

T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİVO AKUT NEFROTOKSİSİTEDE  
BÖBREK VASKÜLER ENDOTELYAL  
BÜYÜME FAKTÖR (VEGF) GENİ İFADESİ  
VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER  
(CAPE)'NİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Zeynal Mete KARACA**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

**MALATYA – 2014**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN VİVO AKUT NEFROTOKSİSİTEDE  
BÖBREK VASKÜLER ENDOTELYAL  
BÜYÜME FAKTÖR (*VEGF*) GENİ İFADESİ  
VE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER  
(CAPE)'NİN ETKİSİ**

**Zeynal Mete KARACA**

**Danışman Öğretim Üyesi : Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından 2012/139 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA – 2014**

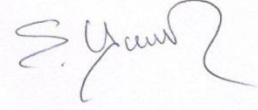
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA



Danışman

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ



Üye

Doç. Dr. Başak KAYHAN



ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2014 tarih ve 2014/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdür V.

## TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e

Kafeik asit fenetil ester'i sentezleyerek bize hediye eden Sayın Prof. Dr. Sabri ULUKANLI'ya

Histopatolojik Analizlerin yapılmasında katkısı bulunan Sayın Doç. Dr. Hasan ÖZEN'e

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ve eğitimimde katkıları bulunan tüm hocalarıma,

İstatistiki analizlerin yapılmasında katkısı bulunan Sayın Doç. Dr. Cemil ÇOLAK'a

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı doktora öğrencisi Berna ÖZYAZGAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Gamze ALAMAN'a

Yüksek lisans tez projeme maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

## ÖZET

Bu tezde; gentamisin ile deneysel böbrek nefrotoksitesini oluşturulmuş sıçanların böbrek dokusunda vasküler endotelial büyüme faktör (*VEGF-A*) geni ifadesi ve kafeik asit fenetil esterinin (CAPE) nefrotoksitesinin önlenmesindeki rolünün araştırılması amacıyla 32 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar her grupta 8'er adet sıçan olmak üzere 4 gruba ayrıldı; Kontrol grubu (K; %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) intraperitoneal yoldan verildi), Gentamisin grubu (G; 8 gün boyunca intraperitoneal yolla 100 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda gentamisin verildi), CAPE grubu (C; 30 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda CAPE intraperitoneal yolla 10 gün boyunca verildi), CAPE+Gentamisin grubu (C+G; 30 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda CAPE ve 100 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda gentamisin intraperitoneal olarak beraber uygulandı). Deney sonunda gruplardan alınan böbrek dokularından *VEGF-A* gen ifadesi ve histopatolojik analizlerin yanısıra, serumdan BUN ve kreatinin analizleri yapıldı. Kontrol grubuna göre gentamisin uygulamasının böbrek *VEGF-A* gen ifadesini düşürdüğü ( $p<0,05$ ), CAPE uygulamasının ise *VEGF-A* gen ifadesinde herhangi bir yükseltici etki yapmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ). Histopatolojik olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin uygulamasının böbrek dokusunda ciddi hasarlanmalara yol açtığı, CAPE uygulamasının ise bu hasarları kısmen iyileştirdiği tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin uygulanan hayvanların serum kreatinin ve BUN değerlerinin anlamlı derecede yükseldiği ( $p<0,05$ ), CAPE uygulamasının yükselen serum ve BUN değerlerini düşürmede anlamlı bir etki yapmadığı bulundu ( $p>0,05$ ). Sonuç olarak gentamisin uygulamasının böbrek *VEGF-A* gen ifadesini ciddi bir şekilde azalttığı, gentamisin kaynaklı böbrek hasarında *VEGF-A*'nın bozulan ifadesinin önemli bir rol oynayabileceği, CAPE uygulamasının ise gentamisin kaynaklı toksitesinin önlenmesinde önemli bir etkisi olmadığı kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: *VEGF*, CAPE, Gentamisin, Nefrotoksitesite, Sıçan

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENYETHYL ESTER (CAPE) ADMINISTRATION AND GENE EXPRESSION OF KIDNEY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (*VEGF*) TO IN VIVO ACUTE RENAL NEPHROTOXICITY CASE

In this thesis, 32 Wistar female rats were used to investigate vascular endothelial growth factor (*VEGF-A*) gene expression and the protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against gentamicin induced experimental renal nephrotoxicity model of rat kidney tissue. Animals in each group of eight rats were divided into 4 groups including; Control group (N; 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) intraperitoneally given), Gentamicin group (G; 8 days via i.p. route, 100 mg/kg/day body weight gentamicin was intraperitoneally given), CAPE (C; 30 mg/kg/day body weight CAPE was given for 10 days), CAPE + gentamicin group (C + G; 30 mg/kg/day body weight CAPE and 100 mg/kg/day body weight gentamicin intraperitoneal were applied together). At the end of the experiment, histopathology, *VEGF-A* gene expression, as well as serum BUN and creatinine levels were analyzed from the kidney tissue of groups. Gentamicin administration decreased the kidney *VEGF-A* gene expression compared to control group ( $p < 0.05$ ), whereas CAPE application did not alter *VEGF-A* gene expression ( $p > 0.05$ ). Histopathologically, gentamicin application caused serious damage in the kidney tissue compared with the control group and the CAPE application was found to improve the damage partially. Gentamicin administration significantly increased serum creatinine and BUN values compared with controls ( $p < 0.05$ ), but CAPE application did not exert any significant effect on raised serum and BUN levels ( $p > 0.05$ ). As a result, gentamicin application significantly reduces kidney *VEGF-A* gene expression and altered *VEGF-A* gene expression could play an important role in gentamicin-induced renal injury. It is concluded that CAPE administration did not have any significant effect in preventing gentamicin-induced toxicity.

Key words: *VEGF*, CAPE, Gentamicin, Nephrotoxicity, Rat

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Böbreğin Fonksiyonları ve Yapısı .....	3
2.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklerin Özellikleri .....	5
2.3. Gentamisin Nefrotoksitesisi .....	7
2.3.1. Gentamisinin Böbrek Tübüllerindeki Etkisi .....	10
2.3.2. Gentamisinin Endoplazmik Retikulum (ER)'daki Etkisi.....	11
2.3.3. Gentamisinin Lizozomdaki Etkisi .....	12
2.3.4. Gentamisinin Mitokondrideki Etkisi .....	12
2.3.5. Gentamisin Nefrotoksitesisinde Oksidatif Stresin Rolü.....	13
2.3.6. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) .....	16
2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) .....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	24

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	24
3.2. Kullanılan Kimyasallar .....	25
3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı .....	26
3.4. Grupların Oluşturulması .....	26
3.5. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri.....	27
3.6. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar .....	27
3.6.1. RNA Saklama Solüsyonu.....	27
3.6.2. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) Çözeltisinin Hazırlanması.....	27
3.7. Toplam RNA Saflaştırılması (PureLink Mini Kit Protokolü) .....	28
3.8. RNA'nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri .....	28
3.9. Spektrofotometrik RNA Ölçümü .....	29
3.10. cDNA Sentez Protokolü.....	29
3.11. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	29
3.12. Biyokimyasal Analizler.....	30
3.12.1. Serum Üre ve Kreatinin Analizleri.....	30
3.12.2. Histopatolojik Analizler .....	30
3.13. İstatistiksel Analizler.....	31
4. BULGULAR .....	32
4.1. Hayvanların Ağırlık Değerleri .....	32
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	33
4.2.1. Hayvanların Serum BUN Değerleri .....	33
4.2.2. Hayvanların Serum Kreatinin Değerleri .....	35
4.3. Moleküler Genetik Bulgular .....	37
4.4. Histopatolojik Bulgular .....	43
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	50



KAYNAKLAR .....	52
EKLER .....	62
Ek 1: $\beta$ -aktin Gen Dizilimi .....	62
Ek 2: VEGF-A Gen Dizilimi .....	64
Ek 3: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	68

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

K	:	Kontrol Grubu
G	:	Gentamisin Grubu
C	:	CAPE Grubu
C+G	:	CAPE+Gentamisin Grubu
ABY	:	Akut böbrek yetmezliği
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
VEGFR-1	:	VEGF Reseptörü 1
VEGFR-2	:	VEGF Reseptörü 2
VEGFR-3	:	VEGF Reseptörü 3
CAPE	:	Kafeik Asit Fenetil Ester
EDP	:	Enerji Bağımlı Faz
ATP	:	Adenozin Trifosfat
NF- $\kappa$ B	:	Nükleer Faktör Kappa Beta
ER	:	Endoplazmik Retikulum
AİF	:	Apoptosis İndükleyen Faktör
RNA	:	Ribonükleik Asit
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
ROT	:	Reaktif Oksijen Türleri
NO	:	Nitrik Oksit
mRNA	:	Mesajcı RNA
tRNA	:	Taşıyıcı RNA

PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HIF-1 $\alpha$	:	Hipoksi İndüklenebilir Faktör-1 Alfa
HIF	:	Hipoksi İndüklenebilir Faktör
EDTA	:	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
cDNA	:	Komplementer DNA
GFH	:	Glomerular Filtrasyon Hızı
TBE	:	Tris Borat EDTA
MDA	:	Malondialdehit
SOR	:	Süper Oksit Radikalleri
BUN	:	Kan Üre Nitrojen
GSH	:	Glutatyon
DMSO	:	Di-metil Sülfoksit
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
ss	:	Standart Sapma
Ort	:	Ortalama

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Böbreğin genel yapısı .....	4
Şekil 2.2. Nefron yapısı .....	5
Şekil 2.3. Gentamisinin sebep olduğu hatalı protein katlanması ve ER stresi .....	11
Şekil 2.4. Gentamisinin sebep olduğu apoptozis ve nekroz mekanizmaları .....	13
Şekil 2.5. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler .....	15
Şekil 2.6. CAPE'nin kimyasal yapısı . .....	17
Şekil 4.1. Gruplarda serum BUN değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G) .....	34
Şekil 4.2. Gruplarda serum kreatinin değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G) .....	36
Şekil 4.3. Purelink (Ambion, Invitrogen) saflaştırma kiti ile böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'nın jel görüntüleme sistemindeki (UVP, ChemiDoc it <sup>2</sup> ) jel görüntüsü (% 1'lik agaroz jel). Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+gentamisin (C+G). .....	37
Şekil 4.4. <i>VEGF-A</i> gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizleri. "Hydrolysis Probe" kimyası kullanılarak $\beta$ –aktin ve <i>VEGF-A</i> mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasındaki oluşan çoğaltım eğrileri. ....	39
Şekil 4.5. $\beta$ -aktin ve <i>VEGF-A</i> cDNA'larının PZR'deki çoğaltımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 75 bp DNA Markeri'dir (Fermentas). <i>VEGF-A</i> (+) (pozitif), <i>VEGF-A</i> (-) (kontrol), $\beta$ -aktin (+) (pozitif), $\beta$ -aktin (-) (kontrol). ....	40
Şekil 4.6. Gruplarda <i>VEGF-A</i> gen ifade değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G) .....	42
Şekil 4.7. K grubu bir denekte böbrek dokusunun normal histomorfolojik yapısı; HE X20 .....	43
Şekil 4.8. G grubu bir denekte böbrek dokusunda şiddetli tübüler dejenerasyon ve nekroz (siyah oklar), glomeruluslarda yıkımlanma (okbaşı) ile mononükleer hücreli infiltrasyon (beyaz oklar); HEX20 .....	44
Şekil 4.9. C grubu bir denekte böbrek histomorfolojisi normal yapıyı göstermektedir; HEX20 .....	44

Şekil 4.10. C+G grubu bir hayvanda gözlenen orta derecedeki renal tübüler dejenerasyon (oklar); HEX20 ..... 45

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Primer dizilimleri.....	30
Tablo 4.1. Deney gruplarında 0.gün ve 10.gün sıçan vücut ağırlıkları (gr).....	32
Tablo 4.2. Serum BUN (mg/dL) değerleri ve gruplar arası istatistiki karşılaştırma..	33
Tablo 4.3. Serum kreatinin düzeyleri (mg/dL) ve gruplar arası istatistiki karşılaştırma.....	35
Tablo 4.4. Gruplarda ölçülen spektrofotometrik absorbans değerleri ve RNA miktarları. Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G). ....	38
Tablo 4.5. Böbrek <i>VEGF-A</i> gen ifadeleri ve gruplar arası istatistiki karşılaştırma ...	41

## 1. GİRİŞ

Günümüzde gram negatif bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidler sıklıkla kullanılmaktadır. Gentamisin bu gurubun en çok kullanılan üyelerinden biri olarak bilinmektedir. Aminoglikozid gurubu antibiyotiklerin kullanımını sınırlandıran en önemli yan etkileri ise oluşturdukları nefrotoksisite olarak bilinmektedir (1). Gentamisin nefrotoksisitesi nedeniyle böbrekte hem proksimal tübül hasarı hemde renal kan dolaşımında bozulmalar meydana gelmekte ve bu durum böbrek yetmezliğine yol açabilmektedir (2). Gentamisin ile tedavi edilen hastaların %10 - %20'sinde akut böbrek yetmezliği gelişebilmekte (3), 7 günden daha fazla gentamisin ile tedavi edilen hastaların da %30'unda nefrotoksisite belirtileri ortaya çıkabilmektedir (4). Gentamisin nefrotoksisitesi tipik olarak tübüler epitelyal hücre sitotoksisitesinden kaynaklanan tübüler hasarla kendini göstermektedir (3). Gentamisin nefrotoksisitesi gentamisin alımının sona erdirilmesinden sonra geri dönüşümlü olarak düzelebilmektedir (5).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), vasküler endotelyal hücrelere özgü bir mitojendir. VEGF, vaskülogenez ve anjiyogenezi düzenlemektedir. Anjiyogenez var olan kan damarlarından yeni kan damarı oluşumu, vaskülogenez ise dolaşımda bulunan endotel hücre öncüllerinin (endotel progenitör hücreler) daha önceden var olan herhangi bir damardan köken almadan olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni bir damar oluşturması olarak bilinmektedir (6). VEGF, heparin bağlayan bir glikoprotein olup, makrofajlar tarafından üretilmekle birlikte, fibroblast, endotelyal ve epidermal hücreler tarafından da sentezlenmektedir. VEGF ailesinin üyeleri kendi özel reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. VEGF; endotelyal hücrelerin mikrovasküler tüp oluşumunu, göçünü ve çoğalmasını uyararak, güçlü anjiyogenik etki göstermektedir (7). VEGF vücutta yeni damar yapımında, yara iyileşmesinde, damar geçirgenliğinde, embriyogenezde ve menstural döngü gibi olaylarda da görev almaktadır (8). Karaciğer hücrelerinin rejenerasyonunda *VEGF* ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (9). *VEGF* vücutta böbrek proksimal tübül hücrelerinde bulunduğu birçok farklı bölgede ifade edilmektedir (10).

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE), bal arılarının kovanından elde edilen propolisin biyoaktif bir komponentidir. Güçlü bir antioksidan olan CAPE, iyi bilinen bir nükleer faktör kappa B (NF-κB) inhibitörüdür. Potansiyel bir antiinflamatuvar ajan olan CAPE'nin, anti mitojenik, antikarsinogenik, anti inflamatuvar, antiviral ve immünomodülatör özellikleri de bilinmektedir (11).

Yapılan birçok çalışmaya rağmen gentamisin toksisitesinin patogenezi tam olarak anlaşılamamaktadır. Bu çalışmada; gentamisin kaynaklı akut böbrek hasarında böbrek *VEGF* gen ifadesindeki muhtemel değişimler ve varsa CAPE'nin akut böbrek hasarını önlemedeki etkileri araştırılarak hasar mekanizmasının anlaşılması ve tedavisine yönelik yeni uygulamaların ortaya konulması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbreğin Fonksiyonları ve Yapısı

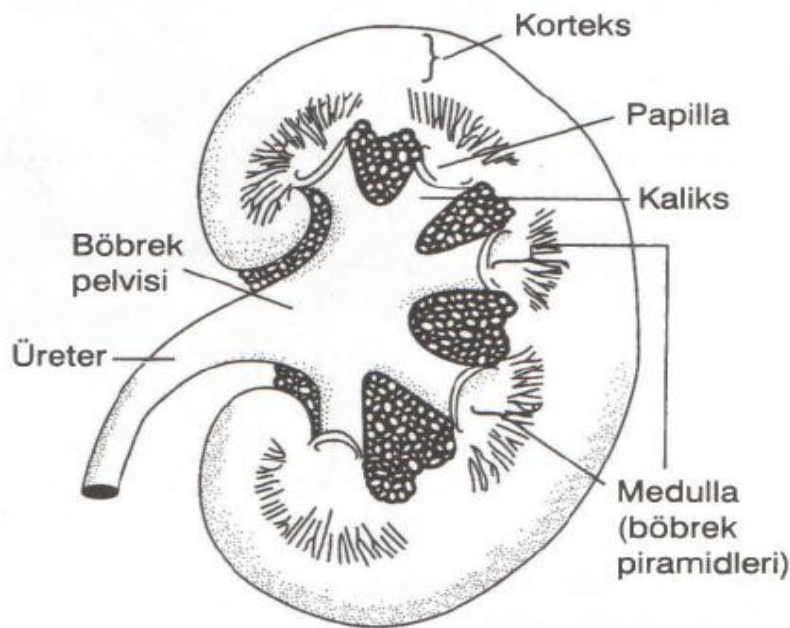
Böbrekler vücut homeostazisini sağlayan ve metabolik atıkları canlıdan uzaklaştıran başlıca organlar olarak bilinmektedir. Vücudun su ve elektrolit dengesinin sürdürülmesi, fizyolojik işlevleri etkileyen hormonların üretimi, vücut işlevlerini etkileyen biyoaktif maddelerin atılımı, kan basıncının düzenlenmesi (renin sentezi ve salgısı yoluyla), alyuvarların üretiminin ayarlanması, D vitamini üretiminin ayarlanması (eritropoietin sentezi ve salınımı yoluyla) ve kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi de böbreğin diğer görevleri arasında sayılmaktadır (12).

Böbrekler üriyasyon yolu ile idrar üretmektedirler. İdrar; üre, ürik asit, kreatinin ve çeşitli maddelerin yıkım ürünleri gibi atık ürünlere ilaveten, su ve elektrolitleri de içermektedir. Böbreklerin çok önemli hayati fonksiyonlarda rol almasından dolayı böbrek fonksiyonlarında meydana gelebilecek herhangi bir bozulma ölüme götürebilecek sonuçlar doğurmaktadır (13).

Böbreğin 3 önemli görevi bulunmaktadır: i) filtrasyon; kan plazması suyunun bir kısmının içinde erimiş maddeleriyle birlikte, filtrasyon (süzülme) yoluyla çıkarılmasıdır. ii) Rezorpsiyon; filtrasyon ile kandan ayrılan fakat homeostazis için gerekli olan maddelerin kana geri emilmesidir. iii) Sekresyon; vücut için yararlı veya zararlı olan artık ve yabancı maddelerin kandan alınıp tübül sıvısına verilmesidir (14).

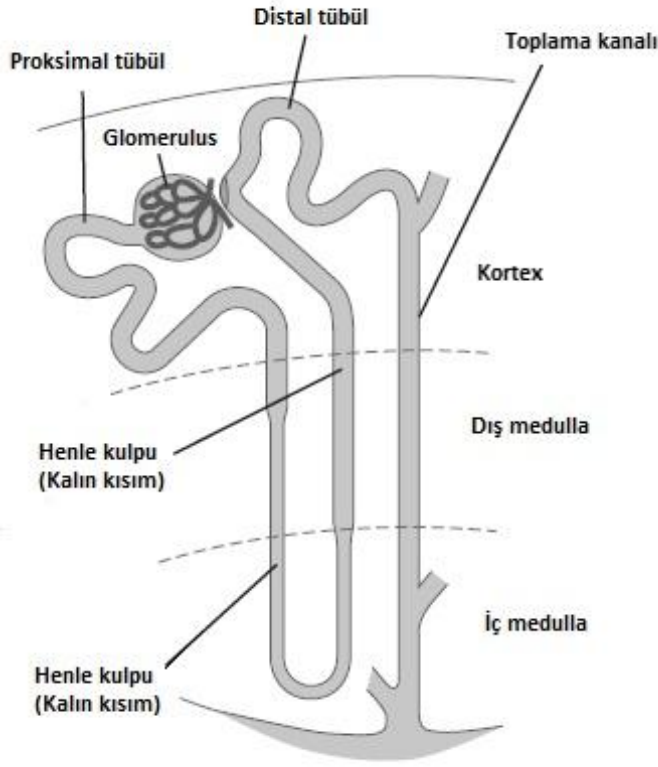
Böbreğin anatomisine bakıldığında, böbreklerin vertebral kolonun her iki yanında, karnın arka duvarına yakın olarak periton boşluğunun dışında bulunduğu görülmektedir. Böbreğin dış yüzü renal kapsül adı verilen bir zarla kaplıdır. Yuvarlak dış konveks yüzeyi vücudun kenarına bakmakta, iç yüzeyi ise hilum olarak isimlendirilmektedir. Hilumda böbrek arteri, böbrek veni, sinirleri ve idrarı böbrekten mesaneye taşıyan üreter bulunmaktadır. Piramid olarak isimlendirilen koni şeklindeki dokular huni şeklindeki kaliksler ile birleşmektedir (14, 15).

Her piramidin tepesi papilla olarak isimlendirilmektedir ve minör kalikslere doğru uzanmaktadır. Böbrek dokusu korteks ve medulla olarak ikiye ayrılmaktadır. Medulla dokusunun üzerinde korteks bulunmaktadır. Böbreğin dış yüzeyinde ise kortikal dokuyu kaplayan ince bağ dokusu (kapsül) bulunmaktadır (Şekil 2.1.). Korteks ve medullada işlev gören doku kitlesini, birincil olarak tübüller (nefronlar ve toplayıcı tübüller) ve kan damarları (kılcal damarlar ve kılcal damar benzeri yapılar) oluşturmaktadır (12).



**Şekil 2.1.** Böbreğin genel yapısı (16)

Kanın kimyasal yapısı böbreklerde düzenlendiği için bütün kanın böbreklerden geçmesi gerekmektedir. Bazal durumda kalbin pompaladığı her dört litre kandan üç litresi tüm vücuda, bir litresi ise böbreklere gitmektedir. Böbreklere giden bu kanı taşıyan arterler doğrudan doğruya Aorta Abdominalis'den ayrılmaktadırlar. Renal arter böbreğe gelince 7 ila 9 parçaya ayrılmakta ve bu parçaların çoğu pelvis renalis'in önünden geçmektedir. (14). Her bir insan böbreğinde yaklaşık 1,3 milyon kadar nefron bulunmaktadır. Nefron; glomerulus ve bowman kapsülünü takip eden proksimal tübül, henle kulpu (ince tübül), distal tübül ve daha sonrada idrar toplama kanalı şeklinde devam eden bir yapıdan oluşmaktadır (Şekil 2.2.). İnsanda nefron uzunluğunun yaklaşık beş santimetre olduğu bildirilmektedir (17).



**Şekil 2.2.** Nefron yapısı (18)

Glomerulus; afferent arteriolün renal korpüsküle girince birçok kılcal damarlara ayrılması ve bu kılcal damarların birleşerek efferent arteriolü meydana getirmesi ile oluşmaktadır (14).

## 2.2. Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklerin Özellikleri

Gentamisin; gram negatif bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlarda sıklıkla kullanılan aminoglikozid gurubu bir antibiyotiktir (19). Aminoglikozid gurubu antibiyotikler yaklaşık 60 yıldır klinikte kullanılmaktadır. İlk olarak 1944’de streptomisin keşfedilmiştir. Streptomisinden sonra sırasıyla neomisin (1949), kanamisin (1957), gentamisin (1963), tobramisin (1968), amikasin (1972) ve netilmisin (1975) bulunmuş ve klinikte kullanılmaya başlanmıştır (20). Aminoglikozid grubu antibiyotiklerin ototoksik ve nefrotoksik etkilerinden dolayı klinikteki kullanımlarında hala önemli sorunlar bulunmaktadır (21).

Gentamisin, 1963 yılında Rosset ve ark. tarafından *Micromonospora purpurea*'dan izole edilmiştir (22).

Bütün aminoglikozidler altı üyeli bir aminosiklitol halkasından oluşmaktadır. Aminosiklitol halkasına glikozidik bağlarla şekerler bağlanmıştır Spektinomisin, aminoşeker ve glikozidik bağ içermemesi nedeniyle diğer aminoglikozidlerden farklı olarak karşımıza çıkmaktadır (23). Gentamisin, serbest baz halinde suda kolay çözünmekte ve asitlerle tuzlar yapmaktadır. Gentamisin verildikten sonraki 160 dakika içinde ilacın böbrek korteksinde plazmanın 20 katı, medullada ise plazmanın 3 katı oranında biriktiği bildirilmiştir (22). Aminoglikozidler son derece polar yapıda olmaları nedeniyle çok az lipofilik özellik gösterdiklerinden dolayı gastrointestinal sistemden emilimleri oldukça çok az olmaktadır. Rektal ve oral uygulamalarda %1'den daha az emilmektedirler. Aminoglikozidler, intravenöz verildikten sonra 30 dakika, intramüsküler verildiği zaman ise 30-60 dakika arasında plazma tepe düzeyine ulaşmaktadırlar. Enfeksiyonların tedavisinde parenteral olarak kullanılmaktadır (22-24).

Sıçanlarda plazma yarı ömrü yaklaşık 30 dakika iken böbrek korteksinde bu sürenin 100 dakikaya ulaştığı bildirilmiştir (24). Bu durum böbreklerde istenmeyen nefrotoksik etkilerin artmasına neden olmaktadır (25).

Aminoglikozidler streptomisin haricinde plazma proteinlerine çok az bağlanmakta, merkezi sinir sistemi ve yağ dokusuna girememektedirler. Yeni doğanlarda beyin omurilik sıvısına (BOS) geçebilmektedirler. Solunum yolları, prostat ve göz içinde seviyeleri istenen seviyenin altında iken idrarda, böbrek dokusunda, iç kulak endolenf ve perilenf sıvısında yoğunlaşırlar. Aminoglikozidler vücuttan metabolize olmadan atılırlar, böbrek fonksiyonları normal kişilerde yarılanma ömrü 1,5 – 3,5 saattir, yaklaşık %99'u idrarla atılırken kalanı dışkı ve tükürük ile elimine olmaktadır (23, 26, 27).

Aminoglikozidler, Gram negatif bakterilerin dış duvarındaki porin kanallarından geçerek periplazmik bölgeye girmektedirler. Gram negatif bakterilerde ve bazı gram pozitif bakterilerde enerji bağımlı bir aktif transport mekanizması ile sitoplazmayı aşarak hücre içerisine aktarılmaktadırlar. (26).

Aminoglikozidlerin etki mekanizması ilk olarak hücrenin dış yüzeyinde iyonik etkileşimle başlamaktadır. Bu olay pasif olarak gerçekleşen elektrostatik ve hızlı bir olaydır. Aminoglikozidler oldukça katyonik bir yapıda olduğu için gram negatif bakterilerin hücre duvarında lipopolisakkaritlere, fosfolipitlerin polar başlarına ve dış membran proteinlerine bağlanarak burada  $Mg^{+2}$  ve  $Ca^{+2}$  iyonlarına rekabet eder ve bu iyonları yerlerinden oynatmaktadırlar. Sonuç olarak hücre duvarının normal geçirgenlik fonksiyonu bozulmaktadır (23, 28, 29).

Hücre içine elektrostatik etkileşim sayesinde geçen aminoglikozidler geri dönüşümsüz olarak sitoplazma içinde kalmaktadır. Bu iyonik bağlanmanın devamında enerji gerektiren iki basamak (EDP: Enerji Bağımlı Faz) gelmektedir, bunlardan biri yavaş (EDP-1), diğeri hızlı (EDP-2) basamaktır. İdrarın hiperozmolar ve asidik olması durumunda, apselerin anaerobik ortamında aminoglikozidlerin etkisi azalmaktadır (23, 29).

Aminoglikozidler daha sonra ribozomlara bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir. Bu olay daha sonraki antibiyotik transport fazı olan EDP-2'yi hızlandırmaktadır, bu aynı zamanda progresif bir membran bozulmasını tetikleyerek böylece önce küçük iyonlar daha sonra büyük moleküller bakteri dışına sızdırmaktadır, bu da aminoglikozidlerin letal etkisini açıklayabilmektedir (23).

Aminoglikozidler, 30S ribozomların 16S A bölgesine geri dönüşümsüz olarak bağlanmaktadırlar. Streptomisin sadece 30S alt birimine bağlandığı halde, diğeri ilave olarak 50S alt birimiyle de etkileşirler. Burada mRNA'nın kodon ve tRNA'nın antikodonlarının yanlış okunmasına neden olurlar. Sonuç olarak yanlış translasyon ve normal olmayan proteinler, hücre membranının fonksiyonunu kaybetmesi ve DNA replikasyonunun engellenmesi ile bakteriyel ölüm meydana gelmektedir (23).

### **2.3. Gentamisin Nefrotoksitesisi**

Canlı organizmaların ilaçlara ve kimyasallara maruz kalması sonucu sıklıkla toksisite oluşmaktadır. Birçok bileşiğin toksik etkisi bazı organlar üzerine odaklanmıştır, bu organlara hedef organlar denmektedir. Bileşiğin farmakokinetiği ve hedef organın toksik maddeye karşı cevap verebilme yeteneği, organın toksisiteye karşı duyarlılığını belirleyen birkaç faktörden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Böbrek ve karaciğer gibi bazı organlar, kimyasalları toksik ara ürünlere metabolize etmektedirler. Bu reaktif ara ürünler hücrel makromoleküllere bağlanarak ya da membranlar veya nükleik asitler gibi fonksiyonel olarak önemli olan hücrel yapıların peroksidatif hasarına yol açan serbest oksijen radikallerini (SOR) üreterek toksisiteyi başlatabilmektedirler (30).

Böbreklerin yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri yoğunlaştırma yeteneği ve tübüler epitelde özellikli taşıyıcılara sahip olması nedeniyle nefronlar zedelenmeye oldukça duyarlı hale gelmektedir (31).

Tübül epitellerinin çoğunluğunun hasara karşı kendini yenileme yeteneği hızlıyken, glomerül ve medulladaki hücreler bu işlevi ya daha yavaş yerine getirirler ya da kendilerini yenileyemezler. Toksik maddelere maruz kalan nefronların belirli bir seviyeye kadar hasarı telafi etme yeteneği bulunmaktadır. Oluşan böbrek hasarının değerlendirilmesinde, glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ve elektrolit emilimi gibi parametrelerden yararlanılmaktadır. Üre ve kreatinin gibi maddelerin kan değerleri böbrek epitel hücrelerinin kantitatif olarak %70-80'inin kaybedildiği durumlarda yükselmektedir (30).

Bazı antibiyotikler, analjezikler ve immünsüpresif ilaçlar nefrotoksitite oluşturabilmektedir (32, 33). Radyokontrast maddeler gibi bazı teşhis amaçlı kullanılan ajanların da nefrotoksik olduğu bilinmektedir: Ayrıca alternatif tıpta kullanılan bazı bitkisel ilaçlar ve doğal ürünler nefrotoksisiteye yol açabilmektedir. Bunların dışında kadmiyum, bakır, uranyum ve bizmut gibi maddelere karşı çevresel maruziyet de, nefrotoksisiteye neden olabilmektedir (34, 35).

Nefrotoksisiteye en sık yol açan ilaçlar antibiyotiklerdir. Bazı antibiyotikler aşırı duyarlılığa neden olduğu için nefrotoksik olabilirken (penisilin, rifampisin, eritromisin, vankomisin), bazıları direk nefrotoksik etki göstererek (aminoglikozidler, sefalosporinler, amfoterisin B), bazıları ise böbrekte çökerek nefrotoksisiteye sebep olmaktadır (36, 37).

Aminoglikozid nefrotoksitesi böbrekte çeşitli patolojilere neden olabilmektedir. Proksimal tübüllerde transportun bozulması nedeniyle glukozüri, proteinüri ve aminoasidüri ortaya çıkabilmektedir. Daha sonra serum, kreatinin ve

azot değerlerinde artış görülebilir. Bu grup ilaçlar içinde nefrotoksisitesi en yüksek ilaç neomisin iken gentamisin, amikasin ve kanamisin de güçlü nefrotoksisite meydana getirebilmektedir (38).

Aminoglikozidlerin oluşturduğu nefrotoksisiteyi önlemek için çeşitli çözüm yolları denenmiş ve bazı ajanların kullanılmasıyla toksik etkisinin azaltılabileceği gösterilmiştir. Doz sınırlaması nefrotoksisiteyi azaltabilen en klasik yöntemlerdendir. Buradaki amaç bir yandan ilacın kan düzeyini terapötik sınırdan tutarken diğer yandan da bunun için doz düzenlemeleri yapmaktır (37). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, ilaçlar nedeniyle oluşan nefrotoksisitenin bazı ajanlarla azaltılabildiği gösterilmiştir. Sılan ve ark. (39), oluşturdukları gentamisin indüklü nefrotoksisite modelinde, resveratrolün, nefrotoksisiteye neden olabilecek lipid peroksidasyon reaksiyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Gentamisin, aminoglikozidler içerisinde en fazla kullanılan ilaçtır (40). Gentamisin'e bağlı nefrotoksisite akut böbrek yetmezliği (ABY) olgularının % 10-20' sini oluşturmaktadır (41) ve kan üre azotu (BUN) ve kreatinin konsantrasyonlarında artışla beraber şiddetli proksimal tübüler nekrozla karakterize olarak karşımıza çıkmaktadır (42). Yapılan birçok çalışmaya rağmen gentamisin toksisitesinin patogenezi tam olarak anlaşılammamaktadır (25). Son yıllarda gentamisin nefrotoksisitesinde serbest radikallerin rolü ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu araştırmaların sonucunda aminoglikozid gurubu antibiyotiklerin ototoksik ve nefrotoksik etkilerini, SOR üretimini artırarak yaptıkları ifade edilmektedir (25, 43). Bazı araştırmacılar, aminoglikozidlerin reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunu teşvik ettiğini ve böylece membran lipid peroksidasyonunun patogenezinde rol oynadığını bildirmişlerdir (43-45).

Renal kortekste gentamisin birikiminin neden olduğu morfolojik değişimler ve indüklenen sendromlar, deney hayvanları ve insanlarda çok benzerdir (3). Gentamisin nefrotoksisitesi tipik olarak tübüler epitel hücre sitotoksisitesinden kaynaklanmaktadır. Deney hayvanlarının gentamisin ile tedavisi/muamelesi in vivo ve hücre kültüründe apoptozisin yanı sıra tübüler epitel hücrelerinin nekrozunu meydana getirebilmektedir (46-48).

Hücre ölümü ve kemoteropatik ajanlar ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi toksik moleküllerin konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunmaktadır. Bu toksik moleküller düşük konsantrasyonlarda apoptozise yüksek konsantrasyonlarda ise nekroza sebep olmaktadır. Hücrenin ölüm şekli güçlü bir şekilde ATP deposuna ve hücredeki enerji durumuna bağlıdır, çünkü apoptoziste ATP gerekmektedir (49, 50). Ciddi bir şekilde azalan renal kan akışı bazı böbrek alanlarında oksijen miktarının azalmasına neden olacağından, ATP havuzu ve solunumun azalmasını da beraberinde getirebilmektedir (51).

### **2.3.1. Gentamisin'in Böbrek Tübüllerindeki Etkisi**

Aminoglikozidlerin böbrekte tübül epitel hücrelerinde biriktiği insanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (3). Bu birikim; megalin ve kübilin adı verilen proteinleri içeren endositotik bir kompleksin hücrenin membranında bulunmasından kaynaklanmaktadır. Bu endositotik kompleks, protein çeşitlerinin ve aminoglikozidler gibi belli ksenobiyotiklerin ultrafiltrasyonunda ve katyonların transportunda rol almaktadır (52-55).

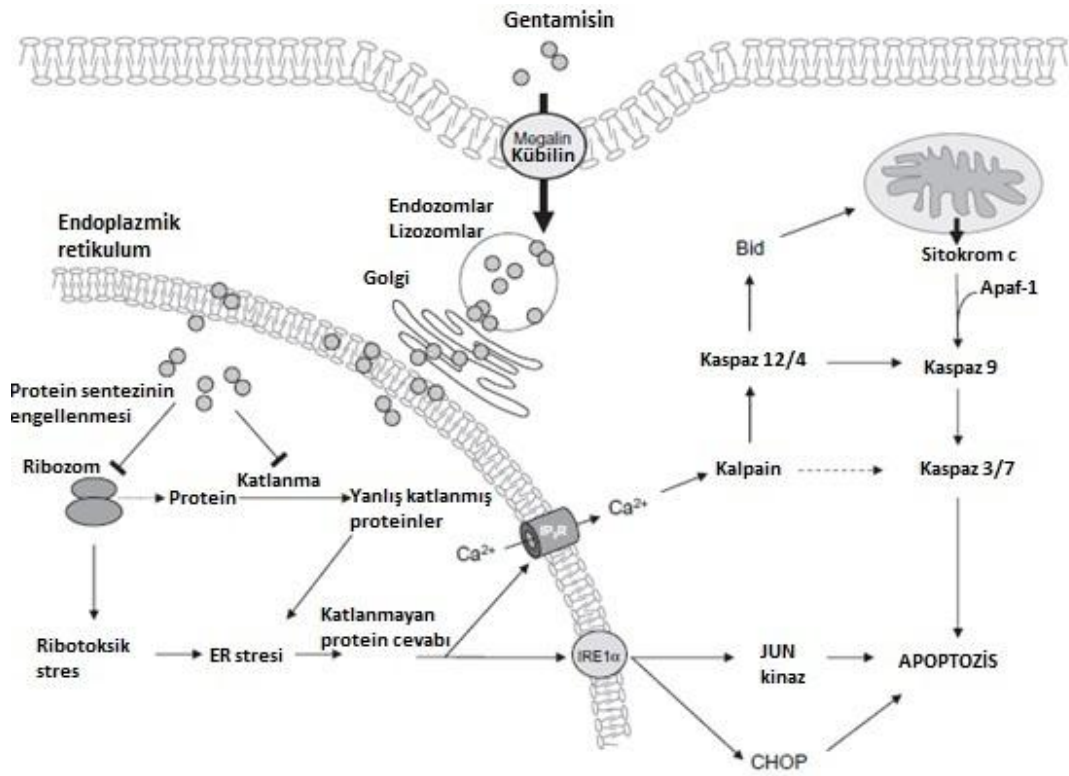
Proksimal tübül epitel hücrelerinin içinde biriken aminoglikozidler hücre hayatı için kritik olan süreçleri ve birkaç organelin fonksiyonunu değiştirmektedir. Ayrıca tübüler hücre ölümlerinde rol oynayan bir membran reseptörü (kalsiyuma hassas reseptör) gentamisinle aktif olmaktadır (3).

Hayvan modellerinde ve insan hücre kültürü araştırmalarında nicel olarak gösterildiği üzere tübüler hücrelere gentamisin girişinin çoğu megalin kübilin aracılı endositoz yoluyla gerçekleşmektedir. Bu süreç, membran fosfolipitlerinin negatif yüklerine, gentamisin'in elektrostatik olarak bağlanması ile gerçekleşmektedir. Gentamisin daha sonra pinositoz yoluyla endozomal kompartımanların içine geçmektedir. İlaç çoğunlukla lizozomlarda birikmekte, geriye doğru salgı sekresyon yolu ile veziküler trafiği değiştirilerek golgi ve endoplazmik retikulum (ER) gitmektedir. Lizozomlarda gentamisin, membranın bozulmasına (destabilizasyon) neden olmaktadır. Lizozomal agregasyon, lipid metabolizmasının değişimi ve fosfolipidozis'in hücre ölümü ile ilişkisi tespit edilmiştir (56-59).



### 2.3.2. Gentamisinin Endoplazmik Retikulum (ER)'daki Etkisi

ER'de gentamisin birikimi ER stresine neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak proteinlerde yanlış katlanmalar ve hücre döngüsünde problemler oluşmaktadır (Şekil 2.3.) (60). Aşırı derecede yanlış katlanan protein bulunması durumunda endoplazmik retikulumdan  $Ca^{2+}$  salınımı ile aktif edilen kaspaz 12 (insanlarda kaspaz 4) ve kalpain, apoptozisi meydana getirmektedir. Bu bağlamda bir kalpain inhibitörünün kulak kılı hücre kültüründe gentamisin sitotoksitesini azaltığı rapor edilmiştir (61). Ayrıca hatalı protein katlanması sonucunda junkinaz ve C/EBP homolog protein transkripsiyon faktörü yoluyla da apoptozis meydana gelmektedir (62-64).



Şekil 2.3. Gentamisinin sebep olduğu hatalı protein katlanması ve ER stresi (3).

Gentamisin kalretikülünün yapısına girerek burada proteinlerin posttranslasyonel katlanması için gerekli olan şaperon aktivitesini inhibe etmektedir (65).

Gentamisinin ribozomun küçük alt ünitesine bağlanma kapasitesinin onun bakterisidal etkisiyle ilişkili olduğu iyi bilinmektedir ancak bu tür bir bağlanmanın memeli hücrelerinde benzer etki göstererek ölüme sebep olduğu veya katkıda bulunup bulunmadığı tam olarak belirlenememiştir. Recht ve ark. (66), yaptıkları çalışmada ökaryotik 16S ribozomal RNA için minimum inhibe edici konsantrasyonun 0,23 mM olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu değer prokaryotlar için gereken miktarın 128 katıdır. Buna rağmen aminoglikozidlerin ökaryotik hücrelerde ribozomun işlevini bozarak protein sentezini inhibe ettiğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (3).

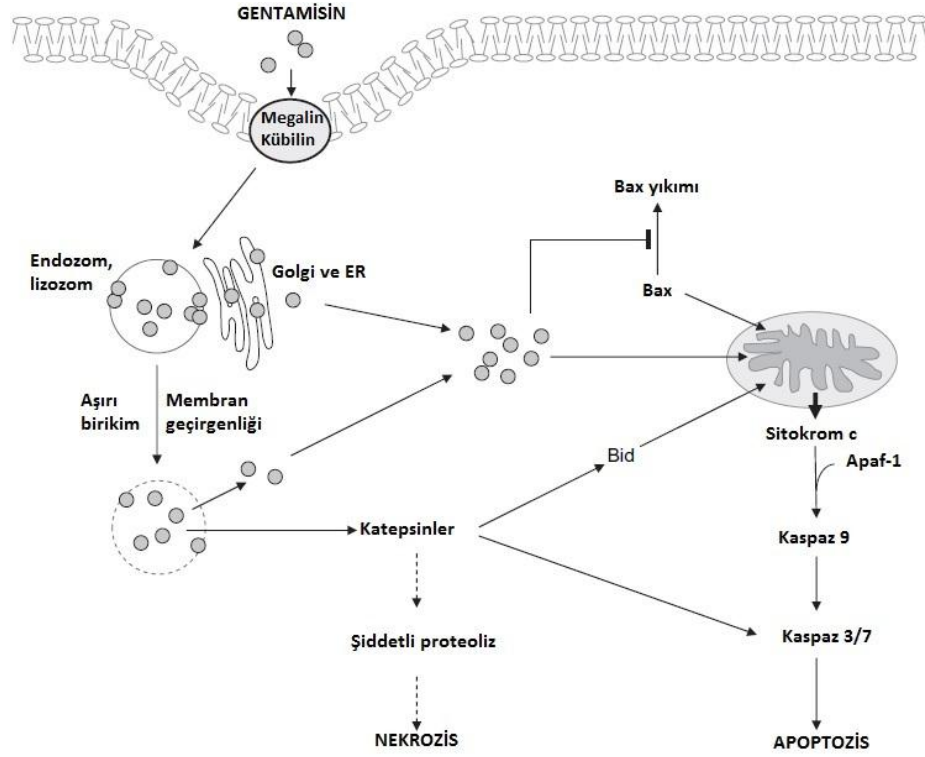
### **2.3.3. Gentamisin Lizozomdaki Etkisi**

Lizozomal membranın yırtılması hücre ölümünü indükleyen L, B, D ve diğer katepsinler gibi proteazların sitozolün içine salınımına neden olmaktadır (67). Katepsinler, uygulayıcı (efektör) kaspaz 3 ve 7'nin proteolitik aktivasyonunu katalize ederler ve Bid'in aktivasyonu ile apoptozisin mitokondriyal yolağını aktive etmektedirler (68, 69). ATP'nin yokluğunda nekrotik hücre ölümüne yol açan sitoplazmadaki katepsinler şiddetli bir proteolize yol açabilmektedirler (70).

### **2.3.4. Gentamisin Mitokondrideki Etkisi**

Mitokondri üzerinde gentamisin etkisi doğrudan veya dolaylı bir şekilde olabilmektedir. Doğrudan etki mekanizması bilinmemektedir, ancak bununla birlikte, apoptozisin intiristik yolunun aktivasyonu için gereken koşul, intramembran boşluktan proapoptotik proteinlerin salınımının indüklenmesidir. Sitozolik gentamisin, mitokondri üzerine etki ederek sitokrom c ve apoptoz-indükleyen faktör (AIF) gibi diğer proapoptotik proteinlerin translokasyonunu tetiklemektedir. Sitozolda sitokrom c, kaspaz 9'u aktive etmekte ve son olarak kaspaz 3 ve 7 aktive olmaktadır. Böylece apoptozis sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.)(71).

Dolaylı yola Bax aracılık etmektedir ve Bcl-2 nin aşırı ekspresyonu ile inhibe edilmektedir (Şekil 2.4.). Bu anlamda, gentamisin Bax'ın bozulmasını etkileyebilen proteozoma bağlanmakta ve hücresel seviyesini artırmaktadır (72).



**Şekil 2.4.** Gentamisinin sebep olduğu apoptozis ve nekroz mekanizmaları (3)

### 2.3.5. Gentamisin Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stresin Rolü

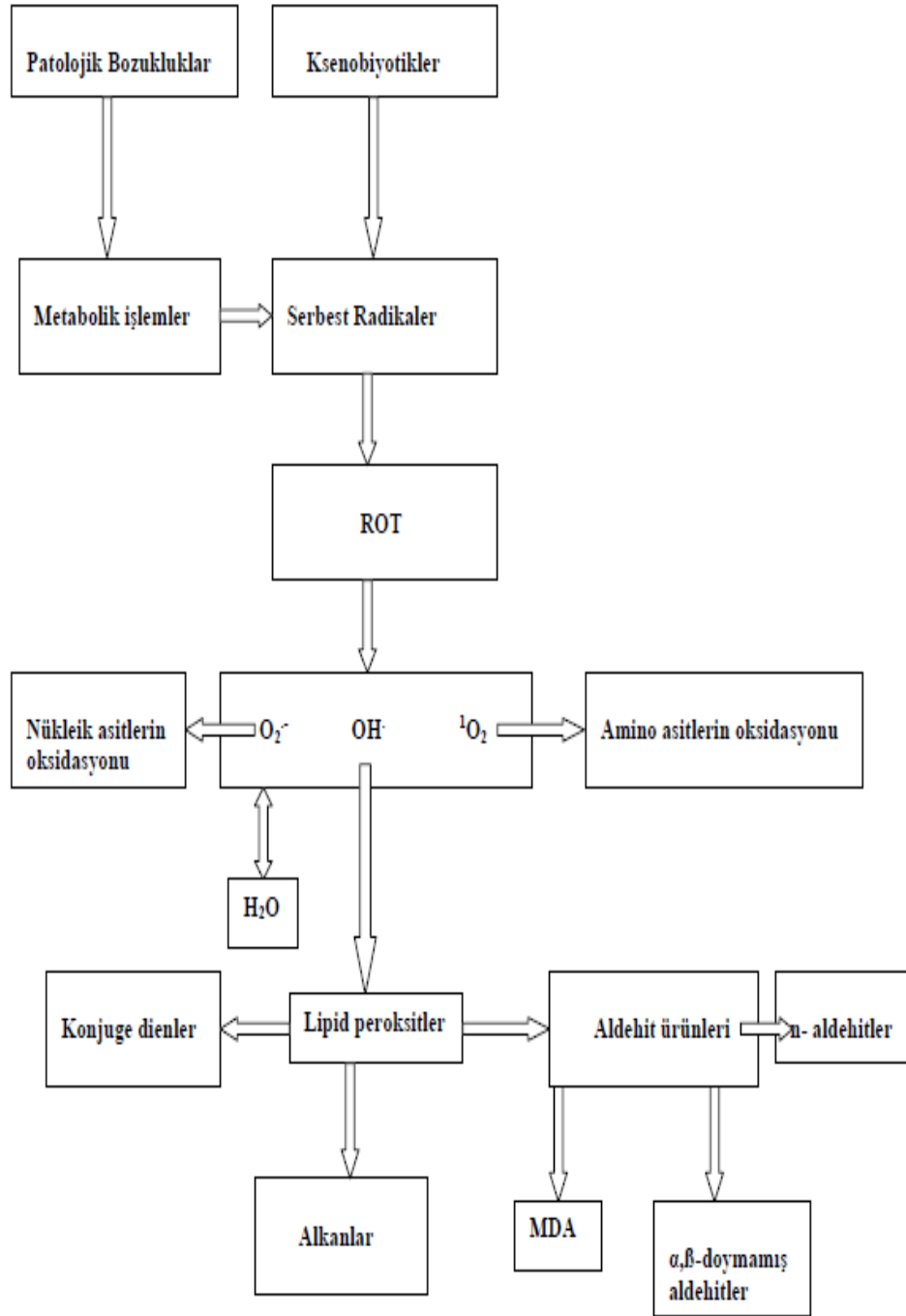
Serbest radikaller; biyokimyasal redoks tepkimeleriyle ortaya çıkan, yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllere denmektedir (73-75). Serbest radikaller eşleşmemiş elektronları nedeni ile kararsız konumdadır ve kararlı yapı kazanabilmesi için eşleşmemiş elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekmektedir. Aşırı derecede reaktif olan bu moleküller diğer moleküller ile hızla reaksiyona girebilmektedirler. Bu radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşmakta ve belli patolojik durumlarda üretimleri artmaktadır (76-78). Bu oksidan ürünlerin arttığı durumlarda hedef moleküller olan membran yapısındaki fosfolipitler, glikolipitler, membran proteinleri ve doymamış yağ asitleri oksidatif strese maruz kalmaktadırlar (79). Sonuç olarak metabolik bozukluklara, hücre hasarına ve hatta ölüme yol açabilmektedirler (78-80).

Serbest oksijen radikalleri; singlet (tekil) oksijen ( $^1O_2$ ), hidroksil radikali (OH $\cdot$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), ve nitrik oksit (NO $\cdot$ ) gibi radikal türleridir. Normal

fizyolojik şartlarda oksijenin %2-5'i ROT'a dönüşmekte ve antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılmaktadır. ROT, antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılamadığı durumda, lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve hücrel hasar meydana gelebilmektedir.  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  gibi ROT'lar, insanlarda bir çok hastalığın patogenezinde işe karışmaktadır. Fizyolojik şartlarda oluşan ROT, antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılmaktadır.  $O_2^-$  radikalleri Süperoksit Dismutaz (SOD) ile  $H_2O_2$ 'ye dönüşmekte, oluşan bu  $H_2O_2$  ise, GSH-Px ve CAT ile su ve oksijene yıkılarak detoksifiye edilmektedir (81).

Serbest radikaller, canlılarda iç ve dış kaynaklı olarak üretilmektedir. İç kaynak olarak, mitokondriyal elektron taşıma sistemi, oksidan enzimler, fagositik hücreler, otooksidasyon reaksiyonları, yaşlanma gibi kaynaklar ile ortaya çıkmaktadırlar (82).

Dış kaynaklı serbest radikallerin en önemli kaynakları ilaçlar, sigara, alkol, uyuşturucular, ksenobiyotikler, kirli hava, nitrojen dioksit, benzen, kükürt dioksit, karbon monoksit gibi maddelerdir. Serbest radikaller, aşırı reaktif olduğu için canlılarda bulunan her çeşit biyomoleküle zarar verebilmektedirler. Serbest radikallerin hasar verdiği biyomoleküller arasında lipidler, proteinler, nükleik asitler, serbest aminoasitler, karbonhidratlar, lipoproteinler ve bunlardan türeyen kompleks moleküller sayılabilmektedir (Şekil 2.5.) (75).



**Şekil 2.5.** Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler (83).

Oksidatif stres gentamisin nefrotoksisitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Deney hayvanlarında ve hücre kültürüyle yapılan çalışmalarda, gentamisin tübül hücrelerinde oksidatif strese neden olduğu bildirilmektedir. Bu oksidatif strese mitokondri kaynaklı süper oksit anyonları ve hidrojen peroksit kaynaklı hidroksil radikalleri sebep olmaktadır (84-86). Gentamisin direk olarak mitokondrinin solunum zincirinden ürettiği ROS'u artırmaktadır (87). Sıçanlarda çeşitli antioksidan

türleri ile yapılan tedavi çalışmalarında antioksidanların renal fonksiyon bozukluğu ve doku hasarını anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur (25, 87, 88).

Gentamisin nefrotoksisitesinde daha çok süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri olmak üzere reaktif oksijen türleri çeşitli mekanizmalarla hücrel hasar ve ölüme sebep olmaktadır. Ramsammy ve ark. (89), gentamisin (100 mg/kg/gün dozda uygulama) toksisitesinde lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinin, ilaç uygulamasının başladığı 48. saatte kontrol grubuna göre % 38 oranında arttığını bildirmişlerdir. Sıçanlarda gentamisin uygulamalarında mitokondriyal kaynaklı süperoksit anyonlarının artışı sonucu  $H_2O_2$  çoğalmaktadır (43). Gentamisin, toksik etkisinden dolayı bir veya birden fazla savunma sistemi aktivasyonunda azalma ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olmaktadır (25, 89). Aynı çalışmada Ramsammy ve ark. (89), gentamisin verdikleri sıçanlarda ilaç uygulamasının 2. dozundan sonra katalaz (CAT) aktivitesinde, 4. dozundan sonra ise glutatyon (GSH) düzeylerinde azalma olduğunu kaydetmişlerdir. Bir başka araştırmada Soejima ve ark. (90), 80 mg/kg/gün gentamisin verdikleri ratlarda böbrek dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesinin ilaç uygulamasının 4. gününe kadar devamlı azaldığını bildirmişlerdir.

Tedavi amacıyla kullanılan gentamisinin ROT'u artırarak yaptığı hasarlanmaya karşı mücadele veren antioksidan sistemde görev yapan moleküller; organizmada sentezlenen (endojen) veya dışarıdan alınan (ekzojen), enzimatik veya nonenzimatik moleküller olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Bu maddelerin yanı sıra antioksidan özellikleri keşfedilen çeşitli maddeler radikal hasarın önlenmesinde kullanılmaktadır. Bu maddelerden biri de Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'dir. CAPE'nin koruyucu rolü çeşitli modellerle yapılan çalışmalarda araştırılmaktadır (3, 85, 91).

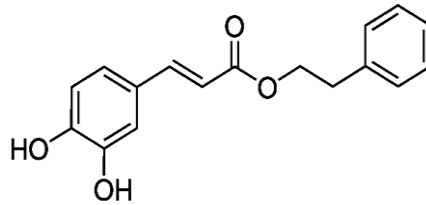
### **2.3.6. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)**

Propolis; arıların bitkilerden toplayarak elde ettiği özütü tükürük salgısı ile karıştırarak ürettiği keskin ve güzel kokulu bir bileşik olarak tarif edilmektedir. Arılar, propolisi kovanda meydana gelen açıklıkları ve çatlakları kapatmak, bakteri ve mantarlar gibi enfekte edici mikroorganizmaları üremesini zorlaştırmak ve kovan

içerisine giren yabancı cisimleri ve canlıları mumyalamak gibi amaçlarla kullanmaktadır (92, 93).

Propolis uzun yıllardan beri insanlar arasında antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkileri başta olmak üzere geniş spektrumlu biyolojik etkileri nedeniyle yaygın bir şekilde tedavi amaçlı olarak kullanılmıştır. İyileştirici rolünün olduğu insanlar tarafından iyice anlaşıldıktan sonra daha çok dikkat çekmeye başlayan propolis son yıllarda hızla artan bir şekilde kapsül ve tablet formlarında piyasaya sürülmektedir ve insanlar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (92). Yapılan araştırmalar sonucunda bugüne kadar propolisin içinde 300'den fazla bileşen tespit edilmiştir (92, 94, 95).

CAPE, propolis'in biyolojik aktif bileşeni olarak tespit edilmiştir (96). Antiinflamatuvar, antioksidan, antiviral, antikanser, antiapoptotik, immunmodülatuar özellikleri daha önceki çalışmalarda ispatlanmış, flavonoid benzeri yapıda bir bileşiktir (97) (Şekil 2.6.).



**Şekil 2.6.** CAPE'nin kimyasal yapısı (11).

CAPE'nin bu özelliklerinin hemen hemen hepsi membranları rahatlıkla geçmesine fırsat verecek fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubuna (-OH) bağlanmaktadır. Bu iki hidroksil grubu moleküle kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır (98). CAPE, birçok radikalik hasarda koruyucu etkisi denenmiş bir antioksidan olarak bilinmektedir. CAPE'nin 10 mikromolar dozda uygulanması insan nötrofillerinde ve ksantin/ksantin oksidaz sisteminde ROT'un üretimini tamamiyle bloke edebilmektedir (98).

Khan ve ark. (99), sıçan beyin iskemi modelinde CAPE'nin nörovasküler alanda enflamasyona olan etkisini incelemişler ve sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon

sonrasında CAPE'nin kaspaz 3 yolunu baskılayarak ve antiapoptotik protein bcl-xl'yi ise arttırarak apoptotik hücre ölümünü engellediğini bildirmişlerdir.

Bir diğer araştırmada Tsai ve ark. (100), orta serebral arter ve bilateral karotid arterleri klempleyerek oluşturduğu 60 dakikalık iskemi ve sonrasındaki 24 saatlik reperfüzyon döneminde 1 µg/kg ve 10 µg/kg dozlarında verilen CAPE'nin NO üretimini artırarak sinir hücrelerini koruyucu etki yaptığını bildirmişlerdir.

Sıçanlara 100 mg/kg dozda gentamisin uygulayarak oluşturdukları gentamisin indüklü nefrotoksisite modelinde CAPE'nin koruyucu rolünü Vardı ve ark. (85), tarafından araştırılmıştır. Araştırmada, gentamisin uygulamasının rat böbreklerinde MDA seviyesini kontrol grubuna göre oldukça artırdığını, CAPE uygulamasının ise gentamisin uygulamasıyla artan MDA seviyesini tekrar normalize ettiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar histopatolojik olarak gentamisinin neden olduğu böbrek nefrotoksisitesinde meydana gelen nekrozu, CAPE uygulamasının önlediğini de tespit etmişlerdir.

Bir başka benzer çalışmada, Parlakpınar ve ark. (101), sıçanlarda gentamisin nefrotoksisitesine karşı CAPE'nin koruyucu etkisini incelemişlerdir. Bu araştırma sonucunda, gentamisin uygulanan ratların böbrek dokusunda NO ve MDA seviyeleri artarken, GSH seviyesinin azaldığını, yine gentamisin uygulanan grubun böbrek dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT ve SOD enzim aktivitelerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. CAPE'nin gentamisin ile birlikte verilmesinin, gentamisin uygulamasıyla artan MDA ve NO seviyelerini düşürdüğünü, azalan GSH, SOD ve CAT düzeylerini ise artırdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar gentamisin tedavisi sırasında CAPE uygulamasının serbest radikal kaynaklı hasarı önleyebileceği sonucuna varmışlardır.

#### **2.4. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)**

VEGF ailesi ilk keşfedildiğinde, kobay derisinde bir vasküler sızıntı başlattığı için vasküler permeabilite faktörü olarak isimlendirilmiştir (102). 1980'lerin sonunda ise, bu aileden ilk özel anjiogenik büyüme faktörü saflaştırılmış ve proteinin NH<sub>2</sub>-



terminal amino asit dizisi elde edilmiştir. Bu protein sadece vasküler endotelyal hücrelerde büyümeyi sağlamasından dolayı "vasküler endotelyal büyüme faktörü" olarak adlandırılmıştır. Daha sonraları ailenin diğer üyeleri de tanımlanmıştır (103). VEGF ailesi, glikoprotein yapısında üyelerden oluşan özellikle endotel hücreleri için özgül etkilere sahip olan multifonksiyonel bir aile olarak bilinmektedir (104).

*VEGF* geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer almaktadır (105). *VEGF* gen ailesinin yedi adet üyesi vardır; *VEGF-A*, *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E*, *VEGF-F* ve *PlGF* (Plasental büyüme faktörü) (106). Bu üyelerden *VEGF-F* yılan zehiri VEGF'si (svVEGF) olarak da bilinmektedir. Takashi ve ark. (107), 2004 yılında yaptıkları çalışmaya göre yılan zehirinin içinde VEGF molekülüne çok benzeyen bir molekül tespit edilmiştir. Bu yeni bulunan molekül anjiyogenezi VEGF-A'dan 10 kat daha az arttırmasına rağmen, vasküler geçirgenliği şiddetle arttırdığı bildirilmiştir.

VEGF-B, başlangıçta VEGF-A ile %23'ü homolog olan bir sinyal peptidinin bölünmesiyle oluşan 186 amino asitli bir protein olarak oluşmakta ve daha sonra COOH- grupları içeren 167 amino asitten oluşan bir proteine dönüşmektedir (108). VEGF-B, vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-1'e (VEGFR-1) bağlanarak monositlerin aktivasyonunda, farklılaşmalarında (109), anjiyogenezi kapsayan immünolojik ve nöronal gelişimde rol almaktadır. Kahverengi yağ dokusunda, kalp ve iskelet kaslarında bol bulunmaktadır. VEGF-A ve VEGF-B'nin izoformları alternatif kesme mekanizması ile oluşurken, VEGF-C ve VEGF-D'nin değişik formları proteolitik süreçler sonucu oluşmaktadır (110).

VEGF-C, VEGF-A benzeri protein olarak da bilinir. VEGF-A ile %16'sı benzeyen 388 amino asitten oluşmuştur (108). VEGF-C, VEGFR-2 (VEGF reseptörü 2) ve VEGFR-3 (VEGF reseptörü 3) ile bağlanarak lenfatik damarların oluşmasında rol oynamakta ve endotelyal hücrelerin hayatta kalmasını, mitogenezisini ve göçünü indüklemektedir. Lenfatik damar gelişiminin olduğu bölgelerde çoğunlukla VEGFR-3 ile birlikte ifade edilmektedir (108, 109, 111).

Anjiyogenik ve lenfanjiogenik etkisi olan VEGF-D ise VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerine bağlanarak aktive etmekte ve endotel hücreler için mitojenik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (110).

PlGF, ağırlıklı olarak plasenta, kalp ve akciğerler de ifade edilmektedir. VEGF ailesi ve reseptörleri vaskülogenik ve anjiyogenik mekanizmalar aracılığıyla vasküler sistem gelişiminde ve lenfogenez sürecinde çok önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, yara iyileşmesi ve endometriyumun döngüsel yenilenmesi gibi doku tamirini içeren süreçler için de gerekmektedir (110).

VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkin dönemde vaskülogenez ve anjiogenez için gerekmektedir (112). VEGF, damarın gelişimini ve morfonogenezini, vasküler tonus ve permeabilitesini, endotel ve inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini düzenlemektedir. VEGF, endotel hücreler, inflamatuvar hücreler ve nöronal hücreler üzerine etki etmektedir. VEGF, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynamasına rağmen, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da işe karışmaktadır (113).

Topikal VEGF uygulanmasının yara iyileşmesini hızlandırması üzerine olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (114, 115). Jacobi ve ark. (114), yara iyileşmesi üzerine yaptıkları çalışmalarında, çözülebilir VEGF reseptörünün anjiyonez ile çelişkili etkilerinin olduğunu ve VEGF'nin yara anjiyogenezi için gerekli; yara kapanması için gerekli olmadığını görmüşlerdir. Saaristo ve ark. (115), diyabetik farelerde topikal olarak uyguladıkları VEGF-C'nin yara iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda VEGF-C'nin yara bölgesinde anjiyogenezisi ve lenf anjiyogenezisini artırarak yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırdığını görmüşlerdir.

VEGF ailesinin etki gösterebilmesi için öncelikle endotel hücrelerine bağlanması gerekmektedir. VEGF reseptörleri sadece vasküler ve lenfatik endotel hücrelerde değil, bazı tümör hücreleri, sinir hücreleri, düz kas hücreleri, iskelet miyositleri ve perisitleri içeren çok çeşitli non-endotel hücrelerde de ifade edilmektedir (116).

VEGF'nin tüm üyeleri trozin kinaz reseptörleri ile (VEGFR-1, VEGFR-2, ve VEGFR-3) farklı derecede bağlanma affinitesi göstererek bağlanabilmektedirler

(Şekil 2.5.) (117). VEGFR-1 hem negatif hem de pozitif anjiyogenik etkilere sahipken, VEGFR-2, VEGF-A'nın mitojenik, anjiyogenik ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık etmektedir. VEGFR-3 ise lenfatik damarlar üzerinde anjiyogenik etkilere sahiptir (6).

VEGF vücutta birçok farklı hücrede sentezlenmektedir bunlardan bazıları şunlardır; akciğer alveolar hücreleri, ovaryum folikülleri, korpus luteum, renal glomerül visseral epitel hücreleri, glomerul podositler, böbrek proksimal tübül hücreleri, adrenal korteksin tüm hücreleri, leydig hücreleri, aktive makrofajlar, arteriollerini çevreleyen fibroblastlar, bronşiyal ve koroid pleksus epitel hücreleri, hepatositlerdir (118-122).

VEGF-A'nın en yüksek transkibe edildiği yerler; yetişkin akciğer, böbrek, kalp ve böbrek üstü bezidir. 34-42 kilo dalton büyüklüğünde olan VEGF-A, dimerik, disülfid bağlı bir glikoproteindir. VEGF-A transkripti sekiz ekzonlu tek bir *VEGF-A* geninden oluşmaktadır (106).

VEGF'nin böbreklerde, glomerüler damar geçirgenliğinin düzenlenmesi (123), renal tübüler hücrelerin korunması (124), glomerular basement membranının yapısının sürdürülmesi (125), kalsiyum homeostazisi ve podositlerin yaşamını sürdürmesi (126) gibi çeşitli olaylarda rol aldığı bildirilmektedir. Kang ve ark (127), yaşlanan farelerde glomerular VEGF seviyelerinin azaldığını ve bu azalmanın glomeruloskleroz ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

*VEGF* ifadesinde ki değişimler, retinopatilerden kansere kadar uzanan; tümörler ile ilişkili patolojik anjiyogenez, romatoid artrit, prematüre retinopatisi ve diğer ilişkili hastalıkların patolojilerinde etkili olabilmektedir. Anjiyogenezin önemli rol oynadığı hastalıklarda ve damar gelişiminde VEGF merkezi rolü üstlenmektedir. VEGF'nin bu rolü onu, anjiyogenezin ya uyarılması ya da inhibisyonu için hedef protein haline getirmektedir. Birçok hastalıkta *VEGF* gen ifadesinin ve protein miktarının azaldığı veya arttığı tespit edilmiştir. Bu yüzden *VEGF* üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda ilgi odağı haline gelmektedir. (113, 128)

Akioshi ve ark. (129), çeşitli karaciğer hastalıkları bulunan hastalarda dolaşımdaki VEGF düzeylerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 21 akut hepatitli

hasta, 40 kronik hepatitli hasta, 34 karaciğer sirozlu hasta, 16 fulminan karaciğer yetmezliği bulunan hasta, 10 primer bilyer sirozlu hasta, 12 otoimmün hepatitli hasta ve sağlıklı 120 kişiden aldıkları kan örneklerini kullanmışlardır. Sağlıklı kontrol grubu hastaların ortalama serum VEGF değerleri hastalarla karşılaştırılmıştır ve kontrol grubuna göre akut hepatitli hastalarda serum VEGF düzeyinin anlamlı derecede arttığını, karaciğer sirozu bulunan hastalarda ise serum VEGF düzeyinin anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarının sonucunda serum VEGF düzeyinin hepatosit rejenerasyon derecesi ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir

Bir başka araştırmada Sone ve ark. (130), 155 romatoid artrit hastası ve 75 sağlıklı bireyden aldıkları örneklerde serum VEGF düzeylerini araştırmışlardır ve romatoid artrit hastalarında serum VEGF düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Shihab ve ark. (131), Sprague-Dawley cinsi sıçanlarla yaptıkları siklosporin indüklü kronik böbrek nefrotoksisite modelinde *VEGF* gen ifadesini ve protein ifadesini gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve western blot tekniği kullanarak ölçmüşlerdir. Siklosporin uygulanan kronik nefrotoksisite modelinde *VEGF* gen ifadesi ve VEGF protein sentezinin hem 7. hemde 28. günlerde kontrol gurubuna göre anlamlı şekilde arttığını tespit etmişlerdir.

Akut böbrek hasarının tespitinde bazı moleküllerin biomarker olarak kullanılabilirliğini araştıran Vaidya ve ark. (132), akut böbrek yetmezliği olan hastalar ve gönüllü sağlıklı kontrol hastalarından aldıkları idrar örneklerinde içlerinde VEGF'nin de bulunduğu çeşitli molekülleri incelemişlerdir ve idrar VEGF seviyesinin akut böbrek hasarı olan hastalarda anlamlı derecede daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, idrardaki VEGF'nin akut böbrek hasarında bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini iddia etmişlerdir.

Birçok sitokin, hormon, kas kasılması ve egzersiz gibi mekanik faktörler, enflamasyon gibi çevresel faktörler ve büyüme faktörü farklı hücre tiplerinde *VEGF*-mRNA ifadesinin düzenleyebilmektedir. Örneğin *ras* gibi onkogenler ile oluşan tümör hücrelerinde *VEGF* ailesinin üyeleri ifade edilmektedir. Bu düzenleyicilerin

her biri transkripsiyon faktörleri ile *VEGF* gen transkripsiyonunun artmasını veya baskılanmasını düzenlemektedir. İnterlökin-1 ve Prostoglandin E-2, kültürdeki sinovyal fibroblastlar *VEGF* ifadesini indüklemekte ve buda inflamasyondaki anjiogenezde bu tür inflamasyon mekanizmalarının katkıda bulunduğunu desteklemektedir (133-135). *VEGF*'nin endotelial nitrik oksit sentetaz tarafından artırıldığı gösterilmiştir (136, 137).

*VEGF* gen ifadesinin düzenlenmesinde hipoksi indüklenebilir faktör-1 alfa (*HIF-1 $\alpha$* )'nın rolünde olduğu bilinmektedir. Hipoksi; hem in vivo hem in vitro ortamda *VEGF* geninin ekspresyonunda ana düzenleyicidir ve *VEGF* gen transkripsiyonunu indüklemektedir. Hipoksik ortamda *HIF-1 $\alpha$*  aktive olmakta ve bu aktive olan protein *VEGF* genine bağlanarak *VEGF*'nin sentezini sağlamaktadır. Hipoksi durumunda *VEGF* geninin transkripsiyon aktivasyonu hipoksi ile indüklenebilen faktör-1'in bu elemente bağlanması aracılığı ile olmaktadır. *HIF-1 $\alpha$*  alt grubu oksijene hassas alt kısmıdır. Hipoksi, *VEGF* mRNA transkripsiyonunu ve *VEGF* mRNA stabilizasyonunu indüklemektedir (133-135). Fizyolojik olarak *HIF-1 $\alpha$* , anjiyogenezi, damar tonusunu, glukoz metabolizması ve apoptozisi düzenlemektedir. *VEGF*'nin artan ekspresyonu nedeni ile tümör anjiyogenezi ve diyabetik nefropati gelişiminde önemli rol oynayabilmektedir (138). İn vitro ve in vivo da yapılan araştırmalarda anjiyogenez oluşumunda *VEGF* ve Temel Fibroblast Büyüme Faktörü'nün sinerjistik etkisinin olduğu gösterilmiştir (139).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler**

PZR cihazı (Biorad-MyCycler)

Gerçek zamanlı PZR cihazı (Roche LC96)

Hassas terazi (OHAUS PA413C)

Elektroforez güç kaynağı (Biorad)

pH metre (Mettler toledo)

Jel görüntüleme sistemi (UVP ChemiDoc it<sup>2</sup>)

Mikroplate spektrofotometre (Biotek Epoch)

Buz makinası (Scostman AF 80)

Otoklav (Hirayama HG 80)

-80 °C Derin dondurucu (Nüve)

Masaüstü santrifüj cihazı (Hettich-zetrifugen Micro 200)

Homojenizatör (Ultra turrax T 25)

Hassas otomatik pipetler ve uçları (Eppendorf)

Vorteks (Heidolph)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph)

Su saflaştırma sistemi (Milipor)

### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Gentamisin (Genta 80 mg İ.E. Ulagay)

CAPE (Prof. Dr. Sabri ULUKANLI tarafından sentezlenmiştir.)

RNA saflaştırma kiti (PureLink RNA mini kit, İnvitrogen)

cDNA sentez kiti (Transcriptor First strand cDNA Syntesis kit; Lot no:14797225)

Gerçek zamanlı PZR kiti (Faststart Essential DNA Probes Master; Lot no:14554900)

Roche Real time ready assay hidroliz problu primerleri

DNA ladder (Fermentas 1kb DNA Ladder Plus)

EDTA (  $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ ; FW: 372,24; Sigma no: E5134)

Tris Baz (  $C_4H_{11}NO_3$ ; FW: 121,14 ; Sigma no: T6066)

Borik asit (  $H_3BO_3$ ; FW:61,83 ; Sigma no: B6768)

Etidyum Bromür (  $C_{21}H_{20}N_3.Br$ ; FW: 394,32; Sigma no: E8751)

Agaroz (Sigma No: 5093)

Sodyum Sitrat tribazik dihidrat (  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ; FW:294,1; Sigma no: C8532)

Sodyum Hidroksit (NaOH; FW:40,00; Sigma no: S8045)

Hidroklorik asit ( HCl; FW:36,46; Sigma no: H1758–1 l)

DEPC- $O(COOC_2H_5)_2$ ; FW: 162,14; sigma no:D5758)

Beta-merkaptotanol (  $C_2H_6OS$ ; FW: 78,13; Sigma no: M3148)

Sodyum Klorit ( NaCl; FW: 58,44; Sigma no: S3014)

Amonyum Sülfat (  $(NH_4)_2SO_4$ ; FW132,14; Sigma no: A4915)

### 3.3. Sıçanların Temini ve Bakımı

Bu araştırma için, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları yerel etik kurulundan 22/06/2012 tarihli ve 2012/A-74 protokol no'lu kararı ile etik onay alındı (Ek 3). Araştırmada 8-10 haftalık dişi sıçanlar kullanıldı. Kontrol grubundaki (K)(n=8) sıçanların ağırlık ortalamaları  $210,4 \pm 25,3$  gr, Gentamisin grubundaki (G)(n=8) sıçanların ağırlık ortalamaları  $217,8 \pm 16,8$  gr, CAPE grubundaki (C)(n=8) sıçanların ağırlık ortalamaları  $219,8 \pm 21,8$  gr, CAPE+Gentamisin grubundaki (C+G)(n=8) sıçanların ağırlık ortalamaları  $214,9 \pm 20,6$  gr idi. Araştırmada kullanılan dişi Wistar albino sıçanlar, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek kullanıldı. Çalışma bütçesinin tamamı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2012/139 no'lu projesinden karşılandı. Deney süresince sıçanlar sıcaklığın  $21^{\circ}\text{C}$  ve ortam neminin %55-60 olduğu, 12 saat ışık (08:00-20:00 saatleri), 12 saat karanlık uygulanan odalarda tutuldu ve ad libitum olarak beslendiler.

### 3.4. Grupların Oluşturulması

Nefrotoksisite modeli küçük modifikasyonlar ile Parlakpınar ve ark. (101) metoduna göre oluşturuldu. Deneye başlamadan önce bütün hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Araştırmada 32 adet wistar ırkı sıçan kullanıldı. Hayvanlar 4 gruba ayrıldı, gruplar aşağıdaki gibi oluşturuldu;

**K grubu(n=8):** 10 gün boyunca 2 ml/kg/gün vücut ağırlığı dozunda serum fizyolojik ile sulandırılmış %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) intraperitoneal yoldan verildi (taşıt).

**C grubu (n=8):** 30 mg/kg vücut ağırlığı dozunda (140) CAPE, %100'lük DMSO ile çözülerek serum fizyolojik ile %10'e sulandırıldıktan sonra intraperitoneal yolla 10 gün boyunca günde bir kez verildi.

**G grubu (n=8):** 8 gün boyunca intraperitoneal yolla 100 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda gentamisin verildi.



**C+G grubu (n=8):** Gentamisin uygulamasından 2 gün önce 30 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda CAPE intraperitoneal olarak verildi daha sonraki 8 günde ise aynı dozda CAPE verildikten 15 dakika sonra 100 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozunda gentamisin intraperitoneal olarak verildi..

### **3.5. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri**

Son uygulamadan 24 saat sonra hayvanlar yüksek doz anestezi altında sakrifiye edildi, hızlıca böbrek dokuları ve kan örnekleri alındı.

Gruplardan alınan böbrek dokuları *VEGF* mRNA seviyelerinin tespiti için, steril şartlarda buz üzerinde küçük parçalar halinde kesilerek RNA saklama çözeltisi içine konuldu ve -80°C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Bu dokulardan Life Technologies firmasının ürettiği PureLink RNA mini kit kullanılarak toplam RNA saflaştırılması yapıldı. Kan örnekleri ise serumu ayrılarak BUN ve kreatinin analizi yapılmak üzere -20°C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı.

### **3.6. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar**

#### **3.6.1. RNA Saklama Solüsyonu**

70 gr Amonyum Sülfat 100 ml dietilpirokarbonat (DEPC) ile işlenmiş suda çözüldü. Üzerine son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde EDTA (pH=8,0) ve son konsantrasyonu 25 mM olacak şekilde Sodyum Sitrat (pH=5,2) eklendi. DEPC ile işlenmiş bidistile su ile 150 ml'ye tamamlandı ve çözeltinin pH değeri 5,2'ye ayarlandı.

#### **3.6.2. 10X TBE (Tris-Borat-EDTA) Çözeltisinin Hazırlanması**

1 litre 10X TBE çözeltisi hazırlamak için 108 gr TRIS baz, 55 gr Borik Asit ve 40 ml 0,5 M EDTA çözeltisi hazırlanarak 900 ml bidistile su içerisinde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Çözeltinin pH değeri 8,0 oluncaya kadar HCl eklendi. Çözeltinin toplam hacmi 1000 ml'ye tamamlandı ve son olarak 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Daha sonra deneyler sırasında bu çözelti 1X konsantrasyonuna düşürülerek ve pH değeri tekrar 8,0'a ayarlanarak kullanıldı.

### 3.7. Toplam RNA Saflaştırılması (PureLink Mini Kit Protokolü)

Dokulardan toplam RNA saflaştırması firmanın önerdiği kit protokolüne göre aşağıdaki metotla yapıldı. Bu protokole göre önce 50-100 mg arası doku tartıldı, üzerine % 5 (w/v) olacak şekilde “Lysis Buffer” eklendi. Daha sonra homojenizatörde 13,500 rpm de yaklaşık 2 dakika homojenize edildi. Homojenattan yaklaşık 750 µl alınarak Eppendorf tüplerine konuldu ve 26000xg’de +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi. 700 µl süpernatant alındı, üzerine 700 µl etanol (%70) eklendi ve karıştırıldı. Elde edilen karışımdan 700µl kit kolonuna eklendi ve 12000 xg’de 15 sn santrifüj edildi. Alt tüpteki sıvı döküldü kalan 700 µl numune eklenerek tekrar 12000 xg’de rpm de 15 sn santrifüj edildi. Kolon altındaki tüpte kalan sıvı döküldükten sonra 700 µl “Wash Buffer I” eklendi ve 12000 xg’ de 15 sn santrifüj edildi. Kolon altındaki tüp içerisindeki sıvı dökülüp tüp tekrar takıldıktan sonra hazırlanmış 500 µl “Wash Buffer II” eklenerek 12000 xg’ de 15 sn santrifüj edildi sonra alttaki sıvı dökülerek tekrar “Wash Buffer II” ile yıkama tekrarlandı. Kolon altındaki tüp içerisindeki sıvı döküldükten sonra hiçbir şey eklemeyen 12000 xg’de 120 sn. santrifüj edilerek filtrenin kuruması sağlandı. Kolon altındaki tüp çıkarılıp temiz steril bir Eppendorf tüp takıldı. Kolona 100µl RNase içermeyen su eklendi ve 120 sn. 12000 xg’de de santrifüj edildi. Son olarak RNA numuneleri tüplerde küçük hacimlere bölünerek -80 °C derin dondurucuda cDNA üretimi için saklandı.

### 3.8. RNA’nın Agaroz Jele Yükleme İşlemleri

“PureLink” kiti ile böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA’larda herhangi bir yıkımın olmadığını belirlemek amacıyla örnekler jel elektroforezinde analiz edildi. Örnekler % 1 agaroz jelinde ve 1X TBE tamponu ile 100 mV’de elektroforez işlemine tabi tutuldu. RNA görüntülemesi UVP marka ChemiDoc it<sup>2</sup> sistemi ile ultraviyole ışık altında gerçekleştirildi. RNA miktarının belirlenmesi amacıyla spektrofotometre kullanıldı.

### 3.9. Spektrofotometrik RNA Ölçümü

Örneklerin RNA'ları miktar ve saflık tayini için "Biotek" marka spektrofotometre cihazı ile "Take 3 Plate" ve "Gen5" programları kullanılarak 260 ve 280 nm UV spektrumunda ölçüldü. RNA miktarı ng/ $\mu$ L cinsinden hesaplandı ve 260/280 oranları yaklaşık 2 olan saf RNA örnekleri cDNA sentezinde kullanıldı. Verimi veya 260/280 oranı düşük olan örnekler tekrar saflaştırıldı.

### 3.10. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için Roche firmasının ürettiği "Transcriptor First strand cDNA Synthesis" kiti (Lot no:14797225)" kullanıldı. cDNA sentezi firmanın önerdiği şekilde yapıldı. Kısaca 100  $\mu$ l'lik PZR tüpüne 1  $\mu$ g toplam RNA, 1  $\mu$ l Oligo dT18 (50 pmol/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Random Hexamer Primer (600 pmol/ $\mu$ l) ve toplam hacim 13  $\mu$ l olacak şekilde bidistile su eklendi ve karıştırıldı. Daha sonra 65 °C'de 10 dakika PZR makinesinde ısıtıldı. Bu karışımın üzerine 4  $\mu$ l "Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer", 0,5  $\mu$ l "Protector RNase Inhibitor", 2  $\mu$ l Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5  $\mu$ l "Transcriptor Reverse Transcriptase" enzimi eklendi ve böylece toplam hacim 20  $\mu$ l oldu. Karıştırılan numuneler PZR makinesinde 25 °C'de 10 dakika, 55 °C'de 60 dakika ve 85 °C'de 5 dakika ısıtıldı daha sonra -20 °C'de analize kadar saklandı.

### 3.11. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek zamanlı PZR analizi; Roche Light Cycler 96 gerçek zamanlı PZR cihazı, Roche firmasının ürettiği "Fast Start Essential DNA Probes Master kit (Lot no:14554900)" ve "Real Time Ready Assay ( $\beta$ -Actin lot no:100072217, *VEGF-A* lot no:100072226)"(8 pmol/ $\mu$ l) hidroliz problu primerler kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar 10  $\mu$ l toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 5  $\mu$ l master mix, 0,5  $\mu$ l real time ready mix, 2  $\mu$ l PCR kalitesinde su ve 2,5  $\mu$ l cDNA olacak şekilde hazırlandı. Çalışmada her örnek için 3 tekrar yapıldı. PZR şartları firmanın önerdiği şekilde yapıldı; ilk denaturasyon 95°C'de 10 dakika, denaturasyon 95°C'de 10 saniye, bağlanma 60°C'de 30 saniye ve polimerizasyon 72°C'de 1 saniye olarak oluşturuldu ve 50 döngü tekrarlandı. Tablo 3.1'de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler *VEGF* gen ifadesinin analizinde kullanıldı.

**Tablo 3.1.** Primer dizilimleri

Genler	Primer dizilimleri	NCBI Gen Referans Numarası	Ürün büyüklüğü (bç)
<i>β-Aktin</i> -ileri	5'-CTGGCTCCTAGCACCATGA-3'	NM_031144.3	76
<i>β-Aktin</i> -geri	5'-TAGAGCCACCAATCCACACA-3'		
<i>VEGF-A</i> ileri	5'- AAAAACGAAAGCGCAAGAAA-3'	NM_001110335.1	73
<i>VEGF-A</i> geri	5'- TTTCTCCGCTCTGAACAAGG-3'		

(Ek 1, Ek 2)

### 3.12. Biyokimyasal Analizler

#### 3.12.1. Serum Üre ve Kreatinin Analizleri

Hayvanlardan alınan kan örnekleri oda sıcaklığında 20 dakika bekletildi, 5000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum ayrıldı. Daha sonra elde edilen bu serumlardan, BUN ve kreatinin seviyeleri, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya laboratuvarında, Abbott Architect c8000 otoanalizatöründe ölçüldü (Abbott Laboratories. Abbott Park, Illinois, U.S.A.).

#### 3.12.2. Histopatolojik Analizler

Deney süresi sonrasında nekropsileri yapılan hayvanlardan elde edilen böbrek dokuları % 10'luk fosfat tampon solüsyonunda hazırlanan formaldehit içerisinde tespit edildi ve sonrasında parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan kesilen 5 µm kalınlığındaki kesitler rutin işlemlerden geçirilerek hematoksileneozin (HE) ile boyandı ve mikroskopta gözlemlenerek değerlendirildi.

### 3.13. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistikî analizinde MedCalc® (11.4.2.0) programı kullanıldı. Gruplar arası maksimum fark 0,0018, varsayılan standart sapma 0,0002, tip I hata 0,05, grup sayısı dört ve her bir grupta en az 8 hayvan olduğunda, çalışmanın gerçekleşen gücü yaklaşık 1,00 olarak hesaplandı. Normal dağılıma sahip olan gruplarda veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma (ss) olarak gösterilirken normal dağılıma sahip olmayan gruplarda veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterildi. Grupların normal dağılıma sahip olup olmadıkları Shapiro-Wilk testi yapılarak belirlendi. Bu teste göre hayvanların vücut ağırlıkları normal dağılım gösterirken ( $p>0,05$ ) serum kreatinin, BUN ve doku gen ifade değerleri normal olmayan dağılım gösterdi ( $p<0,05$ ). Hayvanların deney başlangıcı ve bitimindeki vücut ağırlıklarının grup içi istatistikî karşılaştırmalarında “bağımlı örneklerde t testi” kullanıldı. Vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Serum kreatinin, BUN ve doku gen ifade değerleri Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Daha sonra gruplar arası çoklu karşılaştırma Conover testine göre yapıldı. Karşılaştırmalarda “p” değerinin 0,05 den küçük bulunduğu değerler istatistikî olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hayvanların Ağırlık Değerleri

Deney gruplarındaki 0.gün ve 10.gün sıçan vücut ağırlıkları tablo 4.1’de verildi. Deney başlangıcı (0. gün) ve deney sonunda (10. gün) sıçanların vücut ağırlıkları grup içinde karşılaştırıldığında, 0. güne göre 10. günde K grubu vücut ağırlığında istatistiki olarak anlamlı bir artış ( $p<0,05$ ), G ve C+G grubunda ise istatistikî olarak anlamlı bir azalma tespit edildi ( $p<0,05$ ). 0. ve 10. gün vücut ağırlıklarının gruplar arası istatistiki karşılaştırmasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Deney gruplarında 0.gün ve 10.gün sıçan vücut ağırlıkları (gr)

Gruplar (n=8)	Günler	
	0.gün (Ort ± ss)	10.gün (Ort ± ss)
K*	210,4 ± 25,3	218,5 ± 26,1
G*	217,8 ± 16,8	206,0 ± 17,1
C	219,8 ± 21,8	222,4 ± 18,2
C+G*	214,9 ± 20,6	203,5 ± 21,9

\*Aynı satırda grup içi istatistiki anlamı ifade eder ( $P<0,05$ ), Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)

## 4.2. Biyokimyasal Bulgular

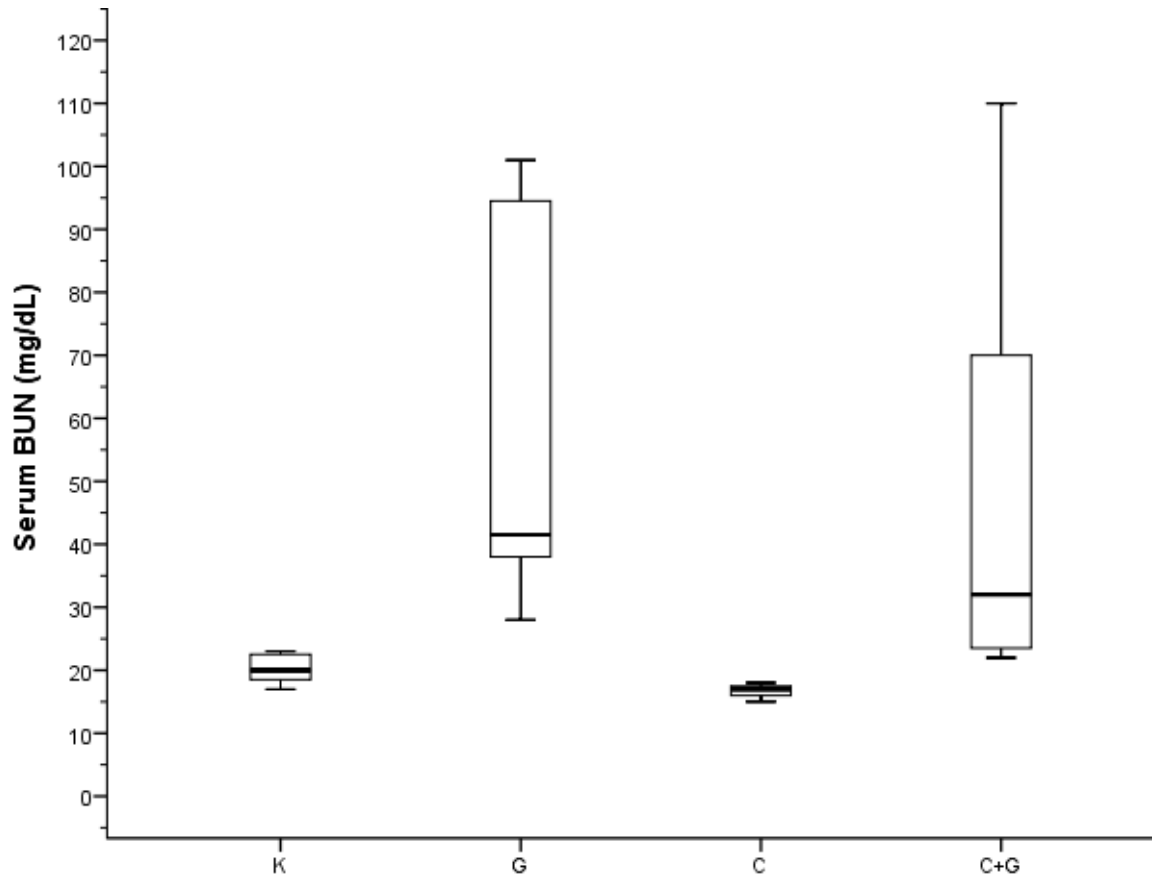
### 4.2.1. Hayvanların Serum BUN Değerleri

K, G, C ve C+G gruplarında serum BUN değerleri ilk önce Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve istatiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p<0,05$ ). Daha sonra gruplar arası fark Conover testi ile analiz edildi. G grubu serum BUN düzeyi, K ve C grubuna göre istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p<0,05$ ). C+G grubundaki azalan serum BUN düzeyi, G grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.2., Şekil 4.1).

**Tablo 4.2.** Serum BUN (mg/dL) değerleri ve gruplar arası istatistiki karşılaştırma

Gruplar (n=8)	Ortanca (Min-Maks)	Sıra ortalaması	İstatistiki karşılaştırma (Conover testi, $p<0,05$ )
K	20 (17-23)	11,63	K grubu; G, C ve C+G gruplarından farklıdır
G	42 (28-101)	25,06	G grubu; K ve C gruplarından farklıdır
C	17 (15-18)	4,57	C grubu; K, G ve C+G gruplarından farklıdır
C+G	32 (22-110)	21,31	C+G grubu; K ve C gruplarından farklıdır

Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)



**Şekil 4.1.** Gruplarda serum BUN değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)



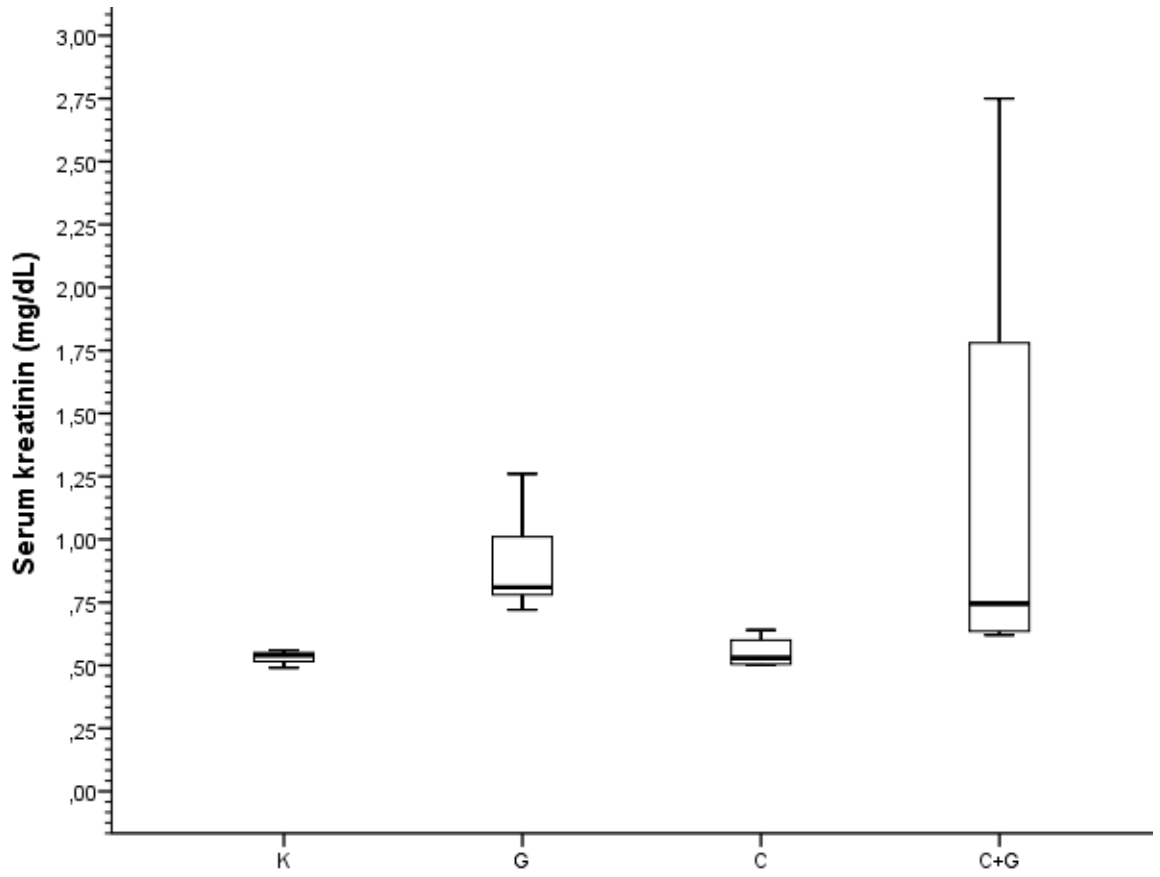
#### 4.2.2. Hayvanların Serum Kreatinin Değerleri

K, G, C ve C+G gruplarında serum kreatinin değerleri ilk önce Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $P<0,05$ ). Daha sonra gruplar arası fark Conover testi ile analiz edildi (Tablo 4.3.). G grubu serum kreatinin düzeyi, K ve C grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ( $p<0,05$ ). C+G grubundaki azalan serum kreatinin düzeyi, G grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.3., Şekil 4.2).

**Tablo 4.3.** Serum kreatinin düzeyleri (mg/dL) ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma

Gruplar (n=8)	Ortanca (Min-Maks)	Sıra ortalaması	İstatistiksel karşılaştırma (Conover testi, $p<0,05$ )
K	0,54 (0,49-0,56)	8,25	K grubu; G ve C+G gruplarından farklıdır
G	0,82 (0,72-1,26)	24,64	G grubu; K ve C gruplarından farklıdır
C	0,53 (0,50-0,64)	9,25	C grubu; G ve C+G gruplarından farklıdır
C+G	0,75 (0,62-2,75)	22,94	C+G grubu; K ve C gruplarından farklıdır

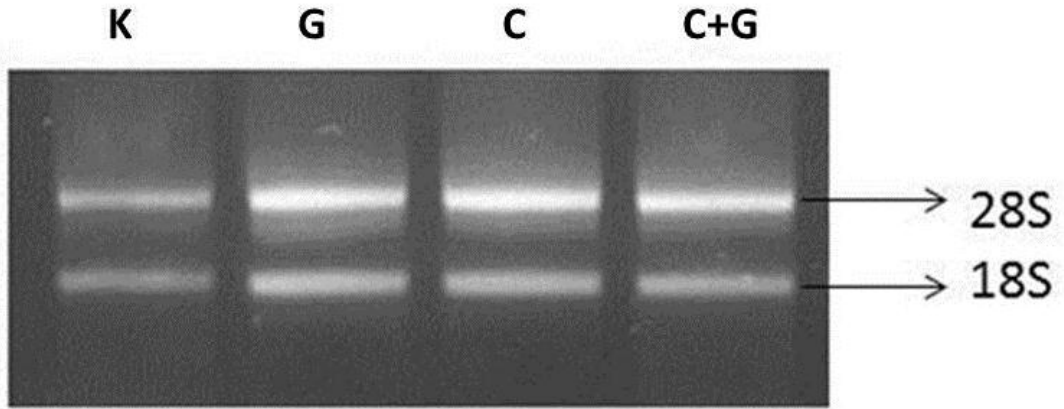
Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)



**Şekil 4.2.** Gruplarda serum kreatinin değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)

### 4.3. Moleküler Genetik Bulgular

RNA'lar dokulardan saflaştırıldıktan sonra %1'lik agaroz jeline yüklenerek incelendiler. Şekil 4.3.'de her gruptan seçilen saflaştırılmış RNA'ların %1'lik agaroz jelde koşturulmuş resmi görülmektedir. Saflaştırılan RNA'larda 28S ve 18S ribozomal bantlarının varlığı ve herhangi bir yıkılım olmadığı görülmektedir (Şekil 4.3).



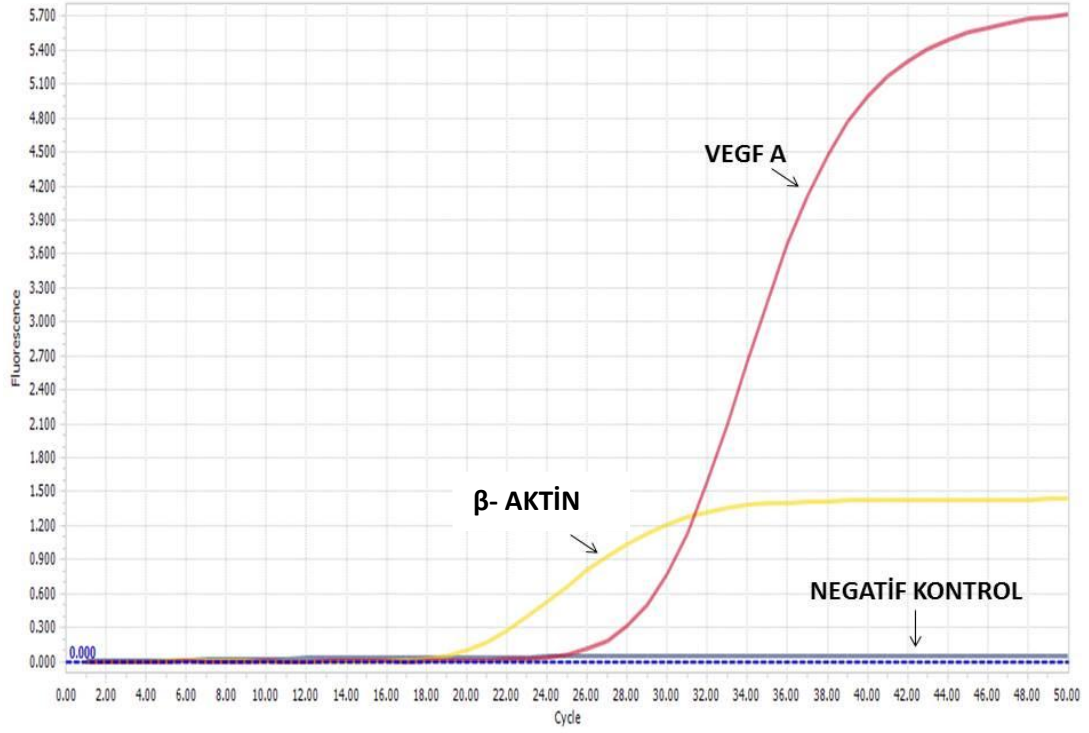
**Şekil 4.3.** Purelink (Ambion, Invitrogen) saflaştırma kiti ile böbrek örneklerinden saflaştırılan toplam RNA'nın jel görüntüleme sistemindeki (UVP, ChemiDoc it<sup>2</sup>) jel görüntüsü (% 1'lik agaroz jel). Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+gentamisin (C+G).

Ayrıca dokulardan saflaştırılan RNA örneklerinin spektrofotometrik analizleri yapıldı, örneklerin saf RNA içerdiği tespit edildi (Tablo 4.4.).

**Tablo 4.4.** Gruplarda ölçülen spektrofotometrik absorbans değerleri ve RNA miktarları. Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G).

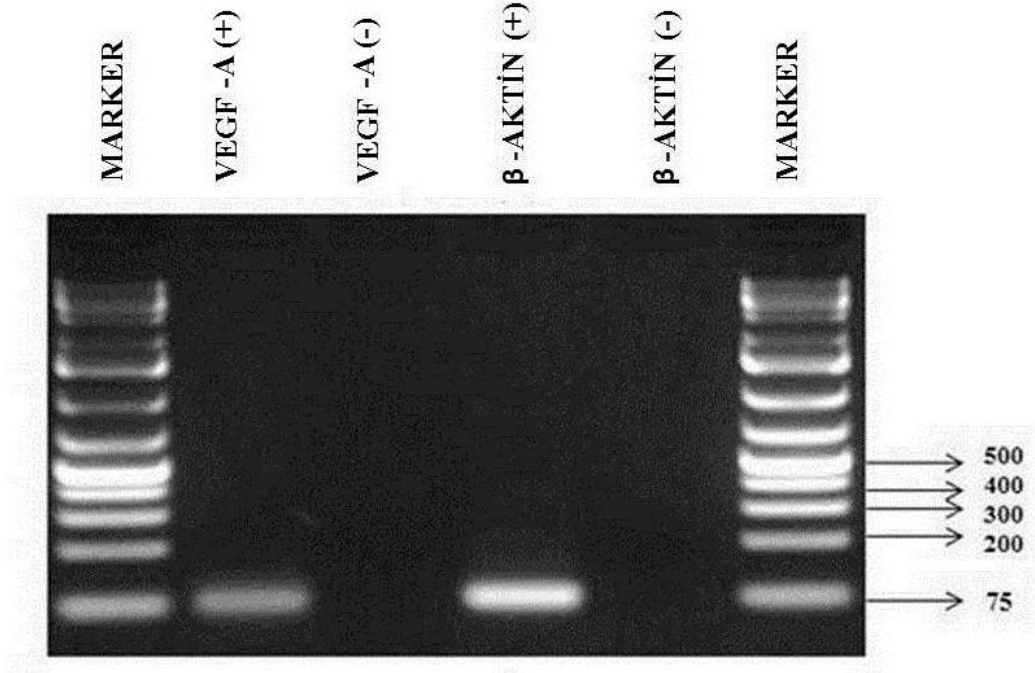
GRUPLAR	Absorbans: 260/280	RNA miktarı: ng/μL
K	2,174	490
K	2,045	627
K	2,014	654
K	2,064	361
K	2,08	594
K	2,058	382
K	2,028	318
K	2,041	248
G	2,028	631
G	2,035	567
G	2,04	355
G	2,026	1061
G	2,034	646
G	2,044	808
G	2,044	413
G	2,019	253
C	2,001	486
C	2,023	566
C	2,01	369
C	2,052	810
C	2,039	617
C	2,039	856
C	2,019	432
C	2,023	193
C+G	1,991	343
C+G	2,018	858
C+G	2,03	804
C+G	2,05	1206
C+G	2,01	742
C+G	2,05	720
C+G	2,063	746
C+G	2,071	960

Her bir örnekten saflaştırılan RNA'lerden elde edilen cDNA'lar,  $\beta$ -aktin ve *VEGF-A* genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile çoğaltıldı (Şekil 4.4.) ve *VEGF-A* gen ifadesindeki değişim  $\beta$ -aktin genine oranla belirlendi.



**Şekil 4.4.** *VEGF-A* gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizleri. “Hydrolysis Probe” kimyası kullanılarak  $\beta$  -aktin ve *VEGF-A* mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR ile çoğaltımı sırasında oluşan çoğalım eğrileri.

*$\beta$ -aktin* ve *VEGF-A* cDNA'ları kullanılarak yapılan gerçek zamanlı PZR sonrası agaroz jelinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgülüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her iki gen için de tek ve istenilen boyda bir DNA bandı oluştuğu görüldü (Şekil 4.5).



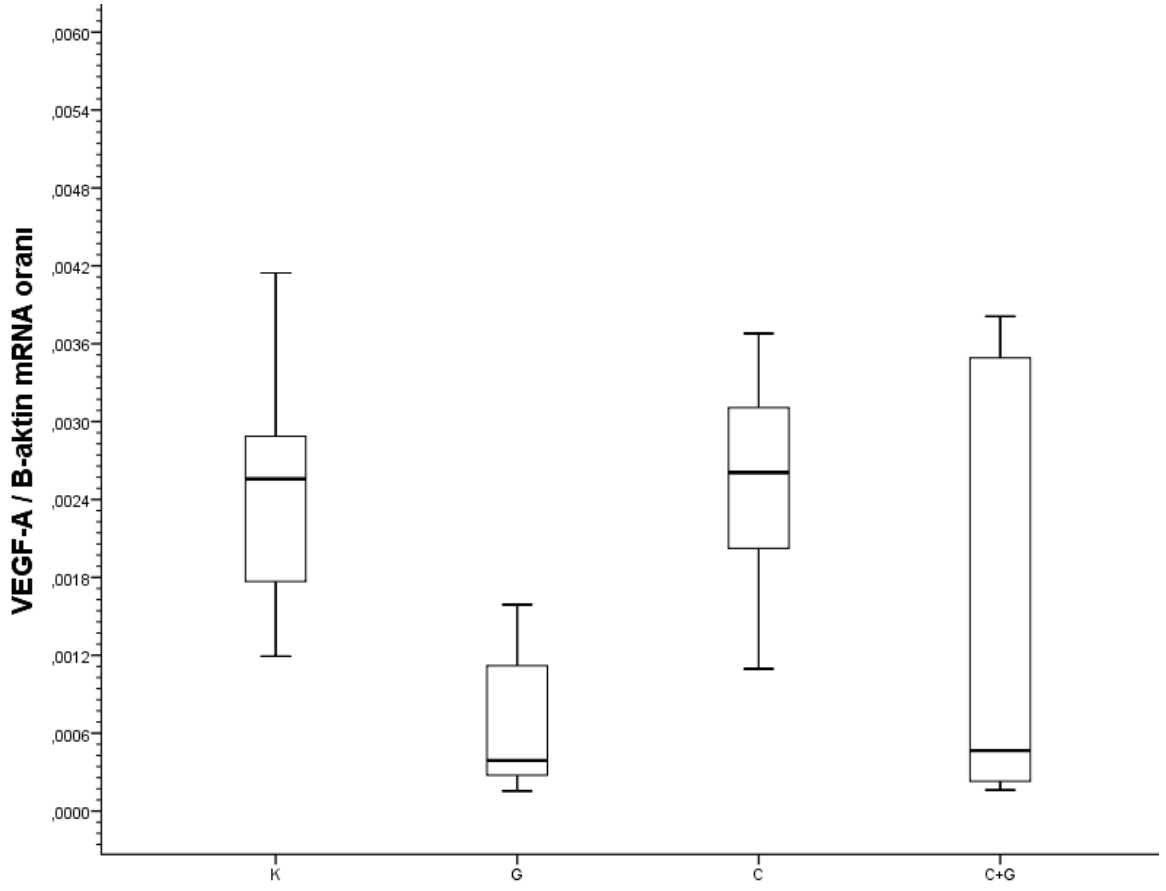
**Şekil 4.5.**  *$\beta$ -aktin* ve *VEGF-A* cDNA'larının PZR'deki çoğalımının agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. Kullanılan DNA Markeri 75 bp DNA Markeri'dir (Fermentas). *VEGF-A* (+) (pozitif), *VEGF-A* (-) (kontrol),  *$\beta$ -aktin* (+) (pozitif),  *$\beta$ -aktin* (-) (kontrol).

K, G, C ve C+G gruplarında *VEGF-A* gen ifadeleri ilk önce Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı ve istatiki olarak anlamlı bir fark tespit edildi ( $p<0,05$ ). Daha sonra gruplar arası fark Conover testi ile analiz edildi. K, G, C ve C+G sıçanların böbrek *VEGF/β-aktin* mRNA seviyeleri karşılaştırıldığında, G grubu gen ifadesinin, K grubu gen ifadesine ve C grubu gen ifadesine göre istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği ( $p<0,05$ ) tespit edildi. G grubu ile karşılaştırıldığında, C+G grubundaki artan doku *VEGF-A* gen ifadesi istatistiki olarak anlamlı değildi ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.5., Şekil 4.6.).

**Tablo 4.5.** Böbrek *VEGF-A* gen ifadeleri ve gruplar arası istatistiki karşılaştırma

Gruplar (n=8)	Ortanca (Min-Maks)	Sıra ortalaması	İstatistiki karşılaştırma (Conover testi, $p<0,05$ )
K	0,00260 (0,0012-0,0042)	19,43	K grubu; G grubundan farklıdır
G	0,00040 (0,00016-0,0016)	8,13	G grubu; K ve C gruplarından farklıdır
C	0,00260 (0,0011-0,0037)	19,71	C grubu; G grubundan farklıdır
C+G	0,00047 (0,00016-0,0040)	13,71	

Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)

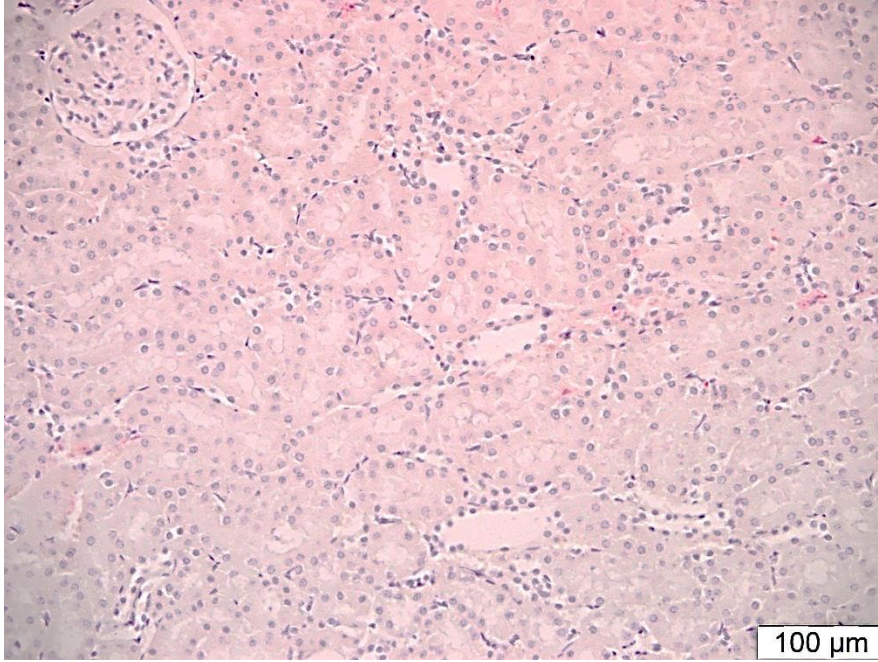


Şekil 4.6. Gruplarda *VEGF-A* gen ifade değerleri, Kontrol (K), Gentamisin (G), CAPE (C), CAPE+Gentamisin (C+G)

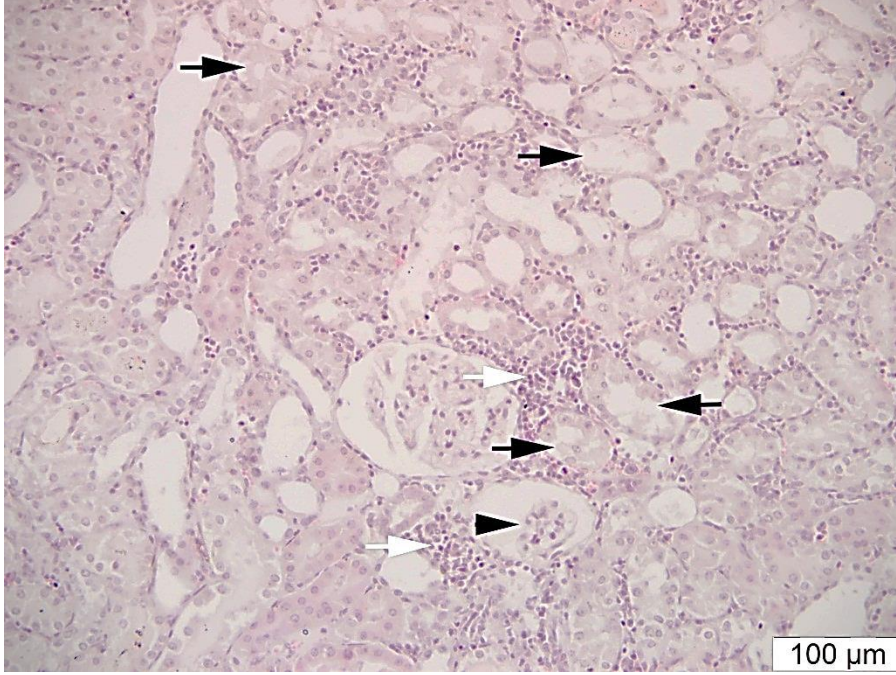


#### 4.4. Histopatolojik Bulgular

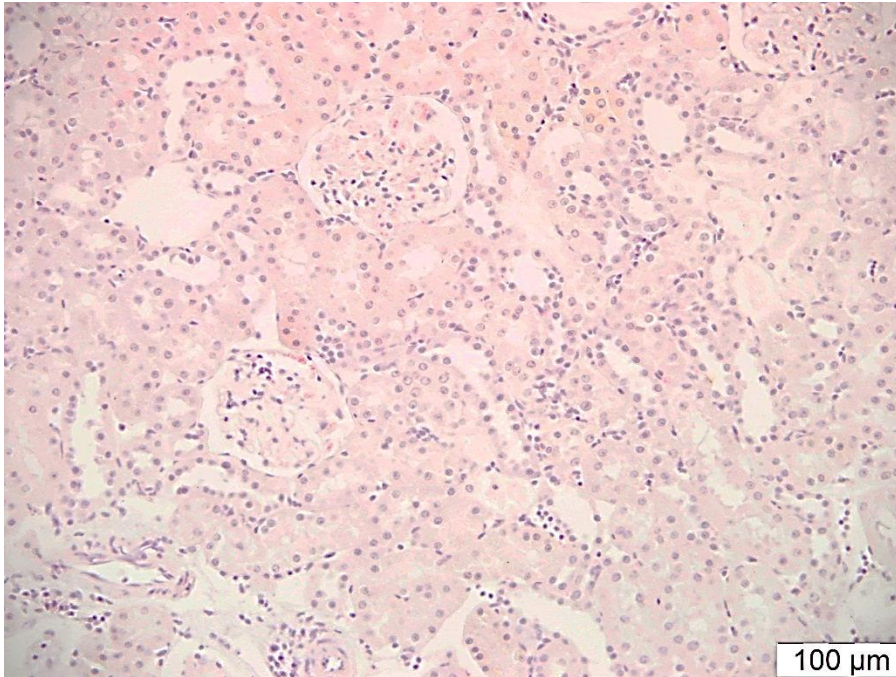
K grubundaki hayvanlarda böbrek morfolojisi normal formasyonunda gözlemlendi (Şekil 4.7.). G grubu böbreklerde ortadan şiddetliye değişen derecelerde dejenerasyonlar vardı. Bu hayvanlarda, proksimal tübül epitellerinde yıkımlanma ve yer yer ölümler dikkati çekti (Şekil 4.8.). Glomerular yıkımlanma bazı deneklerde oldukça belirgin bir şekildeydi. Bazı hayvanlarda şiddetli olmakla beraber değişen miktarlarda mononükleer hücresel infiltrasyon gözlemlendi. C grubunda, K grubundakilere benzer olarak böbrek yapısında herhangi bir patolojiye rastlanmadı (Şekil 4.9.). C+G grubunda renal dejenerasyon açısından farklar olmakla birlikte genel olarak sınırlı sayıda dejeneratif tubul ile az ya da hiç mononükleer hücresel infiltrasyon ile karakterize bir tablo gözlemlendi (Şekil 4.10.).



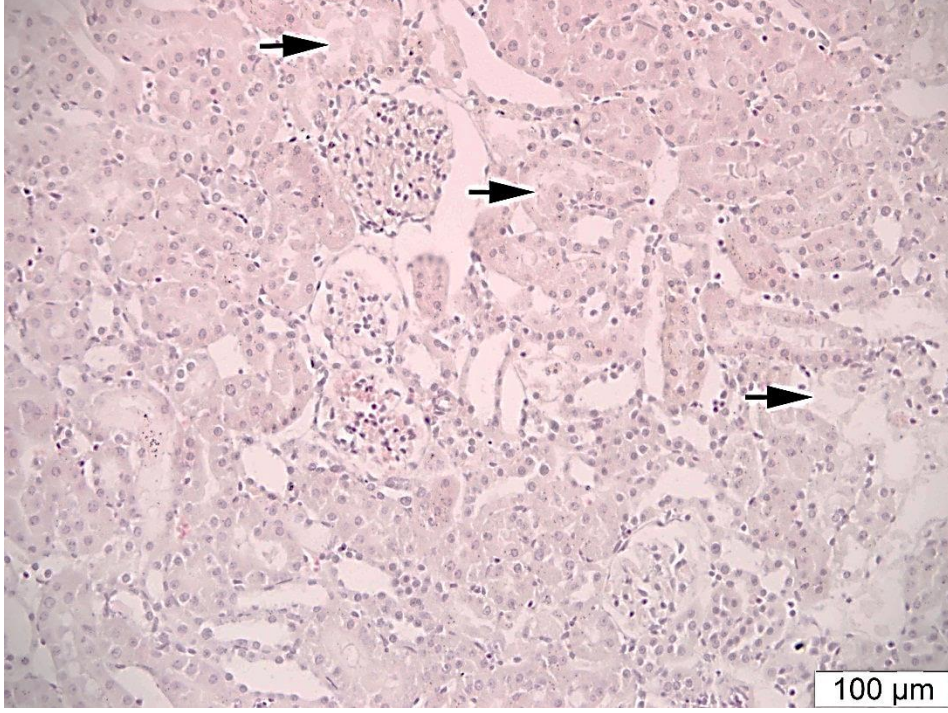
**Şekil 4.7.** K grubu bir denekte böbrek dokusunun normal histomorfolojik yapısı; HE X20



**Şekil 4.8.** G grubu bir denekte böbrek dokusunda şiddetli tübüler dejenerasyon ve nekroz (siyah oklar), glomeruluslarda yıkımlanma (okbaşı) ile mononükleer hücreli infiltrasyon (beyaz oklar); HEX20



**Şekil 4.9.** C grubu bir denekte böbrek histomorfolojisi normal yapıyı göstermektedir; HEX20



**Şekil 4.10.** C+G grubu bir hayvanda gözlenen orta derecedeki renal tübüler dejenerasyon (oklar); HEX20

## 5. TARTIŞMA

Bu tezde, sıçanlarda gentamisin ile oluşturulan deneysel nefrotoksisite modelinde böbrek dokusundaki *VEGF* geni ifadesi ve CAPE'nin koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlandı. Araştırmamızda; kontrol grubuna göre gentamisin uygulamasının böbrek *VEGF-A* gen ifadesini düşürdüğü ( $p<0,05$ ), CAPE uygulamasının ise *VEGF-A* gen ifadesinde herhangi bir yükseltici etki yapmadığı gözlemlendi ( $p>0,05$ ). Histopatolojik olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin uygulamasının böbrek dokusunda ciddi hasarlanmalara yol açtığı, CAPE uygulamasının ise bu hasarları kısmen iyileştirdiği tespit edildi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin uygulanan hayvanların serum kreatinin ve BUN değerlerinin anlamlı derecede yükseldiği ( $p<0,05$ ), CAPE uygulamasının bu artışları anlamlı derecede düşürücü bir etki yapmadığı bulundu ( $p>0,05$ ).

Yapılan birçok araştırmada böbrekte ve vücudun başka bölgelerinde oluşan çeşitli patolojik şartlarda, *VEGF* gen ifadesinin arttığı, azaldığı veya değişmediği bildirilmiştir. Örneğin *VEGF* gen ifadesi; sedef hastalığı, yüksek şekilde vaskülarize olmuş tümörler, lösemi, endometriozis ve üreme işlemlerinin çeşitli basamaklarında artmaktadır (141).

İmmunperoksidaz ve in situ hibridizasyon çalışmaları normal insan böbreğinde *VEGF* mRNA'sı ve proteininin baskın olarak visseral epitel hücrelerinde yerleştiğini göstermektedir (142). Normal böbreklerde *VEGF*'nin görevi, glomerüler damar geçirgenliğinin düzenlenmesi (123), renal tübüler hücrelerin korunması (124), glomerular basement membranın yapısının sürdürülmesi (125), kalsiyum homeostazisi ve podositlerin yaşamını sürdürmesi (126) olarak bildirilmektedir. *VEGF*'nin bilinen bu biyolojik özellikleri ve onun çeşitli böbrek bölgelerinde bulunması onun endotelial hücrelerin fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir. Birçok glomeruler hastalık, *VEGF* ifadesindeki değişikliklerle sonuçlanabilen epitelyal başkalaşımalarla karakterize olabilmektedir. Bu yüzden meydana gelen çeşitli hastalıklar *VEGF* gen ifadesiyle ilişkilendirilmiştir (143).

Boner ve ark. (144), minimal değişim hastalığına sahip kişilerden aldıkları böbrek biyopsi örnekleriyle yaptıkları çalışmada hastaların *VEGF* gen ifadesinin düşük olduğu, *VEGF* reseptörünün gen ifadesinde ise anlamlı bir fark olmadığını bulmuşlardır.

Bir başka araştırmada Shulman ve ark. (143), çeşitli glomerular hastalıkları olan 47 hastadan biyopsi alarak yaptıkları çalışmada, immünohistokimya ve in situ hibridizasyon teknikleri kullanmışlardır ve *VEGF* mRNA ve protein ifadesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, fokal ya da global glomerülosklerozis, amiloidozis, ilerlemiş diabetik nefropati, glomerulonefrit ve diffüz lupus nefrit hastalıklarında *VEGF* ifadesinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Bizim araştırmamızdan farklı olarak Ahn ve ark. (145), gentamisin indüklü böbrek nefrotoksisite modelinde ratlarla yaptıkları araştırmalarında, böbrek *VEGF* gen ifadesini incelemişlerdir. Araştırmacılar, sıçanlara 7 gün boyunca 80 mg/kg dozunda intramüsküler olarak gentamisin uygulaması yapmışlar ve böbrek *VEGF* gen ifadesini gerçek zamanlı PZR metoduyla incelemişlerdir. Gentamisin verilen grupta, kontrol grubuna göre *VEGF* ifadesinde herhangi bir değişikli tespit edilememiştir.

Yine çalışmamızdan farklı olarak Xu ve ark. (138), streptozotosin indüklü sıçan diabet modelinde, diabet grubu sıçanların böbrek *VEGF* gen ifadesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Artmış *VEGF* ve glomerular hasar arasında bir ilişki kurulsa da şimdiye kadar dokuda artan *VEGF*'nin patolojik durumlara neden olan bir aracı molekül mü yoksa patolojik işlemlerin bir sonucu olarak *VEGF* artışı mı ortaya çıkmaktadır bilinmemektedir. Bazı araştırmalar renal hasarda *VEGF*'nin koruyucu rolü olduğunu iddia etmektedirler (146).

Araştırmalar arasındaki bu farklılıklar hastalık modellerinin farklılığından ve uygulanan doz süre ve farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Araştırmamızda tespit ettiğimiz gentamisin indüklü *VEGF* gen ifadesinin azalmasının bir nedeni, *VEGF* üreten hücrelerin, hücre hasarlanması sonucu yok

olmalarıyla meydana gelmiş olabilir. Nitekim Shulman ve ark. (143), çeşitli glomerular hastalıkların ilk başlangıcında VEGF'nin aşırı salınmasıyla (glomerular hastalıklarda meydana gelen glomerular geçirgenliğin nedeni hastalığın başlangıcında salınan yüksek miktardaki VEGF olarak gösterilmektedir) VEGF üretme özelliğine sahip endotel hücrelerinin fonksiyonel yapısını bozarak daha sonra bu hücrelerin hasarlanmalarına neden olabileceğini ve bu durumda ortamda artık VEGF'yi ifade edecek hücre kalmayacağı için bu genin dokudaki miktarını azaltmış olabileceğini bildirmişlerdir. Gentamisin kaynaklı azalan böbrek *VEGF* gen ifadesi, gentamisinin neden olduğu serbest radikal artışından kaynaklanmış olabilir. Ji ve ark. (147), 26-30 haftalık hipertrofiye edilmiş rat kalbinde serbest radikal artışına paralel olarak doku *VEGF* mRNA'sında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Gentamisin serbest radikal oluşumunda güçlü bir katalist olarak karşımıza çıkmaktadır (148).

Araştırmamızda histopatolojik olarak kontrol grubuyla karşılaştırıldığında gentamisin uygulamasının böbrek dokusunda ciddi hasarlanmalara yol açtığı tespit edildi. Gentamisin uygulaması böbrekte histopatolojik değişimler meydana getirebilmektedir. Gentamisin indüklü nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, reaktif oksijen türlerinin gentamisin nefrotoksisitesinin patofizyolojisinde işe karıştığı, gentamisin uygulamasının renal kortikal lipid peroksidasyonunu, mitokondriyal hidrojen peroksit üretimini ve nitrik oksit üretimini artırdığı da ifade edilmektedir (149).

Araştırma sonuçlarımıza paralel olarak yapılan bazı çalışmalarda, gentamisin kaynaklı böbrek hasarı histopatolojik değişimlerle gösterilmiş ve bu patolojik değişimlerin gentamisin kaynaklı serbest radikal üretiminden olabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmalar aynı zamanda gentamisin uygulamasıyla artan serum kreatinin ve BUN artışına da dikkat çekmişlerdir (149, 150). *VEGF* ifadesinin azalması aynı zamanda böbrekteki patolojileri de meydana getirebilecek bir diğer neden olabilir. *VEGF*, mesangioproliferatif nefrit'te glomerular onarım için temel olabilmektedir. Podosit hasarından dolayı azalan VEGF sentezi endotel hücrelerin kaybına ve glomeruloskleorozisin gelişimine katkıda bulunabilmektedir (151). Nitekim, araştırmamızda gözlediğimiz gentamisin kaynaklı böbrekteki histopatolojik değişimler, VEGF'nin azalmasına bağlı olabilir. Örneğin; VEGF inhibitörü ajanlarla

yapılan çalışmalarda böbrek VEGF'sinin inhibe edilmesi böbrekte hasarlanmaya neden olabilmektedir. Bevasizumab, sunitinib ve sorafenib gibi VEGF inhibitörü tedavilerine bağlı masif proteinüri, hipertansiyon, nefrotik sendrom, renal trombotik mikroanjiyopati ve proliferatif glomerulonefrit görülebilmektedir (152, 153). Bu ajanlar VEGF reseptörlerine bağlanarak ya da onları bloke ederek etki göstermektedirler (154).

Araştırmamızda CAPE uygulamasının, böbrek *VEGF* gen ifade düzeyine ve serum parametrelerine herhangi bir etki yapmadığı fakat gentamisin kaynaklı böbrek hasarının düzeltilmesinde kısmen iyileştirici bir etki yaptığı histopatolojik olarak gözlemlendi. Benzer olarak Vardı ve ark. (85) ratlara 100 mg/kg dozda gentamisin uygulayarak oluşturdukları gentamisin indüklü nefrotoksisite modelinde CAPE'nin koruyucu rolünü araştırmışlar ve gentamisinin neden olduğu böbrek nefrotoksisitesinde meydana gelen nekrozu, CAPE uygulamasının önlediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar gentamisin uygulamasıyla meydana gelen hasarın CAPE ile önlenemesinin, CAPE'nin serbest radikallerin oluşumunu engellemesi sayesinde olduğunu belirtmişlerdir.

Yine bizim çalışmamıza benzer bir başka çalışmada, Parlakpınar ve ark. (101) sıçanlarda gentamisin nefrotoksisitesine karşı CAPE'nin koruyucu etkisini incelemişlerdir ve sonuç olarak araştırmacılar gentamisin tedavisi sırasında CAPE uygulamasının serbest radikal kaynaklı hasarı önleyebileceği görüşüne varmışlardır.

Levi ve ark.'ın (155) yaptığı başka bir araştırmada sisplatin veya gentamisin uygulaması ile böbreklerde nefrotoksik bir etki oluşturulmuş ve bu toksik etkiye karşı CAPE ve resveratrol'ün koruyucu bir rol oynadığı hem biyokimyasal hemde histopatolojik olarak ortaya konulmuştur. Sisplatin veya gentamisin uygulamasını takiben böbrek MDA seviyesindeki artış ve GSH seviyesindeki azalma bu iki ilacın yapmış olduğu nefrotoksik etkinin muhtemel patofizyolojik mekanizmalarından birinin serbest radikal kaynaklı hasardan dolayı oluşan oksidatif stres olabileceğini göstermektedir. CAPE'nin böbrek hasarlarını kısmen önleyici etkisinin serbest radikallerin oluşumunu engellemesi sayesinde olduğu söylenebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezden elde edilen veriler ışığı altında sıçan böbreklerinde gentamisin uygulamasıyla nefrotoksisite meydana geldiği ve elde edilen bulgulara göre deneysel gentamisin nefrotoksisitesinde böbrek dokusundaki *VEGF* gen ifadesinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Gentamisin nefrotoksisitesinde CAPE'nin uygulanması ise gentamisinin neden olduğu *VEGF* gen ifadesini değiştirmemiştir.

Araştırmamız sonucunda gentamisin nefrotoksisitesindeki etkenlerden birisinin *VEGF* gen ifadesindeki azalma olabileceği kanaatini taşımaktayız. *VEGF*'nin azalması sonucunda podositlerin hayatını idame ettirmesi, glomerular damar geçirgenliğinin düzenlenmesi, glomerular membranın yapısının sürdürülmesi ve kalsiyum homeostazisi gibi çok önemli görevlerin yerine getirilememesi böbrekte ciddi bozulmalara neden olabilmektedir.

*VEGF* gen ifadesi artırılarak gentamisin indüklü böbrek hasarının önüne geçilebilir. Araştırmamızda CAPE uygulamasının gentamisin kaynaklı azalan böbrek *VEGF* gen ifadesinde herhangi bir artışa neden olmadığını tespit ettik. Fakat diğer birçok faktör böbrek *VEGF* gen ifadesini artırabilir. Örneğin, hipoksi indüklenebilir faktör (*HIF*), vazopressör hormonlar, çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri de *VEGF* transkripsiyonunu artırmaktadır (156).

Yapılan çeşitli araştırmalarda *HIF*'in akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği ve iskeminin de olduğu çeşitli böbrek hasarı modellerinde arttığı bulunmuştur, buda araştırmacılara *HIF*'in böbrek hasarından korunmada önemli bir rolü olabileceğini düşündürmüştür. Son zamanlarda *HIF* aktivasyonunun sıçan remnant böbrek modelinde oksidatif stresi azaltarak podosit hasarına karşı koruduğu öne sürülmektedir. (145) Diyabetik nefropati ve iskemi reperfüzyon hasarında *HIF*'in antioksidan etkileri görülmüştür (157, 158) *HIF* aktivasyonu sisplatin indüklü nefrotoksisitede renal tübüler hücrelerinde apoptozisi azaltmaktadır (159). Bu bağlamda Ahn ve ark. (145) Gentamisin indüklü böbrek nefrotoksisite modelinde *HIF* aktivitesini kontrol ederek *HIF*'in gentamisin indüklü böbrek nefrotoksisitesindeki rolünü araştırmışlardır. Hücre kültürü çalışmalarında, *HIF*'in aktivasyonu ROT oluşumunu azaltmış, apoptozise neden olan kaspaz 3 yolunu



basklamış ve bu sayede gentamisin indüklü böbrek yetmezliğine karşı HIF'in koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Araştırmanın ratlarla yapılan kısmında ise *HIF-1 $\alpha$* 'nın artışına paralel *VEGF* gen ifadesininde anlamlı bir şekilde arttığını bulmuşlardır. *HIF*'in artmış olması *VEGF* ifadesinin de artmasını tetikleyebilmektedir (138).

Bu verilerin ışığı altında şu yorumları getirmek mümkündür;

Gentamisin indüklü nefrotoksisitede *VEGF* geni ifadesi azalmakta, azalan bu gen ifadesi nedeni ile böbrekte muhtemel patolojiler gelişebilmektedir. Böbrekte meydana gelen bu hasarların önüne böbrek *VEGF* geni ifadesi artırılarak geçilebilir kanaatini taşımaktayız.

## KAYNAKLAR

1. Lopez-Novoa, J.M., Quiros, Y., Vicente, L., Morales, A.I., Lopez-Hernandez, F.J., (2011), New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view, *Kidney Int*, 79,33-45.
2. Mazzon, E., Britti, D., De Sarro, A., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., (2001), Effect of N-acetylcysteine on gentamicin-mediated nephropathy in rats, *European Journal of Pharmacology*, 424,75-83.
3. Quiros, Y., Vicente-Vicente, L., Morales, A.I., Lopez-Novoa, J.M., Lopez-Hernandez, F.J., (2011), An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin, *Toxicological Sciences*, 119,245-256.
4. Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Olivares-Corichi, I.M., Granados-Silvestre, M.D.A., Hernandez-Pando, R., Ibarra-Rubio, M.E., (2000), Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: Relation to antioxidant enzymes, *Free Radical Biology and Medicine*, 29,602-611.
5. Bello, S.O., Chika, A., (2009), Dose-Dependent Amelioration of Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Adult Swiss Albino Rats by Vitamin B-complex - A Preliminary Study, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8,111-116.
6. Bhisitkul, R.B., (2006), Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments, *Br J Ophthalmol*, 90,1542-1547.
7. Lineaweaver, W.C., Lei, M.P., Mustain, W., Oswald, T.M., Cui, D., Zhang, F., (2004), Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival, *Ann Surg*, 239,866-873; discussion 873-865.
8. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., (1999), Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb Journal*, 13,9-22.
9. Mochida, S., Ishikawa, K., Inao, M., Shibuya, M., Fujiwara, K., (1996), Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver, *Biochem Biophys Res Commun*, 226,176-179.
10. Kim, B.S., Chen, J., Weinstein, T., Noiri, E., Goligorsky, M.S., (2002), VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: Reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures, *Journal of the American Society of Nephrology*, 13,2027-2036.
11. Lin, H.P., Lin, C.Y., Liu, C.C., Su, L.C., Huo, C., Kuo, Y.Y., Tseng, J.C., Hsu, J.M., Chen, C.K., Chuu, C.P., (2013), Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Potential Treatment for Advanced Prostate Cancer Targeting Akt Signaling, *International Journal of Molecular Sciences*, 14,5264-5283.
12. Eaton, D., Pooler, J. (2009). *Vander's Renal Physiology, 7th Edition*. McGraw-hill.
13. Sherwood, L. (2008). *Human Physiology: From Cells to Systems*. Cengage Learning.
14. Noyan, A. (1999). *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. Ankara. Meteksan.
15. Aydın, S. (2000). *İnsan Anatomisi Ve Fizyolojisi*. T.C. Anadolu Üniversitesi.
16. Ross, M.H., Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.
17. Barret, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, L. H. (2010). *Ganong's Review of Medical Physiology*. New York. The McGraw-Hill Companies.

18. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H. (2012). *Ganong's Review of Medical Physiology, 24th Edition*. McGraw-Hill Education.
19. Valenca-Filipe, R., Costa, J., Carvalho, J., Horta, R., Burnay, T., Silva, A., Costa-Ferreira, A., (2013), Nephrotoxicity of gentamicin implants, *J Plast Reconstr Aesthet Surg*,
20. Becker, B., Cooper, M.A., (2013), Aminoglycoside antibiotics in the 21st century, *ACS Chem Biol*, 8,105-115.
21. Karasawa, T., Steyger, P.S., (2011), Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity, *Integr Biol (Camb)*, 3,879-886.
22. Tulkens, P.M., (1984), Aminoglycoside nephrotoxicity: recent insights and perspectives, *Contrib Nephrol*, 42,168-181.
23. Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (2010). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: Contiene*. Churchill Livingstone Elsevier.
24. Bennett, W.M., (1983), Aminoglycoside nephrotoxicity, *Nephron*, 35,73-77.
25. Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Serraino, I., Di Paola, R., Britti, D., De Sarro, A., Pierpaoli, S., Caputi, A., Masini, E., Salvemini, D., (2002), A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats, *Eur J Pharmacol*, 450,67-76.
26. Kayaalp, S.O. (2013). *Akılci tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Pelikan Yayıncılık.
27. Mistik, R., (2000), Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları, *Klinik Dergisi*, 2,43-45.
28. Bryan, L.E., Kwan, S., (1983), Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin, *Antimicrob Agents Chemother*, 23,835-845.
29. Eustice, D.C., Wilhelm, J.M., (1984), Mechanisms of action of aminoglycoside antibiotics in eucaryotic protein synthesis, *Antimicrob Agents Chemother*, 26,53-60.
30. Pfaller, W., Gstraunthaler, G., (1998), Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know, *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 2,559-569.
31. Longo, D., Fauci, A., Kasper, D., Hauser, S., Jameson, J., Loscalzo, J. (2011). *Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition*. McGraw-Hill Education.
32. Elseviers, M.M., De Broe, M.E., (1999), Analgesic nephropathy: is it caused by multi-analgesic abuse or single substance use?, *Drug Saf*, 20,15-24.
33. Lameire, N.H., Flombaum, C.D., Moreau, D., Ronco, C., (2005), Acute renal failure in cancer patients, *Ann Med*, 37,13-25.
34. Briguori, C., Colombo, A., Airoidi, F., Morici, N., Sangiorgi, G.M., Violante, A., Focaccio, A., Montorfano, M., Carlino, M., Condorelli, G., Ricciardelli, B., (2005), Nephrotoxicity of low-osmolality versus iso-osmolality contrast agents: impact of N-acetylcysteine, *Kidney Int*, 68,2250-2255.
35. Van Vleet, T.R., Schnellmann, R.G., (2003), Toxic nephropathy: environmental chemicals, *Semin Nephrol*, 23,500-508.
36. Şimşek, Ş., (1991), Antimikrobiklerin böbreğe istenmeyen etkileri, *Klinik dergisi*, 4,114-119.
37. Ecdar, S., (1998), Antibiyotik nefrotoksitesisi, *ANKEM Dergisi*, 12,366-368.

38. Appel, G.B., Neu, H.C., (1978), Gentamicin in 1978, *Ann Intern Med*, 89,528-538.
39. Silan, C., Uzun, O., Comunoglu, N.U., Gokcen, S., Bedirhan, S., Cengiz, M., (2007), Gentamicin-induced nephrotoxicity in rats ameliorated and healing effects of resveratrol, *Biol Pharm Bull*, 30,79-83.
40. Reiter, R.J., Tan, D.X., Sainz, R.M., Mayo, J.C., Lopez-Burillo, S., (2002), Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs, *J Pharm Pharmacol*, 54,1299-1321.
41. Erdem, A., Gundogan, N.U., Usubutun, A., Kilinc, K., Erdem, S.R., Kara, A., Bozkurt, A., (2000), The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats, *Nephrol Dial Transplant*, 15,1175-1182.
42. Smetana, S., Khalef, S., Nitsan, Z., Hurwitz, N., Miskin, A., Bar-Khayim, Y., Birk, Y., (1988), Enhanced urinary trypsin inhibitory activity in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Clin Chim Acta*, 176,333-342.
43. Sha, S.H., Schacht, J., (1999), Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin, *Free Radic Biol Med*, 26,341-347.
44. Walker, P.D., Shah, S.V., (1988), Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats, *J Clin Invest*, 81,334-341.
45. Al-Majed, A.A., Mostafa, A.M., Al-Rikabi, A.C., Al-Shabanah, O.A., (2002), Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Pharmacol Res*, 46,445-451.
46. Edwards, J.R., Diamantakos, E.A., Peuler, J.D., Lamar, P.C., Prozialeck, W.C., (2007), A novel method for the evaluation of proximal tubule epithelial cellular necrosis in the intact rat kidney using ethidium homodimer, *BMC Physiol*, 7,1.
47. Li, J., Li, Q.X., Xie, X.F., Ao, Y., Tie, C.R., Song, R.J., (2009), Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats, *Eur J Pharmacol*, 620,97-104.
48. Pessoa, E.A., Convento, M.B., Silva, R.G., Oliveira, A.S., Borges, F.T., Schor, N., (2009), Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not the synthesis of heat shock protein, *Braz J Med Biol Res*, 42,614-620.
49. Edinger, A.L., Thompson, C.B., (2004), Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy, *Curr Opin Cell Biol*, 16,663-669.
50. Saito, Y., Nishio, K., Ogawa, Y., Kimata, J., Kinumi, T., Yoshida, Y., Noguchi, N., Niki, E., (2006), Turning point in apoptosis/necrosis induced by hydrogen peroxide, *Free Radic Res*, 40,619-630.
51. Chiarugi, A., (2005), "Simple but not simpler": toward a unified picture of energy requirements in cell death, *FASEB J*, 19,1783-1788.
52. Verroust, P.J., Christensen, E.I., (2002), Megalin and cubilin--the story of two multipurpose receptors unfolds, *Nephrol Dial Transplant*, 17,1867-1871.
53. Christensen, E.I., Birn, H., (2001), Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule, *Am J Physiol Renal Physiol*, 280,F562-573.
54. Nagai, J., Katsube, T., Murakami, T., Takano, M., (2002), Effect of gentamicin on pharmacokinetics of lysozyme in rats: interaction between megalin substrates in the kidney, *J Pharm Pharmacol*, 54,1491-1496.

55. Nagai, J., Saito, M., Adachi, Y., Yumoto, R., Takano, M., (2006), Inhibition of gentamicin binding to rat renal brush-border membrane by megalin ligands and basic peptides, *J Control Release*, 112,43-50.
56. Silverblatt, F.J., Kuehn, C., (1979), Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell, *Kidney Int*, 15,335-345.
57. Houghton, D.C., Campbell-Boswell, M.V., Bennett, W.M., Porter, G.A., Brooks, R.E., (1978), Myeloid bodies in the renal tubules of humans: relationship to gentamicin therapy, *Clin Nephrol*, 10,140-145.
58. Frommer, J.P., Senekjian, H.O., Babino, H., Weinman, E.J., (1983), Intratubular microinjection study of gentamicin transport in the rat, *Miner Electrolyte Metab*, 9,108-112.
59. Lipsky, J.J., Cheng, L., Sacktor, B., Lietman, P.S., (1980), Gentamicin uptake by renal tubule brush border membrane vesicles, *J Pharmacol Exp Ther*, 215,390-393.
60. Zhang, F., Hamanaka, R.B., Bobrovnikova-Marjon, E., Gordan, J.D., Dai, M.S., Lu, H., Simon, M.C., Diehl, J.A., (2006), Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest, *J Biol Chem*, 281,30036-30045.
61. Shimizu, A., Takumida, M., Anniko, M., Suzuki, M., (2003), Calpain and caspase inhibitors protect vestibular sensory cells from gentamicin ototoxicity, *Acta Otolaryngol*, 123,459-465.
62. Kim, I., Xu, W., Reed, J.C., (2008), Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities, *Nat Rev Drug Discov*, 7,1013-1030.
63. Peyrou, M., Hanna, P.E., Cribb, A.E., (2007), Cisplatin, gentamicin, and p-aminophenol induce markers of endoplasmic reticulum stress in the rat kidneys, *Toxicol Sci*, 99,346-353.
64. Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A., (2007), Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response, *Physiology (Bethesda)*, 22,193-201.
65. Horibe, T., Matsui, H., Tanaka, M., Nagai, H., Yamaguchi, Y., Kato, K., Kikuchi, M., (2004), Gentamicin binds to the lectin site of calreticulin and inhibits its chaperone activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 323,281-287.
66. Recht, M.I., Douthwaite, S., Puglisi, J.D., (1999), Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics, *EMBO J*, 18,3133-3138.
67. Schnellmann, R.G., Williams, S.W., (1998), Proteases in renal cell death: calpains mediate cell death produced by diverse toxicants, *Ren Fail*, 20,679-686.
68. Chwieralski, C.E., Welte, T., Buhling, F., (2006), Cathepsin-regulated apoptosis, *Apoptosis*, 11,143-149.
69. Yin, X.M., (2006), Bid, a BH3-only multi-functional molecule, is at the cross road of life and death, *Gene*, 369,7-19.
70. Golstein, P., Kroemer, G., (2007), Cell death by necrosis: towards a molecular definition, *Trends Biochem Sci*, 32,37-43.
71. Servais, H., Ortiz, A., Devuyt, O., Denamur, S., Tulkens, P.M., Mingeot-Leclercq, M.P., (2008), Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation, *Apoptosis*, 13,11-32.

72. Servais, H., Jossin, Y., Van Bambeke, F., Tulkens, P.M., Mingeot-Leclercq, M.P., (2006), Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation, *Antimicrob Agents Chemother*, 50,1213-1221.
73. Katzung, B., Masters, S., Trevor, A. (2011). *Basic and Clinical Pharmacology 12/E*. McGraw-Hill Education.
74. Brunton, L., Chabner, B., Knollman, B. (2010). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Twelfth Edition*. McGraw-Hill Education.
75. Halliwell, B., Gutteridge, J.M., (1990), Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol*, 186,1-85.
76. Suru, S.M., (2008), Onion and garlic extracts lessen cadmium-induced nephrotoxicity in rats, *Biometals*, 21,623-633.
77. Serarslan, G., Altug, E., Kontas, T., Atik, E., Avci, G., (2007), Caffeic acid phenethyl ester accelerates cutaneous wound healing in a rat model and decreases oxidative stress, *Clin Exp Dermatol*, 32,709-715.
78. Baskin, S., Salem, H. (1997). *Oxidants, Antioxidants And Free Radicals*. Taylor & Francis.
79. Colton, C., Gilbert, D. (1999). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems*. Springer.
80. Stratta, P., Segoloni, G.P., Canavese, C., Muzio, G., Dogliani, M., Serra, A., Allemandi, P., Salomone, M., Caramellino, C., Canuto, R., (1994), Oxygen free radicals are not the main factor in experimental gentamicin nephrotoxicity, *Ren Fail*, 16,445-455.
81. Nordberg, J., Arner, E.S., (2001), Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic Biol Med*, 31,1287-1312.
82. Southorn, A., Powis, G., (1988), Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions, *Mayo Clin. Proc*, 63,381-389.
83. de Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., (1999), Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radic Biol Med*, 26,202-226.
84. Parlakpinar, H., Ozer, M.K., Sahna, E., Vardi, N., Cigremis, Y., Acet, A., (2003), Amikacin-induced acute renal injury in rats: protective role of melatonin, *J Pineal Res*, 35,85-90.
85. Vardi, N., Parlakpinar, H., Ozturk, F., Acet, A., (2005), Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats, *Fundam Clin Pharmacol*, 19,173-177.
86. Karatas, Y., Secilmis, M.A., Karayaylali, I., Doran, F., Buyukafsar, K., Singirik, E., Sagliker, Y., Dikmen, A., (2004), Effect of tempol (4-hydroxy tempo) on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Fundam Clin Pharmacol*, 18,79-83.
87. Morales, A.I., Demaille, D., Prieto, M., Puente, A., Briones, E., Arevalo, M., Lerverve, X., Lopez-Novoa, J.M., El-Mir, M.Y., (2010), Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway, *Kidney Int*, 77,861-869.
88. Ali, B.H., (2003), Agents ameliorating or augmenting experimental gentamicin nephrotoxicity: some recent research, *Food Chem Toxicol*, 41,1447-1452.
89. Ramsammy, L., Ling, K.Y., Josepovitz, C., Levine, R., Kaloyanides, G.J., (1985), Effect of gentamicin on lipid peroxidation in rat renal cortex, *Biochem Pharmacol*, 34,3895-3900.

90. Soejima, A., Ishizuka, S., Suzuki, M., Miyake, N., Fukuoka, K., Nagasawa, T., (1998), Biochemical renal manifestations induced by consecutive administration of gentamicin in rats, *Nephron*, 80,331-339.
91. Aygun, F.O., Akcam, F.Z., Kaya, O., Ceyhan, B.M., Sutcu, R., (2012), Caffeic acid phenethyl ester modulates gentamicin-induced oxidative nephrotoxicity in kidney of rats, *Biol Trace Elem Res*, 145,211-216.
92. Akyol, S., Armutcu, F., Yigitoğlu, M.N., (2011), Propolisin Aktif Bileşenlerinden Kafeik Asit Fenetil Ester'in (Cape) bazı Nörolojik Hastalık ve Acillerde Kullanılması, *Spatula DD*, 4,37-42.
93. Hepşen, İ.F., Tilgen, F., Er, H., (1996), Tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 3,386-391.
94. Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C., Popov, S., (1995), Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis, *Z Naturforsch C*, 50,167-172.
95. Bankova, V., (2005), Recent trends and important developments in propolis research, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2,29-32.
96. Russo, A., Longo, R., Vanella, A., (2002), Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin, *Fitoterapia*, 73,S21-S29.
97. Ozguner, F., Oktem, F., Ayata, A., Koyu, A., Yilmaz, H.R., (2005), A novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester prevents long-term mobile phone exposure-induced renal impairment in rat. Prognostic value of malondialdehyde, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and nitric oxide determination, *Mol Cell Biochem*, 277,73-80.
98. Sudina, G.F., Mirzoeva, O.K., Pushkareva, M.A., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Varfolomeev, S.D., (1993), Caffeic Acid Phenethyl Ester as a Lipoxygenase Inhibitor with Antioxidant Properties, *Febs Letters*, 329,21-24.
99. Khan, M., Elango, C., Ansari, M.A., Singh, I., Singh, A.K., (2007), Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia, *J Neurochem*, 102,365-377.
100. Tsai, S.K., Lin, M.J., Liao, P.H., Yang, C.Y., Lin, S.M., Liu, S.M., Lin, R.H., Chih, C.L., Huang, S.S., (2006), Caffeic acid phenethyl ester ameliorates cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia, *Life Sci*, 78,2758-2762.
101. Parlakpınar, H., Tasdemir, S., Polat, A., Bay-Karabulut, A., Vardi, N., Ucar, M., Acet, A., (2005), Protective role of caffeic acid phenethyl ester (cape) on gentamicin-induced acute renal toxicity in rats, *Toxicology*, 207,169-177.
102. Ferrara, N., (2009), Vascular endothelial growth factor, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29,789-791.
103. Thomas, K.A., (1996), Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent, *J Biol Chem*, 271,603-606.
104. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., (2000), Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature*, 407,242-248.
105. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., Persico, G., (1996), Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3, *Circulation*, 93,1493-1495.

106. Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., De Bruijn, E.A., (2004), Vascular endothelial growth factor and angiogenesis, *Pharmacol Rev*, 56,549-580.
107. Takahashi, H., Hattori, S., Iwamatsu, A., Takizawa, H., Shibuya, M., (2004), A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1, *J Biol Chem*, 279,46304-46314.
108. Ortega, N., L'Faqihi, F.E., Plouet, J., (1998), Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix, *Biol Cell*, 90,381-390.
109. Clauss, M., (2000), Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family, *Semin Thromb Hemost*, 26,561-569.
110. Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K., Paavonen, K., (2005), The biology of vascular endothelial growth factors, *Cardiovasc Res*, 65,550-563.
111. Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., (2003), The biology of VEGF and its receptors, *Nat Med*, 9,669-676.
112. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., (1995), Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature*, 376,62-66.
113. Ng, Y.S., Krilleke, D., Shima, D.T., (2006), VEGF function in vascular pathogenesis, *Exp Cell Res*, 312,527-537.
114. Jacobi, J., Tam, B.Y., Sundram, U., von Degenfeld, G., Blau, H.M., Kuo, C.J., Cooke, J.P., (2004), Discordant effects of a soluble VEGF receptor on wound healing and angiogenesis, *Gene Ther*, 11,302-309.
115. Saaristo, A., Tammela, T., Farkkila, A., Karkkainen, M., Suominen, E., Yla-Herttuala, S., Alitalo, K., (2006), Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing, *Am J Pathol*, 169,1080-1087.
116. Mac Gabhann, F., Popel, A.S., (2008), Systems biology of vascular endothelial growth factors, *Microcirculation*, 15,715-738.
117. Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., Carmeliet, P., (2009), Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system, *Physiol Rev*, 89,607-648.
118. Tamanini, C., De Ambrogi, M., (2004), Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum, *Reprod Domest Anim*, 39,206-216.
119. Monacci, W.T., Merrill, M.J., Oldfield, E.H., (1993), Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues, *Am J Physiol*, 264,C995-1002.
120. Whittle, C., Gillespie, K., Harrison, R., Mathieson, P.W., Harper, S.J., (1999), Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant, *Clin Sci (Lond)*, 97,303-312.
121. Lenz, T., Gauer, S., Weich, H.A., Haak, T., Bergner, R., Gossmann, J., (2005), Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor, Flt-1, are not correlated to erythropoietin in diabetics with normal or reduced renal function, *Nephrology (Carlton)*, 10,84-89.
122. Simon, M., Grone, H.J., Jöhren, O., Kullmer, J., Plate, K.H., Risau, W., Fuchs, E., (1995), Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in human renal ontogenesis and in adult kidney, *Am J Physiol*, 268,F240-250.



123. Eremina, V., Baelde, H.J., Quaggin, S.E., (2007), Role of the VEGF--a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier, *Nephron Physiol*, 106,p32-37.
124. Kanellis, J., Fraser, S., Katerelos, M., Power, D.A., (2000), Vascular endothelial growth factor is a survival factor for renal tubular epithelial cells, *Am J Physiol Renal Physiol*, 278,F905-915.
125. Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R., (1991), Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 181,902-906.
126. Foster, R.R., Hole, R., Anderson, K., Satchell, S.C., Coward, R.J., Mathieson, P.W., Gillatt, D.A., Saleem, M.A., Bates, D.O., Harper, S.J., (2003), Functional evidence that vascular endothelial growth factor may act as an autocrine factor on human podocytes, *Am J Physiol Renal Physiol*, 284,F1263-1273.
127. Kang, D.H., Anderson, S., Kim, Y.G., Mazzalli, M., Suga, S., Jefferson, J.A., Gordon, K.L., Oyama, T.T., Hughes, J., Hugo, C., Kerjaschki, D., Schreiner, G.F., Johnson, R.J., (2001), Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease, *Am J Kidney Dis*, 37,601-611.
128. Zachary, I., (1998), Vascular endothelial growth factor, *Int J Biochem Cell Biol*, 30,1169-1174.
129. Akiyoshi, F., Sata, M., Suzuki, H., Uchimura, Y., Mitsuyama, K., Matsuo, K., Tanikawa, K., (1998), Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases, *Dig Dis Sci*, 43,41-45.
130. Sone, H., Sakauchi, M., Takahashi, A., Suzuki, H., Inoue, N., Iida, K., Shimano, H., Toyoshima, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Matsuo, K., Yamada, N., (2001), Elevated levels of vascular endothelial growth factor in the sera of patients with rheumatoid arthritis correlation with disease activity, *Life Sci*, 69,1861-1869.
131. Shihab, F.S., Bennett, W.M., Yi, H., Andoh, T.F., (2001), Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity, *Transplantation*, 72,164-168.
132. Vaidya, V.S., Waikar, S.S., Ferguson, M.A., Collings, F.B., Sunderland, K., Gioules, C., Bradwin, G., Matsouaka, R., Betensky, R.A., Curhan, G.C., Bonventre, J.V., (2008), Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans, *Clin Transl Sci*, 1,200-208.
133. Kim, B.S., Goligorsky, M.S., (2003), Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease, *Korean J Intern Med*, 18,65-75.
134. Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M., Bunn, H.F., (1996), Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit, *J Biol Chem*, 271,32253-32259.
135. Liu, Y., Cox, S.R., Morita, T., Kourembanas, S., (1995), Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer, *Circ Res*, 77,638-643.
136. Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H.J., Maggi, C.A., Geppetti, P., Ledda, F., (1994), Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and

endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P, *J Clin Invest*, 94,2036-2044.

137. Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H.T., Donnini, S., Granger, H.J., Bicknell, R., (1997), Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis, *J Clin Invest*, 99,2625-2634.

138. Xu, X., Chen, P., Zheng, Q., Wang, Y., Chen, W., (2011), Effect of pioglitazone on diabetic nephropathy and expression of HIF-1alpha and VEGF in the renal tissues of type 2 diabetic rats, *Diabetes Res Clin Pract*, 93,63-69.

139. Ribatti, D., Vacca, A., Presta, M., (2000), The discovery of angiogenic factors: a historical review, *Gen Pharmacol*, 35,227-231.

140. Ek, R.O., Serter, M., Ergin, K., Yildiz, Y., Cecen, S., Kavak, T., Yenisey, C., (2008), The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on TNBS-induced colitis in ovariectomized rats, *Dig Dis Sci*, 53,1609-1617.

141. Aiello, L.P., Wong, J.S., (2000), Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications, *Kidney Int Suppl*, 77,S113-119.

142. Brown, L.F., Berse, B., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Van de Water, L., Senger, D.R., Dvorak, H.F., Rosen, S., (1992), Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney, *Kidney Int*, 42,1457-1461.

143. Shulman, K., Rosen, S., Tognazzi, K., Manseau, E.J., Brown, L.F., (1996), Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases, *J Am Soc Nephrol*, 7,661-666.

144. Boner, G., Cox, A.J., Kelly, D.J., Tobar, A., Bernheim, J., Langham, R.G., Cooper, M.E., Gilbert, R.E., (2003), Does vascular endothelial growth factor (VEGF) play a role in the pathogenesis of minimal change disease?, *Nephrol Dial Transplant*, 18,2293-2299.

145. Ahn, J.M., You, S.J., Lee, Y.M., Oh, S.W., Ahn, S.Y., Kim, S., Chin, H.J., Chae, D.W., Na, K.Y., (2012), Hypoxia-inducible factor activation protects the kidney from gentamicin-induced acute injury, *PLoS One*, 7,e48952.

146. Liu, E., Morimoto, M., Kitajima, S., Koike, T., Yu, Y., Shiiki, H., Nagata, M., Watanabe, T., Fan, J., (2007), Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions, *J Am Soc Nephrol*, 18,2094-2104.

147. Ji, K., Minakawa, M., Fukui, K., Suzuki, Y., Fukuda, I., (2008), Increased superoxide radical with a decrease in vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase level leads to the progression of left ventricular hypertrophy in a pressure-overload rat heart model, *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 14,210-217.

148. Priuska, E.M., Schacht, J., (1995), Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex, *Biochem Pharmacol*, 50,1749-1752.

149. Lee, I.C., Kim, S.H., Lee, S.M., Baek, H.S., Moon, C., Kim, S.H., Park, S.C., Kim, H.C., Kim, J.C., (2012), Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats, *Arch Toxicol*, 86,1527-1536.

150. Acharya, C., Thakar, H., Vajpeyee, S., (2013), A study of oxidative stress in gentamicin induced nephrotoxicity and effect of antioxidant vitamin C in Wistar rats, *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 3,14-20.

151. Schrijvers, B.F., Flyvbjerg, A., De Vriese, A.S., (2004), The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology, *Kidney Int*, 65,2003-2017.
152. Eremina, V., Quaggin, S.E., (2004), The role of VEGF-A in glomerular development and function, *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 13,9-15.
153. Izzedine, H., Massard, C., Spano, J.P., Goldwasser, F., Khayat, D., Soria, J.C., (2010), VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management, *Eur J Cancer*, 46,439-448.
154. Stokes, M.B., Erazo, M.C., D'Agati, V.D., (2008), Glomerular disease related to anti-VEGF therapy, *Kidney Int*, 74,1487-1491.
155. Levi, J., Jacobs, C., Kalman, S.M., McTigue, M., Weiner, M.W., (1980), Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: I. Effects of sulfhydryl groups in rat kidneys, *J Pharmacol Exp Ther*, 213,545-550.
156. Williams, B., (1998), A potential role for angiotensin II-induced vascular endothelial growth factor expression in the pathogenesis of diabetic nephropathy?, *Miner Electrolyte Metab*, 24,400-405.
157. Kojima, I., Tanaka, T., Inagi, R., Kato, H., Yamashita, T., Sakiyama, A., Ohneda, O., Takeda, N., Sata, M., Miyata, T., Fujita, T., Nangaku, M., (2007), Protective role of hypoxia-inducible factor-2alpha against ischemic damage and oxidative stress in the kidney, *J Am Soc Nephrol*, 18,1218-1226.
158. Ohtomo, S., Nangaku, M., Izuhara, Y., Takizawa, S., Strihou, C., Miyata, T., (2008), Cobalt ameliorates renal injury in an obese, hypertensive type 2 diabetes rat model, *Nephrol Dial Transplant*, 23,1166-1172.
159. Weidemann, A., Bernhardt, W.M., Klanke, B., Daniel, C., Buchholz, B., Campean, V., Amann, K., Warnecke, C., Wiesener, M.S., Eckardt, K.U., Willam, C., (2008), HIF activation protects from acute kidney injury, *J Am Soc Nephrol*, 19,486-494.



1261 cgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer




1381 ccctgagtc aagaggacagagagacagatgacagataaagagataaagattctggtccg  
1441 accagacg ttttggggagcctcaggacatggcactattgtggatccccactagattctg  
1501 caagagcaccctgccctctgggcaactgcctggaagaatcaggagcctggccatcaagct  
1561 ctctcctccactctgaggagcctaggaggcctcccacaggggtcctggcaaagagaaga  
1621 cacagtgg tgaagaagaggcctggtaatggctcctcctcctcctcctgggaaccctcg  
1681 tcctctcc ctacccactcctgggtatagctcaggaggacctgtgtgatcagaccatt  
1741 gaaaccactaattctgtcccaggagacttggctgtgtgtgagtggttaccttccc  
1801 catttccctcccaaggtacagagcaatggggcaggaccgcaagcccctcatggaggc  
1861 agagaaaag agaaagtgtttatatacggtaactatattaagcccttttaattagaaa  
1921 ttaaaacag ttaattaaagagtaggggtttttcagtattcttggttaattatta  
1981 atttcaact atttatgaggatgcactcttcttcttcttattgtactgtttttttg  
2041 tttgtttt ctgtgtgtgtgtgtatgaaatctgtgttccaatctctctcccaga  
2101 tcggtgac agtcactagctgtcctgagaagatattaattttgctaactcagctctg  
2161 cctcccct gtccccaccacacattcctttgaaataaggttcaatatacatttacatac  
2221 tatatatata tttggcaactgtgtttgtatataaataatatatatatatatgtttatg  
2281 tatatatgt gattctgataaaatagacattgctattctgtttttatagtataaaacaaa  
2341 acgagaaaaa atagagaattctacatactaaatctctctcctttttaatttaatttt  
2401 gttatcatt tatttttggctactgtttatccgtaataattgtgggggaaaagatatt  
2461 aacatcacgt cttgtctctagagcagtttccgagatattccgtagtacatatttttt  
2521 ttaaacagca caaagaatacagatatatcttaagaaaaaaaaaagcattttgtattaaa  
2581 gaattgaatt ctgatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

>>>>> İleri primer

<<<<<< Geri primer

### Ek 3: Deney Hayvanları Etik Kurul Kararı



T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

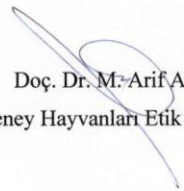
Sayı : B.30.2.İNÜ.0.20.05.05/14  
Konu : 2012/A-74 nolu çalışma

MALATYA  
10 / 07 / 2014

Sayın: Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ  
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

2012/A-74 protokol nolu “Ratlarda Gentamisin İndüklü Akut Böbrek Nefrotoksitesinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) Geninin İfadesi ve Kafeik Asit Fenetil Ester’in (CAPE) Koruyucu Etkisinin İncelenmesi” İsimli projenin başlığının “In Vivo Akut Nefrotoksitede Böbrek Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) Geni İfadesi ve Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)’nin Etkisi.”şeklinde değiştirilmesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.



Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ  
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

---

Inönü Üniversitesi Merkez Kampüsü 44280 MALATYA  
Telefon: (0 422) 341 00 45 Faks: (0 422) 341 00 36  
e-posta: [tip@inonu.edu.tr](mailto:tip@inonu.edu.tr) Elektronik Ağ : <http://cms.inonu.edu.tr/tr/tip>

Bilgi için:





**İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI**

Toplantı Tarihi : 22-06-2012  
 Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
 Araştırma Protokol no.su : 2012/A-74  
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino  
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 adet  
 Deneide Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-12 haftalık/200-250 gram

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ yürütücüsü olduğu "Ratlarda Gentamisin İndüklü Akut Böbrek Nefrotoksisitesinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktör (VEGF) Geninin İfadesi ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in (CAPE) Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" isimli 2012/A-74 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Prof.Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Başkan

Doç.Dr. Abdurrahman KARAMAN  
Başkan Yard.

Prof.Dr. Selim DOĞANAY  
Üye  
katılmadı

Doç.Dr. M.Arif ALADAĞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ  
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KABAKAPLAN  
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ  
Üye

Salih AVCI  
Sivil Üye

Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU  
Sivil Üye

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynal Mete KARACA

Doğum Tarihi : 01.06.1987

Doğum Yeri : Malatya

Uyruk : T.C.

### Eğitim Bilgileri

2011-...Devam ediyor : İnönü Üniversitesi (Malatya) Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Tezli Yüksek Lisans

2010-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Pedagojik Formasyon

2007-2011 : İnönü Üniversitesi (Malatya) Biyoloji Bölümü Lisans