a	.009	.139 (.131 - .144)
	MTX	.161 ^b	.008	.162 (.155 - .167)
	MTX+TQ(20)	.151 ^c	.001	.151 (.151 - .152)
	MTX+TQ(50)	.148 ^c	.001	.148 (.148 - .149)
	*p	.001		

St S: Standart Sapma; IQ: Çeyreklikler; *p <0.05 önemli kabul edildi. Gruplar arası anlamlı farklar küçük harfler ile simgelendi. Aynı küçük harf/harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulunmazken, farklı harfler ile simgelenen gruplar arasında fark önemli bulundu.



Şekil 4.8. Sıçanların gruplarına göre serum KIM-1 değerleri grafiği

— Standart Sapma

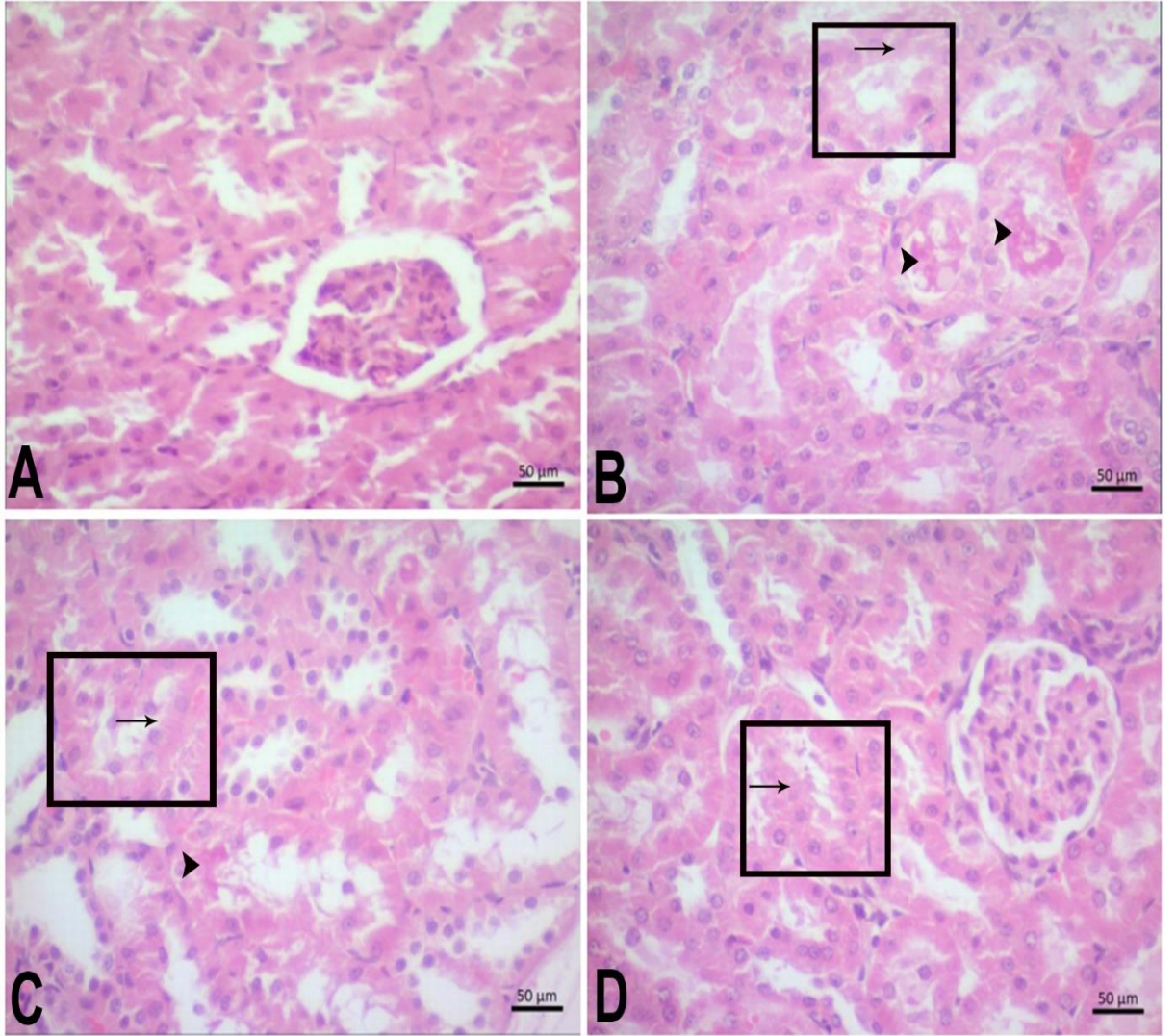
4.2. Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik incelemelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi (Tablo 4.9, *p <0,05).

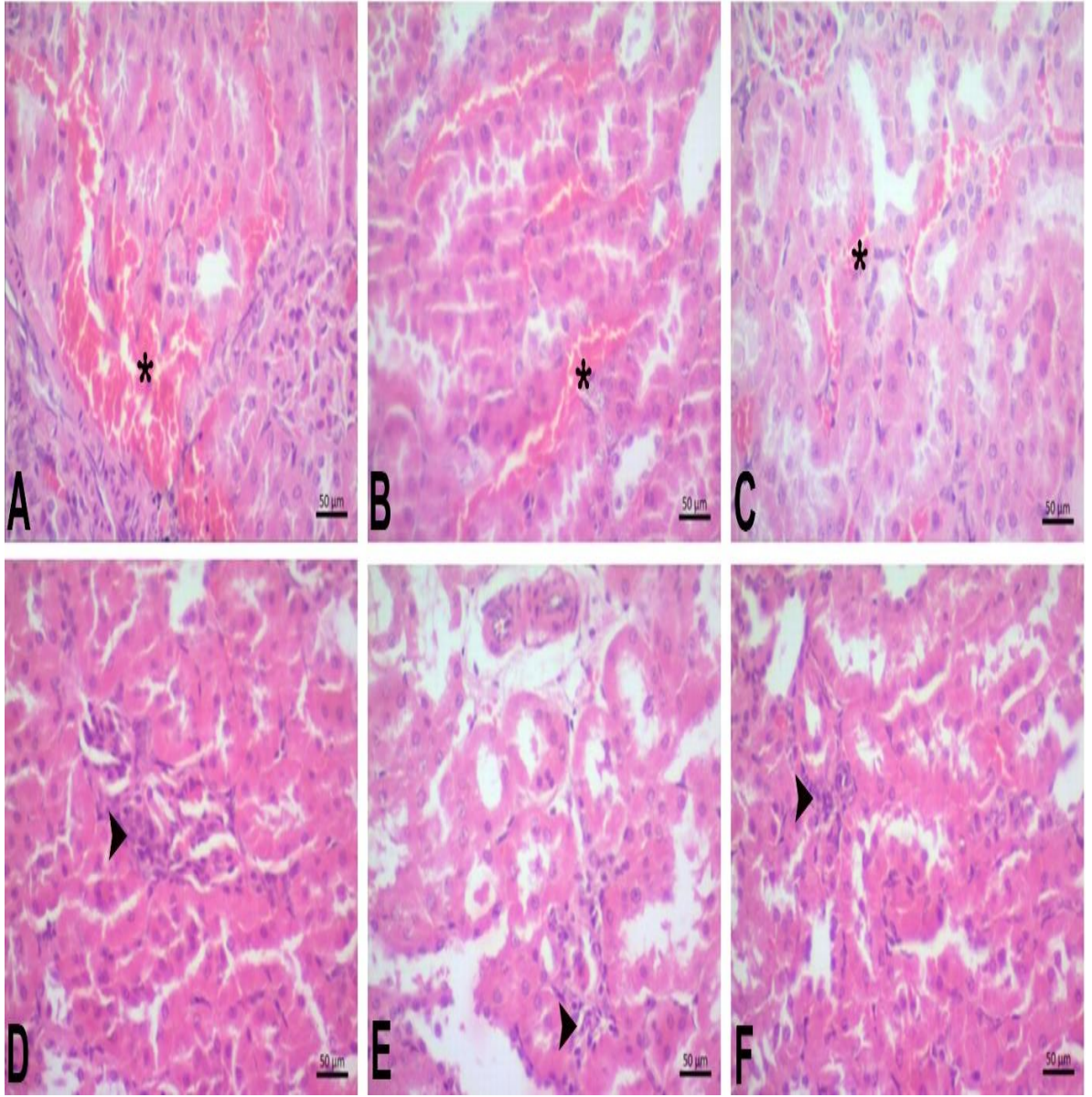
Tablo 4.9. Sıçanlarda gruplara göre histopatoloji değerleri

Gruplar	Tübüler dejenerasyon	Hiyalin birikimi	Hemoraji	İntersitisyel nefritis
Kontrol	0.16±0.40 ^a	0.00±0.00 ^a	0.33±0.40 ^a	0.16±0.40 ^a
MTX	1.83±0.40 ^b	2.83±0.40 ^b	2.66±0.51 ^b	2.83±0.40 ^b
MTX+TQ (20mg/kg)	1.16±0.40 ^c	1.66±0.51 ^c	1.66±0.51 ^c	1.00±0.63 ^c
MTX+TQ (50mg/kg)	1.00±0.63 ^c	0.33±0.40 ^a	0.83±0.40 ^d	1.00±0.00 ^c
*p	0.044	0.026	0.034	0.016

Kontrol grubu normal histolojik görünümdeydi. Tübüler dejenerasyon MTX grubunda orta düzeyde iken, MTX- TQ (20mg/kg) ve MTX- TQ (50mg/kg) gruplarında hafif düzeyde tübüler dejenerasyon görüldü. Tübülüslerin lümenlerinde hiyalin birikim MTX grubunda şiddetli, MTX- TQ (20mg/kg) grubunda orta düzeyde, MTX- TQ (50mg/kg) grubunda ise önemli düzeyde görülemedi. Tespit edilen diğer histopatolojik bulgulardan hemoraji ise MTX grubunda şiddetli, MTX- TQ (20mg/kg) grubunda orta, MTX- TQ (50mg/kg) grubunda ise hafif düzeyde görüldü. İntersitisyel nefritis MTX grubunda şiddetli düzeyde iken, MTX- TQ (20mg/kg) ve MTX- TQ (50mg/kg) gruplarında hafif olarak belirlendi. (Şekil 4. 9-10).



Şekil 4.9. A. Kontrol Group. Normal histolojik görünüm. **B. MTX grubu.** Orta düzeyde dejeneratif tübül (□) ile tübülüs epitellerinde nekroz (→) ve şiddetli düzeyde hiyalin birikimi (okbaşı), **C. MTX- TQ (20mg/kg) grubu.** Hafif düzeyde dejeneratif tübül (□) ile tübülüs epitellerinde nekroz (→) ve hafif düzeyde hiyalin birikimi (okbaşı), **D. MTX- TQ (50mg/kg) grubu.** Hafif düzeyde dejeneratif tübül (□) ile tübülüs epitellerinde nekroz (→). H-E



Şekil 4.10. A. MTX grubu. Şiddetli düzeyde hemoraji (*), **B. MTX- TQ (20mg/kg) grubu.** Orta düzeyde hemoraji (okbaşı), **C. MTX- TQ (50mg/kg) grubu.** Hafif düzeyde hemoraji (okbaşı), **D. MTX grubu.** Şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (okbaşı), **E. MTX- TQ (20mg/kg) grubu.** Hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (okbaşı), **F. MTX- TQ (50mg/kg) grubu.** Hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (okbaşı), H-E.

5. TARTIŞMA

Kemoterapi, tümör hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını durdurmak veya tümör hücrelerini yok etme esasına dayanan kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden biridir. Kemoterapi için kullanılan ilaçların kanser hücresine karşı selektiflikleri az olduğundan bu ilaçlar vücutta kanser hücrelerini yok ederken hızlı çoğalan normal hücreleri de yok etmektedir. Bundan dolayı çeşitli yan etkiler oluşmaktadır. Böbrek hücrelerinin çoğalması hızlı değildir fakat, yüksek kan akımı olması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etmesi ve tübüler epitelde spesifik taşıyıcılara sahip olmasıyla böbreğin toksik zedelenmeye duyarlılığı oldukça fazladır ve bu sebeple sitotoksik ilaçlara bağlı nefrotoksisite kemoterapide en sık görülen ciddi yan etkilerden birisidir. Nefrotoksisiteye sebep olan ilaçlardan antimetabolitler, antrasiklinler ve alkilleyici ilaçlar başta gelmektedir (128).

Metotreksat folik asit analogudur ve pürin, pirimidin sentezini inhibe eden kanser tedavisinde kullanılan en yaygın antimetabolitlerden biridir (129). Metotreksat (MTX) ayrıca dermatomiyozit, sarkoidoz, sedef hastalığı ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır (130). MTX'in sıçan böbrek dokularında oksidatif strese yol açtığı öne sürülmüştür, bu da MTX'in neden olduğu nefrotoksisitenin nedenlerinden biri olabilir. (131). Yüksek doz metotreksat kaynaklı akut böbrek hasarı nadir görülen ancak yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur (132).

Antioksidanlar hasar öncesi radikal oluşumunu önlemenin yanı sıra mevcut oksidatif hasarı onarır, çeşitli reaktif yan ürünleri nötralize eder ve oksitlenmiş biyomolekülleri bozar (133). Yapılan bir çalışmada doğal ve sentetik antioksidanların, sisplatin'e bağlı toksik etkileri azaltabileceği gösterilmiştir (134).

Timokinon (TQ), *Nigella sativa*'nın uçucu yağının en çok bulunan ve en aktif bileşenidir. Anti-oksidan, anti-inflamatuar, immünomodülatör, anti-mikrobiyal ve anti-tümör, anti-histaminik etkileri dahil olmak üzere TQ'nun bir çok farmakolojik etkisi bulunmaktadır. Kanseri ilerleme sinyali yollarını etkili bir şekilde dönüştürür. TQ, kemoterapötik ilaçların antikanser aktivitesini iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda yan etkilerini de azaltır. Bununla birlikte TQ'nun çok düşük olumsuz etkileri olduğunu ve önemli bir toksisiteye sahip olmadığı araştırmalar sonucunda görülmüştür (135,136). TQ'nun kullanımının, metabolik sendromun yanı sıra inflammatuar ve oto-bağışıklık bozukluğu olan hastaların tedavisinde çok sayıda yararlı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (137). Yapılan bir çalışmada MTX, bağırsak dokularında oksidatif ve nitrozatif strese neden olarak inflammatuar ve apoptotik bağırsak hasarı oluşturmuş, TQ uygulaması ile bağırsak toksisitesi iyileşmiş böylece TQ'un antioksidan, anti-nitrozatif, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik mekanizmaları olduğu belirlenmiştir (138).

Biz de bu çalışmamızda sıçanlarda metotreksat ile oluşturulan akut böbrek hasarı modelinde güçlü bir antioksidan olan timokinonun etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmayı amaçladık.

İndirgenmiş glutatyon (GSH), hücre içinde bulunan düşük moleküler ağırlıklı tiyoldür. GSH, elektrofilik/oksidatif doku hasarı durumunda nükleofilik bir süpürücü ve enzim katalizli bir antioksidan görevi görür. Böylece GSH biyolojik yapıların ve fonksiyonların koruyucusu olarak önemli bir yere sahiptir (139). Mabrouk, A. ve Cheikh, H. B. (2016)'nin ratlar üzerinde yaptığı bir araştırmaya göre böbreklerde Pb (kurşun) intoksikasyonunda GSH seviyelerinde önemli bir azalma olduğu, TQ ile takviyenin antioksidan parametrelerini önemli ölçüde iyileştirdiği görülmüştür (140).

Khatab ve Nagi (2007)'nin yaptığı başka bir çalışmada azot (N) ile nitrik oksit sentez kronik inhibisyonu sonrasında sıçanlarda serum kreatinin seviyelerinde yükselme, GSH seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. TQ takviyesi alan sıçanlarda yükselen serum kreatininini önemli ölçüde düşürdüğü ve azalan GSH'ı normal seviyelere yükselttiği böylece bu sıçanlarda hipertansiyonu ve böbrek hasarını hafiflettiği görülmüştür (141). Sıçanlarda akrilamid (AA) kaynaklı toksisiteye karşı böbrek, karaciğer ve beyinde TQ'nun koruyucu etkisine bakılan Abdel-Daim, M. M. ve ark. yaptığı çalışmada akrilamid intoksikasyonu sonucu TQ takviyeli sıçan gruplarında çoğu serum parametresinde AA kaynaklı değişiklikleri normalleştirmiştir. Böbrek biyobelirteci serum üre ve kreatinin seviyelerinde azalma, GSH düzeylerinde yükselme görülmüştür. Karaciğer, böbrek ve beyin dokularındaki antioksidan kapasiteyi doza bağlı bir şekilde arttırmıştır (142). Bizim çalışmamızda biyokimyasal olarak ortalama böbrek dokusu GSH değerleri kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak azalırken, MTX grubuna göre, MTX +TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında da TQ alımına bağlı olarak anlamlı olarak arttığı görüldü. Kontrol grubu ile TQ alan gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. Çalışmamızda ortalama serum GSH değerleri kontrol grubuna göre, MTX ve MTX +TQ (20 mg/kg) gruplarda anlamlı olarak değişirken, MTX+TQ (50 mg/kg) grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklik olmadığı görüldü. Elde edilen veriler ışığında MTX'in sıçanlarda oksidatif stres oluşturduğunu TQ'un antioksidan etkisiyle bu stresi azalttığını söyleyebiliriz. Çalışmamızda biyokimyasal olarak ortalama serum üre değerleri kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak artarken, MTX grubuna göre, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında da artan TQ dozunun ortalama üre değerini azalttığı görüldü.

Çalışmamızda biyokimyasal olarak ortalama serum kreatinin değerleri kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak artarken, MTX grubuna göre, TQ verilen gruplarda da anlamlı olarak azaldığı görüldü. MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarında serum kreatinin değerinin istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü. Böylece çalışmamızın bulguları yapılan benzer çalışmalarda elde edilen bulgularla büyük oranda örtüştüğü görüldü.

MIOX, akut böbrek hasarının biyobelirteçlerinden myo-inositol katabolizmasının ilk ve hız kısıtlayıcı enzimi olup ağırlıklı olarak böbreklerden salınmaktadır (143).

KIM-1, bir tip-1 transmembran proteini olan üriner böbrek hasarı molekülüdür. Böbrekte hasarlı proksimal tübül apikal zarında eksprese edilir. KIM-1'in sıçanlarda böbrek hasarının olağanüstü bir göstergesi olduğu kanıtlanmıştır. KIM-1 birçok patofizyolojik duruma veya toksik maddeye yanıt olarak proksimal tübüldeki histopatolojik değişikliklerin öngörücüleri olarak BUN ve serum kreatinininden daha üstündür (144). Yapılan bir çalışmada akut böbrek hasarı tanısında, serum NGAL, IL-18, KIM-1 ve sistatin-C'nin etkin olduğunu saptanmıştır (145). Başka bir çalışmada hayvan deneylerinde toksik veya iskemik ABH'na yanıt olarak KIM-1 mRNA'nın hasar ve yeniden yapılanmanın özelliklerinin görüldüğü proksimal tübül epiteliyal hücrelerinde belirgin olarak arttığı belirlenmiştir (146). Pallio ve ark. (2019) yaptığı çalışmada doğal bir antioksidan olan miyo-inositolün (MI) etkileri, kadmium (Cd) yüklemesinden sonra fare böbreklerinde değerlendirilmiştir. Cd yüklemesi ile önemli ölçüde artan KIM-1 ve MIOX immünoreaktivitesi, MI ile tedavi sonrasında önemli ölçüde düşmüştür (147). Dutta D. K. ve ark. yaptığı çalışmada tübüle özgü MIOX aşırı ekspresyonu veya nakavtına sahip koşullu MIOX aşırı eksprese eden transgenik

(MIOX-TG) fareler ve MIOX nakavt (MIOX^{-/-}) fareler üretip, sisplatin ile tedavi edilen vahşi tip (WT) fareler ile karşılaştırıldığında, üre, kreatinin ve KIM-1 seviyelerinde daha da büyük artışlara ve daha fazla tübüler hasar ve apoptozise sahip oldukları ve bu etkilerin sisplatin ile tedavi edilen MIOX-TG farelerinde zayıfladığı görülmüştür (148). Mertoğlu ve ark. (2018) yaptığı çalışmada böbrek taşı tedavisinde yapılan retrograd intrarenal cerrahinin böbrek dokusuna etkisi incelenmiş serum MIOX düzeyinin böbrek hasarını göstermede yararlı olduğu ayrıca serum MIOX ve kreatinin değerleri arasında pozitif korelasyon olduğu belirlenmiştir (149). Bizim yaptığımız çalışmada biyokimyasal olarak ortalama böbrek dokusu MIOX değerinin kontrol grubuna göre MTX grubunda anlamlı olarak arttığı MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü. Serum ortalama MIOX değerinin kontrol grubuna göre en yüksek MTX grubunda olduğu, MTX grubuna göre MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında TQ alımına bağlı olarak MIOX değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Çalışmamızda böbrek dokusu ortalama KIM-1 değerinin kontrol grubuna göre en yüksek MTX grubunda olduğu görüldü. MTX grubuna göre, MTX+TQ (20 mg/kg) ve MTX+TQ (50 mg/kg) gruplarında TQ alımına bağlı olarak böbrek dokusu KIM-1 değerlerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Serum ortalama KIM-1 değerinin kontrol grubuna göre, MTX grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü. MTX grubuna göre, MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarında TQ alımına bağlı olarak serum KIM-1 değerlerinde anlamlı azalma görüldü. MTX + TQ (20 mg/kg) ve MTX + TQ (50 mg/kg) gruplarında serum KIM-1 değerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak fark görülmedi. Böylece çalışmamızın bulguları yapılan benzer çalışmalarda elde edilen bulgularla büyük oranda örtüştüğü görüldü.

Aşçı, H. ve Özer, M. (2011)'in yaptığı çalışmada sıçanlarda MTX grubuna ait karaciğer ve böbrek dokularının histolojik incelemelerinde oksidatif hasarın göstergesi olabilecek bulgular gözlenmiş, MTX ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, her iki dokuda, bu bulgular anlamlı iken, misoprostolün (MP) verilmiş MTX grubunda ise, bu histopatolojik değişikliklerde anlamlı ölçüde azalma olduğu belirtilmişti (150). Başka bir çalışmada MTX kullanımına bağlı gelişen karaciğer ve böbrek toksisitesini engellemek için, ekstrasellüler sıvılarda, bilinen en potent antioksidan olan C vitamini kullanılmış, MTX kullanımı sonucu oluşan Kc ve böbrek dokularındaki hasarın histopatolojik olarak azaldığını tesbit edilmiştir (151).

Çalışmamızın histopatolojik sonuçları yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Kontrol grubu normal histolojik görünümdeydi. Tübüler dejenerasyon ile tübülüs epitellerinde nekroz MTX grubunda orta düzeyde iken, MTX- TQ (20mg/kg) ve MTX- TQ (50mg/kg) gruplarında hafif düzeyde görüldü. Tübülüslerin lümenlerinde hiyalin birikim MTX grubunda şiddetli, MTX- TQ (20mg/kg) grubunda orta düzeyde, MTX- TQ (50mg/kg) grubunda ise önemli düzeyde görülemedi. Tespit edilen diğer histopatolojik bulgulardan hemoraji ise MTX grubunda şiddetli, MTX- TQ (20mg/kg) grubunda orta, MTX- TQ (50mg/kg) grubunda ise hafif düzeyde görüldü. İntersitisyel nefritis MTX grubunda şiddetli düzeyde iken, MTX- TQ (20mg/kg) ve MTX- TQ (50mg/kg) gruplarında hafif olarak belirlendi. Böylece çalışmamızın histopatoloji sonuçları biyokimyasal sonuçları destekler niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen bulgular ışığında sıçanlarda metotreksatın kullanımına bağlı olarak oksidatif stres ile böbrek hasarını oluşturduğu, timokinon kullanımının bu hasarı

başlıca antioksidan ve diğer pek çok tespit edilen özellikleri ile koruyucu olarak önlediği saptandı. Buna bağlı olarak TQ'nun, kemotropik ilaca bağlı yan etkilerin hafifletilmesinde ve dolayısıyla koruyucu hekimlik alanında değerlendirilebileceği kanaatine varılırken aynı zamanda metabolik yollar üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi açısından da farklı doz ve süreleri içeren ilave çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Yuluğ E, Türedi S, Alver A ve diğ. Effects of resveratrol on Methotrexate-induced testicular damage in rats. *Hindawi Publishing Corporation The ScientificWorld Journal*. 2013; Article ID 489659.
2. Isık A, Isılay L, Erdemli EA ve diğ. Sıçan testisinde Metotreksatın ısı ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1997; 50 (3): 125-129.
3. Jahovic N, Cevik H, Shirlı AO, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003 May; 34(4):282-7.
4. Bourguou, S., Pichette, A., Marzouk, B., ve Legault, J. (2010). Bioactivities of black cumin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *South African Journal of Botany*, 76(2), 210-216.5- Yüncü ve ark. *Gaziantep Tıp Dergisi* 2013;19(3): 180-184
5. Yüncü, M., Şahin, M., Bayat, N., ve İbrahim, S. (2013). Çörek otu yağının sıçan karaciğer gelişimine etkisi. *Gaziantep Medical Journal*, 19(3), 180-184.
6. Badary OA, Nagi MN, Al-Shabanah OA, Al-Sawaf HA, Al-Sohaibani MO, Al-Bekairi AM. Thymoquinone ameliorates the nephrotoxicity induced by cisplatin in rodents and potentiates its antitumor activity. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1997;75(12): 1356-1361.
7. Badary OA. Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *J. Ethnopharmacol*. 1999;67(2):135-142.
8. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule

containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 1998;273:4135-42.

9. Sabbiseti, V. S., Waikar, S. S., Antoine, D. J., Smiles, A., Wang, C., Ravisankar, A., ... ve Bonventre, J. V. (2014). Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(10), 2177-2186.
10. Gaut, J. P., Crimmins, D. L., Ohlendorf, M. F., Lockwood, C. M., Griest, T. A., Brada, N. A., ... ve Ladenson, J. H. (2014). Development of an immunoassay for the kidney-specific protein myo-inositol oxygenase, a potential biomarker of acute kidney injury. *Clinical chemistry*, 60(5), 747-757.
11. Mertoglu, C., Gunay, M., Gurel, A., ve Gungor, M. (2018). Myo-inositol oxygenase as a novel marker in the diagnosis of acute kidney injury. *Journal of medical biochemistry*, 37: 1–6, 2018.
12. Ürolojik Ve Genital Sistem Cerrahi Hastalıkları, Tedavisi Ve Hemşirelik Bakımı, 22.12.2021, <https://www.alikubilaykorkut.com/urolojik-genital-sistem-hastalik>)
13. Arınsoy, T., Güngör, Ö., ve Koçyiğit, İ. (2017). Böbrek Fizyopatolojisi.
14. Ellis, H. (1997). Clinical anatomy. *Journal of Anatomy*, 190(Pt 4), 631: 105-107
15. Üriner Sistem Anatomisi, 22.12.2021, <https://app.emaze.com/@AOLTWOFTZ#5>

16. Eaton, D. C., ve Pooler, J. P. (2009). Vander's renal physiology. Mc Graw Hil Medical: 2-21
17. Öner G. Böbrekler ve vücut sıvıları. İçinde: Tıbbi Fizyoloji, Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ, Aydın Z, Alican İ, (Çeviri editörleri). Textbook of Medical Physiology, Guyton AC, Hall JE. 10. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 2001: 280-281.
18. Kumar, V. (2018). Robbins patología humana. A. K. Abbas, ve J. C. Aster (Eds.). elsevier. 517
19. Ögütmen, M. B. (2011). *Akut böbrek yetmezliği. Göğüs-Kalp-Damar Anestezisi ve Yoğun Bakım Derneği Dergisi; Sayı: 2; 25-33.*
20. Horoz, M., & Özgür, Ö. (2004). *Akut böbrek yetmezliği. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1(3), 48-63*
21. Özelsancak, R. Akut Böbrek Hasarının Yeni Biyobelirteçleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 22(2), 221-229.*
22. Ögütmen, M. B. (2011). *Akut böbrek yetmezliği. Göğüs-Kalp-Damar Anestezisi ve Yoğun Bakım Derneği Dergisi, 2011(2), 25-33.*
23. Mertoğlu, C. (2019). Ratlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında erken bir biyobelirteç olarak MYO-inositol oksijenaz düzeyi.
24. Wagener, G., Jan, M., Kim, M., Mori, K., Barasch, J. M., Sladen, R. N., ve Lee, H. T. (2006). Association between increases in urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute renal dysfunction after adult cardiac surgery. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists, 105(3), 485-491.*
25. Jaya, M., Catherine, D., ve Ridwan, T. (2005). Mitsnefes Mark M, Ma Qing, Kelly Caitlin, Ruff Stacey M, Zahedi Kamyar, Shao Mingyuan, Bean Judy,

- Mori Kiyoshi, Barasch Jonathan, Devarajan Prasad. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet*, 365(9466), 1231-8.
26. Rickli, H., Benou, K., ve Ammann, P. (2006). Time course of serial cystatin C among different clinical presentations. *Kidney Int*, 69, 399-405.
27. Metnitz, P. G., Krenn, C. G., Steltzer, H., Lang, T., Ploder, J., Lenz, K., ... ve Druml, W. (2002). Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *Critical care medicine*, 30(9), 2051-
28. Altuntaş, R., ve Orak, Y. 65-80 Yaş Arası Hastalarda Akut Böbrek Hasarı Ve Mortalite Belirteçleri.
29. Set, T., ve Şahin, E. M. (2003). Birinci basamak hekimi için böbrek fonksiyon testleri. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 12, 344.
30. Böbrek Hastalıklarında Biyokimyasal Değişiklikler, 28.02.2022, <https://slideplayer.biz.tr/slide/10587514/>
31. Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 2000;80(3):1107-213.
32. Odek, U. (2010). *Karbonhidratla Birlikte Kreatin Yuklemesinin Genç Sporcularda Anaerobik Performans Ve Vücut Kompozisyonu Üzerine Etkisi*. Unpublished Master Thesis, Spor Bilimleri Ve Teknolojisi Programı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üni., Ankara.
33. Persky AM, Brazeau GA. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev* 2001;53(2):161-76.
34. Porter, R. S., ve Kaplan, J. L. (2011). The Merck manual of diagnosis and therapy. Merck Sharp & Dohme Corp.

35. Berne RM, Levy MN. (2008). Fizyoloji. (5. Bs.). (Türk Fizyolojik Bilimler Derneği çev.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
36. Clerico, A., Galli, C., Fortunato, A., ve Ronco, C. (2012). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury: a review of the laboratory characteristics and clinical evidences. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 50(9), 1505-1517.
37. Çakırca, M. (2021). Bölüm 7 Ortopedi Hastalarında Preoperatif Değerlendirme. Peroperatif Hasta Yönetimi, 67.
38. Ichimura, T., Brooks, C. R., ve Bonventre, J. V. (2012). KIM-1/Tim-1 and immune cells: shifting sands. *Kidney international*, 81(9), 809-811.
39. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R., ve Bonventre, J. V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tübüle injury. *Kidney international*, 62(1), 237-244.
40. Altun, D. A., ve Bozkurt, D. D. A. Perkütan Nefrolitotomi Ve Fleksible Üreterorenoskopi Yapılan Hastalarda Serum KIM-1 Ve MIOX Düzeylerinin Karşılaştırılması.
41. Bonventre, J. V. (2008). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(sup241), 78-83.
42. Arner RJ, Prabhu KS, Reddy CC. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:1386–1392.
43. Li, Z., Liu, Z., Wei, Y., Liu, Y., Xing, L., Liu, M., ... ve Peng, R. (2021). Genome-wide identification of the MIOX gene family and their expression

- profile in cotton development and response to abiotic stress. *Plos one*, 16(7), e0254111.
- 44.Sharma, I., Deng, F., ve Kanwar, Y. S. (2020). Modulation of Renal Injury by Variable Expression of Myo-Inositol Oxygenase (MIOX) via Perturbation in Metabolic Sensors. *Biomedicines*, 8(7), 217.
- 45.Sharma, I., Deng, F., Liao, Y., ve Kanwar, Y. S. (2020). Myo-inositol oxygenase (MIOX) overexpression drives the progression of renal t b lointerstitial injury in diabetes. *Diabetes*, 69(6), 1248-1263.
- 46.Deng, F., Sharma, I., Dai, Y., Yang, M., ve Kanwar, Y. S. (2019). Myo-inositol oxygenase expression profile modulates pathogenic ferroptosis in the renal proximal tübüle. *The Journal of clinical investigation*, 129(11), 5033-5049.
- 47.Mertoglu, C., Ozmen, Z. C., Firat, F., Arici, A., Unsal, V., ve Erdemir, F. (2020). Effectiveness of myo-inositol oxygenase in the early diagnosis of experimental acute kidney injury. *Bratislavske Lekarske Listy*, 121(8), 565-570.
- 48.Mertoglu, C., Gunay, M., Gurel, A., ve Gungor, M. (2018). Myo-inositol Oxygenase as a Novel Marker in the Diagnosis of Acute Kidney Injury. *Journal of Medical Biochemistry*, 37(1), 1.
- 49.Gaut JP, Crimmins DL, Ohlendorf MF, Lockwood CM, Griest TA, Brada NA, Hoshi M, Sato B, Hotchkiss RS, Jain S, Ladenson JH. Development of an immunoassay for the kidney-specific protein myo-inositol oxygenase, a potential biomarker of acute kidney injury. C.
- 50.Dickinson, D. A., ve Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), 1019-1026.

51. Forman, H. J., Zhang, H., ve Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1-12.
52. Nelson, D. L., ve Cox, M. M. (2005). Lehninger biyokimyanın ilkeleri (Çevirici: Nedret K.). Palme Yayıncılık., 842
53. Kanat, N., ve Akdemir, S. (2014). Bakterilerde glutatyon ve önemi. *Sakarya University Journal of Science*, 18(2), 111-117.
54. Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 42-59.
55. Eren, E., Alper, A. T. A., ve Arıcan, A. (2012). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve nefrotoksisite. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 229-235.
56. Vural N. Toksikoloji. Baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 2005.
57. Yurdun, T. Analitik Toksikolojinin Önemi Ve Türkiye’deki Akut Zehirlenmelerin Değerlendirilmesi. Prof. Dr. Emre Murad Albek Anısına, 56.
58. Padmanabhan S, Tripathi DN, Vikram A ve diğ. Methotrexate induced cytotoxicity and genotoxicity in germ cells of mice: Intervention of folic and folinic acid. *Mutation Research*. 2008; 673/s 43–52.
59. Uzar E. Metotreksat uygulanan ratların siyatik sinir ve medulla spinalisinde oksidan /antioksidanların durumu: Kafeik asit fenetil ester’in antioksidan koruyucu etkisi. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı. 2006.
60. Kayaalp, O. S., ve Farmakoloji, T. (1990). 5. baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara.

- 61.Dökmeci İ. Farmakoloji ilaçlar ve etkileri (1.Baskı), Alfa Yayınları, İstanbul, 2007
- 62.Aşcı H *Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi*. Tıpta Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 2010.
- 63.Şentürk, N. (2016). Metotreksat. Türkderm: Türk Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi= Türkderm: Türk Dermatoloji ve Zührevi Arşivi, 50, 20.
- 64.Weli, S. H. W. (2022). *Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Böbrek Toksisitesi Üzerine Ellagik Asidin Koruyucu Etkisi* (Doctoral Dissertation).
- 65.Seçgin, Ş. (2021). *Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Böbrek Toksisitesi Üzerine Morinin Koruyucu Etkisi* (Doctoral Dissertation).
- 66.Jahovic, N., Çevik, H., Şehirli, A. Ö., Yeğen, B. Ç., ve Şener, G. (2003). Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of pineal research*, 34(4), 282-287.
- 67.Ueland, P. M. (1982). Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Pharmacological Reviews*, 34(3), 223-253.
- 68.Bangert CA, Costner MI. Methotrexate in dermatology. *Dermatol Ther* 2007;(4):216-28.
- 69.Roenigk HHJr, Auerbach R, Malbach H et al. Methotrexate in psoriasis: consensus conference. *J Am Acad Dermatol* 1998;38:478-85.
- 70.Karyağar EN. *Uzun süreli Metotreksat tedavisi alan juvenil idiyopatik artritli çocuklarda folik asit desteğinin plazma total homosistein düzeyine etkisi*.

Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı İstanbul Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, 2006.

71.Eray İC. *Deneyisel kolit modeli üzerine glutamin, N-asetil sistein ve intrarektal Metotreksat'ın etkilerinin incelenmesi*. Uzmanlık Tezi Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı. 2009.

72.Hannoodde, M., ve Mittal, M. (2020). Methotrexate. StatPearls.

73.Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliosıçanes methotrexateinduced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit*. 2006;12:BR274-78.

74.Jahovic N, Cevik H, Sehirli Ao, Yeğen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *J Pineal Res*. 2003;34:282-7

75.Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Neutrophil infiltsıçanion and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. *Chemotherapy*. 2009;55:83-90

76.Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scand J Gastroenterol*. 2004;39:1119-27.

77.Cağlar Y, Ozgür H, Matur I, Yenilmez ED, Tuli A, Gönluşen G, Polat S. Ultrastructural evaluation of the effect of Nacetylcysteine on methotrexate nephrotoxicity in rats. *Histol Histopathol* 2013; 28: 865-74

78.Sarıkaya M, Yıldırım M, Sarı F. Hemodiyaliz uygulanan hastalarda kemoterapi. *ACU Sağlık Bil Derg* 2013; 4: 1-5.

79. Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Aydoğdu İ. Kanser kemoterapisi ve böbrek. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2009; 16: 63-8
80. Vardi, N., Parlakpınar, H., Ates, B., Cetin, A., ve Otlı, A. (2013). The protective effects of *Prunus armeniaca* L (apricot) against methotrexate-induced oxidative damage and apoptosis in rat kidney. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69(3), 371-381.
81. Evren, K., Beytur, A., Vardı, N., Türköz, Y., Ekinci, N., ve Ekincioglu, Z. (2011). Metotreksat'ın neden olduğu akut böbrek hasarına karşı montelukast'ın etkileri. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 18(2), 73-77.
82. Kocaman, N., ve Çolakoğlu, N. (2013). Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Böbrek Dokusu Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*, 18(4), 198-202.
83. Oksidatif Stres ve Antioksidan Kapasite, 22.12.2021, https://ir.clinic/oksidatif_stres_antioksidan_kapasite
84. Kasapçopur Özel, G. S., ve Birdane, Y. O. (2014). Antioksidanlar.
85. Di Meo, S., ve Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 9829176
86. Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4 (1), 0-0.
87. Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., ve Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 178, 687–704.
88. Jakubczyk, K., Dec, K., Kałduńska, J., Kawczuga, D., Kochman, J., ve Janda, K. (2020). Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative

- damage. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 48(284), 124–127.
89. Halliwell B, Gutteridge JMc. Free radical in biology and medicine (Third ed). Oxford: Oxford University Press, 2000.
90. Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar . *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1 (1) , 65-76. DOI: 10.24880/maeuofd.260790
91. Akkus I. Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza, Konya, 1995.
92. Naito Y, Lee MC, Kato Y ve diğ. Oxidative stress markers. *Anti-Aging Medicin*. 2010; 7(5): 36–44.
93. Yılmaz, S. (2018). Serviks Kanseri Hücre Hattında Timokinonun Sisplatin Sitotoksitesine Etkilerinin İncelenmesi.
94. Aslan, R. (2019). Siyah Reçete: Çörek Otu (Nigella Sativa). *Ayrıntı Dergisi*, 7(74).
95. Çakmakçı, S., ve Çakır, Y. (2011). çörekotu (Nigella sativa L.): Bileşimi, Gıda Sanayinde Kullanımı ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Academic Food Journal/Akademik Gıda*.
96. Datta, AK, Saha, A., Bhattacharya, A., Mandal, A., Paul, R., ve Sengupta, S. (2012). Çörek otu (Nigella sativa L.)–bir inceleme. *Bitki geliştirme bilimleri dergisi* , 4 (1), 1-43.
97. Altuncu, M., ve Gıdık, B. Çörek otu (Nigella sativa L.) Bitkisinin Kullanım Alanları ve Önemi. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 149-153.
98. Gali-Muhtasib, H., El-Najjar, N., ve Schneider-Stock, R. (2006). Çörek otu (Nigella sativa) ve bileşenlerinin tıbbi potansiyeli. *Bitkisel Tıpta Gelişmeler* , 2 , 133-153.

99. Gholamnezhad, Z., Havakhah, S., ve Boskabady, M. H. (2016). Preclinical and clinical effects of *Nigella sativa* and its constituent, thymoquinone: A review. *Journal of ethnopharmacology*, 190, 372–386.
100. Majdalawieh, A. F., ve Fayyad, M. W. (2015). Immunomodulatory and anti-inflammatory action of *Nigella sativa* and thymoquinone: A comprehensive review. *International immunopharmacology*, 28(1), 295–304.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.06.023>
101. Imran, M., Rauf, A., Khan, I. A., Shahbaz, M., Qaisrani, T. B., Fatmawati, S., Abu-Izneid, T., Imran, A., Rahman, K. U., ve Gondal, T. A. (2018). Thymoquinone: A novel strategy to combat cancer: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 106, 390–402.
102. Ermumcu, M. Ş. K., ve Şanlıer, N. (2017). black cumin (*Nigella sativa*) and its active component of thymoquinone: Effects on health. *Food and Health*, 3(4), 170-183.
103. Woo, C. C., Kumar, A. P., Sethi, G., ve Tan, K. H. (2012). Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(4), 443–451.
104. Çam, S. A. (2019). Deneysel Alzheimer Hastalık Modeli Oluşturulan Sıçanlarda *Nigella Sativa* I. ve Timokinon'un Etkileri (Doctoral dissertation, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
105. Güllü, E. B., ve Gülcan, A., (2013). Timokinon: *Nigella Sativa*'nın biyoaktif komponenti. *Kocatepe Veterinary Journal*, 6(1), 51-61.

106. Asal Ulus, C., Sökülmez Kaya, P., ve Taşçı, B. (2018). Çörek Otu Tohumunun Kimyasal Bileşimi ve İnsan Sağlığındaki Yeri. *Samsun Sağlık Bil Derg.* 3 (1): 25, 29.
107. Salomi M J, Nair SC, Panikkar KR. Inhibitory effects of *Nigella sativa* and saffron (*Crocus sativus*) on chemical carcinogenesis in mice. *Nutr. Cancer.* 1991;16(1): 67-72.
108. Abdel-Fattah AM, Matsumoto K, Watanabe H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000;400(1)89-97.
109. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials, *Pharmacological Research*, 2015, 95–96:138–158.
110. Kal, S. (2019). *GC-MS ile çörek otu (Nigella sativa) yağının içeriğinin analizi* (Master's thesis, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
111. Amin, B., ve Hosseinzadeh, H. (2016). Black Cumin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects. *Planta medica*, 82(1-2), 8–16.
112. Mollazadeh, H., ve Hosseinzadeh, H. (2014). The protective effect of *Nigella sativa* against liver injury: a review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 17(12), 958.
113. Güzelsoy, P., Aydın, S., ve Başaran, N. (2018). Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 7(2), 118-135.

114. Khan, M. A., Tania, M., ve Fu, J. (2019). Epigenetic role of thymoquinone: impact on cellular mechanism and cancer therapeutics. *Drug discovery today*, 24(12), 2315–2322. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.007>
115. Khan A, Chen H, Tania M, Zhang D. Anticancer activities of Nigella sativa (black cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8:226-232.
116. El-Far A. H. (2015). Thymoquinone Anticancer Discovery: Possible Mechanisms. *Current drug discovery technologies*, 12(2), 80–89. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150716111821>
117. Mahmoud, Y. K., ve Abdelrazek, H. (2019). Cancer: Thymoquinone antioxidant/pro-oxidant effect as potential anticancer remedy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 115, 108783.
118. Noorbakhsh, M. F., Hayati, F., Samarghandian, S., Shaterzadeh-Yazdi, H., ve Farkhondeh, T. (2018). An Overview of Hepatoprotective Effects of Thymoquinone. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 9(1), 14–22.
119. Badary, O. A., Hamza, M. S., ve Tikamdas, R. (2021). Thymoquinone: A promising natural compound with potential benefits for COVID-19 prevention and cure. *Drug design, development and therapy*, 15, 1819.
120. Isaev, N. K., Chetverikov, N. S., Stelmashook, E. V., Genrikhs, E. E., Khaspekov, L. G., ve Illarioshkin, S. N. (2020). Thymoquinone as a Potential Neuroprotector in Acute and Chronic Forms of Cerebral Pathology. *Biochemistry. Biokhimiia*, 85(2), 167–176.
121. Ali, M. Y., Akter, Z., Mei, Z., Zheng, M., Tania, M., ve Khan, M. A. (2021). Thymoquinone in autoimmune diseases: Therapeutic potential and molecular

- mechanisms. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 134, 111157.
122. Cascella, M., Palma, G., Barbieri, A., Bimonte, S., Amruthraj, NJ, Muzio, MR, ... ve Cuomo, A. (2017). Çörek otu ve onu oluşturan timokinonun kemoterapinin neden olduğu nefrotoksisite üzerindeki rolü: deneysel hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar. *Besinler* , 9 (6), 625.
123. Ragheb, A., Attia, A., Eldin, W. S., Elbarbry, F., Gazarin, S., ve Shoker, A. (2009). The protective effect of thymoquinone, an anti-oxidant and anti-inflammatory agent, against renal injury: a review. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, 20(5), 741.
124. Yonca, S. S. (2015). Timokinon'un streptozotosin ile oluşturulan tip 1 diyabette damar hasarı üzerine etkisi/Effect of thymoquinon on vascular damage caused by streptozotocin-induced TYPE-1 diabetes.
125. Aşcı, H., ve MK, Ö. (2010). Metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında misoprostolün koruyucu etkisi (Doctoral dissertation, SDÜ Tıp Fakültesi).
126. Çam, S. A. (2019). *Deneysel Alzheimer Hastalık Modeli Oluşturulan Sıçanlarda Nigella Sativa I. ve Timokinon'un Etkileri* (Doctoral dissertation, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
127. Ehlivan, DY ve Durdağı, G. (2020). Doksorubisin Kardiyotoksitesinde Timokinonun Kan Parametreleri Üzerine Etkileri. *Deneysel ve Uygulamalı Tıp Bilimi* , 1 (1), 7-16.
128. Tian, H., ve Cronstein, B. N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 65(3), 168-173.

129. Jolivet, J., Cowan, K. H., Curt, G. A., Clendeninn, N. J., ve Chabner, B. A. (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *New England Journal of Medicine*, 309(18), 1094-1104.
130. Demiryilmaz, I., Sener, E., Cetin, N., Altuner, D., Suleyman, B., Albayrak, F., ... ve Suleyman, H. (2012). Biochemically and histopathologically comparative review of thiamine's and thiamine pyrophosphate's oxidative stress effects generated with methotrexate in rat liver. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 18(12), BR475.
131. Devrim, E., Çetin, R., Kılıçoğlu, B., İmge Ergüder, B., Avcı, A., ve Durak, İ. (2005). Metotreksat sıçan böbrek dokularında oksidatif strese neden olur. *Böbrek yetmezliği*, 27 (6), 771-773.
132. Vardi, N., Parlakpınar, H., Ateş, B., Çetin, A., ve Otlı, A. (2013). Sıçan böbreğinde metotreksat kaynaklı oksidatif hasar ve apoptoza karşı *Prunus armeniaca* L'nin (kayısı) koruyucu etkileri. *Fizyoloji ve biyokimya dergisi*, 69 (3), 371-381.
133. Kisaoglu, A., Borekci, B., Yapca, O. E., Bilen, H., ve Suleyman, H. (2013). Tissue damage and oxidant/antioxidant balance. *The Eurasian journal of medicine*, 45(1), 47.
134. Sabuncuoğlu, S., ve Özgüneş, H. (2011). Sisplatin Toksisitesi: Oksidatif Stresin Önemi Ve Antioksidanların Etkisi. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 74(1), 18-25.

135. Darakhshan, S., Pour, A. B., Colagar, A. H., ve Sisakhtnezhad, S. (2015). Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological research*, 95, 138-158.
136. Gupta, B., Ghosh, K. K., ve Gupta, R. C. (2016). *Thymoquinone. In Nutraceuticals* (pp. 541-550). Academic Press.
137. Ruffmann, R., ve Wendel, A. (1991). GSH rescue by N-acetylcysteine. *Klinische Wochenschrift*, 69(18), 857–862.
138. Tavakkoli, A., Mahdian, V., Razavi, B. M., ve Hosseinzadeh, H. (2017). Review on clinical trials of black seed (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone. *Journal of pharmacopuncture*, 20(3), 179.
139. El-Sheikh, A. A., Morsy, M. A., ve Hamouda, A. H. (2016). Protective mechanisms of thymoquinone on methotrexate-induced intestinal toxicity in rats. *Pharmacognosy Magazine*, 12(Suppl 1), S76.
140. Mabrouk, A., ve Cheikh, H. B. (2016). Thymoquinone ameliorates lead-induced suppression of the antioxidant system in rat kidneys. *Libyan Journal of Medicine*, 11(1), 31018.
141. Khattab, M. M., ve Nagi, M. N. (2007). Thymoquinone supplementation attenuates hypertension and renal damage in nitric oxide deficient hypertensive rats. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(5), 410-414.
142. Abdel-Daim, M. M., El-Ela, F. I. A., Alshahrani, F. K., Bin-Jumah, M., Al-Zharani, M., Almutairi, B., ... ve Alkahtani, S. (2020). Protective effects of thymoquinone against acrylamide-induced liver, kidney and brain oxidative

- damage in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(30), 37709-37717.
143. Mertoğlu, C. (2019). Ratlarda böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında erken bir biyobelirteç olarak MYO-inositol oksijenaz düzeyi.
144. Bonventre, J. V. (2008). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 68(sup241), 78-83.
145. Büget, M. İ., Özkilitçi, E., Küçükgergin, C., Seçkin, Ş., Küçükay, S., Yenigün, Y., ... ve Özcan, P. E. (2014). Akut Böbrek Yetmezliğinde Erken Tanı: Nötrofil Gelatinoz İlişkili Lipokain (NGAL), Kidney İnjury Molekül-1 (KIM-1), ve İnterloklin-18 (İL-18), Sistatin-C. *Journal of the Turkish Society of Intensive Care/Türk Yogun Bakım Derneği Dergisi*, 12(3).
146. Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L., ve Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *Journal of Biological Chemistry*, 273(7), 4135-4142.
147. Pallio, G., Micali, A., Benvenga, S., Antonelli, A., Marini, H. R., Puzzolo, D., ... ve Minutoli, L. (2019). Myo-inositol in the protection from cadmium-induced toxicity in mice kidney: An emerging nutraceutical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110675.
148. Dutta, R. K., Kondeti, V. K., Sharma, I., Chandel, N. S., Quaggin, S. E., ve Kanwar, Y. S. (2017). Beneficial effects of myo-inositol oxygenase deficiency

in cisplatin-induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(5), 1421-1436.

149. Mertoglu, C., Bozkurt, A., Keskin, E., ve Gunay, M. (2018). Evaluation of the effect of retrograde intrarenal surgery with myo-inositol oxygenase. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 34(1), 170.

150. Halil, A. ve Mehmet, Ö. (2011). Protective effect of misoprostol in methotrexate induced liver and kidney damage. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2(2), 125-126.

151. Savran, M. (2011). Ratlarda metotreksat kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarında C vitamininin koruyucu etkisinin araştırılması.

EKLER

EK 1: Etik Kurulu Onay Sayfası

TOPLANTI TARİHİ : 29.12.2020

TOPLANTI SAYISI : 14

KARAR NO 198: Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü, Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.T.Abdülkadir ÇOBAN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Timokinonun Sıçanlarda Metotreksat İle İndüklenen Böbrek Hasarı Üzerine Etkisinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak İncelenmesi”** isimli araştırma çalışması ile ilgili 21.12.2020 tarihli ve 77040475-641.04-E.2000316380 sayılı Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Hukuk Müşavirliğinin yazısı ekindeki Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Rektörlüğü, Genel Sekreterliğinin 17.12.2020 tarihli ve E-88012460-050.99-48616 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

