

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DOKSORUBİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL BÖBREK  
HASARINDA OKSOLAMİN'İN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Zeynep KILINÇ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Bilge AYGEN**

**ELAZIĞ  
2015**

## DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr.Murad Atmaca

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Emir DÖNDER

### **İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı**

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

Prof. Dr. Bilge AYGEN

\_\_\_\_\_

### **Danışman**

### **Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalına adım attığım Temmuz 2011 tarihinden itibaren ihtisas sürem boyunca katkılarını gördüğüm tüm hocalarıma, Prof. Dr. Emir DÖNDER'e, tez konumun seçilmesi ve çalışmalarımın yürütülmesinde destek ve katkılarını esirgemeyen, daima sabırla ve güleryüzüyle kendisinden asistanlığım boyunca çok şey öğrendiğim çok değerli danışman hocam Nefroloji B.D Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bilge AYGEN'e, tüm İç Hastalıkları ABD Öğretim Üyelerine, Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, tez yapım aşamalarında katkılarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Dr. Hilal OĞUZ'a, son olarak, yalnızca asistanlığım süresince değil tüm hayatım boyunca desteğini ve güvenini her zaman yanımda hissettiğim, sevgili anne ve babama, birlikte paylaştığımız hayatın her aşamasında büyük fedakarlığını ve desteğini gördüğüm sevgili eşim, hayat arkadaşım İsmail KILINÇ'a ve uzmanlık eğitimim süresince her türlü sıkıntımı paylaşan, büyük bir özveriyle bana destek olan hayatımın anlamı olan çocuklarım, Mesih Veysi KILINÇ, Mustafa Celalettin KILINÇ ve Fatma Nurcihan KILINÇ'a teşekkür ederim.

**Dr. Zeynep KILINÇ**

## ÖZET

Doksorubisin, antrasiklin türevi, antineoplastik bir ajandır. Klinik etkinliğini doza bağlı toksik yan etkileri sınırlandırır. Kalp, böbrek ve karaciğerde toksik yan etkileri görülmektedir. Oksolamin, antitusif bir ajandır. Oksolamin ayrıca analjezik, antiinflamatuvar, lokal anestezi ve antispazmodik özelliklere sahiptir. Bu çalışmada doksorubisin ile oluşturulan böbrek hasarına karşı oksolaminin etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 24 yetişkin erkek Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Grup I (Kontrol, n=6), Grup II (Doksorubisin, n=6), Grup III (Doksorubisin+oksolamin, n=6), Grup IV (Oksolamin, n=6) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Doksorubisin grubuna tek doz doksorubisin 15 mg/kg i.p. olarak verildi. Doksorubisin+oksolamin grubuna tek doz doksorubisin 15 mg/kg i.p. ve daha sonra 7 gün süresince oksolamin 50 mg/kg/gün i.p. olarak verildi. Oksolamin grubuna ise deney süresince oksolamin 50 mg/kg/gün i.p. olarak verildi. İlaçların uygulanmasını takiben ratlardan alınan böbrek kesitleri % 10'luk nötral tamponlanmış formalinde tespit edildi. Alınan doku örnekleri hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altında incelendi. TUNEL boyama ile apoptoz değerlendirildi. Spektrofotometrik yöntemle MDA düzeyleri değerlendirildi. ASIC3, MMP-2, MMP-9 immünreaktivitesi için immünohistokimyasal boyama yapılarak renal doku örnekleri ışık mikroskopisi altında incelendi.

Doksorubisin grubunda hem glomerüller hem tübüler apoptotik indeks kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ( $p<0.05$ ). Doksorubisin grubuna göre, doksorubisin+oksolamin grubunda glomerül ve tübülde apoptotik indeks daha düşük düzeyde bulundu. Doksorubisin grubunda renal doku MDA düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Doksorubisin grubuyla karşılaştırıldığında doksorubisin+oksolamin grubu renal doku MDA düzeyinde anlamlı değişiklik izlenmedi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında doksorubisin grubunda böbrek doku MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu. Doksorubisin+oksolamin grubunda renal doku MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 düzeyleri doksorubisin grubuna göre anlamlı olarak daha düşük saptandı.

Sonuç olarak doksorubisin uygulanan ratlara oksolamin verilmesi renal doku MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 düzeylerini ve apoptotik indeksi anlamlı şekilde

azaltarak doksorubisin nefrotoksisitesi gelişimini önlemede olumlu etkiler sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Doksorubisin, oksolamin, ASIC3, MMP-2, MMP-9

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF OXOLAMINE ON DOXORUBICIN INDUCED EXPERIMENTAL RENAL DAMAGE

Doxorubicin is an anthracycline derivative and is antineoplastic agents. Clinical effectiveness is restricted due to dose-limiting toxic side effects. Toxic side effects is seen in cardiac, renal and liver. Oxolamine is a antitussive agent. Oxolamine also possesses analgesic, antiinflammatory, local anaesthetic and antispasmodic properties. The aim of present study was to investigate the effects of oxolamine in doxorubicine induced kidney injury.

Twentyfour adult, male Wistar albino rats were used and were divided into four groups: I, control (n=6); II, doxorubicin (n=6); III, doxorubicine+oxolamine, (n=6); IV, oxolamine (n=6). In the doxorubicin group; the animals were treated with single dose 15 mg/kg/i.p. doxorubicin. In the doxorubicin+oxolamine group; the animals were treated with single dose 15 mg/kg/i.p. doxorubicin and also during experiment rats are treated oxolamine 50 mg/kg/i.p. dose per day total 7 day. In the oxolamine group were treated with oxolamine 50 mg/kg/i.p. dose per day during experiment. After administration of the drugs, the rats were decapitated and their kidneys were removed and fixed in 10% neutral buffered formalin. Tissue samples were stained with H&E (Hematoxylin-Eosin) and histological examined with light microscopy. Apoptosis was evaluated with TUNEL staining. MDA levels were evaluated with spectrophotometric method. Immunohistochemical stain is done for ASIC3, MMP-2, MMP-9 and investigate by light microscopy.

Both glomerular and tubular apoptotic index in doxorubicin group was significantly higher than the control group ( $p<0.05$ ). Glomerular and tubular apoptotic index in doxorubicin+oxolamine group was lower than doxorubicin group. Renal tissue MMP-2, MMP-9 and ASIC3 levels in doxorubicin group was significantly higher compared to control group. Renal tissue MMP-2, MMP-9 and ASIC3 levels in doxorubicin+oxolamine group was significantly lower compared to doxorubicin group.

As a result giving oxolamine to doxorubicin applied rats can provide positive effects in preventing the development of doxorubicin nephrotoxicity via significantly lowering renal tissue MMP-2, MMP-9 and ASIC3 levels and also apoptotic index.

**Key words:** Doxorubicin, oxolamine, ASIC3, MMP-2, MMP-9

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>ii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Böbrek	2
1.1.1. Böbreğin Yapısı	2
1.1.2. Böbreğin Kan Dolaşımı	3
1.1.3. Nefronun Yapısı	3
1.1.4. Böbreğin Fonksiyonlar	7
1.1.4.1. Vücut Elektrolit Dengesinin Korunması ve Sürdürülmesi	8
1.1.4.2. Metabolik Atık Ürünlerin Atılımı	9
1.1.4.3. Böbreklerin Endokrin Fonksiyonu	10
1.2. Dokсорubisin	10
1.2.1. Dokсорubisin Yapısı	10
1.2.2. Etki Mekanizması	11
1.2.3. Dokсорubisin Farmakokinetiği	12
1.2.4. Dokсорubisinin Yan Etkileri	13
1.2.4.1. Genel Yan Etkiler	13
1.2.4.2. Kardiyotoksisite	14
1.2.4.3. Dokсорubisine Bağlı Nefrotoksisite	15
1.2.5. Dokсорubisin ve Apoptosis	18
1.2.6. Deneysel Model Olarak Dokсорubisin Nefrotoksisitesi	20
1.3. Matriks Metalloproteinazlar	21
1.3.1. Latent MMP'lerin Aktivasyon Mekanizmaları	24
1.3.2. MMP Ekspresyonunun Regülasyonu	26

1.3.3. Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörlerinin (TIMP) Yapıları ve Fonksiyonları	27
1.3.4. Jelatinazlar	28
1.3.4.1. Jelatinazlar ve Böbrek	29
1.4. Malondialdehit (MDA)	30
1.5. ASIC (Aside Duyarlı İyon Kanalları)	31
1.6. Oksolamin	34
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>36</b>
2.1. Deney Hayvanları	36
2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	37
2.3. Örneklerin Alınması	37
2.4. Malondialdehit Çalışması	37
2.5. TUNEL Metodu	38
2.6. İmmünohistokimyasal İnceleme	39
2.7. İstatistiksel Analiz	41
<b>3. BULGULAR</b>	<b>42</b>
3.1. Malondialdehit Düzeyi	42
3.2. TUNEL Boyama Sonuçları	42
3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	45
3.3.1. Matriks Metalloproteinaz-2 İmmünreaktivitesi	45
3.3.2. Matriks Metalloproteinaz-9 İmmünreaktivitesi	49
3.3.3. Aside Duyarlı İyon Kanalı 3 İmmünreaktivitesi	51
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>55</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>63</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>81</b>

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Doksorubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri	13
<b>Tablo 2.</b>	Matriks metalloproteinaz ailesinin üyeleri	23
<b>Tablo 3.</b>	Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler	29
<b>Tablo 4.</b>	Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşenleri	36
<b>Tablo 5.</b>	TUNEL Boyama Prosedürü	39
<b>Tablo 6.</b>	İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	40
<b>Tablo 7.</b>	Histoskor	45

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Nefronun yapısı	4
<b>Şekil 2.</b>	Glomerüler kapiller membran	5
<b>Şekil 3.</b>	Dokso rubisin yapısı	10
<b>Şekil 4.</b>	Matriks metalloproteinaz enzimlerinin moleküler yapısı	22
<b>Şekil 5.</b>	Latent MMP'lerin Aktivasyon Mekanizmaları	25
<b>Şekil 6.</b>	Fibrinolitik sistem ve MMP'ler	25
<b>Şekil 7.</b>	MT1-MMP ve TIMP-2 tarafından proMMP-2 aktivasyon modeli	26
<b>Şekil 8.</b>	Matriks metalloproteinaz-9	28
<b>Şekil 9.</b>	Aside duyarlı iyon kanallarının yapısı	31
<b>Şekil 10.</b>	Aside duyarlı iyon kanallarının intrasellüler ve ekstrasellüler moleküler sinyallerle modülasyonu	32
<b>Şekil 11.</b>	Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MDA düzeyleri	42
<b>Şekil 13.</b>	Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler	43
<b>Şekil 14.</b>	Oksolamin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler	44
<b>Şekil 15.</b>	Dokso rubisin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler	44
<b>Şekil 16.</b>	Dokso rubisin+OXO grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler	45
<b>Şekil 17.</b>	Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MMP-2 düzeyleri	46
<b>Şekil 18.</b>	Kontrol grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi	46
<b>Şekil 19.</b>	Dokso rubisin grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi	47
<b>Şekil 20.</b>	Dokso rubisin+OXO grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi	48
<b>Şekil 21.</b>	Oksolamin grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi	48
<b>Şekil 22.</b>	Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MMP-9 düzeyleri	49
<b>Şekil 23.</b>	Kontrol grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi	49
<b>Şekil 24.</b>	Dokso rubisin grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi	50
<b>Şekil 25.</b>	Dokso rubisin+OXO grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi	50
<b>Şekil 26.</b>	Oksolamin grubuna ait renal doku MMP-9 immünreaktivitesi	51

<b>Şekil 27.</b>	Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu ASIC3 düzeyleri	52
<b>Şekil 28.</b>	Kontrol grubuna ait böbrek doku ASIC3 immunreaktivitesi	52
<b>Şekil 29.</b>	Doksorubisin grubuna ait böbrek doku ASIC3 immunreaktivitesi	53
<b>Şekil 30.</b>	Doksorubisin+OXO grubuna ait böbrek doku ASIC3 immunreaktivitesi	53
<b>Şekil 31.</b>	Oksolamin grubuna ait böbrek doku ASIC3 immünreaktivitesi	54

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ADH</b>	: Antidiüretik Hormon
<b>ADR</b>	: Adriyamin
<b>AN</b>	: Adriyamin Nefropatisi
<b>ASIC</b>	: Aside Duyarlı İyon Kanalı
<b>AT I</b>	: Anjiotensin I
<b>ATP</b>	: Adenozintrifosfat
<b>BM</b>	: Bazal Membran
<b>BUN</b>	: Kan Üre Azotu
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>DEG/ENaC</b>	: Degenerin/Epitelyal Na kanalı
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DX</b>	: Doksorubisin
<b>ECM</b>	: Ekstrasellüler Matriks
<b>ENaC</b>	: Epitelyal Sodyum Kanalı
<b>Fe</b>	: Demir
<b>GBM</b>	: Glomerüler Bazal Membran
<b>GFH</b>	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
<b>GSSG</b>	: Okside Glutatyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>i.p.</b>	: İntraperitoneal
<b>KBH</b>	: Kronik Böbrek Hastalığı
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MMP</b>	: Matriks Metalloproteinaz
<b>MT</b>	: Metallotioninler
<b>NSAİİ</b>	: Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>SCID</b>	: Ağır Kombine İmmün Yetmezlik
<b>SOR</b>	: Serbest Oksijen Radikalleri
<b>O<sup>-</sup></b>	: Süperoksit Anyonu
<b>OH<sup>-</sup></b>	: Hidroksil Radikali

**TopoII** : Topoizomeraz II  
**TRP** : Transient Reseptör Potensiyal Kanalları  
**VSMCs** : Vasküler Düz Kas Hücreleri

## 1. GİRİŞ

Doksorubisin (DX), antrasiklin türevi, kemoterapötik bir ilaçtır. Doksorubisin, çeşitli kanser tiplerine karşı etkili, geniş spektrumlu, antitümöral olan bir antibiyotiktir (1, 2). Oldukça geniş spektrumlu ve güçlü etkili olmasının sağladığı üstünlüğün yanısıra, toksisitesinin de fazlalığı sakınca oluşturmaktadır (3). Doza bağlı şiddetli kalp, böbrek ve karaciğerde toksisite görülmektedir (4).

Doksorubisine bağlı toksisite patogenezinde; serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma rol oynamaktadır (5, 6). Patogeneze sorumlu tutulan serbest radikaller  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ’leri ve nitrik oksittir. Serbest radikallerin indüklediği malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de patogeneze katkısı olduğu gösterilmiştir (6, 7).

Matriks metalloproteinazlar (MMP), çinko bağımlı matriks parçalayıcı enzimlerden oluşan geniş bir ailedir; ekstrasellüler matriksin parçalanması ve dönüşümünde önemli rol sahibidir (8). Yusuke ve ark. (9) yaptığı çalışmada, adriamisin’in non-immün yolla glomerüler hasar modelinde, glomerüloskleroz ve albüminürinin artışında MMP-9 ve MMP-13’in rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Bu da, spesifik MMP inhibitörlerinin geliştirilmesinin, glomerülosklerozun iyileştirilmesinde yeni tedavi imkanı sağlayabileceğini göstermektedir.

Doksorubisinin indüklediği glomerülopatide epitelyal hücre hasarı, tübüler kast oluşumu ve proteinüri görülmektedir. Kast formasyonu, interstisyel inflamatuvar reaksiyona neden olan tübüler obstrüksiyon ve tübüler bazal membran parçalanmasıyla tespit edilen interstisyel hasarın gelişiminin başlangıcıdır (10). Ayrıca DX’in indüklediği renal toksisite, glomerüler vakuolizasyon ve tübüler dilatasyonu içermektedir. Son çalışmalarda, kapiller loop’un segmental oklüzyonu ve epitelyal hücre hasarı, glomerüler tuft-kapsül adezyonuyla karakterize glomerül hasar gösterilmiştir (11). Ek olarak doksorubisin nefropatisi epitelyal sodyum kanalı (ENaC)-bağımlı volüm retansiyonu ve renal fibrozise yol açar. Yapılan bir çalışmada duyarlı farelerde DX’in indüklediği nefrotik sendromda, volüm retansiyonu izlenmiş olup toplayıcı kanalda  $Na^+K^+$ -ATPase ve artmış ENaC akvitesi tespit edilmiştir. Ratlarda volüm retansiyonu ve asit oluşumu mineralokortikoid reseptörlerinin blokajıyla önlenememiş fakat ENaC inhibitörü amilorid tarafından tamamen durdurulmuştur. Böylece volüm retansiyonu, esas olarak mineralokortikoid bağımsız

ENaC aktivitesi upregulasyonuna bağlanmıştır. Doksorubisinin indüklediği nefrotik sendrom sırasında ENaC stimülasyonu için gerekli sinyalin ne olduğu anlaşılamamıştır (12).

Aside duyarlı iyon kanalları (ASIC), degenerin/epitelyal Na kanalı (DEG/ENaC) süper familyasından, voltaj bağımsız, amilorid sensitiv, katyon-selektif kanallardır (13). RT-PCR amplifikasyonu kullanılarak beyin, serebellum, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas; kolon; lenfosit, over, prostat, ince barsak, testis, trigeminal ganglion gibi birçok santral ve periferik insan dokusunda ASIC-2a ve ASIC-3 transkriptlerinin ortak ekspresyonu tespit edilmiştir (14).

Epitelyal sodyum kanalları ve yakından ilişkili olduğu ASIC proteinlerinin, vasküler düz kas hücrelerinde (VSMCs) potansiyel mekanoreseptör oldukları düşünülmektedir, çünkü bunların degenerin olarak adlandırılan protein grubuyla güçlü evrimsel bağlantıları vardır (15).

Duysal nöronlarda, nonsteroid anti-inflamatuar ilaçların (NSAİİ) terapötik dozda, direkt COX inhibisyonundan bağımsız olarak nativ ASIC akımlarında, heterolog sistemde ASIC kanal ekspresyonu üzerine farklı aktivitesi gösterilmiştir. Ayrıca NSAİİ'ler, geniş inflamasyonun indüklediği ASIC kanal ekspresyonu artışını önler. Aspirin, diklofenak ve flurbiprofen, ASIC-3 içeren kanalları inhibe eder (16).

Oksolamin (3-fenil-5,8-dietilaminoetil-1, 2, 4-oksadiazol), antitusif olarak kullanılan bir ajandır. Oksolamin ayrıca analjezik, antiinflamatuvar, lokal anestezi ve antispazmodik özelliklere sahiptir (17).

Randall ve Selitto (18), oksolaminin aspirin ile karşılaştırıldığında analjezik, anti-inflamatuar etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Barron'un (19) yaptığı toksikoloji çalışmasında, 50 mg/kg/gün dozunda oksolamin uygulaması sırasında, 3 hafta içinde hafif salivasyon haricinde patoloji tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada doksorubisin'in oluşturduğu deneysel böbrek hasarında, oksolamin'in etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **1.1. Böbrek**

### **1.1.1. Böbreğin Yapısı**

Böbrekler, retroperitoneal yerleşimli organlardır. Üst kutupları 12. torasik vertebra, alt kutupları 3. lomber vertebra hizasındadır. Sağ böbrek, karaciğer baskısı

nedeniyle daha aşığıdadır. Her bir böbrek ortalama 130-180 gram ağırlığındadır. Böbreğin yetişkin bir insandaki boyutları: uzunluğu 12-13 cm, eni 6-7 cm, derinliği ise 3 cm civarında olup bu büyüklük kişinin vücut yüzeyi ile ilgilidir. Her bir böbreğin konkav olan iç yüzünde longitudinal bir yarık, yani böbrek hilusu vardır. Renal hilustan böbreğin damarları, lenfatikler, sinirler ve renal pelvis geçer. Renal pelvis önce 3 majör kalikse, majör kaliksler de 8 veya daha fazla minör kalikse bölünür. Sagittal kesitte ise korteks ve medulla olarak iki ayrı bölge fark edilir. Renal medulla, genellikle 12-18 konik yapılu piramitten oluşur. Her bir piramidin apeksleri renal pelvis içine doğru uzanır (papilla) ve tabanı kortikomedüller sınıra dayalıdır. Papillalar, minör kalikslerin içine doğru çıkıntı yapar. Her bir papillaya 15 veya daha fazla terminal kollektör kanal (*Bellini*) açılır. Yaklaşık 1 cm kalınlığındaki renal korteks hem piramidlerin tabanını örter hem de aralarından içeriye doğru ilerler (Bertin'in böbrek kolonları) (20).

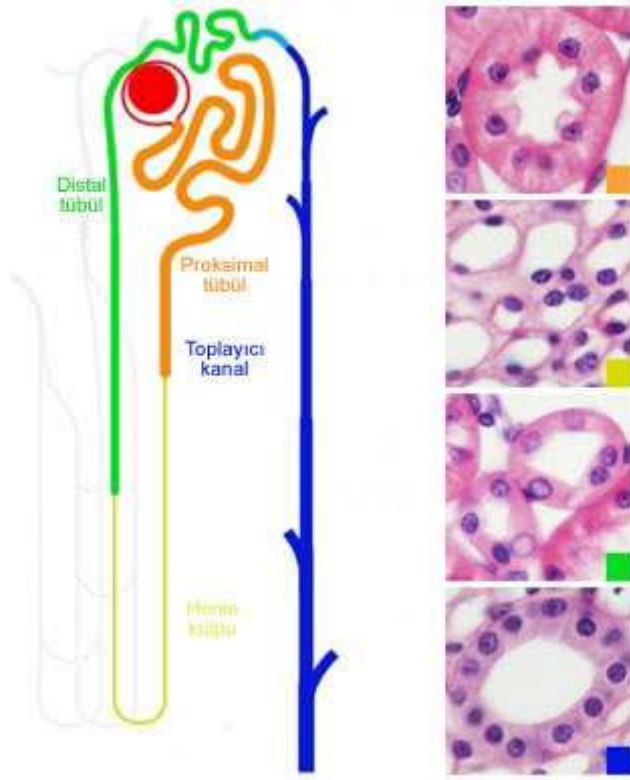
### **1.1.2. Böbreğin kan dolaşımı**

Her bir böbrek, aortadan birinci lomber vertebra hizasında çıkan tek bir arter ile kanlanır. Renal arter çoğunlukla anterior ve posterior olarak iki dala ayrılır ve bu dallar da daha sonra üst, orta ve alt lobar dallara ayrılır. Böbrek parankimine girince interlobar arter ismini alır, medüller piramidlerin kenarlarından kortekse doğru ilerleyerek piramidlerin tabanındaki arkuat arterler ile devam ederler. Arkuat arterlerden dik olarak çıkan interlobüler arterler korteks içinde periferde doğru ilerler. Bu arterden glomerüle giden afferent arterioller çıkar. Özelleşmiş kapiller yumak olan glomerülün kanı, vasküler polden çıkan afferent arteriol ile taşınır. Efferent arterioller hemen dallanarak korteksteki tübülüslerin çevresini saran peritübüler kapiller ağını oluşturur. Jukstamedüller glomerüllerin arteriollerinden çıkan kapiller vasa recta medullanın derinliklerine doğru iner. Böbrek, kalp debisinin 1/5'ini alır ki bu değer insan organizmasında birim doku ağırlığı başına düşen en yüksek kan akımı değeridir (100 gram böbrek dokusu için yaklaşık 350 ml/dk). Venöz sistem de arteriyel sisteme benzer tarzda bir yol izler. Kapillerlerden gelen kan sırasıyla interlobüler, arkuat, interlobar ve lobar venlerden geçerek renal venlere oradan da inferior vena kava'ya drene olur (21, 22).

### **1.1.3. Nefronun yapısı**

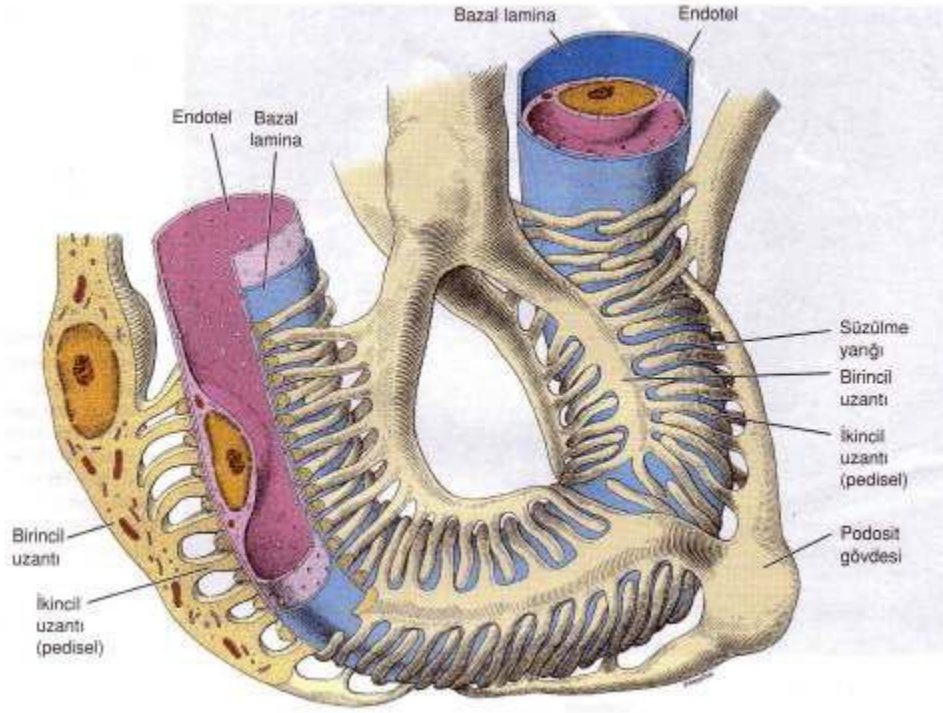
Böbrekteki en küçük fonksiyonel fizyolojik birim nefrondur. Her böbrekte bir milyon nefron vardır.

Her bir nefron 5 bölüm içermektedir.



**Şekil 1.** Nefronun yapısı (23)

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



**Şekil 2.** Glomerüler kapiller membran (24)

Nükleusları mezangiyuma bitişik olan endotel hücreleri, insanlardaki çapı 70-100 nm olan fenestrasyonlara sahiptir. Bu yapısal özelliği dolayısıyla büyük moleküllerin geçişine karşı önemli bir engel oluşturmazlar. Endotel yüzeyi polianyonik glikoproteinler nedeniyle negatif yüklüdür.

Orta tabakayı oluşturan glomerüler bazal membran, ortalama 320 nm (300-400) kalınlığında olup elektron mikroskopik incelemede içten dışa doğru, lamina rara interna, lamina densa ve lamina rara eksterna olmak üzere üç alt tabakadan oluşmuştur (25). Glomerüler bazal membranın kollagen ve glikoprotein elemanlarından oluştuğu gösterilmiştir. Fibrillerin arasını dolduran glikoprotein yapısındaki zemin maddesi esas olarak laminin, nidogen ve heparan sülfattan oluşmuştur (26). İç tabaka (lamina rara interna) subendotelial tabaka olup fibronektin, laminin ve negatif yüklü glikozaminlerden oluşur. Orta tabaka (lamina densa) tip 4 kollagen içerir ve elektron mikroskopta yoğun görünür. Dıştaki subepitelial tabaka ise laminin ve glikozamin gibi glikoproteinler içerir. Lamina raralardaki glikozaminler içerdikleri heparan sülfat nedeniyle negatif yüklüdürler ve bu yük bazal membran fonksiyonunda oldukça önemlidir (27).

İki tip epitelyal hücre vardır. Biri glomerüler filtrasyon bariyerinin dış tabakasını oluşturan visseral epitelyum hücreleri podosit denilen ayaklı uzantılarla bazal membrana dayanırlar. Ayaklı uzantılar arasındaki boşluklar slit diyaframlarla kapatılmıştır. Ayaklı uzantıların ve slit diyaframların yüzeyi siyaloproteinlerden zengin glikoproteinlerle örtülüdür. Bunlar özellikle albümin gibi negatif yüklü makromolekülleri iterek filtrasyona engel olurlar (28). Diğer pariyetal epitel hücresi olup Bowman kapsülünün dış kısmındadır. Bowman kapsülü denince de bu tabaka anlaşılır ve proksimal tübül hücresi ile devam eder.

Mezangiyumda fagositik yeteneği olan ve olmayan iki tip hücre bulunur. Mezangial hücreler gövdelerinden glomerüler bazal membrana doğru uzanan çok sayıda uzantıları bulunan ve yoğun mikrofilament bantları içeren hücrelerdir (29). Fagositik olmayan hücreler çoğunlukta olup düz kas hücreleri gibi davranır ve özellikle anjiotensin-2 veya vazopressinle kontraksiyon yaparlar. Kontraksiyon ile filtrasyon yüzeyini değiştirerek glomerüler kan akımının ve filtrasyonun ayarlanmasında önemli rol oynarlar. Ayrıca çeşitli tipte kollagen sentezlerler. İkinci tip mezangiyum hücreleri fagositer fonksiyona sahip makrofajlardır (30).

2- Proksimal Tübül: Kortekste lokalizedir.

3- Henle Lupu: Kortikomedüller birleşim yerine lokalizedir.

4- Distal Tübül: Kortekstedir.

5- Toplayıcı Kanal: İki veya daha fazla distal tübülden oluşmuştur. Korteks ve medulladan geçerek idrarı drene ederler.

Kortikal nefronların glomerülleri korteksin dış kısmındadır. Sadece Henle kıvrımı dış medullaya kadar iner. Efferent arteriolü tübüller etrafında peritübüler kapiller ağ oluşturur. Jukstamedüller nefronların glomerülleri korteks ile medulla arasındadır. Henle kıvrımı medullanın derinliklerine kadar iner. Efferent arteriolü Henle kıvrımı ile yan yana seyreden ve medullanın derinliklerine kadar inen farklı bir kapiller ağ oluşturur. Bu organizasyon idrarın yoğunlaştırılmasında önemlidir (31).

Böbrekler kanı süzerek idrarı oluştururlar. İdrar üreterler aracılığı ile mesanede toplanır, üretrayla dışarı atılır. İdrar ile üre ve ürik asit gibi nitrojen

içeren metabolizma ürünleri atılır. Nitrojen atıklarının en önemli kaynağı proteinler ve pürin bazlarıdır. Pürin bazlarının yıkım ürünü ürik asit, proteinlerin yıkımıyla oluşan ürün ise amonyaktır. Amonyak hücreler için oldukça toksik bir madde olduğundan karaciğerde üre haline dönüştürülür ve üre böbrek tarafından atılır (32).

#### **1.1.4. Böbreğin fonksiyonları; (33)**

- 1- Vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması ve sürdürülmesi
- 2- Metabolik atık ürünlerin (Üre, ürik asit, kreatinin) atılımı
- 3- İlaçlar, toksinler ve bunların metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı
- 4- Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi
- 5- Hormon sentezi ve metabolizmasına katkı: Eritropoetin, D vitamini
- 6- Peptid hormonlarının (İnsülin, glukagon) yıkımı
- 7- Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin ( $\beta$ 2-Mikroglobulin) yıkımı
- 8- Metabolik etki: Glukoneogenez, lipid metabolizması

#### **İdrar Oluşumu**

İdrar oluşumunun 3 aşaması vardır:

- 1) Filtrasyon
- 2) Geri Emilme (Reabsorbsiyon)
- 3) Salgılama (Ekskresyon)

1. Filtrasyon: Afferent arteriol ile glomerüler kapiller yumağa ulaşan kanın proteinleri ve hücreleri dışındaki tüm elemanları Bowman kapsülü içine süzülür ve içeriği proteinler dışında plazmanın yapısı ile eş değer sayılabilir. Glomerül kapillerlerindeki filtrasyon hızı (GFH), birim zamanda süzülen plazma miktarı olarak tanımlanır (Normal değeri 125 ml/dk). Normalde böbrekler bir dakikada 125 ml yani günde 180 litre plazmayı filtre eder. Böbreklerde filtre edilen plazma miktarı bu kadar yüksekken, günde çıkarılan idrar miktarı ortalama 1-1.5 litre kadardır. Glomerüler filtrasyon hızı çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir. Glomerül kapilleri içindeki kanın hidrostatik basıncının azalması filtrasyonu azaltır, yükselmesi artırır. Kapillerdeki hidrostatik basınç, afferent arteriol daralmasında, böbreğe gelen kan miktarının azalmasında (arteriyel kan basıncının düşmesi ve kan kayıpları gibi koşullarda) azalır. Buna karşı efferent arteriol daralması, basıncı yükseltir. Glomerül

kapillerindeki geçirgenlik artışları GFH'yi artırır. Bowman kapsülü içindeki sıvının basıncının artması filtrasyonu azaltır.

2. Geri Emilim (Reabsorbsiyon): Filtrat içindeki su ve maddeler basit diffüzyon ve aktif taşınma ile önce tübülüs hücrelerine, buradan da kana geri emilirler. Maddelerin geri emilimleri organizmanın gereksinimi doğrultusunda düzenlenmektedir. Geri emilimin % 90'ı proksimal tübülüs bölgesinde yapılmaktadır. Bu bölgede geri emilen maddeler, neden oldukları ozmotik güç ile bir miktar suyun da geri emilimini sağlar. Tübülüslerde geri emilemeyen madde miktarının artması suyun geri emilimini azaltarak diürece neden olur. Diüretik ilaçlar, bazı maddelerin geri emilimini engelleyerek, mannitol ise tübülüslerden reabsorbe olamadığı için diürece neden olmaktadır (32).

Aldosteron, distal tübülüs bölgesine etki ederek  $\text{Na}^+$  iyonunun geri emilimini artırırken  $\text{K}^+$  iyonunun idrar ile atılmasını hızlandırır. Antidiüretik hormon (ADH) ise toplayıcı kanalların suya olan geçirgenliğini kontrol etmektedir. ADH varlığında toplayıcı kanallarda suyun geri emilimi artar ve konsantre idrar çıkarılır. ADH yokluğunda idrar ile çıkarılan su miktarının artması ile idrar dilüe olur. Tübülüslerden aktif taşınma ile geri emilen maddeler için bir eşik değer söz konusudur. Bu duruma en iyi örnek glukoz taşınmasıdır. Kan glukoz konsantrasyonu normal olduğu zaman glomerüllerden filtre olan glukozun hepsi proksimal tübülüs bölgesinde aktif taşınma ile geri emilir ve idrara hiç glukoz çıkmaz. Kan glukoz konsantrasyonu normalden yüksek olduğu zaman glukozun fazlası geri emilemez ve glukoz idrara çıkar. Geri emilemeyip tübülüs sıvısı içinde kalan glukoz fazlası, ozmotik güç oluşturarak suyu da beraberinde sürükler ve poliüri meydana gelir (32, 34).

3. Salgılama (Ekskresyon): İdrar oluşması sırasında bazı maddeler doğrudan tübülüs epitelyum hücreleri tarafından tübülüsler içine salgılanmaktadır. Penisilin bu tip maddelere iyi bir örnektir. Bazı maddeler ise hem glomerül filtrasyonu yoluyla hem de ekskresyon ile idrara çıkmaktadır. Bu tip maddeye en iyi örnek ise kreatinindir (32, 34).

#### **1.1.4.1. Vücut Elektrolit Dengesinin Korunması ve Sürdürülmesi**

Vücut sıvıları ve içerdikleri elektrolitler yaşamın devam etmesi için gerekli olan iyonik çevreyi sağlamaktadır. Böbrekler, vücut sıvılarının miktarını ve elektrolit

içeriklerini düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Vücut sıvı ve iyon içeriğindeki sapmalar genel olarak idrar atılımındaki uygun değişikliklerle düzeltilmektedir. Elektrolit fazlalığında böbrek yolu ile bunların idrarla atılımı sağlanırken, azlığında ise bu elektrolitler böbrekler tarafından tutulmaktadır. Böbreklerde elektrolit dengesi tübüler geri emilim ile düzenlenmektedir. Geri emilim işlemi genel olarak proksimal kıvrımlı tübülde gerçekleşir.  $\text{HCO}_3^-$  geri emilim miktarı GFH ve  $\text{H}^+$  salgılanma hızına bağlıdır. Geri emilen  $\text{PO}_4^{3-}$  miktarı,  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu ve kısmen de PTH'nın tübüler hücre üzerine olan etkisiyle kontrol edilir. Glukoz ve amino asitler hücre içi aktif taşıma sistemleri aracılığıyla proksimal kıvrımlı tübülde geri emilir (35).

Distal tübül, plazma asit-baz düzeyleri ve plazma elektrolitlerinin homeostatik düzenlenmesinde nefronun işlevsel olarak en aktif bölgesidir. Bu bölgede salgılama ve geri emilim işlemleri  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve  $\text{H}^+$  arasındaki kombinasyonla gerçekleşir. Plazmada bulunan fazla  $\text{H}^+$  iyonları tüm tübül boyunca salgılanır. Normal plazma pH'sını sürdürmek için  $\text{H}^+$  iyonunun tutulması gerektiğinde distal tübül hücreleri  $\text{H}^+$  sekresyonunu, amonyak ( $\text{NH}_3$ ) oluşumunu ve  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  değişimini azaltır ve  $\text{HCO}_3^-$  atılımını arttırlar. Tüm bu işlemlerin amacı plazma  $\text{HCO}_3^-$ 'nin azaltılması ve normal plazma pH'sının yeniden oluşturulmasıdır (36, 37).

Vücut sıvılarının pH'sı çok dar sınırlar içinde sabit tutulmaya çalışılırken idrarın pH'sı 4.5 ile 8 arasında değişim gösterir (38).

#### **1.1.4.2. Metabolik Atık Ürünlerin Atılımı**

Protein metabolizması sonucu oluşan üre, kreatinin ve ürik asit böbrekler tarafından vücuttan uzaklaştırılır. Amino asit deaminasyonu ile ortaya çıkan  $\text{NH}_4^+$ 'ün kanda toksik düzeylere ulaşması karaciğerde üre oluşumu ile engellenmektedir. Kandaki üre, kan üre azotu (BUN) olarak tanımlanır. Karaciğerde fazla aminoasit metabolize edildiğinde üre oluşumu ve BUN düzeyleri artmaktadır. Kolay filtre olan ürenin % 40-50 kadarı proksimal tübüllerde geri emilmektedir. Kreatinin, iskelet kasında kreatinden enzimatik olmayan dehidrasyon ile oluşur. Glomerüllerden serbestçe filtre olan kreatinin, tübüllerden geri emilime uğramamaktadır. Bu özelliğinden dolayı GFR tahmininde kreatinin klirensi kullanılır. Ürik asit, pürin bazlarının oksidasyonu ile oluşur ve plazma düzeyi değişkendir. Tamamen filtre

edilen plazma üratları proksimal tübüllerde geri emilir ve distal tübüllerden salgılanır (39).

### 1.1.4.3. Böbreklerin Endokrin Fonksiyonu

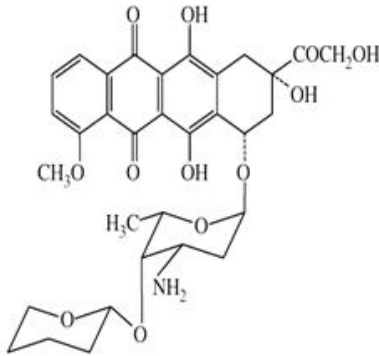
Böbrekler, sistemik ve lokal etkili çeşitli hormonlar sentezleyip salgılar. Eritropoietin, renin, prostaglandin, kalsitriol gibi hormonlar böbrekler tarafından üretilir. Ayrıca böbrekler; insülin, parathormon, glukagon ve aldosteron gibi hormonların yıkım bölgesidir (40).

## 1.2. Doksorubisin

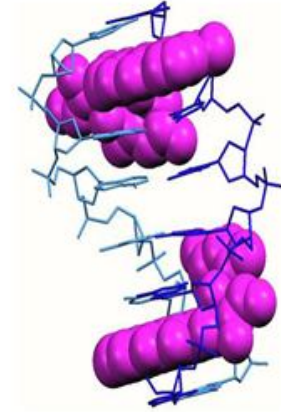
### 1.2.1. Doksorubisin Yapısı

Doksorubisin, antrasiklin türevidir, kemoterapötik bir ilaçtır. Antrasiklinler, 1963'de bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius* varietate *caesius* kültüründen üretilmiştir (1, 2).

Antrasiklin molekülü, tetrasiklik çekirdek ve aminoşekerden (daunosamin) oluşur



Kimyasal yapı



Uzaysal düzlemde

### Şekil 3. Doksorubisinin yapısı

Tetrasiklik çekirdek ilaca kırmızı rengini verir. Grubun tüm üyelerinin tetrasiklik halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (41).

Daunorubisin molekülündeki 14. karbonun hidroksil grubu alması ile doksorubisin meydana gelir (Şekil 3).

Antrasiklinler, katı planer 4 halkalı yapı ve bunu tamamlayan D halkasında bir glikozidik substituasyonu ile A ve D halkalarında değişik yan grupları içerirler. Planer yapı, antrasiklinin DNA zinciri arasındaki interşelasyonu sağlar ve bu hareket

de antrasiklinlerin DNA sentez inhibisyonunda orijinal olarak sorumlu olduğunu düşündürür. C halkasındaki quinon, Fe<sup>++</sup> gibi metallerin varlığında oksidasyon/redüksiyon döngüsüne girer ve oksijen ve/veya lipidlerde serbest radikaller oluşturur (42). Bu serbest radikallerin kardiyak toksisiteden sorumlu olduğuna inanılır. Doksorubisin (adriamisin), daunorubisin'in hidroksi türevi olan ve aynı kaynaktan elde edilen bir antrasiklin bileşiği olup döneme özgü değildir; fakat daunorubisin gibi bu ilacın da S dönemindeki hücrelerde etkinliği en fazladır (43).

### 1.2.2. Etki Mekanizması

Antrasiklinlerin, DNA sentez ve temininde önemli DNA sarmalını çözülmesine yol açan bir enzim olan topoizomeraz II (TopoII)'ye bağlandığı ve inhibe ettiği gösterilmiştir. TopoII DNA'ya bağlanır ve çift sarmal kırılması yaratarak, sarmal geçişini sağlar. Antrasiklinler, kovalan DNA-Topo II kompleksine bağlanır ve üç parçalık bu kompleks, sarmal kırılmanın yapışmasını önleyici sağlamlıktadır (44).

Doksorubisin, hücrede 4 farklı şekilde etki gösterir (45, 46):

**a.** Kompleks oluşturarak deoksiribonükleik aside (DNA) bağlanma: Deoksiribonükleik asidin içine girip, DNA topoizomeraz II-DNA-antrasiklin kompleksini oluşturur. DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyon ve sentezini inhibe eder. Deoksiribonükleik asid zincir kırıklarına da neden olur (47).

**b.** Deoksiribonükleik asid ve RNA polimerazların inhibisyonu: DNA ve RNA polimerazların fonksiyonlarını engelleyerek DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu bozar.

**c.** Hücre membranı üzerine etkileri: Hücre membranına bağlanarak, membran fonksiyonunu bozar (48, 49).

**d.** Serbest radikal oluşturma: Mikrozomlardaki sitokrom P-450 redüktaz enzimi ile reaksiyona girer ve serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşturur (50, 51). Apoptozisi indükler (52).

Sonuçta maruz kalan hücre DNA'sında kimyasal ve oksidatif hasar oluşur (53). Doksorubisin tedavisi çeşitli kanser hücrelerinde (Örneğin, ürotelyal hücrelerde, doksorubisine maruz kaldığında prostaglandin E2 ve IL-1 $\beta$  artış olduğunu gösterilmiştir) inflamasyonu uyarmaktadır (54, 55). Doksorubisin tedavisi adezyon proteinlerini etkiler. Doksorubisin, MMP-2/MMP-9 gen ekspresyonunu

etkilemekte (55) ve hücre ayrışmasıyla sonuçlanmaktadır (56). Genel olarak insan örneklerinde mitokondrial ve fibriller düzensizlik tespit edilmektedir (57).

### **1.2.3. Doksorubisin Farmakokinetiği**

İlk iki antrasiklin olan daunorubisin ve doksorubisin 1960'lı yıllarda geliştirildi. Doksorubisin daunorubisinden tek bir hidroksil grubuyla ayrılır (58). Doksorubisin, gastrointestinal sistemden absorbe edilmez, yalnız parenteral uygulanır (59).

Adriyamisin önemli oranda metabolizmaya katılmaz. Adriyamisin, daunorubisinle karşılaştırıldığında aslında böbrekte birikir, ama aynı zamanda karaciğerde, kalpte ve incebağırsakta da bulunur (60). Bu durum adriyamisinin, daunorubisinle karşılaştırıldığında **daha fazla nefrotoksisiteye** ve daha geniş terapötik indekse sahip olmasını açıklar.

Doksorubisin intravenöz (İV) uygulanımdan sonra hızla parçalanır. Doksorubisinol ve daunorubisinol oluşur (61). Bunlar ana bileşikten daha az aktiftir. İntravenöz uygulamadan sonra kalp, karaciğer, dalak, miyokard gibi dokularda birikir ve plazmadan 5-10 kat daha yüksek konsantrasyona ulaşır. Tümör dokusu en yüksek doku konsantrasyonunu içerir (62). Asit ortamda stabil olmaması oral yolla kullanılmasını engeller. Doku hasarı yapıcı özelliği ise intramusküler ve subkutan kullanımına izin vermez (48, 49)

Dokulara fazla bağlanıp oradan yavaş salıverildiğinden, karaciğerde hızlı metabolize edilmesine karşın vücutta kalışı ve etkisi uzun sürer; büyük kısmı safra içinde itrah edilir. Karaciğer metastazı veya primer tümörü ya da diğer bir nedenle, karaciğer fonksiyonu bozulmuşsa eliminasyonu yavaşlar ve doz azaltılmazsa vücutta birikir. Hidroliz sonucu vücutta kısmen serbest kalan aglikon kısmı etkinlik göstermez (43) Karaciğerde biyotransformasyona uğrar, safradan ekskresyonla doksorubisinol ve daunorubisinol olarak atılır. Karaciğerde önce indirgenme gerçekleşir ve ardından karbonil kökü ayrılır. Böbreklerde ise önce karbonil kökü ayrılır, sonra indirgenme gerçekleşir (63). Esas olarak karaciğerden safra yoluyla elimine edilmesine rağmen az bir miktarda böbreklerden (% 3-10) ve dışkıyla (% 40-50) atılır. Dışkıyla atılan kısım değişmemiş ilaç şeklindedir. Böbreklerden itrahi ise ilaç uygulandıktan 1-2 gün sonra idrarın geçici bir süre için kırmızıya boyanmasına neden olur ancak bunun klinik önemi yoktur (59). Karaciğer fonksiyon

bozukluğu olanlarda doz ayarlaması gerekirken **böbrek yetmezliği olanlarda dikkatli kullanılmalıdır (64).**

#### **1.2.4. Doksorubisinin Yan Etkileri**

##### **1.2.4.1. Genel Yan Etkiler**

Antineoplastik ilaçların pekçoğu, diğer alanlarda kullanılan ilaçlara göre fazla toksik ilaçlardır; fakat bunların kanser gibi son derece ciddi ve halen önemli bir ölüm nedenini oluşturan durumlarda yararlı olmaları, bu sakıncaların önemini azaltır (43).

Antrasiklinlerin sık gözlenen yan etkileri, kemik iliği baskılanması, saçlarda dökülme, mukozit, bulantı-kusma ve deri pigmentasyonunda artmadır. Doksorubisinin klinikte daha önemli yan etkileri Tablo 1’de gösterilmiştir (46).

**Tablo 1.** Doksorubisinin klinikte sıklıkla görülen yan etkileri.

<b>Yan etki</b>	<b>Patogenezi</b>
Alopesi	Antimitotik etki
Kemik iliği supresyonu	Antimitotik etki
Mukozit	Antimitotik etki
Ekstravazasyon hasarı	Lokal toksisite
Radyosensitizasyon	En çok etkilenen organ kalptir. 200 rad üzeri radyasyonda toksisite hızla gelişir.
Gastrointestinal toksisite	
Nefrotoksisite	Serbest radikal aracılı hasar
Kardiyotoksisite	Birden çok mekanizma ile

Doksorubisin verilen hastaların neredeyse tamamında alopesi görülür ve tedavi bitiminden 2-3 ay sonra normale döner. Çok hızlı verildiği takdirde yüzde flushing ortaya çıkar. Fotosensitiviteye neden olabilir. Tırnak yatağında hiperpigmentasyon veya bantlaşma meydana gelebilir (59).

Doksorubisine bağlı kemik iliği supresyonu en sık doz ayarlanmasına neden olan yan etkisidir. Lökopeni tedavinin 2. haftasında ortaya çıkar ve 4. haftanın sonlarında hücreler yükselir. Toksik etkisi ilacın dozuna ve kemik iliğinin rejenerasyon kapasitesine bağlı olarak değişir (65). Trombositopeni ve anemi de görülebilir (66).

Stomatit, gastrointestinal mukozit, alopesi sık görülen ancak geridönüşümlü yan etkilerdir (67).

İlaç bir kaç gün süreyle verildiğinde mukozit riski artar. Genellikle tedavinin 2. haftasında meydana gelir ve 3-7 gün içinde geriler (65).

Ateş, döküntü ve ürtikere neden olabilir. Nadiren anafilaksi meydana gelebilir (59). Doksorubisine bağlı hipersensitivite reaksiyonlarının sıklığı % 3-21 arasında bildirilmiştir (68).

Doksorubisin tedavisi gonadları baskılayarak oligospermi, azospermi veya amenoreye neden olabilir (59).

Gastrointestinal sistemde bulantı, anoreksiye ve ishale neden olabilir, kolonda ülserasyonlar ve nekroz ortaya çıkabilir (59).

Doksorubisinin damar dışına kaçıışı ciddi ve geri dönüşümsüz doku hasarına sebep olur (69). Ekstravazasyon olarak adlandırılan bu durum; yanma ve hassasiyet gibi semptomlarla ortaya çıkabileceği gibi hiçbir şikayete neden olmayabilir (65) Ekstravazasyonda, ağrı ve lokalize inflamasyondan tam kat nekroz ve ülserasyon gibi ciddi hasara kadar değişen şiddette bulgulara neden olabilir (70).

Doksorubisine bağlı toksisite patogenezinde; serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma rol oynamaktadır (5, 6). Patogeneze sorumlu tutulan serbest radikaller  $O_2^-$ ,  $OH^-$ 'leri ve nitrik oksittir. Serbest radikallerin indüklediği MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de patogeneze katkısı olduğu gösterilmiştir (6, 7). Antrasiklinlerdeki kinon ve hidrokinon gurupları, peroksitleri ve serbest radikalleri aktif edecek potansiyele sahiptir. Doksorubisin toksisitesinde serbest radikallerin rolü, çeşitli araştırmaların konusudur (71).

#### **1.2.4.2. Kardiyotoksisite**

Kardiyotoksisite, birden çok mekanizma ile meydana gelir. Kardiyotoksisite: DX'e bağlı olarak gelişen en önemli ve sıklıkla doz sınırlayıcı olan yan etkidir (1).

Doksorubisinin İV. enjeksiyonundan sonra vücuttaki dağılımı sırasında, doksorubisini plazmadan en hızlı olarak alan dokulardan birisi kalp dokusudur (72).

Doksorubisin tedavisi sonrasında görülen kardiyotoksisite, kümülatif doz bağımlı olup önemli morbidite ve mortalite nedenini oluşturmaktadır. Toplam kümülatif dozu  $550 \text{ mg/m}^2$ 'yi geçmemelidir; aksi takdirde kardiyomiyopati ve ona

bağlı akut konjestif kalp yetmezliği riski belirgin şekilde artar (43). Kardiyotoksisite akut, subakut ve geç dönemlerde ortaya çıkabilmektedir. Akut dönemde; ritm problemleri, hipotansiyon ve kalp fonksiyonlarda bozulma görülebilmektedir. Ortaya çıkan bu sorunlar reversibldir ve kalpte kalıcı hasara neden olmamaktadır (73).

Subakut dönem; birkaç hafta ile 30 ay arası zaman diliminde ortaya çıkabilmekte ve bu dönemde kardiyomiyopatiler izlenebilmektedir. Bu dönemde ortaya çıkan hasar kalıcıdır ve % 60 oranında ölümlerle sonuçlanmaktadır (74).

Geç dönem kardiyotoksisite ise tedavi verildikten 4 ile 20 yıl sonra görülebilir, kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği kliniği ile karşımıza çıkabilmektedir. İrreversible miyosit hasarı, miyokard kitlesinde azalma ve ilerleyici fibrozis kalp fonksiyon bozukluğuna neden olan etmenlerdir (73, 74).

Antrasiklin tedavisi verilen hastalarda konjestif kalp yetmezliği görülme riski; aldığı tedavi, tanı, yaş ve izlem süresine göre değişiklik göstermektedir. Lefrak ve ark.(75) toplam antrasiklin dozunun 500 mg/m<sup>2</sup>'nin üzerine çıktığı durumunda kardiyomiyopati ve konjestif kalp yetmezliği gelişme riskinin arttığını belirtmişlerdir. Antrasiklin verilen hastalarda konjestif kalp yetmezliği gelişme riski; toplam dozun 500-550 mg/m<sup>2</sup> arasında olması durumunda % 4, 551-600 mg/m<sup>2</sup> dozda % 18 ve 601 mg/m<sup>2</sup>'nin üzerindeki dozlarda ise % 36'ya çıkmaktadır (76). Toplam doz 550-600 mg/m<sup>2</sup> olması kardiyomiyopati riskini belirgin olarak artırmaktadır, bu nedenle total dozun 500 mg/m<sup>2</sup>'nin üzerine çıkılmaması önerilmektedir (77).

#### **1.2.4.3. Doksorubisine Bağlı Nefrotoksisite**

Doksorubisin kaynaklı böbrek hasarının moleküler mekanizmasını inceleyen farklı çalışmalar mevcuttur. Artan serbest radikal üretiminin, patogeneizde rol oynayan bir mekanizma olduğu görüşü ileri sürülmektedir. Adriamisinin, glomerüller ATP'az aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. Adriamisinin bu etkisi, su geçirgenliğinde görülen azalma ile ilişkilidir ki bu azalma, sülfhidril vericisi N-asetilsistein tarafından tersine çevrilen bir etkidir. Ayrıca ADR verildikten sonra, karaciğer, böbrek ve kalpteki glutatyonun düzeyleri azalmış ve lipid peroksit düzeyleri artmıştır (78).

Adriyamisinin, miyelotoksisite (79) hepatotoksisite (80) ve kardiyomiyopati (81) gibi diğer organlara olan etkisi, potansiyel olarak ADR kaynaklı nefropatiye katkıda bulunur.

Hayvan modelindeki histolojik değişiklikler insanlarda görülen, podosit füzyonu ile fokal glomerüloskleroz, fokal segmental ve global glomerüloskleroz, tübülo-interstiyel inflamasyon ve fibrozis ile benzerdir (82). Jeansson ve ark. (83) yaptığı çalışmada, adriyamisinin, glomerüler bariyerin, özellikle boyut ve yük seçiciliğinin kaybına neden olduğunu tespit etmişlerdir. Adriamisine maruz kalan hayvanların, glomerüler endotelial yüzey tabakası veya glikokaliksi normalin yalnızca % 20'si kadar saptanmıştır. Aynı zamanda glomerülde izole edilen çeşitli proteoglikanlar azalmış olarak gözlenmiştir. Adriyamisinin, proteoglikan sentezini azaltarak glomerüler glikokaliksin kalınlığını ve glomerüler seçiciliği değiştirdiği belirtilmiştir. Bu bulguların proteinürik renal hastalıkların patogeneğinde glomerüler endotelin rol oynadığını desteklediği ifade edilmiştir. Adriyamisin, glomerüler endoteliumun incelmeye neden olurken, podositlerin yok olması ile plazma proteinlerinin süzülmesini engelleyecek olan boyut ve yük özellikli bariyerlerin kaybı da bu duruma eşlik etmektedir. Bu değişiklikler adriyamisin enjeksiyonundan sonra en erken 1-2 hafta içerisinde görülür ve 4 haftaya kadar da şiddetlenmektedir. Sıçanlarda serum kreatininindeki artış, kreatinin atılımındaki düşüş, azalan serum albümini, dislipidemi ve idrarla atılan protein miktarının artması ile görülen renal fonksiyonun etkilenme durumu, kronik böbrek hastalığı ve nefrotik sendromla tutarlı bulunmuştur.

Erkek sıçanlar ADR'nin indüklediği nefropatiye, dişi sıçanlardan daha duyarlıdır. Sham operasyonu geçiren sıçanlarla karşılaştırıldığında kastrasyon yapılan erkek sıçanların daha az duyarlı olması, ADR'nin indüklediği renal hasarın patogeneğine cinsiyet hormonlarının katkıda bulunduğunun göstergesidir. Renal hasar modeli olarak ADR nefropatisi kullanılacaksa, deneyin dizayn edilmesinde cinsiyet seçimi önemli bir faktördür, çünkü renal hasar şiddetinde fark oluşmaktadır (84).

Wang ve ark. (82) erkek farelerde oluşturduğu adriyamisin nefropatisinde aşikar proteinüri 5. günde görülmüştür ve çalışma boyunca oldukça yüksek olarak kalmıştır. Birinci ve 2. haftada tübüler hücrelerde reabsorbsiyon damlacığında fokal

artış olmuştur ve 2 hafta sonra çeşitli intraluminal kastlar oluşmuştur. Dört ile 6 haftada glomerüller vakuolizasyon ve orta derecede fokal segmental skleroz belirginleşmiştir. Orta derecede interstisyel genişleme ve şiddetli inflamasyonla birlikte fokal ve tam global glomerüller skleroz yaygınlaşmıştır. İkinci haftada interstisyum ve glomerülün her ikisinde de öncül makrofaj infiltrasyonu belirginleşmiştir, bunu CD4+ve CD8+ T hücrelerinin her ikisinin, interstisyumda birikmesi izlenmiştir, glomerülde ise birikme olmamıştır.

Adriyaminin etkilerinin böbrek korteks ve medullasında CD4+ ve CD8+ hücre miktarının artıyor olması, renal hasar oluşumunda bu hücrelerin doğrudan rolü olduğunu düşündürür (85); Wang ve ark. (86, 87), makrofaj integrin CD11b/CD18'e karşı direkt monoklonal antikoru (ED7) ADR'den önce uyguladıklarında makrofajlardaki deplesyon, ratlarda oluşturulan ADR nefrozisinde yapısal ve fonksiyonel hasarı azaltmıştır. ED7 antikoru, ADR nefrozisinde dolaşımdaki ve renal korteksdeki makrofajları kısmen azaltmaktadır. Bu da ED7 pozitif makrofajların ADR nefrozisinde önemli rolü olduğunu düşündürmüştür.

Adriyaminin, böbrekte direkt toksik etkiyle glomerüller hasara, tübüler dilatasyon ve atrofiye, renal fibrosiz neden olur. Glomerüller endotel hücreleri, bazal membran ve podositlerin yer aldığı glomerüller filtrasyon bariyerinde değişikliklere neden olur. Glomerüller hücrelerde proteoglikan ve glikozaminoglikan sentezinde azalma sonucu glikokaliks kalınlığı azalır, glomerüller endotel hücre porlarının çapı artar, glomerüller seçicilik azalır, podosit hücrelerinde füzyon meydana gelir (83).

Adriyaminin'in indüklediği glomerülopatide epitelyal hücre hasarı ve proteinüri görülmektedir. Ayrıca DX'in indüklediği renal toksisite, kast formasyonu, glomerüller vakuolizasyon ve tübüler dilatasyonu içermektedir. Kapiller loop'un segmental oklüzyonu ve epitelyal hücre hasarı, glomerüller tuft-kapsül adezyonuyla karakterize glomerül hasar gösterilmiştir (10, 11).

Doksorubisin nefropatisi ENaC-bağımlı volüm retansiyonu ve renal fibrozise yol açmaktadır. Ratlarda DX'in indüklediği nefrotik sendromda toplayıcı kanalda artmış Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase ve ENaC aktivitesi tespit edilmiştir. Ratlarda meydana gelen volüm retansiyonu ENaC inhibitörü amilorid tarafından tamamen durdurulmuş ve DX'in indüklediği nefrotik sendromda meydana gelen volüm retansiyonu esas olarak mineralokortikoid bağımsız ENaC aktivitesi upregulasyonuna bağlanmıştır. Bununla

birlikte DX'in indüklediği nefrotik sendrom sırasında ENaC stimülasyonu için gerekli sinyalin ne olduğu anlaşılamamıştır (12).

Adriamisin nefropatisi, insan fokal segmental glomerulosklerozuna benzer oluşturulan rodent modelinde, glomerül filtrasyon hızında azalma, proteinüri, glomerül filtrasyon bariyerinde değişimle ilişkili glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrozisle karakterizedir (88). Ratlarda, ADR'nin indüklediği nefrozis sırasında, renal Ang II, muhtemelen AT I reseptör aracılığıyla ICAM-1 ekspresyonunda artış, monosit/makrofaj infiltrasyonu, oksidatif stres ve proteinüri ile önemli proinflamatuvar etkilere sahiptir (89).

Sıçanlarda DX'e bağlı hepatotoksitite oluşturulduğunda antioksidan enzimlerin azaldığı gösterilmiştir (90). Antioksidan kullanımının ise karaciğer ve böbrekte DX'in neden olduğu apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (91). Srdjenovic ve ark. (92), DX uyguladıkları ratların testis, akciğer ve böbrek dokularını incelediklerinde, antioksidan tedavi öncesi lipid peroksidasyon artışı ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliklerin olduğunu, antioksidan tedavi sonrasında ise oksidatif hasarın gerilediği göstermiştir.

Matriks metalloproteinazlar çinko bağımlı matriks parçalayıcı enzimlerden oluşan geniş bir ailedir. Matriks metalloproteinazlar, ekstrasellüler matriksin parçalanması ve dönüşümünde önemli rol sahibidir. İçerdikleri substratlara göre çeşitli alt gruplara ayrılırlar. Jelatinaz alt grupları, MMP-2 (Jelatinaz A) ve MMP-9 (Jelatinaz B)'dur. Jelatinazlar için klasik substratlar, tip IV, V, VII, X, XI kollajenler, elastin, fibronektin, laminin ve proteoglikanlardır. Bu substratların önemi, hepsinin de glomerüler bazal membranın komponenti olmasıdır (93). Adriamisinin non-immün yolla oluşturduğu glomerüler hasar modelinde, glomerüloskleroz ve albüminürinin artışında MMP-9 ve MMP-13'in rolü olduğu tespit edilmiştir. Spesifik MMP inhibitörlerinin geliştirilmesinin, glomerülosklerozun iyileştirilmesinde yeni tedavi imkanı sağlayabileceği ileri sürülmüştür (9).

#### **1.2.5. Doksorubisin ve Apoptoz**

Apoptoz, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Apoptozis, ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir. Kerr ve ark. (94) hücre ölümlerini morfolojik olarak takip ederken, ölen hücrelerin

parçalandığını ve bu parçaların tekrar membranla kaplanarak daha küçük küreciklere dönüştüğünü ve bunlarında makrofajlar tarafından fagosite edildiğini görmüşlerdir.

Apoptotik hücre ölümü, gelişmiş dokuda gelişmenin ve dengenin önemli bir parçasıdır. Hızlı gelişen ve sayısı artan dokularda granüositler gibi apoptoz hızı fazla iken kendini yenileme yeteneği olmayan sinir hücreleri gibi dokularda apoptoz hızı çok yavaştır (95).

Apoptoz (programlı hücre ölümü) ve nekroz memeli hücrelerini ölüme götüren iki önemli olaydır ve özellikle apoptoz; gelişim, homeostaz ve patojenezde önemli rol oynayan hücre intihar mekanizmasıdır (96, 97).

Apoptoz indüksiyonu, doksorubisinin önemli sitotoksik mekanizmalarındandır (52). Doksorubisinin, renal tübül hücrelerinde apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (98). Kronik renal hastalıkların belirleyici özelliği olan tübüler atrofinin anahtar özelliği renal tübüler hücre apoptozudur (69).

Tsang ve ark. (99) doksorubisinin hücrelerde apoptozise neden olabileceğini göstermiştir. Burada doksorubisinin (adriamisinin) kanser hücrelerinde apoptozise neden olduğu ve bu etkiyi ortadan kaldıracak genetik değişikliklerin kemoterapi yetersizliği ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Van de Water ve ark. (100) adriamisinden sonra renal tübüler hücrelerde apoptozun arttığını göstermişlerdir. Ratlarda adriamisine oluşturulan nefrotik sendrom modelinde kronik tübülointerstisyel nefritin bir bulgusu olarak tübüler hücrelerde fenotipik değişikliklerin ve apoptozisin meydana geldiği gösterilmiştir (101). Özen ve ark. (102) adriamisine oluşturulan nefrotik sendrom modelinde nitrik oksit üretiminin rolünün araştırıldığı deneysel sıçan çalışmasında özellikle tübülointerstisyel alanda apoptotik hücrelerin yoğunlaştığını ve aynı bölgede inflamatuvar hücre oranının da artmış olduğu gösterilmiştir. Usta ve ark. (101) pentoksifilinin etkilerini araştırdığı bir çalışmada adriamisin kullanılarak nefrotik sendrom modeli oluşturulmuş ve apoptotik hücrelerin sayısında artış olduğu gösterilmiştir. Aksine, Büyükçelik ve Anarat (103)'ün yaptığı çalışmada ise adriamisin ile oluşturulan nefrotik sendrom modelinde apoptozisin artmadığı bulunmuştur. Doksorubisin, oksidatif stresi tetikler ve bunu izleyen apoptozis, renal hasara neden olur. Chmielewska ve ark. (104) yaptıkları çalışmada, renal tübüler hücrelerde endojen metallothioneinler I/II (MT)'in ekspresyonu ile doksorubisinin indüklediği apoptoz arasında korelasyon tespit

edilmiştir. Lahoti ve ark. (105) doksorubisinin indüklediği nefrotoksisite çalışmasında: pro-apoptotik APAF-1, Kaspaz-3, Bax ve Bad proteinlerinde artış; anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL genlerin ekspresyonunda azalma, p53 gen ekspresyonunda artış ve p53 geninin regülatörü Mdm2 supresyonunu tespit etmişlerdir. Glomerüler hücrelerde, özellikle Bax proteinlerinde artış ve Bcl-2 ekspresyonunda azalma yaparak DX'nin apoptozu indüklediği görülmüştür (106). Endojen PGI2 birikimi, adriyamisin'in Bcl-xL ekspresyonunu azaltarak indüklediği renal tübüler hasarı azalttığı düşünülmüştür (107).

### **1.2.6. Deneysel Model Olarak Doksorubisin Nefrotoksisitesi**

Adriamisine bağlı glomerüler ve interstisyel fibrozis modelini farelerde ilk kez Wang ve ark. tanımlamışlardır. Bu çalışmada farelere adriamisine i.v olarak 10-11 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Bu uygulamanın 1, 2, 4, ve 6. hafta sonundaki etkileri incelenmiştir (82). Antineoplastik bir ajan olan adriamisine 4-6 hafta içerisinde hafif derecede renal yetmezlikle birlikte giden nefrotik sendrom tablosuna neden olmaktadır (108-111). Bunun için progresif glomerüler hastalığa neden olmaktadır (112).

Deneysel modeli olarak DX nefropatisi, birkaç güçlü yöne sahiptir. Öncelikle, böbrek hasarı için oldukça elverişli bir modeldir. Doku hasarının şiddetli olduğu durumlarda dahi buna düşük oranda mortalitenin (< %5) ve morbiditenin eşlik ettiği güçlü bir modeldir. İlacın uygulandığı ilk bir kaç gün içerisinde böbrek hasarı başladığından, hasarın oluşma zamanı ve şiddeti önceden tahmin edilebilir olması böbrek hasarının daha kötüye gitmesini sağlayacak ya da bundan korunmayı gerektirecek müdahalelerin denenmesi açısından faydalıdır. Hasarın yapısal ve fonksiyonel özellikleri insanlarda görülen kronik proteinürik renal hastalıkla benzerlik gösterir. Ratlar kısa üreme dönemleri, kolay (ve ucuz) yoldan elde edilebilen denekler olmaları ve genetik manipülasyona uyumluluklarıyla bilinirler (113).

Doksoşubisin nefropatisinin deneysel model olarak kullanılmasında bazı dezavantajlar vardır. Bazı grupta diğerlerinden daha düşük şiddette renal hasar meydana geldiğinden grup değişkenlikleri oluşur. Adriamisine dar bir terapötik indekse sahiptir, bu sebeple optimum dozdan daha az verilmesi renal hasarın oluşmamasına da daha fazla verilmesi ölümlü sonuçlanan toksisiteye yol açabilir.

Tutarlı ve kolay üretilebilen bir model olmasına rağmen, ilaca verilen cevapta bazı bireysel değişiklikler aynı tür kemiricilerde dahi oluşabilir (114).

### **1.3. Matriks Metalloproteinazlar**

Matriks metalloproteinazlar, membran yapılarında ve hücreler arası matrikste bulunan kollajen, laminin, proteoglikan gibi yapıları yıkıma uğratan endopeptidazlardır (115). Matriks metalloproteinaz ailesi, ekstrasellüler proteinazların önemli bir üyesidir. Ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkımı, en önemli görevleridir. Birçok fizyolojik ve patolojik süreçlere katılırlar. Ekstrasellüler matriksin turnover'i, doku remodelingi, anjiyogenez, morfogenez ve gelişimde oldukça esansiyel bir konuma sahiptir. Matriks metalloproteinazlar emriyogenez, ovülasyon, kemik remodelingi ve yara iyileşmesi gibi birçok fizyolojik olayda rol alırlar. Aynı zamanda bu enzimler hücre göçü, invazyon, proliferasyon ve apoptoziste etkilidirler (116, 117).

Matriks metalloproteinazların aktivitelerindeki kontrol kaybının artışı, kardiyak hastalık, ateroskleroz, periodontal hastalık, tümör metastazı ve artritler gibi birçok hastalığın patogeneğinde etkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (116).

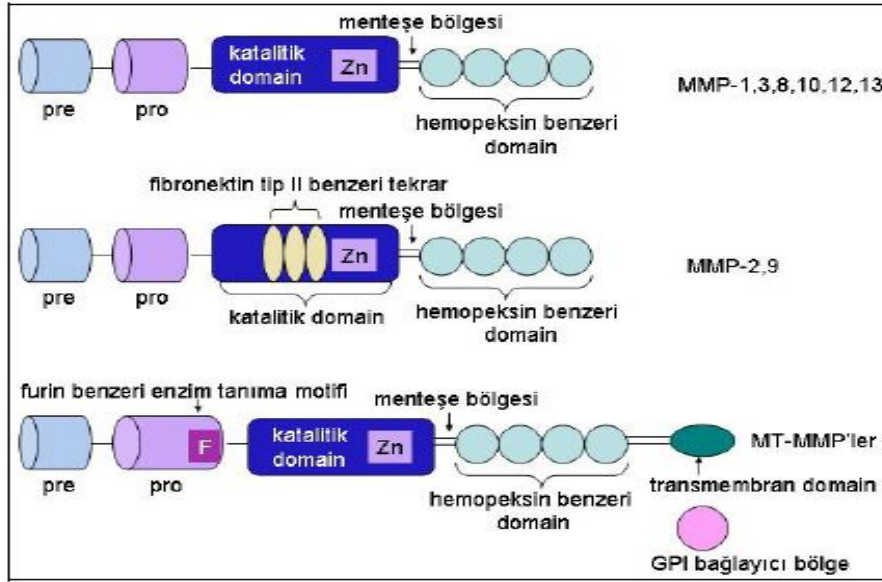
Matriks metalloproteinazlar hakkında ilk bilgi, Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından 1962 yılında yayınlanmıştır (118). Matriks metalloproteinazların molekül ağırlıkları 19-92 kDa arasında değişmektedir (119). Günümüzde MMP ailesinin 25 üyesi saptanmıştır. Matriks metalloproteinazlar substrat spesifitesi, primer yapısı ve hücrel lokalizasyonuna göre 5 temel sınıfa ayrılırlar. Bunlar;

1. Kollajenazlar
2. Stromelizinler
3. Jelatinazlar
4. Matrilizinler

5. Mebran-tip MMP'ler (Mt-MMP) (Tablo II) (120, 121). Matriks metalloproteinazlar çeşitli ortak yapısal özelliklere sahiptirler. Matriks metalloproteinazların tümü tipik olarak N terminalinde enzimin lider dizilimi olan pre-domain içerirler (122, 123) Bu lider dizilim enzimi salgılanma için etiketler ve salgılanma sonrası kaybolur.

İkinci bölge olan pro-domain enzimin latent formda kalmasından sorumludur ve enzim aktivasyonunu takiben kaybolur. Bir sonraki kısım  $Zn^{++}$  bağlayan bölgeyi içeren katalitik domaindir. Katalitik domain ek olarak yapısal bir  $Zn^{++}$  iyonu ve 2-3  $Ca^{++}$  iyonu içerir. Bu bölge stabilite ve enzimatik aktivitenin oluşması için gereklidir (124).

Bazı MMP üyelerinde genel yapıya ek olarak farklı bölgeler yer alır. Jelatinaz sınıfına ait MMP-2 ve 9, jelatin, kollajenler, ve laminine bağlanmayı sağlayan katalitik domaine giren tip II fibronektin üçlü tekrar alanına sahiptir (125) Hemopeksin benzeri bölüm, substrat spesifitesini belirlemede anahtar rol oynar. Jelatinazların yapısında katalitik bölge ve C-terminal hemopeksin benzeri bölüm arasında proline zengin bağlayıcı bölge vardır (116, 117, 126).



Şekil 4. Matriks metalloproteinaz enzimlerinin moleküler yapısı (127).

**Tablo 2.**Matriks metalloproteinaz ailesinin üyeleri (127).

Grup	Üyeler	MMP Numarası	Ana Substratları
Kollajenazlar	İnterstitial Kollajenaz	MMP-1	Fibriler kollajenler
	Nötrofil kollajenaz	MMP-8	Fibriler kollajenler
	Kollajenaz 3	MMP-13	Fibriler kollajenler
	Kollajenaz 4	MMP-?	Bilinmiyor
Jelatinazlar	Jelatinaz A	MMP-2	Jelatin. Kollajen Tip IV-V. Fibronektin
	Jelatinaz B	MMP-9	Jelatin. Kollajen Tip IV-V. Fibronektin
Sıromelizinler	Stromelizin-1	MMP-3	Laminin. Non-fibriler Kollajen, Fibronektin
	Stromelizin-2	MMP-10	Laminin. Non-fibriler Kollajen. Fibronektin
	Matrilisin	MMP-7	Laminin. Non-fibriler Kollajen, Fibronektin
	Stromelizin-3	MMP-11	$\alpha$ -1 proteinaz inhibitör (serpin)
Mt-MMP'ler	Mt-1 MMP	MMP-14	Pro-MMP-2, kollajenler, jelatin
	Mt-2 MMP	MMP-15	Pro-MMP-2. kollajenler. jelatin
	Mt-3 MMP	MMP-16	Pro-MMP-2. kollajenler, jelatin
	Mt-4 MMP	MMP-17	Pro-MMP-2. kollajenler. jelatin
Diğerleri	Metalloelastaz	MMP-12	Elastin
	Enamelsin	MMP ?	Bilinmiyor
	Xenopus	MMP-?	Bilinmiyor
	Bilinmeyen	MMP-19	Aggrecan

Matriks metalloproteinazların tümü preproenzim olarak sentezlenir ve bunların çoğu inaktif latent zimojen form olan pro-enzim formunda salgılanır. Latent zimojenlerin aktivasyonu hücre içinde, MT-MMP'ler aracılığıyla hücre yüzeyinde, diğer proteazların etkisiyle ekstrasellüler aralıkta ya da “aktivasyon kaskadı” olarak adlandırılan şekilde ya da önceden aktive olmuş MMP'lerin diğerlerini aktive etmesiyle meydana gelebilir (128). Ya da bir amino-terminal propeptidin çıkarılmasıyla aktif hale dönüşürler. Propeptit yapısında, enzimin aktif bölgesinde çinko ile sistein rezidülerinin etkileşimi enzimi latent formda tutar. Sistein switch mekanizmasının tetiklenmesi ile bu etkileşimin kesilmesi enzimin aktivasyonu ile sonuçlanır. Son zamanlarda, Gu ve ark tarafından yapılan çalışmalarda serebral iskemi sırasında proMMP-9 kimyasal aktivasyonunu in vivo göstermişlerdir (116, 117, 129).

Matriks metalloproteinazlar birçok farklı hücrede sentezlenirler:

Matriks metalloproteinaz-1; makrofaj, monosit, fibroblast, keratinosit, kondrosit, hepatosit ve bir çok tümör hücresinden sentezlenir.

Matriks metalloproteinaz-8; kondrositler, sinovial fibroblastlar ve endotelial hücrelerden sekrete edilir.

Matriks metalloproteinaz-3 ve MMP-10; fibroblastik hücreler, normal ve trasforme squamöz epitelyal hücrelerden sentezlenir.

Matriks metalloproteinaz-9; keratinosit, monosit, alveolar makrofajlar, PMN lökositler ve maling hücrelerin çoğundan sentezlenir (116, 117, 130). Matriks metalloproteinazların üyeleri ve etki ettikleri substratlar Tablo II'de gösterilmiştir,

### **1.3.1. Latent MMP'lerin Aktivasyon Mekanizmaları**

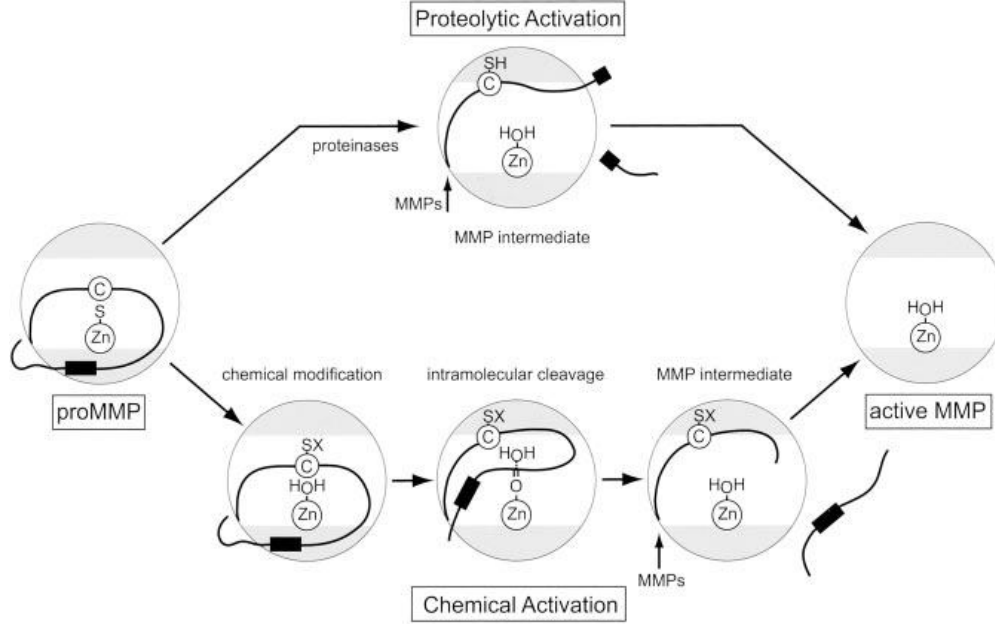
Matriks degradasyonu yapabilmesi için MMP'lerin proteolitik kırılma ile aktif forma dönüşmeleri gerekmektedir. Üç farklı aktivasyon mekanizması tanımlanmıştır (116).

1. Stepwise aktivasyon
2. Mt-MMP'ler ile hücre yüzeyinde aktivasyon
3. İntrasellüler furin ile aktivasyon.

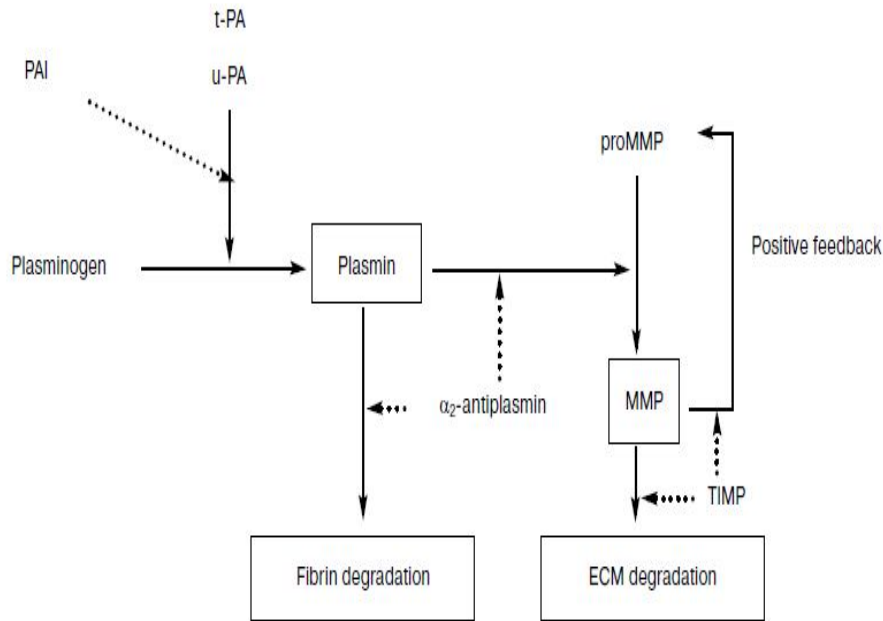
Aktivasyon sırasında amino-terminal propeptitlerin ayrılmasıyla 10 kDa civarında peptit kaybına uğrarlar. Bu zimojen enzimlerin latent durumunu sağlayan; aktif merkezdeki çinkoya bağlanan korunmuş sistein aminoasitidir. Sistein aminoasitinin çinkodan koparılmasıyla aktivasyon gerçekleşir (Şekil 5) (126, 131).

İntrasellüler furin tarafından aktif hale getirilen birkaç üyenin dışında inaktif zimogenler olarak hücreden salınıp ekstrasellüler aktive edilirler. Sekrete edilen proMMP'ler; SH reaktif ajanlar, civalı bileşikler, reaktif oksijen ve denatüranları gibi non-proteolitik ajanlar tarafından ve proteinazlar tarafından invitro da aktive edilirler. Tüm durumlarda Cyn-Zn<sup>+2</sup> (sistein swich) etkileşiminin kesilmesi gereklidir ve bu aktivasyon stepwise aktivasyon olarak adlandırılır. Matriks metalloproteinazların stepwise aktivasyonu esnasında ilk adım; plazmin, tripsin, elastaz ve kallikrein gibi bir proteinazlar ve diğer MMP'ler ile gerçekleşir. Bu proteinazların in vivo da çoğu potent patolojik aktivatörleri plazmin yoluyla olur (116, 132).

Plazmin, MMP'nin propeptit domeininin plazminojene hassas bölgesine atak yapar. Propeptitte konformasyonel bir değişiklik meydana gelir ve ikinci bir proteinaz (muhtemelen diğer bir MMP) ile hızla kırılarak aktive edilir (Şekil 6).



Şekil 5. Latent MMP'lerin Aktivasyon Mekanizmaları (116).

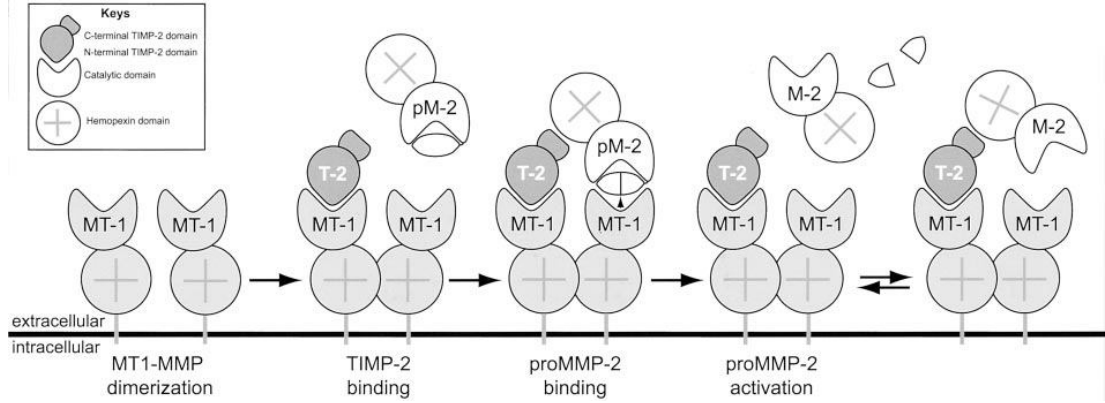


Şekil 6. Fibrinolitik sistem ve MMP'ler (126).

İn vitro ortamda 4-aminofenil merkürük asetat (APMA), hipokloröz asit (HOCL), okside glutasyon (GSSG) ve denatüranlar (üre, sodyum dodesil sülfat) gibi non-proteolitik ajanlar tarafından da gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Ayrıca aktive olan MMP'ler de diğer proMMP'leri aktive edebilir. Örneğin membran bağımlı Mt-

MMP'ler hücre yüzeyinde pro-MMP-2 enzimlerini aktive edebilir (Şekil 7) (116, 117, 126).

Matriks metalloproteinazların hücre yüzeyinde aktivasyonu, hücre migrasyonu esnasında ECM'in degradasyonunda önemlidir. Bu olaya örnek membranda bulunan Mt1-MMP ile MMP-2'nin aktivasyonudur (Şekil 7).



**Şekil 7.** MT1-MMP ve TIMP-2 tarafından proMMP-2 aktivasyon modeli (116).

Matriks Metalloproteinazların bazı üyeleri intrasellüler olarak da aktivasyona uğrayabilirler. Bu olaya örnek stromelizin (MMP-11) golgi ile ilişkili subtilisin benzeri proteinaz tarafından aktivasyonudur (116).

### 1.3.2. Matriks Metalloproteinaz Ekspresyonun Regülasyonu

Normal yetişkin dokularında, MMP'lerin çoğunun ekspresyonu düşük düzeyde bulunur. Fizyolojik ve patolojik remodeling süreçlerinde ekspresyonları upregüle olur. Matriks metalloproteinazların transkripsiyonel regülasyonu, proksimal promoter bölgelerinde yer alan AP-1 düzenleyici eleman ile sağlanır. Matriks metalloproteinaz gen transkripsiyonu ekstrasellüler yerleşimli pek çok madde ile uyarılabilir: Mesela sitokinler (Interlökin 1-4), büyüme faktörleri (EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , 'basic fibroblast growth faktör'), hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-matriks etkileşimleri gibi. Bu aktivatörlerin reseptöre bağlanması ile en az 3 değişik sınıf mitojen aktive-edilmiş kinazlar (MAP) tarafından sağlanan intrasellüler olaylar zinciri ile hücre AP-1 transkripsiyon faktörü aktif hale geçirilir ve AP-1 cis elementine bağlanarak MMP geninin transkripsiyonunu sağlar (133, 134).

Matriks metalloproteinaz gen ekspresyonu onkojenik hücresel transformasyon, fiziksel stres, kimyasal ajanlar (forbol esterleri ve ilaçlar), sitokinler,

büyüme faktörlerini kapsayan efektörler ile upregüle edilir. Matriks metalloproteinaz gen ekspresyonu, supresyon faktörleri ile (TGF-beta, retinoik asit, glukokortikoidler) ile downregüle edilir (Tablo 3) (130).

### **1.3.3. Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörlerinin (TIMP) Yapıları ve Fonksiyonları**

Matriks metalloproteinazların üç boyutlu yapısından yararlanılarak inhibitörlerin tasarımı yapılmaktadır (135).

Plazma  $\alpha$ 2-Makroglobulinler, genel bir endopeptidaz inhibitörüdürler (136). Matriks metalloproteinazların proteolitik aktiviteleri, hem non-spesifik olan  $\alpha$ -2 makroglobulin,  $\alpha$ -1antiproteaz gibi hem de spesifik doku metalloproteinaz inhibitörleri ile engellenebilir (9). Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri, 6 disülfid bağı oluşturan 12 sistin rezidüsü içerir ve MMP'lerin çinko içeren katalitik domaine bağlanırlar. Şu ana kadar tanımlanan 4 farklı grup TIMP mevcuttur (133, 137). Dolaşımdaki genel proteaz inhibitörlerinden biri  $\alpha$ -2 makroglobulindir. Bu yapı; enzimlere kovalent olarak bağlanarak onların yapısını değiştirir, kollajenin ve diğer matriks makromoleküllerinin parçalanmasına engel olur (115).

Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1 (TIMP-1); 28,5 kDa ağırlığında ve ilk olarak tavşan kemiğinden izole edilen bir glikoproteindir. Daha sonra insan vücut sıvıları ve dokularında da olduğu anlaşılmıştır. Tüm aktive kollajenazları inhibe edebilir. Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1, Mt-1-MMP ve MMP-2 dışındakileri inhibe eder. Fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, forbol esterleri ve interlökin-1 gibi birçok uyaran TIMP-1'in fibroblastlardaki ekspresyonunu artırır (138). Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-1, 92 kDa'luk jelatinaz sınıfından olan pro-MMP-9'a bağlanır. Bu ikili proMMP-9/TIMP-1 kompleksi bütün aktif MMP'leri inhibe eder ve daha aktif stabil form olan üçlü proMMP-9/TIMP-1/MMP kompleksi oluşur (115).

Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-2 (TIMP-2); ilk olarak melanom hücrelerinden izole edilen 21 kDa ağırlıkta non-glikolize bir proteindir. Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-2, MMP-9 dışındakileri inhibe eder. Fibroblast gibi bazı hücrelerde pro-MMP-2 ile birlikte sekrete edilir ve MMP-2'yi inhibe eder. Alveolar makrofajlarda tek başına da sekrete edilebilirler (138).

Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-3 (TIMP-3), kolorektal karsinomdan identifiye edilmiştir (138). TIMP-3; tümör anjiogenezi inhibe eder (139).

Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-4 (TIMP-4), matriks metalloproteinaz-2,7 ve 9'u inhibe eder (131). Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-4'ün meme kanserinde tümör invazyon ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (140).

Matriks metalloproteinaz doku inhibitörü-3, %30 TIMP-1 ile %38 TIMP-2 ile homoloji gösterirken, moleküler klonlama sırasında ilk kez keşfedilen 22 kDa'luk TIMP-4, %37 TIMP-1 ile %51 TIMP-2 ve TIMP-3 ile homoloji gösterir (131).

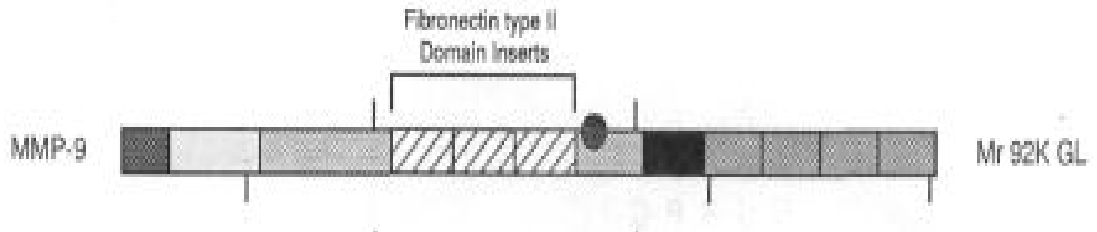
Metastaz supressör protein olan membran yerleşimli glikoprotein (RECK), MMP-2,-9 ve MT1-MMP'in proteolitik aktivitesini inhibe eder (141).

Tüm bu endojen inhibitörlerin yanında akrebin ürettiği glioma yüzeyine bağlanan klorotoksin de MMP-2'yi inhibe edebilmektedir (142).

#### 1.3.4. Jelatinazlar

Matriks metalloproteinazlardan farklı olarak jelatinazlar, katalizör bölge ile aktif bölgesi arasında jelatin bağlayıcı bölge içerir (93, 143).

Matriks metalloproteinaz-9 (Jelatinaz B), ilk olarak 1974 yılında Sapota ve Dancemicz tarafından polimorfonükleer lökositlerden salgılanan bir jelatinolitik enzim olarak tanımlanmıştır (Şekil 8). İn vitro olarak doku metalloproteinaz-1 inhibitörü, MMP-9'un işleyişini değiştirebilir. Matriks metalloproteinaz-9, denatüre kollajen ve jelatin, tip IV ve V kollajen ve elastini de içeren pek çok ekstrasellüler matriks elemanını yıkabilir. Matriks metalloproteinaz-9, diğer bir jelatinaz olan MMP-2 ile oldukça benzerlik gösterir; MMP-9, kazeine karşı oldukça spesifiktir, ancak MMP-2'de bu duyarlılık bulunmaz (8). Matriks metalloproteinaz-2 meme kanserinde metastatik progresyonla ilgilidir (144).



Şekil 8. Matriks metalloproteinaz-9 (132)

Matriks metalloproteinaz-9'da, C-terminal hemopeksin benzeri bölüm substrat spesifitesini belirlemede anahtar rolü oynar. Fibronektin benzeri bölüm kollajen ve jelatinlere bağlanmayı kolaylaştırır (Şekil 8) (126). Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** Jelatinazların salınımını etkileyen faktörler (145).

Hücre Yüzeyinde Etkili Faktörler	Aktive Edici Faktörler		İnhibe Edici Faktörler
	Kimyasal Ajanlar	Diğerleri	
Kalsiyum iyonofor A23187	cAMP	Viral transformasyon	Retinoik asit
Hücre füzyonu	Kolşisin	Onkogenler	Glukokortikoidler
Konkanavalin A	Lipopolisakkarit	Otokrin ajanlar	Adenovirüs-5 ELA geni
Kristaller	Mitomisin C	Fibroblastların yaşlanması	Östrojen
Ürat	Pentoksifilin	İnterlökin	Progesteron
Hidroksi apatit	Forbol diesterleri	Epidermal büyüme faktörü	
Kalsiyum pirofosfat	Prostaglandin E	Platelet büyüme faktörü	
İntegrin reseptör antikoru	Trifluoperazin	Tümör nekroz faktör	
Polihidroksietilmethakrilat	Fiziksel ajan: UV		
Fagositoz	ışını		

#### 1.3.4.1. Jelatinazlar ve Böbrek

Jelatinazlar (MMP-2,-9), bazal membran (BM) bileşenlerinden tip-IV kollajenleri ayırdıkları için böbrekte, jelatinazların önemli rolleri olduğu düşünülmektedir (146).

Matrix metalloproteinaz 9, mezangiumda bulunur. Matrix metalloproteinaz 9 mRNA, normal rat böbreğinde predominant olarak glomerülden eksprese edilir. WKY ratlarda anti-GBM glomerulonefrit indüksiyonundan 3-7 gün sonra, glomerüler patoloji ve hasar gelişimi ile paralel olarak MMP-9 mRNA glomerülden ekspresyonunun artması, MMP-9'un glomerulonefrit sırasında GBM'nin proteolizisinde önemli rolü olduğunu düşündürür. Matrix metalloproteinaz-2, nefritin sonraki fazında rol oynayabilir (147). Matriks metalloproteinaz 2 ekspresyonu, rat ve insan mezengial hücre kültüründe gösterilmiştir (148, 149).

Matriks metalloproteinaz 9'un lokal olarak proteolitik aktivitenin artışı göstermektedir ki MMP-9, glomerüler proteinüri (150) ile ve tip 2 diabette gelişen albuminüri (151) ile bağlantılıdır. Podositlerin kültürde MMP-9 ürettiği gösterilmiştir (152) ve podosit hasarı adriamisin nefropatisi geliştiğinde karakteristik bulgudur (113). Yusuke Sakamaki ve ark. (9) yaptığı çalışmada, adriamisinin non-immün yolla glomerüler hasar modelinde, glomerüloskleroz ve albüminürinin artışında MMP-9 ve MMP-13'in rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Bu da spesifik MMP inhibitörlerinin

geliştirilmesinin, glomerülosklerozun iyileştirilmesinde yeni tedavi imkanı sağlayabileceğini gösterir.

Miyokardiyal ve dolaşımdaki MMP aktivasyonu özellikle de MMP 2 aktivasyonu DX'in toksik etkilerinin progresyonuyla yakın ilişkilidir (153). Matrix metalloproteinaz-2'nin farelerde DX'in indüklediği kardiyotoksitenin akut belirteci olduğu bulunmuştur (152). Matrix metalloproteinaz-2 oksidatif strese duyarlıdır ve reaktif oksijen ürünler ile aktive olabilen MMP'nin prodomaininde sülfid bağının oksidasyonu pro-MMP-2 (72-kDa MMP-2) aktive olur, peroksinitrit (süperoksit ve nitrik oksidin reaksiyon ürünü) glutatyonla etkileşimi, pro-MMP-2'i aktive eder. Apoptozis indüksiyonuna ek olarak, ventriküler dokudan MMP2'nin, 72-kDa formunun non-klevaj aktivasyonu, radikal (superoksit) formasyonuyla ilişkili enzimlerin aktivasyonunu değiştirmede potansiyel etkili olduğunu düşündürmüştür. Barteková ve ark. (154) total SOD (süper oksid dismutaz) aktivitesinin indirgenmesi ile DX'nin sol ventriküldeki 72-kDa MMP-2 aktivasyonu ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

#### **1.4. Malondialdehit (MDA)**

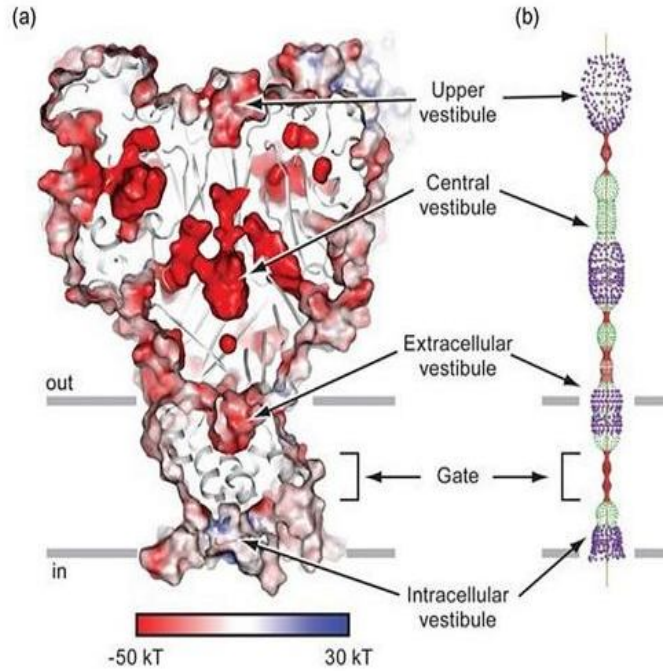
Reaktif oksijen bileşiklerinin hücrede oluşturduğu hasarı tespit etmek amacıyla kullanılan farklı oksidatif stres markerları vardır. Bunlardan biri de lipid peroksidasyonunun markeri için kullanılan MDA'dır (155). Malondialdehit, lipid peroksidasyonu, lipid moleküllerindeki iki ansatüre bağ arasında yerleşmiş metilen grubundan bir hidrojen atomunun çıkması ile başlatılan kompleks bir fenomendir. Sonuçta yeni bir karbon merkezli lipid serbest radikali oluşur. Oksijen varlığında bu yeni lipid serbest radikalinden lipid peroksitler veya hidroperoksitler oluşmaktadır. Bu son ürünler nispeten daha stabil bir son ürün olan ve lipid peroksidasyonunun markeri olarak kullanılabilen MDA'ya dönüşür. Lipit peroksit radikalleri membran yapısındaki diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlere dönüşürler ve olay kendi kendine katalizlenerek devam eder (156-159). Malondialdehit, üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur

(160). Malondialdehit bu değişimsel özelliklerinden dolayı, DNA'nın nitrojen bazları ile de etkileşime girebilir. Bundan dolayı malondialdehit, mutajenik, kültür hücreleri için genotoksik ve karsinojeniktir (158, 161).

Yağ asidi hidroperoksitlerinin başka bir toksik etkisi de araşidonik asit metabolizmasında gözlenmektedir. Yüksek lipid peroksid seviyeleri prostasiklin sentezini güçlü bir şekilde inhibe edeceğinden araşidonik asit metabolizması tromboksan sentezine doğru yeniden düzenlenecek, nihayetinde nötrofil stimülasyonu, süperoksit anyon üretimi ve trombosit agregasyonu tekrar modüle olacaktır (160).

### 1.5. Aside duyarlı iyon kanalları (ASIC)

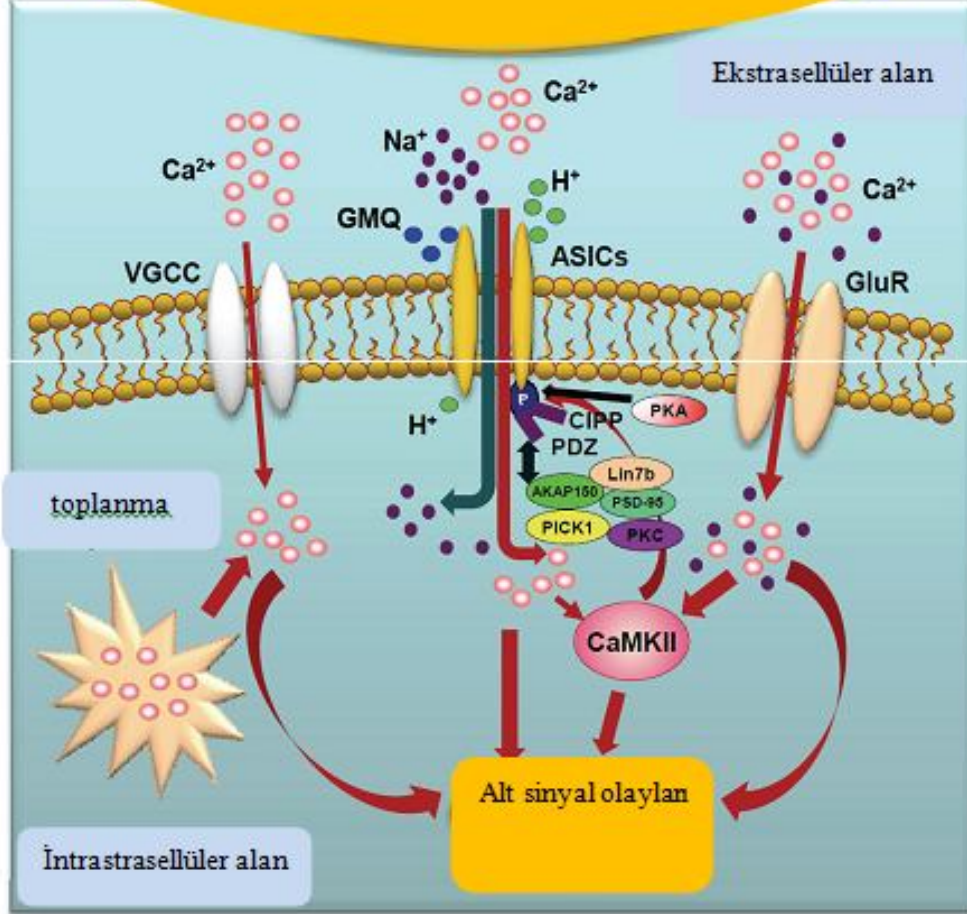
Aside duyarlı iyon kanalları (ASIC), degenerin/epitelyal Na kanalı (DEG/ENaC) süper familyasından, voltaj bağımsız, amilorid sensitiv, katyon-selektif kanallardır. Aside duyarlı iyon kanallarının yapısı Şekil 9'da gösterilmiştir. Çeşitli intrasellüler ve ekstrasellüler moleküler sinyaller ASIC kanallarının aktivasyonunu modüle etmektedir. Aside duyarlı iyon kanallarının intrasellüler ve ekstrasellüler moleküler sinyallerle modülasyonu Şekil.10'da gösterilmiştir. Bugüne kadar ASIC kanallarının 4 gen tarafından kodlanan 7 subuniti (1a, 1b1, 1b2, 2a, 2b, 3, ve 4) tespit edilmiştir (13).



Şekil 9. Aside duyarlı iyon kanallarının yapısı (162).

### ASIC'lar için Ekstrasellüler modölatörler

Cl<sup>-</sup>, di- ve polivalan kanyonlar, nöropeptidler, iskemide salinan moleküller, inflamatuvar mediatörler, insülin, proteazlar, serbest radikaller/redoks reaktifleri, aminoglikozidler, diarilamidinler, vs



**Şekil 10.** Aside duyarlı iyon kanallarının intrasellüler ve ekstrasellüler moleküler sinyallerle modülasyonu (13).

Aside duyarlı iyon kanalları 2a ve ASIC 3 subunitleri arasındaki biyokimyasal etkileşim, transfekte insan embriyosu renal hücrelerinde (HEK293) birlikte purifikasyonu ile gösterilmiştir. Ayrıca RT-PCR amplifikasyonu kullanılarak beyin, serebellum, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas; kolon; lenfosit, over, prostat, ince barsak, testis, trigeminal ganglion gibi birçok santral ve periferik insan dokusunda ASIC2a ve ASIC3 transkriptlerinin ortak ekspresyonu tespit edilmiştir (163). Aside duyarlı iyon kanalları yaygın olarak santral ve periferik sinir sisteminde bulunur (164, 165), fakat nonnöral ASIC ekspresyonu, testis, pitüiter bez, akciğer

epitelyal hücreler, kemik ve üretiliyal hücrelerde tespit edilmiştir (165-168). Fonksiyonel ASIC'lar homomerik ve heteromerik kanal formlarının biraraya gelmesinde oluşur (169). Aside duyarlı iyon kanallarının, ekstrasellüler asidosize duyarlı ve iskemi, fraktür, lezyon ve postoperatif durumlar gibi çeşitli patolojik durumlarda nosisepsiyona katkıda bulunan kanallar olduğu ileri sürülmüştür (164, 170, 171).

Doksozobisin nefropatisi epitelyal sodyum kanalı (ENaC)-bağımlı volüm retansiyonu ve renal fibrozise yol açar. Yapılan bir çalışmada duyarlı farelerde DX'nin indüklediği nefrotik sendromda volüm retansiyonu izlenmiş toplayıcı kanalda Na-K-ATPase ve artmış epitelyal sodyum kanal (ENaC) aktivitesi tespit edilmiştir. Ratlarda volüm retansiyonu ve asit oluşumu mineralokortikoid reseptörlerinin blokajıyla önlenememiş fakat ENaC inhibitörü amilorid tarafından tamamen durdurulmuştur. Böylece, volüm retansiyonu, esas olarak mineralokortikoid bağımsız ENaC aktivitesi upregulasyonuna bağlanmıştır. Doksozobisinin indüklediği nefrotik sendrom sırasında ENaC stimülasyonu için gerekli sinyalin ne olduğu anlaşılammıştır (12).

Epitelyal sodyum kanalı ve yakından ilişkili olduğu ASIC proteinlerinin, vasküler düz kas hücrelerinde (VSMCs) potansiyel mekanotransduker oldukları düşünülmektedir, çünkü bunların degenerin olarak adlandırılan protein grubuyla güçlü evrimsel bağlantıları vardır. Vasküler düz kas hücrelerinde basınç değişimine karşı oluşan hücresel olayların (vazokonstriksiyon gibi) altındaki moleküler mekanizma anlaşılammıştır. Son çalışmalar, miyojenik yanıtın, özellikle konkomitant renal hastalığı olan ve basınca bağlı hasardan dolayı bozulan renal mikrosirkülasyonda önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Miyojenik yanıt, perfüzyon basıncı azaldığında, vazodilatasyon, arttığında vazokonstriksiyonla karakterize intrinsik vasküler bir yanıttır. Mekanosensitiv cevapla bağlantılı, integrinler, transient reseptor potansiyel (TRP) kanalları ve epitelyal Na kanalı familyasından olan kanallar olmak üzere çeşitli potansiyel moleküller tanımlanmıştır (15).

Tümör, iskemi ve inflamasyonda dominat faktör olan doku asidozu; ağrı ve hiperaljezide önemli rolü vardır. Bunun nedeni iyon bağımlı depolarizasyon akımlarından oluşan nosiseptif duysal nöronların direkt eksitasyonudur. Aslında, bu

nöronlar ana kategoride ekstrasellüler pH değişimine hassas ASIC kanallarına sahiptir. Asid-duyarlı iyon kanalları ılımlı ekstrasellüler pH düşüşü sonrasında duysal nöronların aksiyon potansiyelinin tetiklenmesini indükleyebilirler. İnflamasyon sırasında post-translasyonel regülasyona ve transkripsiyonel indüksiyona uğrarlar ve sonuçta nosiseptif sistemin fizyopatolojik süreçte hipersensitizasyonuna katkıda bulunurlar. Spesifik bir ASIC izoformunun, kardiyak iskemik ağrıya sebep olduğu düşünülmektedir (14).

Duysal nöronlarda, NSAİİ'nin terapötik dozda, direkt COX inhibisyonundan bağımsız olarak nativ ASIC akımlarında, heterolog sistemde ASIC kanal ekspresyonu üzerine farklı aktivitesi gösterilmiştir. NSAİİ'nin, prostaglandin sentezinde, ASIC akım ve ASIC ekspresyonunu kombine inhibisyonu, onları ağrı durumu için özellikle doku inflamasyonuna bağlı ağrı durumunda geniş spektrumlu tedavide ideal kılar. Doku inflamasyonunun akut fazında, örneğin inflamatuvar asidozis nedeniyle ağrıya duyarlı nöronların aktivasyonunu, ASIC akımlarının hızlı inhibisyonuyla NSAİİ bloke eder. Sonra NSAİİ'ler COX üzerindeki diğer etkileriyle prostaglandin sentezini sınırlayarak ağrı ve inflamasyonu baskırlar. Kronik fazda, ASIC akımlarının ve ekspresyonlarının COX'ın kombine inhibisyonuyla ağrı duyarlılığını azaltırlar. Ayrıca NSAİİ'ler, geniş inflamasyonun indüklediği ASIC kanal ekspresyonu artışını önler. Aspirin ve salisilat ASIC3 içeren kanalları inhibe eder (16).

### **1.6. Oksolamin**

Oksolamin (3-fenil-5,8-dietilaminoetil-1,2,4-oksadiazol), antitusif olarak kullanılan bir ajandır. Antitusif aktivitesi ağırlıklı olarak, periferik bir mekanizmayı göstermektedir. Antiinflamatuvar özelliği nedeniyle solunum yolları mukozasındaki inflamasyonu azaltır. Oksolamin ayrıca analjezik, anti-inflamatuvar, lokal anestejik ve antispazmodik özelliklere sahiptir. İnflamasyon ve irritasyona bağlı olarak oluşan spazmı azaltarak solunumu rahatlatmaktadır (17).

Randall ve Selitto, (18) oksolaminin aspirin ile karşılaştırıldığında analjezik, anti-inflamatuvar etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Oksolamin'nin subkutan ve oral uygulanmalarının her ikisi sonucunda da aspirin ile benzer analjezik etki gözlemlenmiştir. Ancak, Oksolamin 50 mg/kg subkutan doza kadar sıcak plaka ve fenilquinin testinde analjezik etkisi olmadığını, fakat morfinin ise 2 mg/kg subkutan

dozda etkin olduğunu tespit etmişlerdir. Aspirin'in 80 mg/kg subkutan doza kadar sıcak plaka testinde aneljezik etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Oksolamin'in anti-inflamatuar etkisi, fenilbutazonun etkisinin yarısı veya üçte biri kadar olduğunu, ancak 100 mg/kg subkutan doz aspirinden daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir (172). Ayrıca oksolamin, spazmolitik ve bronkodilatatör etkilidir. Oksolamin, günde 3-4 kez, 125-200 mg dozunda kullanılmaktadır. Oksolaminin insanlarda belirgin toksik etkisi yoktur (43).

Barron (19) yaptığı toksikoloji çalışmasında, ratları 3 gruba ayırıp grup-1 (kontrol), grup-2 (düşük doz); 50 mg/kg/gün, grup-3 (yüksek doz); 250 mg/kg/gün dozunda oksolamin uyguladıkları ratları 3 ay klinik olarak gözlemlemişlerdir. Grup 2'de, grubun % 50'sinde 3 hafta içinde hafif salivasyon artışı haricinde patoloji tespit etmemişlerdir. Yapılan otopside de herhangi bir organda patolojik değişiklik görmemişlerdir. Grup 3'te ise 2. haftada orta derecede salivasyon ortaya çıkmış, yapılan otopside ise bazı ratlarda, mesanede diffüz epitelyal hiperplazi tespit etmişlerdir. Bir hayvanda karsinoma in situ görmüşlerdir. Deney hayvanlarına kronik verildiğinde mesane lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda belirgin toksik etkisi yoktur (43).

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı ve Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde yapıldı. Çalışmanın yapılabilmesi için gerekli olan etik onay, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 19.11.2014 tarihinde toplantı sayısı; 2014/23, karar No; 217 protokol no 2014/118 ile alındı.

### 2.1. Deney Hayvanları

Çalışmada FÜDAM'dan temin edilen 8 haftalık Wistar Albino cinsi, 24 adet erkek (220- 280 g) rat kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Grupların kendi içinde homojen olmasına ve gruplardaki rat ağırlık toplamalarının yaklaşık aynı değerde olmasına dikkat edilerek gruplar oluşturuldu. Çalışmamızda kullanılacak ratlar 21° C oda ısısında 12 saat ışık (7: 00-19: 00) ve 12 saat karanlıkta (19: 00-7: 00) takip edilecek şekilde özel olarak yaptırılan ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler çelik kaplarda, su cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Tüm gruplara aynı standart sıçan yemi verilerek ad-libitum su, yiyecek alımları sağlandı ve hayvanların günlük olarak altları temizlenerek bakımları yapıldı. Sıçanlar Elazığ Yem Fabrikasında özel olarak hazırlanan pelletler şeklindeki sıçan yemleriyle beslendi. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 4'de gösterilmiştir. Deney hayvanlarının deneysel uygulama yapılmaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

**Tablo 4.** Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin bileşenleri

Buğday	(%) 15
Mısır	(%) 10
Arpa	(%) 27
Kepek	(%) 8,0
Soya	(%) 29,4
Balık Unu	(%) 8,0
Tuz	(%) 0,6
Kavimix VM 23-Z	(%) 0,2
Methionin	(%) 0,2
DCP	(%) 1,6

## 2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Toplam 4 deney grubu şu şekilde oluşturuldu: Hayvan çalışmaları, toplam 24 adet rat üzerinde gerçekleştirildi. İlk ağırlık ölçümleri yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Ratlar; kontrol (grup 1), DX (grup 2), DX+OXO (grup 3) ve OXO (grup 4) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

**Grup 1 (Kontrol) (n: 6):** Yedi günlük çalışma süresince herhangi bir işlem yapılmadı.

**Grup 2 (DX) (n: 6):** Deneyin 1. günü doksorubisin hidroklorid (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>HCl) (Doxo Teva 50 mg flakon) 15 mg/kg i.p. tek doz uygulandı.

**Grup 3 (DX+OXO) (n: 6):** Deneyin 1.günü doksorubisin hidroklorid (C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>HCl) (Doxo Teva 50 mg flakon) 15 mg/kg i.p. tek doz uygulandı. Daha sonra deney süresince oksolamin 50 mg /kg/gün i.p. olarak verildi.

**Grup 4 (OXO) (n: 6):** Deney süresince oksolamin i.p. olarak 50 mg/kg/gün dozunda verildi.

## 2.3. Örneklerin Alınması

Bütün gruplardaki ratlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg)+xylazine (10 mg/kg) i.p. uygulanarak anestezi altında etik yönergelere uygun biçimde dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından ratların böbrek dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan böbrek dokuları histolojik çalışma için % 10'luk formol solüsyonunda tespit edildi.

## 2.4. Malondialdehit Çalışması

Malondialdehit çalışması için 0.42 gr Tris-Base + 1.43 gr Tris-HCl + 3 gr KCl ve 0.5 ml Tween 20, 250 ml distile suda hazırlandı. Hazırlanan bu tampon örneklerin homojenatında kullanıldı. X gr doku üzerine 5 ml tampon ilave edildi ve parçalandı. Homojenat 5000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısımdan 1 ml başka bir tüpe alındı. Alınan 1 ml örnek üzerine 1ml % 10'luk Triklosetik Asit (TCA) (10 gr TCA 100 ml distile suda hazırlandı) ilave edildi. Üzerine 1 ml %0.6 Tiyobarbiturik Asit (TBA) (0.6 gr TBA 100 ml distile suda hazırlanır hazırlanan TBA +4 en fazla bir gün saklanabilir) ilave edildi. Üzerine 1 ml distile su ilave edildikten sonra, son olarak 0.5 ml % 4 HCl ilave edildi (4 ml HCl 100 ml distile suda hazırlanır, asit ve su şiddetli reaksiyona girdiği için mümkünse asit damlalar şeklinde suya ilave edilmelidir).

Hazırlanan karışım 90-95 °C de 120 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler oda sıcaklığında soğutuldu ve üzerine 3 ml bütanol ilave edilip vortekslendi. Daha sonra tüpler 5 dk 5000 rpm de santrijüj edilir ve oluşan (bütanol faz) süpernatanttaki kırmızı-pembe renk spekro küvetine pipet yardımıyla alınır ve bütanole karşı 532 nm de okundu. Okunan absorbans değeri x: (okunanABS +0.0344) /0.0492 formülüyle hesaplandı. Bulunan değer 5 ile çarpıldı (nedeni doku homojenatı 5ml tamponda hazırlandı) çıkan sonuç homojenatta kullanılan doku ağırlığı kadardır.

### **2.5. TUNEL Metodu**

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. Phosphate buffered saline ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi.

Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Skala bar: 20µm. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5.** TUNEL Boyama Prosedürü

	<b>İşlem</b>	<b>Süre</b>
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3X15 dakika
3	%100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6	1: 500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3X5 dakika
8	Endojen peroksit blokağı (% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 dakika
9	PBS	3X5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	3X5 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3X5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1-5 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	%80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2X5 dakika
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	.....

## 2.6. İmmünohistokimyasal İnceleme

Böbrek dokusunda MMP-2, MMP-9 VE ASIC3 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı (Tablo 6). Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6'da mikrodalga fırında (750W) 12 dakika kaynatıldı. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu ile 5 dakika muameleden sonra primer antikorlar (Anti-MMP2 antibody, PA1122-2, Bosterbio, USA, Rabbit Anti-MMP-9 Polyclonal Antibody, bs-0397R, Bioss, USA. Rabbit Anti-ASIC3a/ASIC3 Polyclonal Antibody, bs-12132R, Bioss, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor uygulanmasından sonra Streptavidin Alkaline

Phosphatase (TS-060-AP, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra distile su içerisine alındı. Dokulara Fast Red Substrate System (TA-125-AF, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak distile su ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: < % 25, 0.4: % 26-50, 0.6: % 51-75, 0.9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, + 0.5: çok az, + 1: az, + 2: orta, + 3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. (Histoskor= Yaygınlık x şiddet)

**Tablo 6.** İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin Streptavidin Alkaline Phosphatase	30 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	Fast Red	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	.....

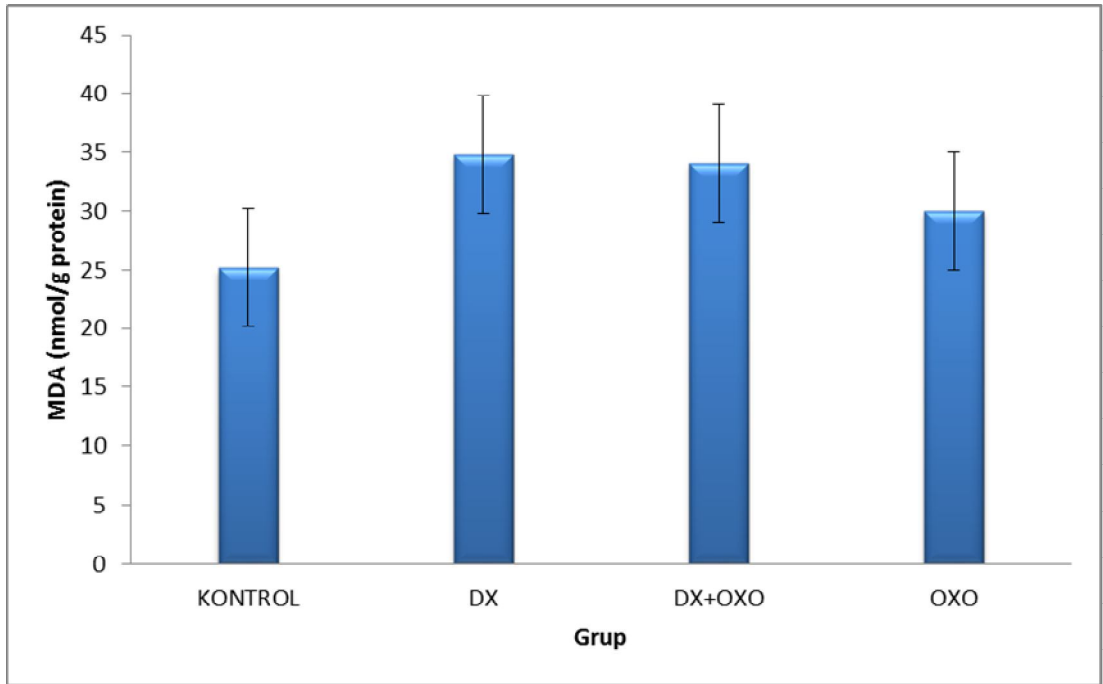
## **2.7. İstatistiksel Analiz**

Tüm istatistiksel analizler SPSS version 22 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve posthoc tukey testi ile yapıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Malondialdehit düzeyi

Böbrek dokusu MDA düzeylerinin ortalaması ve gruplar arasındaki değişiklikler Şekil 11’de gösterilmiştir. Kontrol ( $25.17 \pm 0.73$  nmol/g protein) ve OXO ( $30.01 \pm 1.57$  nmol/g protein) grupları arasında böbrek dokusu MDA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı. Dokсорubisin grubunda böbrek doku MDA düzeyleri  $34.82 \pm 8.69$  nmol/g protein olarak saptandı. Kontrol grubuyla kıyaslandığında DX grubunda MDA düzeyleri daha yüksek düzeyde saptandı, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p > 0.05$ ). Dokсорubisin grubuyla ( $34.82 \pm 8.69$  nmol/g protein) kıyaslandığında ise DX+OXO ( $34.09 \pm 5.03$  nmol/g protein) grubu böbrek doku MDA düzeyleri açısından anlamlı bir değişiklik izlenmedi.

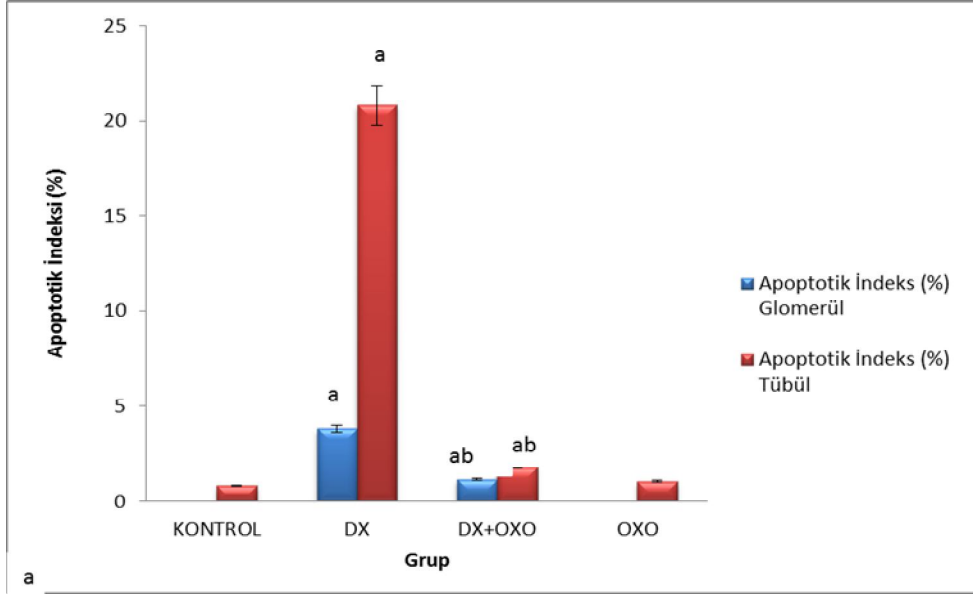


Şekil 11. Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MDA düzeyleri.

#### 3.2 TUNEL Boyama

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği tüm gruplarda böbrek dokusunda glomerül ve tübül (Kırmızı ok) hücrelerinde gözlemlendi.

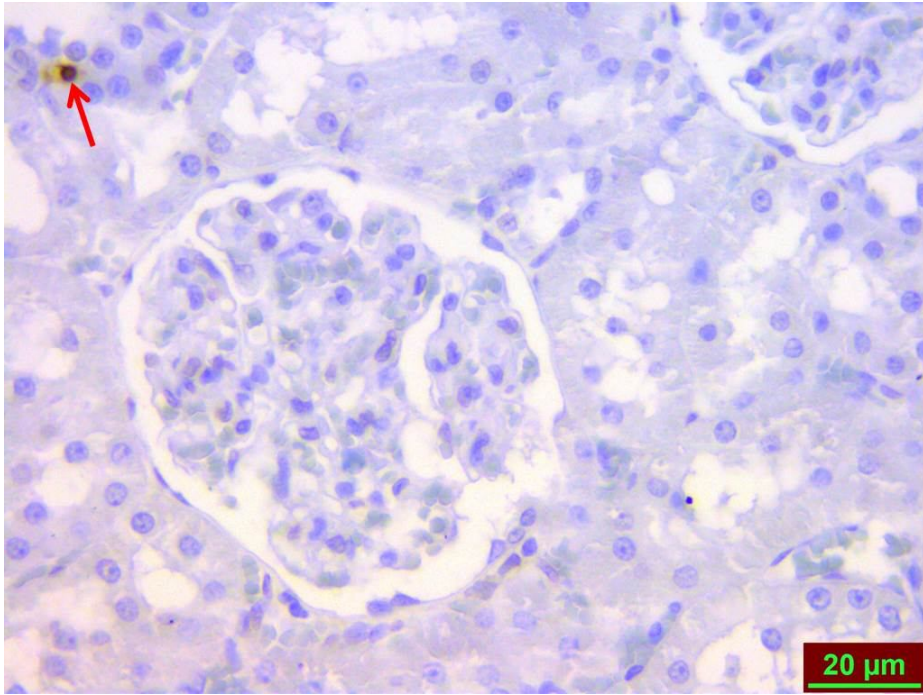
Böbrek dokusunda TUNEL pozitifliği, kontrol ve OXO grubunda benzerdi (Şekil 12). (Şekil 13). (Şekil 14).



**Şekil 12.** Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu apoptotik indeks (%) düzeyleri.

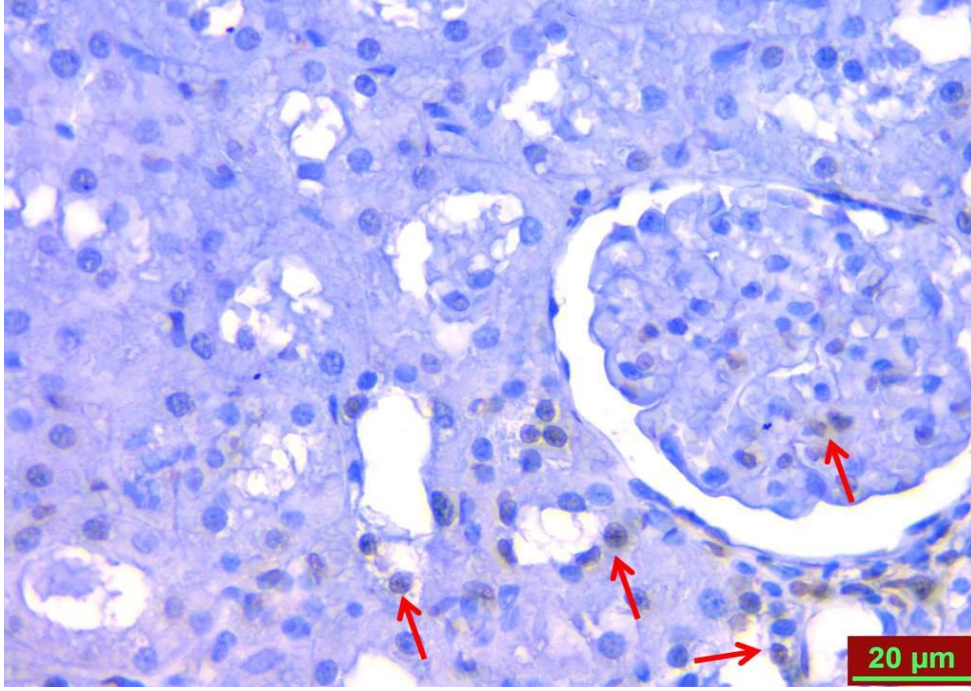
<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> DX grubuna göre karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 13.** Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).

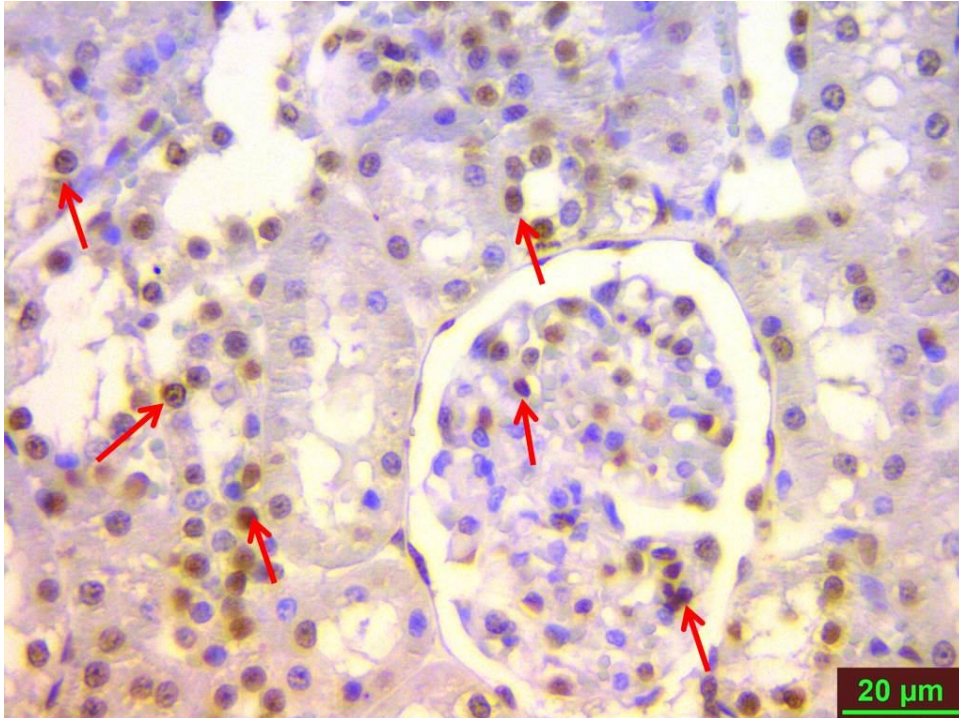
Skala bar: 20µm.



**Şekil 14.** Oksolamin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).

Skala bar: 20µm

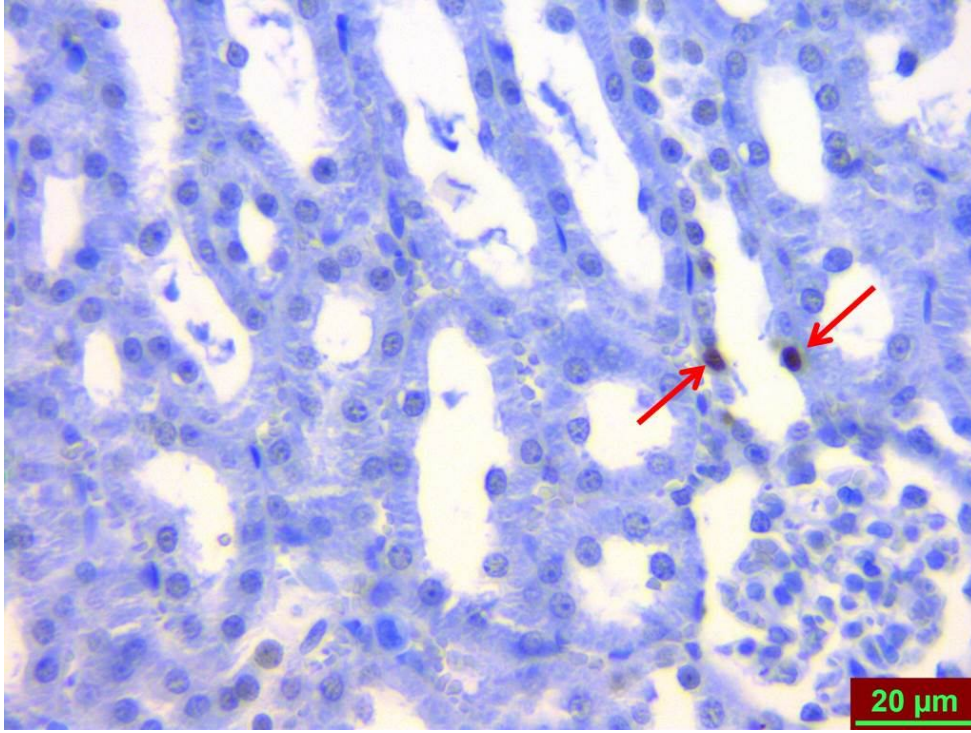
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DX grubunda TUNEL pozitifliği anlamlı olarak daha yüksek düzeylerde bulundu ( $p<0.05$ ) (Şekil 15).



**Şekil 15.** Dokxorubisin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler

(→). Skala bar: 20µm.

Doksorubisin grubuyla karşılaştırıldığında ise DX+OXO grubunda TUNEL pozitifliği anlamlı olarak daha düşük düzeylerde izlendi ( $p<0.05$ ) (Şekil 16).



**Şekil 16.** Doksorubisin+OXO grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler (→).Skala bar: 20µm

### 3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde; immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <% 25, 0.4: % 26-50, 0.6: % 51-75, 0.9: % 76-100) ve şiddeti (0: yok, +0.5: çok az, +1: az, +2: orta, +3: şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu (Histoskor= yaygınlık x şiddet)

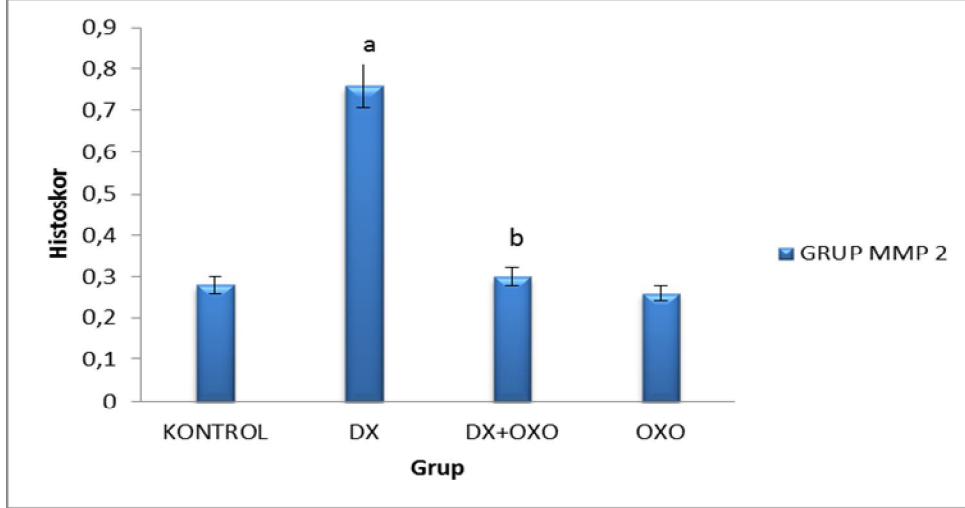
**Tablo 7.** Histoskor

GRUP	Histoskor= yaygınlık x şiddet		
	MMP 2	MMP 9	ASIC3
KONTROL	0.28±0.04	0.38±0.40	0.18±0.40
DX	0.76±0.81 <sup>a</sup>	2.55±0.36 <sup>a</sup>	1.23±0.32 <sup>a</sup>
DX+OXO	0.30±0.06	1.70±0.24 <sup>a</sup>	0.63±0.081 <sup>a</sup>
OXO	0.26±0.05 <sup>b</sup>	0.36±0.51	0.06±0.51 <sup>b</sup>

#### 3.3.1. MMP-2 immünreaktivitesi

Matriks metalloproteinaz-2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; MMP-2

immünreaktivitesi böbrek dokusunda sadece peritübüler olarak gözlemlendi. Matriks metalloproteinaz-2 immünreaktivitesi kontrol grubunda  $0.28 \pm 0.04$  yaygınlığında görüldü (Şekil 17). (Şekil 18).

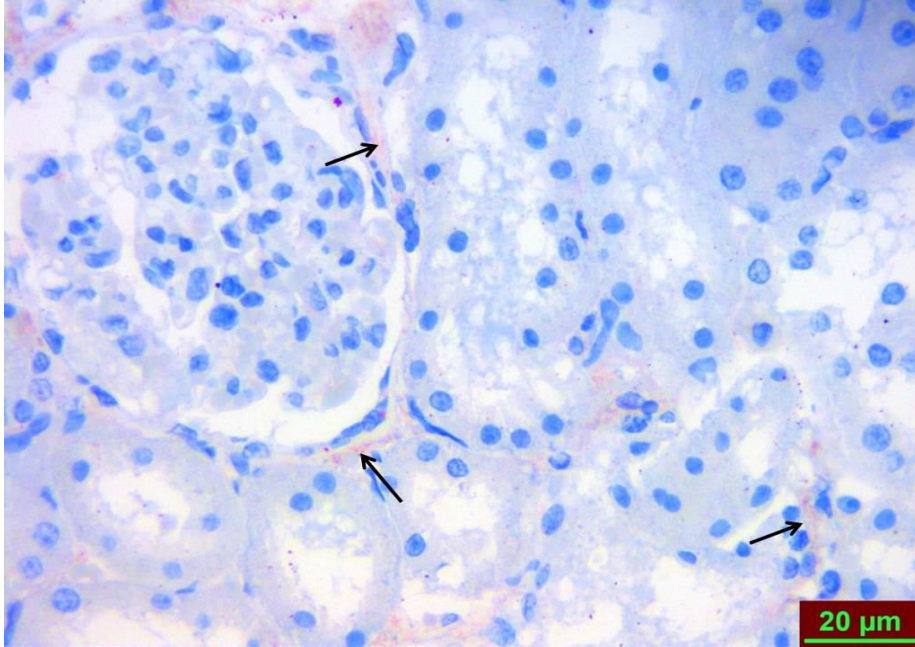


**Şekil 17.** Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MMP-2 düzeyleri.

Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

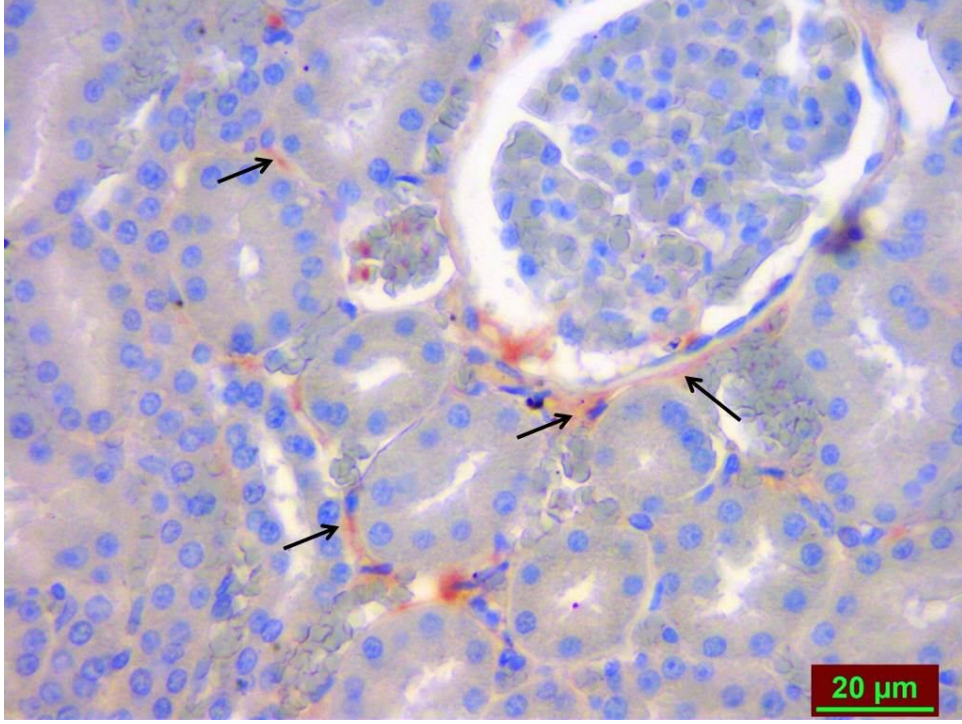
<sup>b</sup> DX grubuna göre karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 18.** Kontrol grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

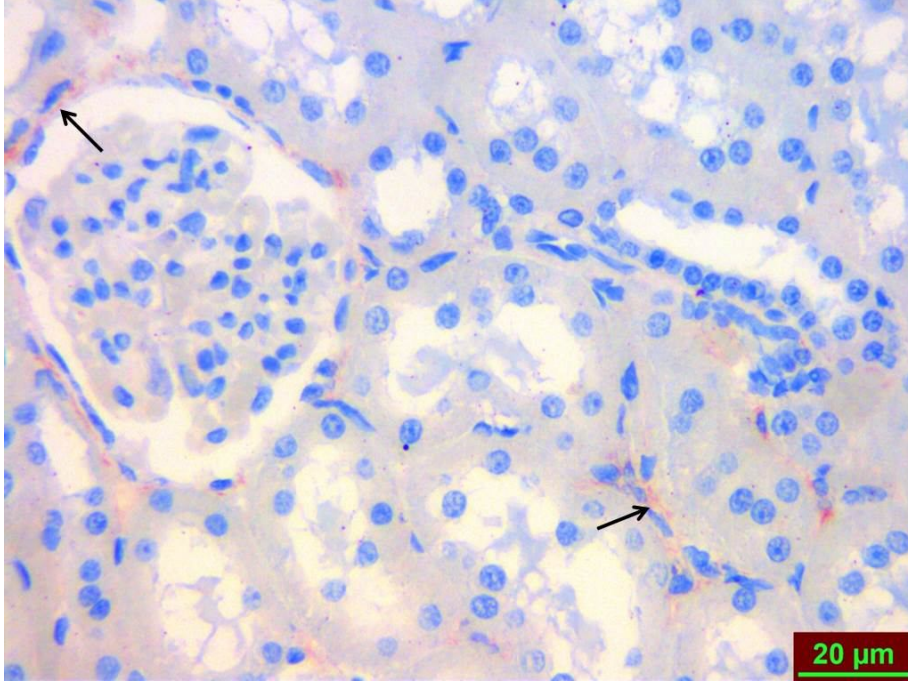
Doksorubisin grubunda MMP-2 immünreaktivitesinin  $0.76 \pm 0.81$  yaygınlığında olduğu görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DX grubunda

MMP-2 immünreaktivitesi anlamlı olarak daha yüksek düzeylerde saptandı (Şekil 19).



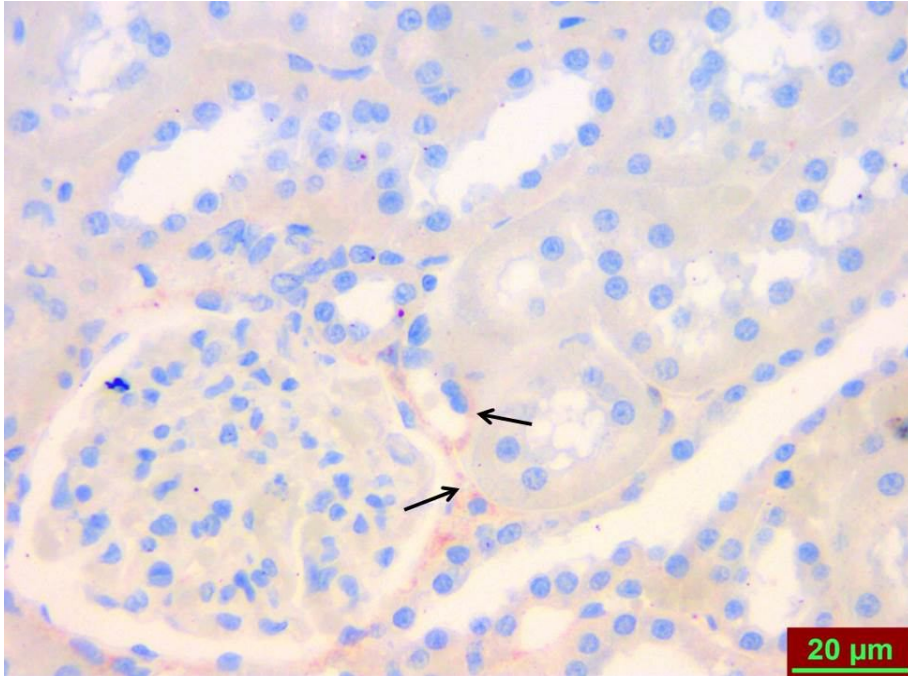
**Şekil 19.** Doksorubisin grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi.  
Skala bar: 20µm.

Doksorubisin+OXO grubuna ait böbrek dokusu MMP-2 immünreaktivitesi  $0.30 \pm 0.06$  yaygınlığında gözlemlendi. Matriks metalloproteinaz-2 immünreaktivitesi, DX+OXO grubunda DX grubuna göre belirgin olarak daha düşük düzeylerde saptandı ( $p < 0.05$ ) (Şekil 20).



**Şekil 20.** Dokсорubisin+OXO grubuna ait böbrek doku MMP-2 immunreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

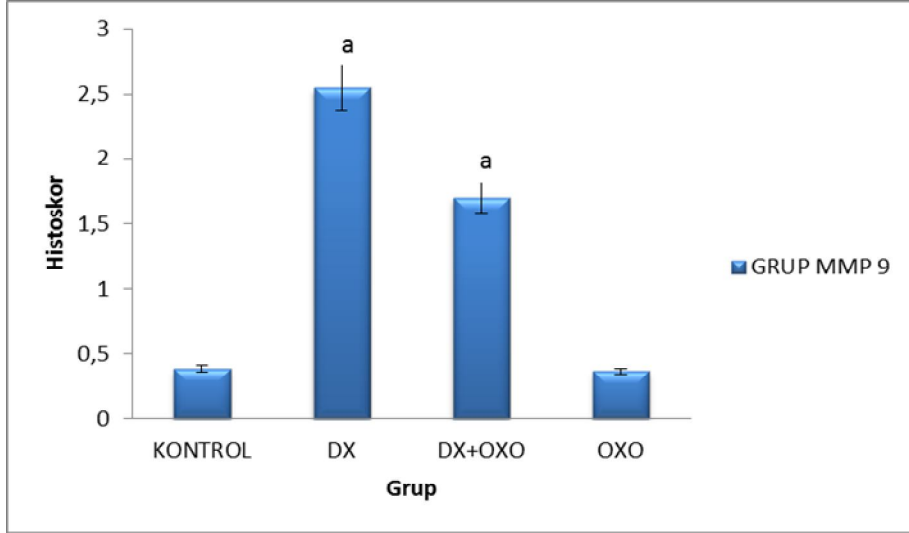
Sadece oksolamin verilen grupta böbrek dokusu MMP-2 immünreaktivitesi  $0.26 \pm 0.05$  yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 21).



**Şekil 21.** Oksolamin grubuna ait böbrek doku MMP-2 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

### 3.3.2. Matris metalloproteinaz-9 immünreaktivitesi

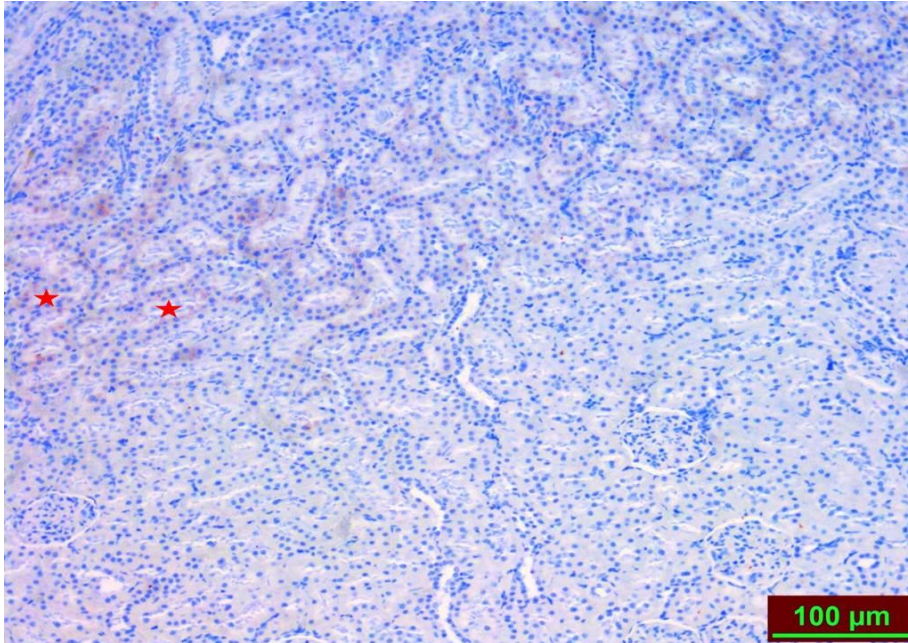
Matris metalloproteinaz-9 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; MMP-9 immünreaktivitesi böbrek dokusunda sadece peritübüler olarak gözlemlendi. Matris metalloproteinaz-9 immünreaktivitesi kontrol grubunda  $0.38 \pm 0.40$  yaygınlığında görüldü (Şekil 22). (Şekil 23).



**Şekil 22.** Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu MMP-9 düzeyleri.

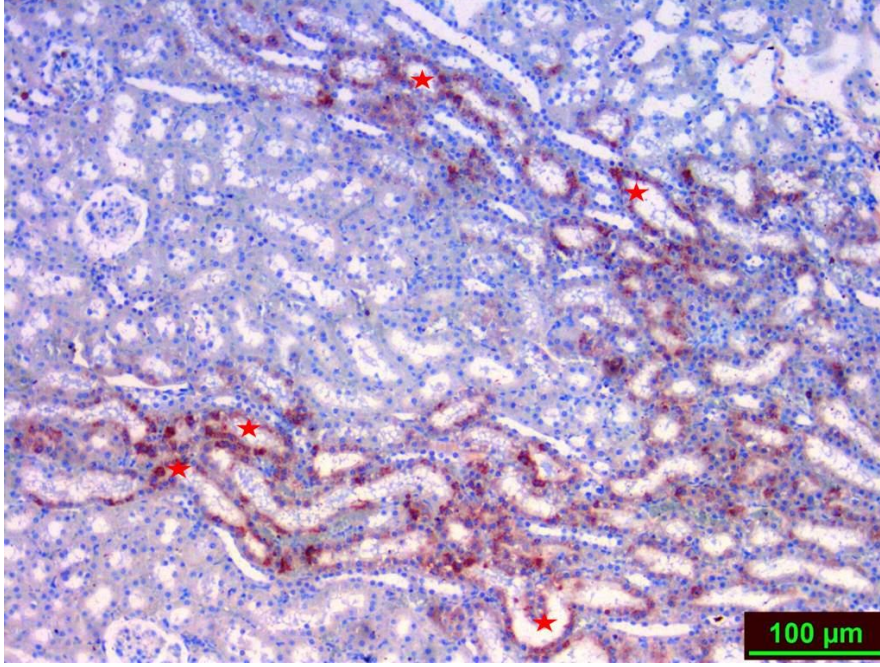
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).

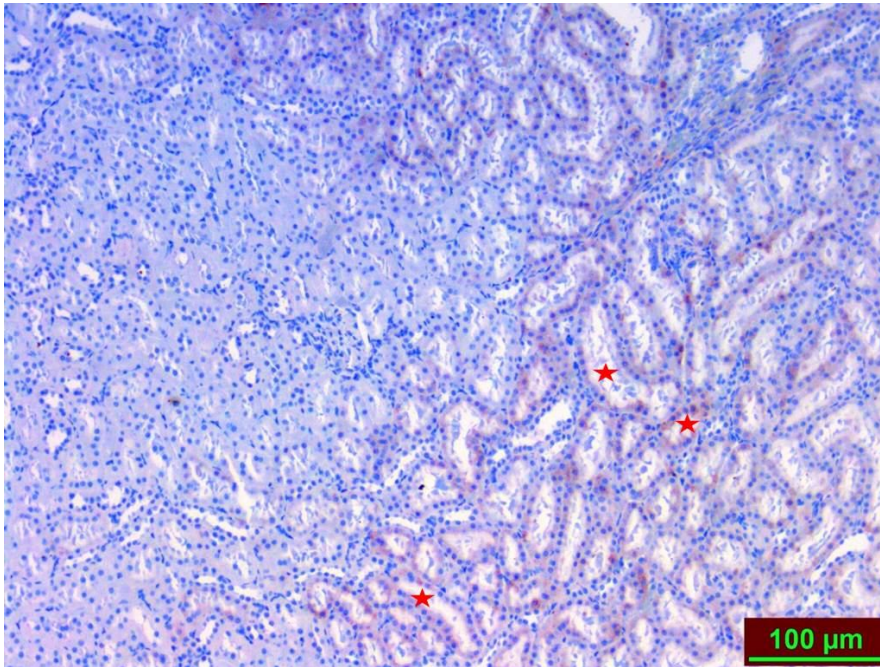


**Şekil 23.** Kontrol grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DX grubunda MMP-9 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ( $p<0.05$ ) ve  $2.55\pm 0.36$  yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 24).

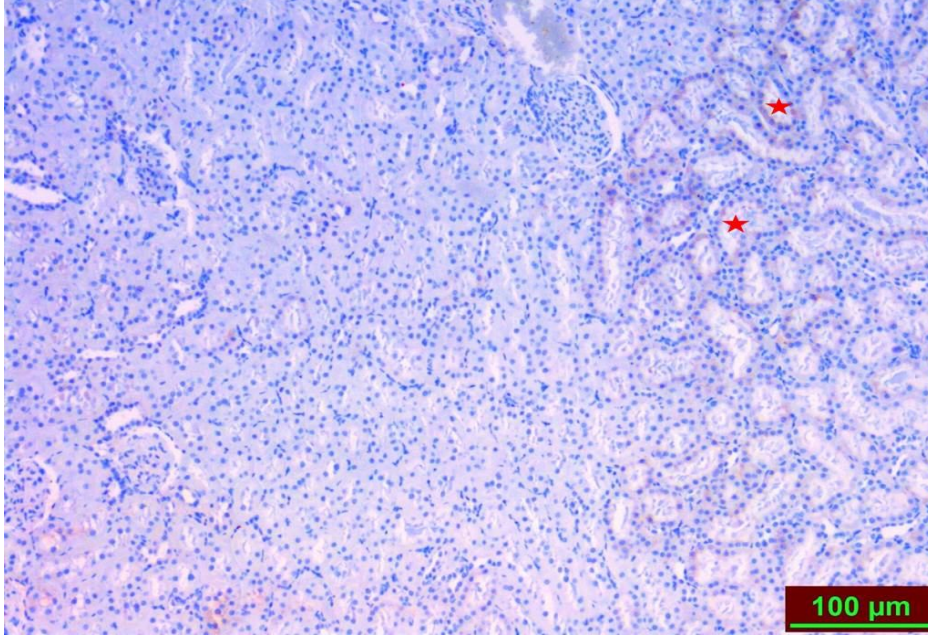


**Şekil 24.** Dokсорubisin grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi.  
Skala bar: 20µm.



**Şekil 25.** Dokсорubisin+OXO grubuna ait böbrek doku MMP-9 immünreaktivitesi.  
Skala bar: 20µm.

Doksorubisin+OXO grubunda MMP-9 immünreaktivitesi  $1.70\pm 0.24$  olarak değerlendirildi (Şekil 25). Doksorubisin+OXO grubunda MMP-9 immünreaktivitesi DX grubuna göre daha düşük düzeylerde saptandı. Sadece oksolamin verilen grupta ise MMP-9 immünreaktivitesi  $0.36\pm 0.51$  yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 26).

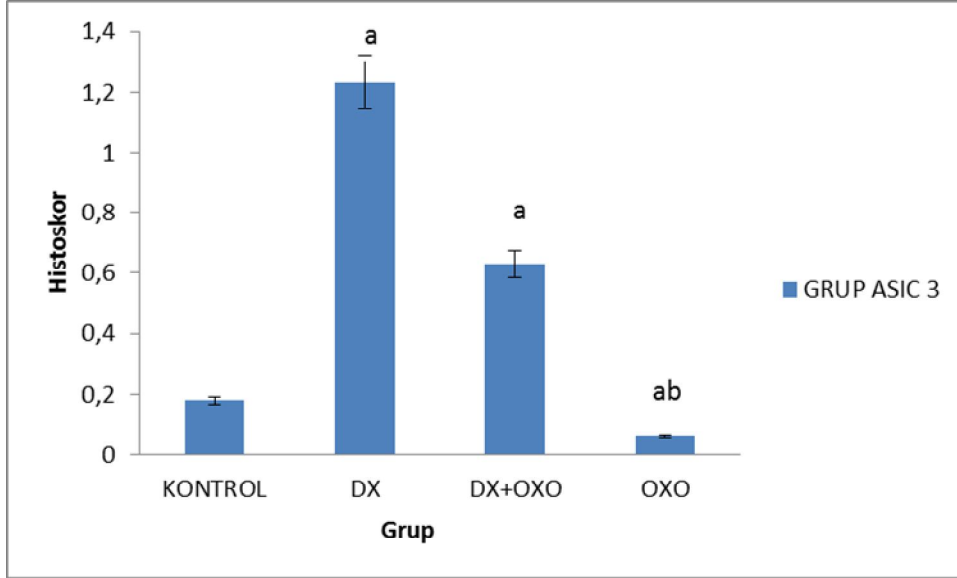


**Şekil 26.** Oksolamin grubuna ait renal doku MMP-9 immünreaktivitesi. Skala bar:  $20\mu\text{m}$ .

### 3.3.3. Aside Duyarlı İyon Kanalı-3 İmmünreaktivitesi

Aside duyarlı iyon kanalı 3 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; ASIC3 immünreaktivitesi böbrek dokusunda sadece tübüler olarak gözlemlendi.

Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda ASIC3 immünreaktivitesi  $0.18\pm 0.40$  yaygınlığında görüldü (Şekil 27, 28).

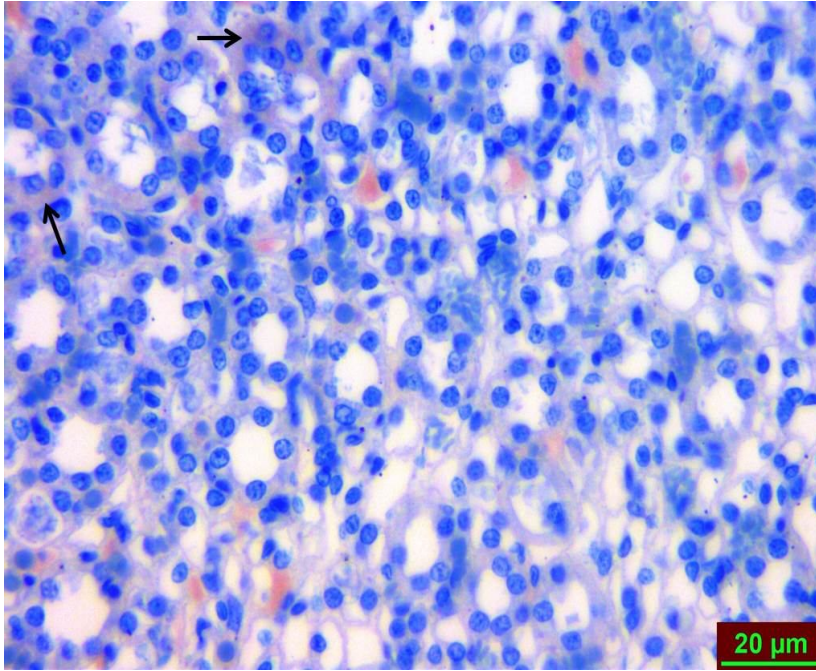


**Şekil 27.** Çalışma gruplarına ait böbrek dokusu ASIC3 düzeyleri.

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

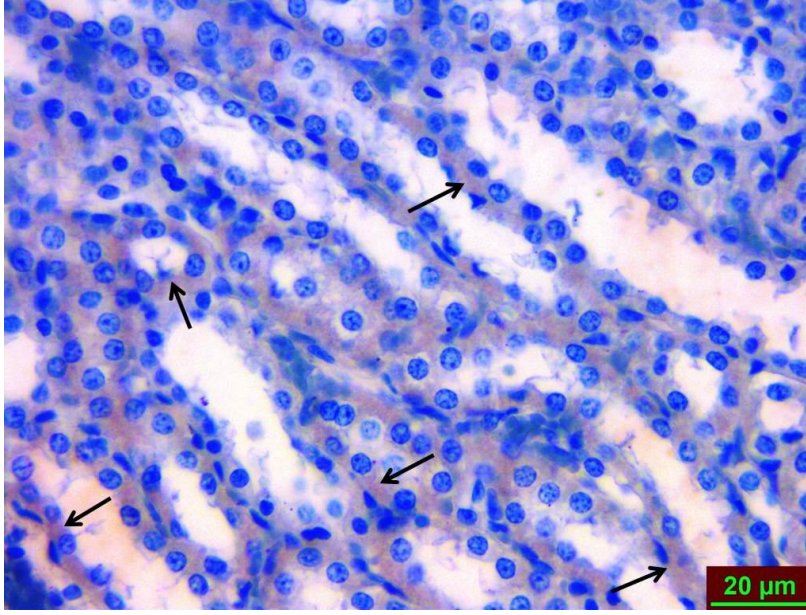
<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> DX grubuna göre karşılaştırıldığında, ( $p < 0.05$ ).



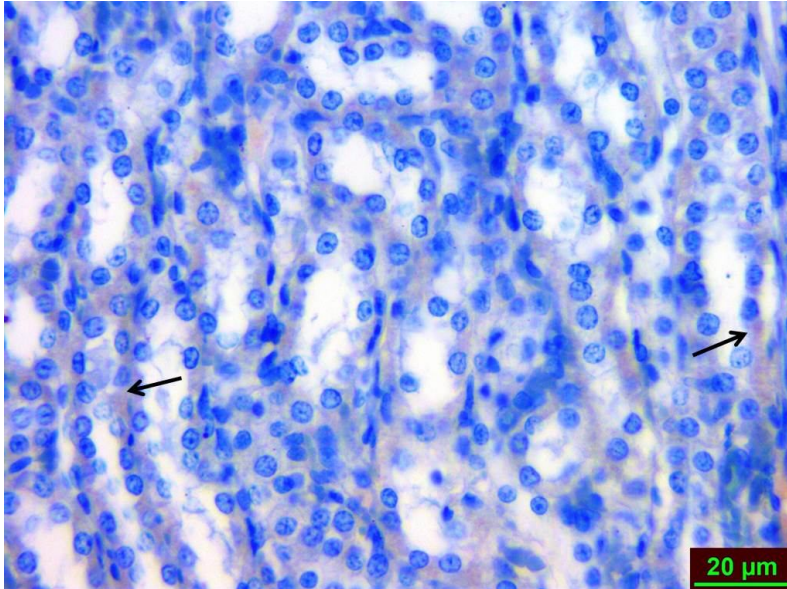
**Şekil 28.** Kontrol grubuna ait böbrek doku ASIC3 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DX grubunda böbrek dokusu ASIC3 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve  $1.23 \pm 0.32$  yaygınlığında olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 29).



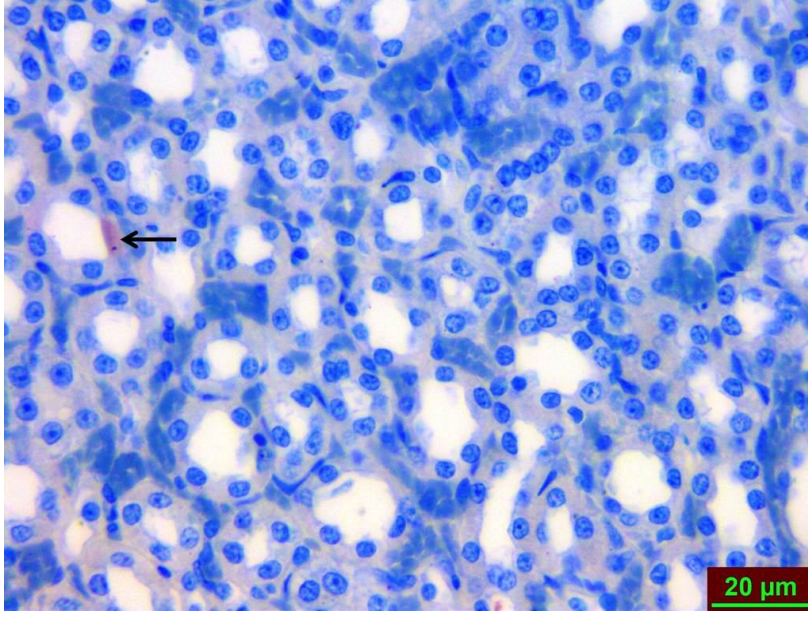
**Şekil 29.** Dokсорubisin grubuna ait böbrek doku ASIC3 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

Dokсорubisin+OXO grubunda böbrek dokusu ASIC3 immünreaktivitesi DX grubuna göre daha düşük düzeylerde izlendi ve  $0.63\pm 0.08$  olarak değerlendirildi (Şekil 30).



**Şekil 30.** Dokсорubisin+OXO grubuna ait böbrek doku ASIC3 immünreaktivitesi. Skala bar: 20µm.

Sadece oksolamin verilen grupta böbrek dokusu ASIC3 immünreaktivitesi  $0.06\pm 0.51$  yaygınlığında saptandı (Şekil 31).



Şekil 31. Oksolamin grubuna ait böbrek doku ASIC3 immünreaktivitesi Skala bar:  
20μm

#### 4. TARTIŞMA

Doksorubisin, antrasiklin türevi, kemoterapotik bir ilaçtır. Antrasiklinler, 1963'de bir mantar türü olan *Streptomyces peucetirus* variete caesiu kültüründen üretilmiştir (1, 2). Doksorubisin genellikle solid tümörler (uterus, meme, tiroid, özefagus, over ve akciğer karsinomları gibi), akut lösemi, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfoma ve yumuşak doku sarkomlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Antineoplastik ilaçların pekçoğu, diğer alanlarda kullanılan ilaçlara göre fazla toksik ilaçlardır; fakat bunların kanser gibi son derece ciddi ve halen önemli bir ölüm nedenini oluşturan durumlarda yararlı olmaları, bu sakıncaların önemini azaltmaktadır (43). Antrasiklinlerin sık gözlenen yan etkileri, kemik iliği baskılanması, saçlarda dökülme, mukozit, bulantı-kusma ve deri pigmentasyonunda artmadır. Nefrotoksisite, DX tedavisinin önemli diğer bir yan etkisidir. Böbreklerin kanlanması fazla olması toksik maddelere daha çok maruz kalmalarına ve toksik hasarlanmaya duyarlı olmalarına neden olmaktadır. Doksorubisinin, miyelotoksisite, (79) hepatotoksisite (80) ve kardiyomiyopati (81) gibi diğer organlara olan etkisi, potansiyel olarak DX kaynaklı nefropatiye katkıda bulunmaktadır. Oksidatif hasar, DX'e bağlı toksisite patogenezinde önemli bir mekanizmadır. Serbest radikal oluşumu, antioksidan enzimlerde azalma ve lipid peroksidasyonunda artma patogeneze katkıda bulunmaktadır (5, 6, 78). Patogeneze sorumlu tutulan serbest radikaller  $O_2^-$ ,  $OH^-$ 'leri ve nitrik oksittir. Doksorubisin, intraselüler hidrojen peroksit ve süperoksit düzeylerini artırır. Serbest radikallerin indüklediği MDA gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin de patogeneze katkısı olduğu gösterilmiştir. Doksorubisin uygulaması karaciğer, böbrek ve kalpteki antioksidan düzeylerini azaltmakta ve lipid peroksit düzeylerini ise artırmaktadır (78, 99). Doksorubisin nefropatisinin patogenezinde rol oynayan oksidatif hasarın önlenmesine yönelik olarak çok sayıda antioksidan ajanla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Srdjenovic ve ark. (92), DX uygulamasının ratların böbrek dokularında lipid peroksidasyon artışına ve antioksidan enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olduğunu antioksidan tedavi sonrasında ise oksidatif hasarın gerilediğini göstermişlerdir. Kurkuminin, oksidatif hasarı baskılayarak ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırarak DX nefropatisi üzerinde koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir (173). Zingiber officinale ekstraktının renal antioksidan sistem aktivitesini artırarak DX'nin neden olduğu renal hasarı

azalttığı gösterilmiştir (174). Benzer olarak Luffa acutangula ekstraktının da DX nefrotoksitesinde antioksidan özellikleriyle koruyucu etkileri olduğu belirtilmiştir (175). Yapılan çeşitli çalışmalarda nikotinamid, likopen, silymarin gibi ajanların antioksidan özellikleri ile DX nefropatisinde koruyucu etkileri saptanmıştır (176, 177).

Oksolamin (3-fenil-5,8-dietilaminoetil-1, 2, 4-oksadiazol), antitusif olarak kullanılan bir ajandır. Ayrıca, oksolamin analjezik, antiinflamatuvar, lokal anestezik ve antispazmodik özelliklere sahiptir (17). Aspirin ile karşılaştırıldığında oksolaminin analjezik, anti-inflamatuvar etkisi olduğunu belirtilmiştir (18). Yapılan toksikoloji çalışmasında, 50 mg/kg/gün dozunda oksolamin uygulaması sırasında, 3 hafta içinde hafif salivasyon artışı haricinde patoloji tespit edilmemiştir (19). Oksolaminin antitusif olarak yaygın kullanımına rağmen diğer etkileri açısından literatürde fazla çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, DX ile oluşturulan deneysel böbrek hasarında renal doku apoptotik indeks, MDA, MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 düzeylerindeki değişiklikler ve oksolaminin bu parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), birçok sistemin homeostazının sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır. Diğer taraftan apoptoz, hücre yıkımında aktif süreçtir. Antikanser ilaçları tipik olarak proapoptotik özelliklere sahiptir ve etkinlikleri kanser hücrelerindeki apoptotik hücre ölümünü teşvik etme yeteneği ile bağlantılıdır. Doksorubisinin önemli sitotoksik mekanizmalarından birisi apoptoz indüksiyonudur (52). Doksorubisin, DNA hasarı ve serbest radikallerin üretimini artırarak apoptoza neden olmaktadır (178). Tsang ve ark. (99), doksorubisinin hücrelerde apoptozise neden olabileceğini göstermiştir. Doksorubisinin apoptotik etkisine p53 proteini aracılık etmektedir (52). Doksorubisin uygulamasının osteosarkom hücrelerinde apoptozisle ilişkili kaspas 3 ve sitokrom C düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (99). Doksorubisin, renal tübül hücrelerinde apoptozu indüklemektedir (98). Kronik renal hastalıkların belirleyici özelliği olan tübüler atrofinin anahtar özelliği renal tübüler hücre apoptozudur (69). Doksorubisin uygulamasından sonra renal tübüler hücrelerde apoptozun arttığı gösterilmiştir (100). Ratlarda DX ile oluşturulan deneysel modelde renal tübüler hücrelerde fenotipik değişikliklerin ve apoptozisin meydana geldiği gösterilmiştir (101). Adriamisinle

oluşturulan deneysel nefrotik sendrom modelinde özellikle tübülointerstisyel alanda apoptotik hücrelerin yoğunlaştığı ve aynı bölgede inflamatuvar hücre oranının da artmış olduğu gösterilmiştir (102). Adriamisin nefropatisinde pentoksifilin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada apoptotik hücrelerin sayısında artış olduğu gösterilmiştir (101). Bununla birlikte, Büyükçelik ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise DX ile oluşturulan nefrotik sendrom modelinde apoptozisin artmadığı saptanmıştır (103). Doksorubisin, renal dokuda oksidatif stresi tetiklemekte ve apoptozise neden olmaktadır. Renal tübüler hücrelerde endojen metallotioninler (MT) I/II'nin ekspresyonu ile DX'nin indüklediği apoptoz arasında korelasyon tespit edilmiştir (104). Lahoti ve ark. (105) DX'nin indüklediği nefrotoksisite çalışmasında pro-apoptotik APAF-1, Kaspaz-3, Bax ve Bad proteinlerinde artış; anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL genlerin ekspresyonunda azalma, p53 gen ekspresyonunda artış ve p53 geninin regülatörü Mdm2 supresyonunu tespit etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada da DX'nin glomerüler hücrelerde özellikle Bax proteinlerinde artış ve Bcl-2 ekspresyonunda azalma yaparak apoptozu indüklediği görülmüştür (106). Adriamisin'in Bcl-xL ekspresyonunu azaltarak indüklediği renal tübüler hasarı endojen PGI2 birikiminin azalttığı düşünülmüştür (107). Çalışmamızda kontrol grubuna göre doksorubisin uygulanan ratlarda apoptotik belirteç olan TUNEL immunreaktivitesinde hem glomerüler hem tübüler bölgede belirgin bir artış tespit edildi. Doksorubisin+OXO grubunda ise renal doku TUNEL immünreaktivitesi DX grubuna göre anlamlı olarak daha düşük düzeylerde gözlemlendi. Bu bulgular DX'nin renal dokuda oksidatif stresi ve apoptozu artırdığını göstermekte olup literatürde bu konuda yapılmış olan çalışmalarla uyum sağlamaktadır. Oksolamin ise DX'e bağlı olarak meydana gelen hem glomerüler hem de tübüler apoptozu azaltmaktadır.

Doksorubisin'in indüklediği nefropatide epitelyal hücre hasarı ve proteinüri gelişmektedir. Bu renal toksisite glomerüler vakuolizasyon ve tübüler dilatasyonu içermektedir. Son çalışmalarda, kapiller loop'un segmental oklüzyonu ve epitelyal hücre hasarı, tuft-kapsül adezyonuyla karakterize glomerül hasar gösterilmiştir. Doksorubisin nefropatisinde gelişen kast formasyonu tübüler obstrüksiyon ve tübüler bazal membran parçalanmasıyla tespit edilen interstisyel hasarın gelişiminin başlangıcıdır (10, 11). Doksorubisin nefropatisi ENaC bağımlı volüm retansiyonu ve renal fibrozise yol açmaktadır. Doksorubisinin indüklediği nefrotik sendrom

sırasında ENaC stimülasyonu için gerekli sinyalin ne olduğu anlaşılamamıştır (12). Aside duyarlı iyon kanalları, DEG/ENaC süper familyasından, voltaj bağımsız, amilorid sensitiv, katyon-selektif kanallardır. Aside duyarlı iyon kanallarının ekstrasellüler asidoza duyarlı ve iskemi, fraktür ve postoperatif durumlar gibi çeşitli patolojik durumlarda nosisepsiyona katkıda bulunan kanallar olduğu ileri sürülmüştür (164, 170, 171). Aside duyarlı iyon kanalları yaygın olarak santral ve periferik sinir sisteminde bulunur (164, 165). Bununla birlikte testis, pituiter bez, akciğer epitelyal hücreler, kemik ve üretelyal hücrelerde nonnöral olarak ASIC ekspresyonu tespit edilmiştir (166-168). Ayrıca, beyin, serebellum, böbrek, karaciğer, akciğer, pankreas; kolon; lenfosit, over, prostat, ince barsak, testis, trigeminal ganglion gibi birçok santral ve periferik insan dokusunda RT-PCR amplifikasyonu kullanılarak ASIC2a ve ASIC3 transkriptlerinin ortak ekspresyonu tespit edilmiştir (163). Aside duyarlı iyon kanalları ve ENaC kanalları böbrek dışı dokularda ağrı ve tat algılamada önemli rol oynamakla birlikte böbreklerde asit-baz algılamada moleküler mekanizmadaki rolleri rapor edilmemiştir (179). Bununla birlikte yeni yapılan çalışmalarda degerin proteinlerin, böbrek damarlarında basınç bağımlı organ yaralanmalarına karşı koruma ve kan akımının düzenlenmesi mekanizmalardan olan miyojenik daralmaya katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür. Bu konu ile ilgili olarak yapılan çalışma sonuçları, ASIC2'nin renal miyojenik yanıt iletimine katkısı olduğunu göstermiş ve böbrek hasarı ve hipertansiyona karşı miyojenik daralmanda koruyucu rolü ile tutarlı bulunmuştur (180).

Aside duyarlı iyon kanalı 1, ASIC2 ve ASIC3'ün vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) eksprese edildiği ve burada migrasyona katkıda buldukları gösterilmiştir. Vasküler düz kas hücrelerinin migrasyonunun, hipertansiyon, diabetes mellitus, ateroskleroz ve koroner anjiyoplasti sonrası restenoz gibi birçok vasküler bozukluğun patofizyolojisinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır. Aside duyarlı iyon kanalı proteinlerin, migrasyona katkısı tam olarak bilinmemekle birlikte, elde edilen sonuçlar ASIC proteinlerin arter duvarı hasarını takiben VSMC yeniden yapılanmasında önemli bir rol oynayabileceği olasılığını göstermiştir. Yapılan çalışma verileri ASIC protein ekspresyonunun sadece duyusal epitelyum ve sinir dokuda sınırlı olmadığını düşündürmektedir (181).

Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar, inflamasyonun indüklediği ASIC kanal ekspresyonu artışını önlemektedir. Aspirin ve salisilatların ASIC3 içeren kanalları inhibe ettiği gösterilmiştir. Aside duyarlı iyon kanalı akım ve ASIC ekspresyonunun kombine inhibisyonu, NSAİİ'leri doku inflamasyonuna bağlı ağrı durumunda geniş spekturumlu tedavide ideal kılmaktadır. Nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar, doku inflamasyonunun akut fazında inflamatuvar asidoz nedeniyle ağrıya duyarlı nöronların aktivasyonunu, ASIC akımlarının hızlı inhibisyonuyla bloke eder. Kronik fazda, ASIC akımlarının ve ekspresyonlarının COX'ın kombine inhibisyonuyla ağrı duyarlılığını azaltmaktadır (14,16). Diklofenak ve ibufenin ASIC protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (182, 183).

Çalışmamızda diğer NSAİİ benzer olarak oksolaminin ASIC3 düzeylerini azalttığı saptanmıştır. Doksorubisin ile birlikte uygulandığında ASIC3'ü belirgin olarak azaltması, oksolaminin antiinflamatuvar etkinliğini desteklemektedir.

Çinko bağımlı endopeptidaz ailesinden olan matriks metalloproteinazlar vücutta fizyolojik ve patolojik birçok süreçte görev alır. Deneysel çalışmalarda böbrek dokusunda proksimal ve distal tübülde ve tavşanlarda toplayıcı kanallarda ve insan glomerüllerinde MMP eksprese edildiği gösterilmiştir (184). Jelatinazlar glomerülde (Özellikle insan mezangial ve epitelyum hücrelerinde) ve tübülde (Özellikle proksimal tübül hücrelerinde) eksprese edilmektedir (185). Matriks metalloproteinaz 2 ekspresyonu, rat ve insan mezangial hücre kültüründe gösterilmiştir. Matriks metalloproteinaz 9 mRNA, normal rat böbreğinde predominant olarak glomerülden eksprese edilmiştir (148). Böbrek glomerül hücreleri, interstisyel fibroblastlar ve tübüler hücrelerin MMP-2 ve MMP-9 salgıladığı gösterilmiştir (149). Jelatinazlardan MMP-2, fibroblastlar, epitel ve mezankimal hücreler tarafından ve MMP-9 sentezi glomerül epitelyum hücreleri ve mezangial hücreler tarafından üretilmektedir (186). Matriks metalloproteinazlar TIMP ile birlikte glomerüler mezangial hücreler ve interstisyel fibroblastların proliferasyon/apoptozunu düzenler. Matriks metalloproteinaz 2 ve MMP 9, normal renal gelişim ve glomerüler hastalıklar ile ilişkilidir. Matriks metalloproteinaz 2 ve MMP 9 aktivitesi ve ekspresyonundaki değişiklikler direkt olarak ekstraselüler matriks turnoveri ile ilgilidir. Bu da glomerüler skarlaşma ve renal hücre fonksiyonunda azalmaya neden olabilmektedir. Deneysel veriler ve klinik çalışma

bulguları, artmış MMP aktivitesinin yapısal glomerüler hasarla korele olduğunu ve artmış glomerüler MMP ekspresyonunun glomerüler hastalık sürecine katkıda bulunduğunu göstermektedir (150).

Böbrek hastalıklarının patogeneğinde MMP'lerin rol aldığı gösterilmiştir. Matriks metalloproteinazlar özellikle fibrozis patogeneğinde rol oynayan önemli yollardan birisidir. Deneysel modellerde kronik böbrek hastalıkları, karaciğer fibrozisi ve myokard infarktüsü gibi hastalıklarda fibrozis gelişiminde MMP-2 ve MMP-9 gibi jelatinazların rol oynadığı gösterilmiştir. Matriks metalloproteinazların proliferatif glomerülonefritlerin patogeneğinde de rol oynadığı düşünülmektedir. Lupus nefriti, IgA nefropatisi, postenfeksiyöz glomerülonefrit ve Henoch-Schönlein Purpurasında artmış glomerüler MMP-9 bulunmuştur (187). Anti-GBM glomerülonefrit indüksiyonundan 3-7 gün sonra, glomerüler patoloji ve hasar gelişimi ile paralel olarak MMP-9 mRNA'nın glomerülden ekspresyonunun artması, MMP-9'un glomerülonefrit sırasında GBM'nin proteolizisinde önemli rolü olduğunu düşündürmektedir. Matriks metalloproteinaz 2'nin nefritin sonraki fazında rol oynayabileceği düşünülmüştür (147). Matriks metalloproteinaz 9'un lokal olarak proteolitik aktivitesinin artışı glomerüler proteinüri (150) ile ve tip 2 diabette gelişen albuminüri (151) ile bağlantılı bulunmuştur. Podositlerin kültürde MMP-9 ürettiği gösterilmiştir (152) ve podosit hasarı doksorubisin nefropatisi geliştiğinde karakteristik bulgudur (113). Yusuke ve ark. (9) yaptığı çalışmada, DX non-immün yolla glomerüler hasar modelinde, glomerüloskleroz ve albüminürinin artışında MMP-9 ve MMP-13'in rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Doksorubisin tedavisi çeşitli kanser hücrelerinde (Örneğin, ürotelyal hücrelerde, doksorubisine maruz kaldığında prostaglandin E2 ve IL-1 $\beta$  artış olduğunu gösterilmiştir) inflamasyonu uyarmaktadır (54). Ayrıca DX tedavisi adezyon proteinlerini ve matriks metalloproteinaz MMP-2/MMP-9 gen ekspresyonunu etkilemekte (55) ve hücre ayrışmasıyla sonuçlanmaktadır (56). Miyokardiyal ve dolaşımdaki MMP aktivasyonu özellikle de MMP-2 aktivasyonu DX'nin toksik etkilerinin progresyonuyla yakın ilişkilidir (153). Matriks metalloproteinaz-2'nin farelerde DX'in indüklediği kardiyotoksisitenin akut belirteci olduğu bulunmuştur (152). Barteková ve ark. (154) total SOD (süper oksid dismutaz) aktivitesinin indirgenmesi ile DX'in sol ventriküldeki MMP-2 aktivasyonu ve apoptoz indüksiyonuyla ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Birçok böbrek hastalığının patogeneğinde MMP yapım artışının gösterilmesi MMP'lerin baskılanmasını hedef alan tedavi seçeneklerini gündeme getirmiştir. Matriks metalloproteinazların inhibisyonu anti-Thy1.1 nefritinde patolojik bulguları iyileştirmiştir. Sentetik bileşiklerle MMP inhibisyonunun mezangial hücre aracılı glomerülonefrit formlarının tedavisi için yeni bir yaklaşım şekli olabileceği ileri sürülmüştür (188). Metalloproteinaz inhibitörü olan doksisisiklin glomerülonefritli hastada proteinüri düzeyini azaltmıştır (189). Glomerülonefritli hastalarda ACE inhibitörü fosinopril ile tedavinin plazma ve idrar MMP düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (190). Çalışmamızda DX uygulanan ratlarda renal doku MMP-2 ve MMP-9 düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek saptamamız diğer çalışma sonuçlarıyla uyumlu olarak DX nefrotoksisitesinde MMP'lerin rol aldığını desteklemektedir. Oksolamin'in, DX ile birlikte uygulanması nefrit gelişiminde rolü olduğu düşünülen MMP-2, MMP-9 düzeylerini azaltmıştır. Bu sonuçlar oksolaminin antiinflamatuvar etkinliğini desteklemektedir.

Bu çalışmada

- DX uygulaması böbrek dokusunda apoptoz, MDA, MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 seviyelerini artırmaktadır.
- Oksolamin uygulamasının DX nefrotoksisitesinde MDA üzerine anlamlı etkisi tespit edilmedi.
- Oksolamin uygulaması DX nefrotoksisitesinde inflamasyonda arttığı düşünülen ASIC3'ü anlamlı şekilde azaltmıştır.
- Oksolamin uygulaması glomerül ve tübülde apoptotik indeksi DX grubuna göre azaltmıştır.
- Oksolamin uygulaması, nefrit gelişiminde rolü olduğu düşünülen MMP-2 ve MMP-9'u azaltmıştır.

Oksolamin, doksorubisin nefropatisi modelinde jelatinazları baskılamış ayrıca antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkiler göstermiştir. Oksolaminin klinikte kullanım endikasyonları dışında farklı endikasyonlarda kullanmak için antiinflamatuvar etkinlik açısından gerek doz gerekse süre ile ilgili olarak geniş çaplı deneysel araştırmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak doksorubisin uygulanan ratlara oksolamin verilmesi renal doku MMP-2, MMP-9 ve ASIC3 düzeylerini ve apoptotik indeksi anlamlı şekilde

azaltarak doksorubisin nefrotoksisitesi gelişimini önlemede olumlu etkiler sağlayabilir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem.* 2000; 207: 77-85.
2. Küçükhüseyin C. Kanser kemoterapisi. Özüner Z. *Temel ve Klinik Farmakoloji.* 3. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi, 1995: 1116-1117.
3. Türker AS. Kayaalp O. Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, S. Oğuz Kayaalp (ed), *Tıbbi Farmakoloji,* 10. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 2002: 403.
4. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV. Adriamycin-induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology* 1999; 134: 51-62.
5. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention review of the literature. *Med Sci Monit* 2000; 6: 411-420.
6. Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997; 11: 931-116.
7. Singal PK, Deally CM, Weinberg LE. Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 817-828.
8. Woessner JF Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.
9. Yusuke S, Hiroyuki S, Kaori H, Kimiko I, Hironari T, Yasunori O, et al. Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-induced albuminuria and glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol* 2010; 115: 22-32.
10. T, Cutillo F, Zoja C, Broggin M, Remuzzi G. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int* 1986; 30: 488-496.
11. Herman EH, el-Hage A, Ferrans VJ. Protective effect of ICRF-187 on doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity in spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 92: 42-53.

12. Artunc F, Nasir O, Amann K, Boini KM, Hans-Ulrich Haring, Teut Risler, Florian Lang. Serum and glucocorticoid-inducible kinase 1 in doxorubicin-induced nephrotic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 1624-1634.
13. Chu XP, Papasian CP, Wang JQ, Xiong ZG. Modulation of acid- sensing ion channels: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 2011; 3: 288-309.
14. Voilley N. Acid-Sensing Ion Channels (ASICs): New Targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs): current drug targets. *Inflammation & Allergy* 2004; 32: 71-79.
15. Drummond HA. Yes, no, maybe so: ENaC proteins as mediators of renal myogenic Constriction Hypertension 2009; 5: 962-963.
16. Odendaal CL, MBChB, MMed (Anest), GFN (SA) Are NSAIDs inferior to other analgesics? Are NSAIDs inferior to other analgesics? *S Afr J Anaesthesiol Analg* 2010: 16.
17. Silvestrini B, Pozzatti C. Pharmacological properties of 3-phenyl-5 $\beta$  diethylaminoethyl-1, 2, 4-oxadiazole. *Br J Pharmacol Chemother* 1961; 16: 209-217.
18. Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957; 111: 409-419.
19. Barron CN. Observations on the chronic toxicity of 3-phenyl-5  $\beta$ -diethyl-aminoethyl-1, 2, 4-oxadiazole, in the rat and dog. *Exp and Molec Path* 1963; 2; 1-27.
20. Kriz W, Kaissling B. Structural organization of the mammalian kidney. Seldin DW, Giebisch G, (eds). *The Kidney: physiology and pathophysiology*. New York: Raven Press 1992; 707-777.
21. Guyton AC, Hall JE, Çev (Ed). Çavuşoğlu H. *Tıbbi Fizyoloji 10*. Baskı, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2001.
22. *Textbook of Medical Physiology*, 10 ed. Philadelphia: WB Saunders, Chapters 25-31. 2001.
23. <http://embryology.med.unsw.edu.au/Notes/urogen7.htm>

24. Junqueira CL, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakođlu S (Eds). İstanbul: Nobel Tıp Yayınları, 2006.
25. Savage, CO. The biology of the glomerulus: endothelial cells. *Kidney Int* 1994; 45: 314-319.
26. Groffen, AJ, Veerkamp, JH, Monnens, LA, van den Heuvel, LP. Recent insights into the structure and function and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 2119-2129.
27. Guasch A, Deen, WM, Myers, BD. Charge selectivity of the glomerular filtration barrier in healthy and nephrotic humans. *J Clin Invest* 1993; 92: 2274-2282.
28. Endlich K, Kriz W, Witzgall R. Update in podocyte biology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2001; 10: 331-340.
29. Schreiner GF. The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 74-82.
30. Erek E, Süleymanlar G. Böbreğin Yapısı ve Fonksiyonları. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç hastalıkları. 2. Baskı. Ankara: Günes Kitabevi, 2003: 1211-1228.
31. Kriz W, Elger M. Renal Anatomy. Feehally J, Floege J, Johnson RJ. *Comprehensive Clinical Nephrology* 3rd ed. Philadelphia: Mosby; 2007: 1-4.
32. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996; 334: 1448-1460.
33. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. Nefroloji El Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1996: 1-23.
34. Bullock J, Boyle J, Wang BM. *NMS Physiology* 4th edition. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 289-296.
35. David J. Tietz basic principles in clinical chemistry. Aslan D, (Eds). Klinik kimyada Temel İlkeler. Türkiye: Palme Yayıncılık, 2005: 308-722.

36. Ozbek E, Turkoz Y, Sahna E, Ozugurlu F, Mizrak B, Ozbek M. Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin. *BJU Int* 2000; 85: 742-746.
37. Hancock RE, Raffle VJ, Nicas TI. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19: 777-785.
38. Reiser IW, Porush JG. Evaluation of renal function. In Massry SG, Glasscock RJ, (ed). *Textbook of Nephrology*, 4th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1793-1802.
39. İşlekel H. Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (Ed). *İnsan Biyokimyası Türkiye: Palme Yayıncılık*, 2002: 37-42.
40. Guyton AC, Hall JE. Urine formation by the kidneys: glomerular filtration, renal blood flow and their control. *Textbook of Medical Physiology*. 9th ed. Pennsylvania: WB Saunders Company, 1996: 315-330.
41. Aubeil-Sadron G, Londos-Gagliardi D. Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 1984; 66: 333-52.
42. Doroshoov JH. Anthracyclines and anthracenediones. In BA Chabner, DL Longo (eds), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice*. Lippincott. Philadelphia: Williams and Wilkins, 2006: 416.
43. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe TAŞ, 10. Baskı, Ankara: 2002: 402.
44. Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem*. 1989; 58: 351-375.
45. Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 2008; 94: 525-533.
46. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General principles of chemotherapy. Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principle and Practice Pediatric Oncology*. JB. Lippincott Company, 1989: 186-189.

47. William EE. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children, anthracyclines. Saunders. *Pediatr Clin North Am. Clinical Pharmacology* 1989; 36: 1206-1209.
48. Muggia FM, Green MD. New anthracycline antitumor antibiotics. *Crit Rev Oncol Hematol* 1991; 11: 43-64.
49. Hideg K, Kálai T. Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 160-164.
50. Çetinkaya Y, Kabakçı MG, Aydemir K. Antrasiklinler ve kalp. *İlaç ve Tedavi Dergisi* 1995; 8: 214-218.
51. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, Giardina B, Minotti G. Human heart cytosolic reductases and anthracycline cardiotoxicity. *IUBMB Life* 2001; 52: 83-88.
52. Müller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med* 1998; 491-495.
53. Wolf BM, Baynes WJ. The anticancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1760: 267-271.
54. Kang SH, Chess-Williams R, Anoopkumar-Dukie S, McDermott C. Induction of inflammatory cytokines and alteration of urothelial ATP, acetylcholine and prostaglandin E2 release by doxorubicin. *Eur J Pharmacol* 2013; 700: 102-109.
55. Mukhopadhyay P, Rajesh M, Batkai S, Kashiwaya Y, Hasko G, Liaudet L, Szabo C, Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: 1466-1483.
56. DeAtley SM, Aksenov MY, Aksenova MV, Jordan B, Carney JM, Butterfield DA. Adriamycin induced changes of creatine kinase activity in vivo and in cardiomyocyte culture. *Toxicology* 1999; 134: 51-62.
57. Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen UP, Setzer B, Walker UA. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol* 2005; 207: 436-444.

58. Weiss RB. The anthracyclines: Will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 1992; 19: 670-686.
59. BC Cancer Agency Cancer Drug Manual, 2006; 1-13.
60. Yesair DW, Schwartzbach E, Shuck D, Denine EP, Asbell MA. Comparative pharmacokinetics of daunomycin and adriamycin in several animal species. *Cancer Res* 1972; 32: 1177-1183.
61. Lipshultz SE, Cohen H, Colan SD, Herman EH. The relevance of information generated by in vitro experimental models to clinical doxorubicin cardiotoxicity. *Leuk Lymphoma* 2006; 47: 1454-1458.
62. Robert J, Gianni L. Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surveys* 1993; 17: 219-252.
63. Woo MH, Evans WE, Relling MV. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Pui C-H (ed). *Childhood Leukemias*, Cambridge University 1999: 275-276.
64. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, Fisher BD. *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*. 2nd Edition. Lippincott-Raven Publishers 1997.
65. American Society of Health System Pharmacists; AHFS Drug Information 2009. Bethesda MD 2009: 1049-1051.
66. Hilmer SH, Cogger VC, Muller M, Le Couteur DG. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin. *Drug Metabolism and Disposition* 2004; 32: 794-799.
67. Hardman JG, Limbird LE. *Goodman&Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10th Edition 2001: 1425-1429.
68. Vargel İ, Erdem A, Ertoy D, Pınar A, Erk Y, Altundağ MK, Güllü İ. Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GM-CSF and G-CSF. *Ann Plast Surg* 2002; 49: 646-653.

69. Khan MS, Holmes JD. Reducing the morbidity from extravasation injuries. *Ann Plast Surg* 2002; 48: 628-632.
70. Ener RA, Meglathery SB, Styler M. Extravasation of systemic hematooncological therapies. *Annals of Oncology*. 2004; 15: 858-862.
71. Cummings J, Anderson L, Willmott N, Smyth JF. The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo. *Eur J Cancer* 1991; 27: 532-535.
72. Ergül PB. Erken antrasiklin kardiotoksisitesinin renkli doppler ekokardiografi ile izlemi ve karnitinin kardioprotektif etkisinin araştırılması. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi. 2001.
73. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycine-induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 2007; 12: 117: 6-15.
74. Zucchi R, Danesi R. Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines. *Curr Med Chem* 2003; 3: 151-171.
75. Lefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity *Cancer* 1972; 32: 302-334.
76. Ehrke MJ, Maccubbin D, Ryoyama K, Cohen SA, Mihich E. Correlation between adriamycin-induced augmentation of interleukin 2 production and of cell-mediated cytotoxicity in mice. *Cancer Res* 1986; 46-54.
77. Giorgio M, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.
78. Barbey MM, Fels LM, Soose M. et al. Adriamycin affects glomerular renal function: Evidence for the involvement of oxygen radicals. *Free Radic. Res. Commun* 1989; 7: 195-203.
79. Lahouel M, Viotte G, Sumereau E, Morin JP, Fillastre JP. Haematotoxicity of doxorubicin and 1- (2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) and of their association in rats. *Drugs Exp Clin Res* 1987; 13: 593-599.

80. Llesuy SF, Arnaiz SL. Hepatotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin. *Toxicology* 1990; 63: 187–198.
81. Shug AL. Protection from adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Z. Kardiol* 1987; 76: 46-52.
82. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 2000; 58: 1797-804.
83. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 114-22.
84. Sakemi T, Ohtsuka N, Tomiyoshi Y, Morito F. Sex difference in progression of adriamycin-induced nephropathy in rats. *Am J Nephrol* 1996; 16: 540-547.
85. Mahajan D, Wang Y, Qin X. CD4+CD25+regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 2731-2741.
86. Wang Y, Feng X, Bao S. Depletion of CD4 (+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 975-84.
87. Wang Y, Mahajan D, Tay YC et al. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in Adriamycin nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10: 470-77.
88. Lee V, Harris. D. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology* 2011; 16: 30-38.
89. Munoz M, Rincon J, Pedrañez A, Viera N, Hernández-Fonseca JP and Mosquera J. Proinflammatory role of angiotensin II in a rat nephrosis model induced by adriamycin. *J RAAS* 2011; 12: 404-412.
90. Bulucu F, Ocal R, Karadurmus N. Effects of N-acetylcysteine, deferoxamine and selenium on doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Biol Trace Elem Res* 2010; 132: 184-196.

91. Qin XJ, He W, Hai CX, Liang X, Liu R. Protection of multiple antioxidants Chinese herbal medicine on the oxidative stress induced by adriamycin chemotherapy. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 271-282.
92. Srdjenovic B, Milic-Torres V, Grujic N, Stankov K, Djordjevic A, Vasovic V. Antioxidant properties of fullereneol C60 (OH) 24 in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol Mech Methods* 2010; 20: 298-305.
93. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5: 2145-2154.
94. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
95. Hettis SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
96. Hu R, Zhai Q, Liu W, Liu X. An Insight into the mechanism of cytotoxicity of ricin to hepatoma cell: Roles of Bcl-2 family proteins, caspases, Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases and protein kinase C. *J Cell Biochem* 2001; 81: 583-593.
97. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
98. Zhang J, Clark JR, Herman EH, Ferrans VJ. Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28: 1931-143.
99. Tsang WP, Ho FY, Fung KP, Kong SK, Kwok TT. p53-R175H mutant gains new function in regulation of doxorubicin-induced apoptosis. *Int J Cancer* 2005; 114: 333-336.
100. Van de Water B, Houtepen F, Huigsloot M, Tijdens IB. Suppression of chemically induced apoptosis but not necrosis of renal proximal tubular epithelial (LLC-PK1) cells by focal adhesion kinase (FAK). Role of FAK in maintaining focal adhesion organization after acute renal cell injury. *J Biol Chem* 2001; 276: 36183-36193.

101. Usta Y, Ismailoglu UB, Bakkaloglu A, Orhan D, Besbas N, Sahin-Erdemli I, Ozen S. Effects of pentoxifylline in adriamycin-induced renal disease in rats. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 840-843.
102. Ozen S, Usta Y, Sahin-Erdemli I, Orhan D, Gumusel B, Yang B, et al. Association of nitric oxide production and apoptosis in a model of experimental nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 32-38.
103. Büyükçelik M, Anarat A. Endotelin reseptör antagonistinin (Bosentan) deneysel nefrotik sendrom modelinde apopitoz üzerine etkisi. *Yan Dal Uzmanlık Tezi*. Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Nefrolojisi ABD, 2005.
104. Chmielewska M, Symonowicz K, Pula B, Owczarek T, Podhorska-Okolow M, Ugorski M, Dziegiel P. Expression of metallothioneins I and II in kidney of doxorubicin-treated rats. *Exp Toxicol Pathol* 2015; 67: 297-303.
105. Lahoti TS, Patel D, Thekkemadom V, Beckett R, Ray SD. Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro-and anti-apoptotic signaling pathways. *Curr Neurovasc Res* 2012; 9: 282-295.
106. Liu L, Li Q.X, Xia L, Li J, Shao L. Differential effects of dihydropyridine calcium antagonists on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats; *Toxicology* 2007; 23181-23190.
107. Chen CH. The protective effect of prostacyclin on adriamycin-induced apoptosis in rat renal tubular cells. *Eur J Pharma* 2006; 529: 8-15.
108. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, Delaini F, Sacchi G, Thoua et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest* 1982; 46: 16-23.
109. Bertani T, Remuzzi G, Rocchi G, Delaini F, Sacchi G, Falchetti M, Donati MB. Steroids and adriamycin nephrosis. *Appl Pathol* 1984; 2: 32-38.
110. Franco R, Gut A, Ferrari-Spadotto A, Georgette J, Gavras I, Gavras H. Pressor mechanisms in adriamycin-induced nephropathy with hypertension in rats. *Hypertension* 1994; 23: 1246-1249.

111. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986; 29: 502-510.
112. Bohrer MP, Baylis C, Robertson CR, Brenner BM, Troy JL, Willis WT. Mechanisms of the puromycin-induced defects in the transglomerular passage of water and macromolecules. *J Clin Invest* 1977; 60: 152-161.
113. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 213-229.
114. Lee VW, Harris DC, Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)* 2011; 16: 30-38.
115. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1135-1149.
116. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
117. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes And Development* 2000; 14: 2123-2133;
118. Gross J, Lapière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci* 1962; 54: 1197-1204.
119. De Souza AP. Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev FOB* 2002; 10: 1-6.
120. Amano S, Akutsu N, Matsunaga Y, Nishiyama T, Champlaud MF, Burgeson RE, Adachi E. Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 2001; 10; 271: 249-262.
121. Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I. Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 2-4.

122. Kuzuya M, Iguchi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10: 275-282.
123. Vihinen P, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and therapeutic targets. *Int J Cancer* 2002; 99: 157-166.
124. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-21494.
125. Allan JA, Docherty AJ, Barker PJ, Huskisson NS, Reynolds JJ, Murphy G. Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components. *Biochem J*. 1995; 309: 299-306.
126. Lijnen HR. Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2002; 30; 163-167.
127. Reel B. Matriks metalloproteinaz enzimleri ve ateroskleroz. *Türkiye Klinikleri J Med* 2006; 26: 527-537.
128. Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: A review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 812-823.
129. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-Nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 2002; 297: 1186–1190.
130. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure. *Circ Res* 2001; 89: 201-210.
131. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
132. Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix Metalloproteinases: A Review: *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 1993; 4: 197-250.

133. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6: 121-125.
134. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 657-672.
135. Rao BG. Recent development in the design of specific matrix metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies. *Curr Pharm Des* 2005; 11: 295-322.
136. Barrett AJ. 2-Macroglobulin. *Methods Enzymol* 1981; 80: 737-754.
137. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001; 7: 93.
138. Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol* 1999; 189: 300-308.
139. Jian Hua Qi, Bela Anand-Apte Springer Science+Business Media New York Apoptosis 2015: 4.
140. Wang M, Liu YE, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen EM, Shi YE. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 1997; 23: 2474-2767.
141. Oh J, Takahashi R, Kondo S. The membrane anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001; 107: 789-800.
142. Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem* 2003; 278: 4135-4144.
143. Opdenakker G, Van den Sten PE, Dubois B, Nelissen I, Coillie EV, Masure S. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 851-859.
144. Bates AL. Stromal matrix metalloproteinase 2 regulates collagen expression and promotes the outgrowth of experimental metastases. *J Pathol* 2015; 235: 773-783.

145. Johansson N, Ahonen M, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 5-15.
146. Ronco P, Lelongt B, Piedagnel R. Matrix metalloproteinases in kidney disease progression and repair: a case of flipping the coin. *Semin Nephrol* 2007; 27: 352-362.
147. Tadahide K, Yutaka Y, Junichi K, Pavel K, Masaaki N. Hidehiko Fujinaka et al. Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes in anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8: 206-215.
148. Watanabe K, Kinoshita S, Nakagawa H. Gelatinase secretion by glomerular epithelial cells. *Nephron* 1990; 56: 405-409.
149. Martin J, Knowlden J, Davies M, Williams JD. Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases. *Kidney Int* 1994; 46: 877-885.
150. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 574-581.
151. Ebihara I, Nakamura T, Shimada N, Koide H. Increased plasma metalloproteinase-9 concentrations precede development of microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: 544-550.
152. Bai Y, Wang L, Li Y, Liu S, Li J, Wang H, Huang H. High ambient glucose levels modulates the production of MMP-9 and alpha5 (IV) collagen by cultured podocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2006; 17: 57-68.
153. Ivanova, M, Dovinova I, Okruhlicová L, Tribulova N, Simončíkova P, Bartekova M, et al. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33: 459-469.
154. Bartekova M. Quercetin improves postischemic recovery of heart function in doxorubicin-treated rats and prevents doxorubicin-induced matrix metalloproteinase-2 activation and apoptosis induction. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 8168-8185.

155. Zhou H, Kato A, Miyaji T, Yasuda H, Fujigaki Y, Yamamoto T, et al. Urinary marker for oxidative stress in kidneys in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 616-623.
156. Slater TF. Overview of methods for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 283-305.
157. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye klinikleri Derg* 1989; 9: 1-8.
158. Moslen MT. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis, Free radicals in diagnostic medicine, Ed. D. NewYork: Armstrong Plenum Press, 1994.
159. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya. 1995.
160. Freeman Ba, Crapo JD. Biology of disease, Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-26.
161. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1984; 105: 273-283.
162. Robert JA, Michael J. Caplan, Orson WM. Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology & Pathophysiology. 5th. Edition. Alpern & Caplan & Moe editörs (ed). Academic Press, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut: 2013.
163. Babinski K, Catarsi S, Biagini G, Seguela P. Mammalian ASIC-2a and ASIC-3 Subunits Co-assemble into Heteromeric Proton-gated Channels Sensitive to Gd<sup>3+</sup>. *J Biol Chem* 2000; 275: 28519-28525.
164. Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J* 2008; 27: 3047-3055.
165. Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 2007; 282: 17325-17329.

166. Kobayashi H, Yoshiyama M, Zakoji H, Takeda M, Araki I. Sex differences in the expression profile of acid-sensing ion channels in the mouse urinary bladder: a possible involvement in irritative bladder symptoms. *BJU Int* 2009; 104: 1746-1751.
167. Kullmann FA, Shah MA, Birder LA, de Groat WC. Functional TRP and ASIC-like channels in cultured urothelial cells from the rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296: 892-901.
168. Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem* 2007; 282: 17325-17329.
169. Reeh PW, Steen KH. Tissue acidosis in nociception and pain. *Prog Brain Res* 1996; 113: 143-151.
170. Staniland AA, McMahon SB. Mice lacking acid-sensing ion channels (ASIC) 1 or 2, but not ASIC3, show increased pain behaviour in the formalin test. *Eur J Pain* 2009; 13: 554-563.
171. Waldmann R. Proton-gated cation channels—neuronal acid sensors in the central and peripheral nervous system. *Adv Exp Med Biol* 2001; 502: 293-304.
172. Silvestrini B, Pozzatti. Pharmacological properties of 3-phenyl-5beta diethylaminoethyl-1, 2, 4-oxadiazole. *Brit. J. Pharmacol* 1961; 16, 209-217.
173. Venkatesan N, Punithavathi D. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 231-234.
174. Reddy YA. *J Food Sci Technol* 2014; 51: 98-914.
175. Jadhav VB, Thakare VN, Suralkar AA, Naik SR. Ameliorative effect of *Luffa acutangula* Roxb. On doxorubicin induced cardiac and nephrotoxicity in mice. *Indian J Exp Biol* 2013; 51: 149-156.
176. Çetin F. Doksorubisin uygulamasının sıçan böbrek dokusunda meydana getirdiği değişiklikler üzerine benfotiamin'in koruyucu etkilerinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Elazığ: Fırat üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2014.
177. Koul A. Phytomodulatory potential of lycopene from *Lycopersicum esculentum* against doxorubicin induced nephrotoxicity. *Indian J Exp Biol* 2013; 51: 635-645.

178. Jendrossek V. Anticancer agents. *Current Med Chem* 2003; 3: 343-353.
179. Brown D, Wagner CA. Molecular mechanisms of acid-base sensing by the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 774-780.
180. Gannon KP, McKey SE, Stec DE, Drummond HA. Altered myogenic vasoconstriction and regulation of whole kidney blood flow in the ASIC2 knockout mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; 308: 339-348.
181. Grifoni SC, Jernigan NL, Hamilton G, Drummond HA. ASIC proteins regulate smooth muscle cell migration. *Microvasc Res* 2008; 75: 202-210.
182. Sun X, Jin J, Zhang JG, Qi L, Braun FK, Zhang XD, Xu F. Expression of acid-sensing ion channels in nucleus pulposus cells of the human intervertebral disk is regulated by non-steroid anti-inflammatory drugs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014; 46: 774-781.
183. Dorofeeva NA, Barygin OI, Staruschenko A, Bolshakov KV, Magazanik LG. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J Neurochem* 2008; 106: 429-441.
184. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 905-911.
185. Norman JT, Gatti L, Wilson PD, Lewis M. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases expression by tubular epithelia and interstitial fibroblasts in the normal kidney and in fibrosis. *Exp Nephrol* 1995; 3: 88-89.
186. Dimas G, Iliadis F, Grekas D. Matrix metalloproteinases, atherosclerosis, proteinuria and kidney disease: Linkage-based approaches. *Hippokratia* 2013; 17: 292-297.
187. Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, Tamaki T, Kuroda Y. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1189-1196.
188. Steinmann-Niggli KJ. Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis. *Am Soc Nephrol* 1998; 9: 397-407.

- 189.** Ahuja TS. Doxycycline decreases proteinuria in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 23; 42: 376-380.
- 190.** Lods N, Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II receptor blockade regulates matrix metalloproteinase activity in patients with glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2861-2872.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

08.08.1970 yılında Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 1987 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 1996 yılında mezun oldum. Temmuz 2011 yılında Tıpta Uzmanlık sınavını kazanarak F.Ü. Tıp Fak. İç Hastalıklar ABD’ında Uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitime devam etmekteyim. İngilizce bilmekteyim.