



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PRENATAL UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN
POSTNATAL SIÇANLARDA RENAL COX-2 DAĞILIMININ
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Sağlık Memuru Murat SEVEN
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL UYGULANAN DİKLOFENAK SODYUMUN
POSTNATAL SIÇANLARDA RENAL COX-2 DAĞILIMININ
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Sağlık Memuru Murat SEVEN
TIBBİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TIP PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

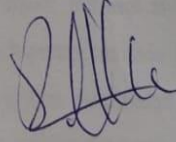
DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

VAN-2019

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Sağlık Memuru Murat SEVEN tarafından hazırlanan "Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Sığıçnlarda Renal COX-2 Dağılımının Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

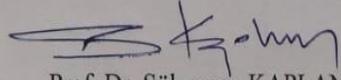
Tez Savunma Tarihi: 04/09/2019



Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

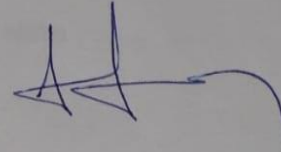
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Jüri Üyesi

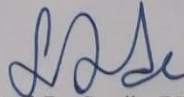


Dr. Öğr. Üyesi Fikret ALTINDAĞ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "*Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Sıçanlarda Renal COX-2 Dağılımının Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması*" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Murat SEVEN

Tarih: 14/06/2019

İmza:



TEŞEKKÜR

İlmi tefekkür ve gayreti bize aŐılayan, derin bilgi ve birikimlerini üleŐtirmekten hiçbir zaman imtina etmeyen, üzerimde devasa emeği olan değerli danışman hocam Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ'ye, çalışmamın immünohistokimyasal değerlendirmesinde bilgilerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Remzi ERTEN'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Veysel AKYOL'a saygı ve sonsuz teŐekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu süreçte manen hep yanımda olduklarını hissettiren çok değerli aileme sonsuz teşekkür eder ve bu güzel insanlara hayatlarında başarılar dilerim.



ÖZET

Seven, M. “Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Sıçanlarda Renal COX-2 Dağılımının Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması” Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019. Bu çalışmada, nonsteroidal antiinflatuvar ilaç olan diklofenak sodyumun bir COX-2 inhibitörü olarak gebelik süresince uygulandıktan sonra doğan sıçanların dördüncü haftalarındaki böbreklerinde COX-2 ekspresyonu stereolojik ve immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Toplam 12 adet erişkin albino dişi sıçan diklofenak sodyum ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gebeliklerinin beşinci gününden itibaren 1mg/kg diklofenak sodyum intraperitoneal yolla enjekte edildi. Kontrol grubunaysa herhangi bir işlem yapılmadı. Postnatal dört haftalık sıçanlardan altı adet diklofenak sodyum ve altı adet kontrol grubu oluşturuldu. Derin anestezi altında perfüze edilip tespit edildi. Rutin doku takipleri yapıldı. Diklofenak ve kontrol grubundan toplam 12 böbrekten kesitler alındı. Preparatların stereolojik incelemesinde, noktalı alan ölçüm cetveli ile hacim; tarafsız sayım çerçevesi ile hücre sayımı yapıp, istatistiksel analizde Mann-Whitney U testi kullanıldı. İmmünohistokimyasal değerlendirmede boyanma yoğunlukları skorlama tekniğiyle incelendi; her iki grubun postnatal sıçan böbreklerinin maküla densa, proksimal tübül, distal tübül, korteksteki tübüller, medulladaki tübüller, toplayıcı tübüller ve glomerüllerinde değişik yoğunluklarda COX-2 ekspresyonu tespit edildi. Skorlama yöntemiyle yapılan değerlendirmede; COX-2 boyanma derecelerinin iki grup böbreklerinin maküla densa ve toplayıcı tübüllerinde diğer bölgelere nispeten daha yüksek olduğu gözlemlendi. Maküla densa haricindeki bahsedilen diğer tüm bölgelerde, kontrol grubuna nazaran diklofenak grubunun COX-2 ortalama boyanma yoğunluğunun daha az olduğu; proksimal tübül, distal tübül ve korteksteki tübüllerde boyanma yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla azlığı nispeten farklı skorla tespit edildi. Stereolojik hesaplamalar neticesinde gruplar arasındaki fark ($p<0,05$) istatistiksel açıdan anlamlı bulundu. Böbrek volümü diklofenak sodyum grubu böbreklerinde daha yüksek çıkarken; kontrol grubu böbreklerinin COX-2 tarafından nüfus edilen hücre miktarının daha fazla olduğu tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Diklofenak Sodyum, Prenatal Sıçan, Renal COX-2, Stereoloji

ABSTRACT

Seven, M. “A stereological study of renal COX-2 expression in rats treated prenatally with diclofenac sodium.” Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Histology and Embryology, Master of Science Thesis, Van, 2019. In this study, expression of COX-2 was stereologically and immunohistochemically investigated by administering the diclofenac sodium which is a nonsteroidal antiinflammatory drug and as a COX-2 inhibitor during pregnancy of rats then by examining their fourth week offsprings' kidneys. Totally 12 adult albino female rats were divided into two groups as diclofenac sodium group as experimental group and control group. Diclofenac sodium was injected (1mg/kg) intraperitoneally to the diclofenac group on the fifth day of pregnancy. The control group did not undergo any procedures. Six diclofenac sodium groups and six control groups were formed from postnatal four-week-old rats. It was perfused under deep anesthesia and transferred to the formaldehyde. Routine tissue follow-up was performed. A total of 12 kidneys were collected from the diclofenac and control groups. After incubation, staining was performed. In the stereological examination of the preparations, the volume with point grid; Cell counting was performed with unbiased counting frame and Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. In immunohistochemical evaluation, staining intensities were evaluated by scoring technique; COX-2 expressions of postnatal rat kidneys of both groups were found at different concentrations of macular densa, proximal tubule, distal tubule, tubules in the cortex, tubules in the medulla, collecting tubules and glomeruli. It was observed that COX-2 staining levels were significantly higher in the macular densa and collector tubules of the two groups. In scoring method evaluation; In all other regions except macula densa, the mean dye density of the diclofenac group was lower than that of the control group; Proximal tubule, distal tubule and cortical tubule staining intensity was determined with a relatively different score compared to the control group. As a result of stereological calculations, nuance between two clusters ($p < 0.05$) was found statistically significant. Renal volume is higher in the kidneys of the diclofenac sodium group; control group's kidneys were found to have more cells penetrated by COX-2.

Keywords: Diclofenac Sodium, Prenatal Rat, Renal COX-2, Stereology

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Böbrek.....	4
2.1.1. Böbreğin gelişimi.....	4
2.1.2. Böbrek histolojisi.....	9
2.1.3. Fonksiyonel ilişkiler.....	13
2.2. Diklofenak Sodyum.....	17
2.2.1. Tanım.....	17
2.2.2. Etki mekanizması.....	17
2.2.3. Farmakokinetiği.....	18
2.2.4. Fiziksel ve kimyasal yapısı.....	18
2.3. Siklooksijenazlar.....	20
2.3.1. Eikozanoidler.....	20
2.3.2. Biyosentez.....	20
2.3.3. Siklooksijenaz yolu.....	21
2.3.4. Prostaglandinlerin etkileri.....	22
2.3.5. Siklooksijenaz inhibitörleri.....	23
2.4. Stereoloji.....	24
2.4.1. Stereolojik yöntemler.....	24
2.4.2. Cavalieri yöntemi.....	25
2.4.3. Disektör.....	30

3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Gereç.....	34
3.2. Yöntem.....	36
3.2.1. Histolojik doku takip işlemleri, kesit alma ve boyama.....	36
3.2.2. Hücre sayısının hücre izdüşüm sayısına göre analizi.....	38
3.2.3. İstatistiksel analiz.....	38
4. BULGULAR	39
4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	39
4.2. Hücre Sayısının Hücre İzdüşüm Sayısına Göre Analizi, Bulgular.....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
Sonuç ve öneriler	52
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	57
EKLER	58
EK 1. Etik Kurul Raporu.....	58
EK 2. Tez Orijinallik Raporu.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ASA	: Asetil Salisilik Asit
COX	: Siklooksijenaz
CR	: Kontrol Grubu Sağ Böbrek (Control Right)
DK	: Değişim Katsayısı
DR	: Diklofenak Grubu Sağ Böbrek (Diclofenac Right)
DS	: Diklofenak Sodyum
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HK	: Hata Katsayısı
IM	: Işık Mikroskobu
IOP	: İntraoküler Basınç
µm	: Mikrometre
MMPT	: Mitokondriyal Membran Permeabilite Transition
Noise	: Karmaşıklık Değeri
NSAİİ	: Nonsteroidal Antiinflamatuvar İlaç
PG	: Prostaglandin
PN	: Postnatal
SRÖ	: Sistemik Rastgele Örnekleme
SS	: Sodyum Salisilat
TXA₂	: Tromboksan
Ort	: Ortalama
VarSRÖ	: Toplam Alan Değişimi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Gelişimin farklı evrelerindeki embriyolara ait nefrik tübüllerin oluşumunu gösteren transvers kesitler. A. 21. gün, B. 25. gün.....	4
Şekil 2.	Intermediate mezodermin pronefrik, mezonefrik ve metanefrik sistemler arasındaki ilişki (A). Beş haftalık embriyoda pronefrik ve mezonefrik sistemlerin boşaltım tübülleri (B).....	5
Şekil 3.	Beş haftalık embriyonun alt torasik bölgesindeki ürogenital sırttan geçen ve mezonefrik sisteme ait bir boşaltım tübülünün oluşumunu gösteren transvers kesit (A). Gonad ve mezonefroz arasındaki ilişki (B).....	6
Şekil 4.	Beşinci hafta sonunda son barsak ve kloak arasındaki ilişki.....	7
Şekil 5.	Renal pelvis, kaliksler ve metanefrozun toplayıcı kanallarının gelişimi.....	8
Şekil 6.	Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi.....	9
Şekil 7.	Diklofenak sodyumun formülü.....	19
Şekil 8.	Araşidonik asit.....	21
Şekil 9.	Noktalı alan ölçüm cetveli.....	26
Şekil 10.	Paralel dilimlenmiş böbrek kesitleri.....	28
Şekil 11.	Fiziksel disektör uygulaması.....	31
Şekil 12.	Disektör örneklerinin sayısını arttırmak üzere, kesitlerin rolleri değiştirilerek iki yönlü bir disektör sayımı uygulaması.....	32
Şekil 13.	Ekran üzerine yerleştirilmiş bir tarafsız sayım çerçevesi.....	33
Şekil 14.	Deney hayvanları.....	35
Şekil 15.	Perfüzyon uygulaması.....	36
Şekil 16.	Kesit alınan mikrotom.....	37
Şekil 17.	Sayımda kullanılan fotoğraf ataçmanlı araştırma ışık mikroskobu...	37
Şekil 18.	DR2-3P, diklofenak grubu ikinci sağ böbreğin kesiti.....	39
Şekil 19.	CR1-1P, kontrol grubu birinci sağ böbreğin kesiti.....	44
Şekil 20.	CR4-3P, kontrol grubu dördüncü sağ böbreğin kesiti.....	45
Şekil 21.	DR2-3P, diklofenak grubu ikinci sağ böbreğin kesiti.....	45

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.	Diklofenak sodyum.....	19
Tablo 2.	Böbrek kesitlerinin immünokimyasal boyanma dereceleri.....	40
Tablo 3.	Kontrol ve diklofenak grubu böbreklerin HK değerleri.....	46
Tablo 4.	Kontrol ve diklofenak grubu böbreklerin DK değerleri.....	46
Tablo 5.	Grupların hacim ve hücre sayılarına göre karşılaştırılması.....	47



1. GİRİŞ

Dünyada en fazla antibiyotik, analjezik ve antiromatizmal ilaçlar kullanılmaktadır. Analjezik olarak sıklıkla kullanılanlardan biri de nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ)'dir. NSAİİ'lar yaygın olarak tüm dünyada kullanılmaktadır. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde günlük yaklaşık 36 milyon insanın reçetesiz ağrı kesici kullandığı; yıllık olarak 111 milyon NSAİİ'nin reçetelendirildiği tespit edilmiştir (Hersh ve ark., 2007). Bu ağrı kesici ve antiinflamatuvarlar, ABD'de özellikle yaşlı kesimlerce uygunsuz bir şekilde reçetelenen ilaçlar sınıfındadır (Pai, 2015).

ABD'de kırsal kadın popülasyonu tarafından ilaç kullanım kategorizasyonunun amaçlandığı bir çalışmada; görüşülen kadınlardan %15'inin gebelikte kontrendike olan Ibuprofen'in reçete edilmeksizin kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu sayede ağrı kesicilerin, özellikle kırsalda, denetimsiz bir şekilde kullanılabilirdiği gösterilmiştir (Glover ve ark., 2004). Bu sonuç ağrı kesiciler üzerinde yapılacak çalışmaların önemini göstermektedir.

Ülkemizde analjezik ilaçların kullanımı ile ilgili olarak, İç Anadolu'da, bir eğitim ve araştırma hastanesinde yapılan bir anket çalışmasında, hastanede çalışan hekimlerin NSAİİ reçete etme sıklığı ve daha çok tercih ettikleri ilaçlarla ilgili veriler toplanıp değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, NSAİİ reçete etme sıklığının polikliniklerde %34,5 olduğu tespit edilmiştir. Dahili ve cerrahi polikliniklerde çalışan hekimlere en çok reçetelendirdikleri analjezikler sorulmuş, diklofenak sodyumun dahili polikliniklerde %23, cerrahi polikliniklerde %26,1 olarak yazıldığı tespit edilmiştir. Burada bahsi geçen ilacın hastanelerimizde yaygın bir şekilde kullanıldığı hususunda bize bilgi sunmaktadır (Börekçi, 2017).

Diklofenak sodyumun gebelikteki etkilerini araştıran bir çalışmada, söz konusu ilacın, uterus üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırma neticesinde iki gruba ayrılan farelerden gebelik süresince ilaçlara maruz kalan farelerin uterus epitel ve seroza tabakalarının ilaç verilmeyenlere nazaran volümlerinin istatistiki açıdan anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bunlarla birlikte gebelik süresince bu ilaçların verildiği farelerin yavrularının endometriyumlarında değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir.

Dolayısıyla gebelik süresince bu ilaçların kullanımının özellikle itinayla seçilmesi gerektiği hususu vurgulanmıştır (Çölçimen ve ark., 2018).

NSAİİ'lar kadın doğum uzmanlarınca, özellikle erken doğum ve preeklampsiyi önleme gibi durumlar için kullanılır (Schoenfeld ve ark., 1992; Dawood, 2013). NSAİİ'lar gebelik sürecinde kullanıldığında, plasentayı geçip fetüse ulaştıklarından, embriyonal ve postnatal dönemlerde organlara zarar verebilmekte veya malformasyonlara neden olabilmektedir (Zenker ve ark, 1998). Olgun/erişkin insan böbreğinde NSAİİ kullanımından kaynaklı toksik etkiler postnatallarda da gözlenmiştir. Böbreğe olan toksik etkileri, mitokondriyal membran permeabilite transition (MMPT) indüklenmeleriyle ilişkilidir. Bu etki özellikle diklofenak grubu NSAİİ'larda gözlenmiştir (Uyemura ve ark., 1997).

Altunkaynak ve arkadaşlarının yaptığı histopatolojik bir çalışmada (2014), doğum öncesi diklofenak sodyuma maruz kalan yetişkin erkek farelerin böbreğindeki histopatolojik değişimler gözlenmiştir. Bu çalışmada gebe fareler iki gruba ayrılmıştır: İlaçlı grup ve kontrol grubu. Diklofenak grubuna intraperitoneal ilaç enjekte edilmiştir. Daha sonra bunların yavru erkekleri ayrıştırılmış, doğumlarından 12 hafta sonra tüm hayvanlardan böbrek dokuları alınmıştır. Rutin histolojik aşamalardan sonra ışık mikroskopuyla yapılan incelemede, diklofenak sodyum grubu farelerin böbreklerinin kan damarlarında ve Bowman boşluğunda bir genleşmenin; nefronlarda dejenerasyonun mevcudiyeti tespit edilmiştir. Çalışmada yapılan bu tespitten ötürü diklofenak sodyum kullanımının dilatasyon, tübüler defektler, inflamasyon ve bağlayıcı doku genişlemesinin bir sonucu olarak renal deformitelere sebebiyet verebileceği savunulmuştur.

Gebelik süresince uygulanan diklofenak sodyumun doğum sonrası etkilerini amaçlayan bir başka çalışmada (Gökçimen ve ark., 2001); karaciğer, böbrek ve testiküler dokular incelenmiştir. İki grup halinde incelenen hayvanlarla ilgili diklofenak sodyum grubunun gestasyonel periyodunun diğer kontrol grubuna nispeten daha uzun olduğu, diklofenak sodyum grubundaki farelerde periportal bölgede ılımlı bir genleşme, sinüzoidal dilatasyon, safra kanalı proliferasyonu, hepatositlerin çekirdeklerinde piknozis ve parankimal hücrelerde boşluklu dejenerasyon gözlenmiştir.

Hamile kadınların yaklaşık onda sekizinin gebelik süresince minimum bir defa reçetesiz ilaç kullandıkları ve konjenital defektlerin minimum 1/10'unda annenin hamilelik esnasında tükettiği ilaçlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir (Tillett ve Kostich, 2003). Analjezikler de bu grupta en çok kullanılan reçetesiz ilaçlardır (Dede ve ark., 2015). NSAİİ'lar en baskın etkilerini prostaglandin G/H sentaz olarak da bilinen siklooksijenaz (COX) enzim aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirirler. İki farklı COX izoenzimi klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Her biri farklı bir kromozom üzerinde ayrı bir gen tarafından kodlanmış membrana bağlı proteinlerdir. COX-2 normalde görülmeyen ve çeşitli uyarılara cevaben indüklenen bir izoform gibi değinilmesine karşın, COX-1 yapısal özellikleri ve ağırlıklı asli dağılımı neticesinden bir 'Housekeeping' izoformu gibi tanımlanmıştır (Warden, 2005).

COX izoenzimleri araşidonik asitten prostaglandinlerin (PG) oluşumunda hız kısıtlayıcı aşamasını katalize eder. PG'ler özel hücre membran reseptörleriyle etkileşim vasıtasıyla hücre-hücre arası iletişim için koordinasyonu yapan kısa ömürlü bir lipid mediyatör ailesidir. COX-1'in yapısal dağılımından fizyolojik koşullar altında prostaglandinlerin üretimi; homeostasis, renal hemodinamik ve gastrik mukozanın hücre korumasında önemli bir rol oynar. Buna karşın, indüklenmiş COX-2 ekspresyonundan meydana gelen PG'ler, kanser ve akut yaralanmaları izleyen inflamasyon gibi patolojik koşullarda meydana gelir. Dahası COX-2, çeşitli hücre tiplerinin katıldığı yangısal yanıtındaki sinyal yolağı boyunca hızlı bir şekilde indüklenir. PG'lerin sentezleri sonucu vazodilatasyona ve lokal vasküler permabilite artırımına neden olarak inflamasyonun yoğunluğu arttırdığı bildirilmiştir (Warden, 2005).

Özellikle COX-2 fonksiyonuna bağlı olarak böbreğin farklı bölümlerinde, COX-1'den farklı bir şekilde yerleşim gösterdiği bilinmektedir. Farelerde COX-2 gelişme süresince nefrogeneziste önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaç olan diklofenak sodyumun bir COX-2 inhibitörü olarak gebelik süresince uygulandıktan sonra doğan sıçanların dördüncü haftalarındaki böbreklerinde COX-2 ekspresyonunun stereolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması ve etkilerinin ortaya konması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

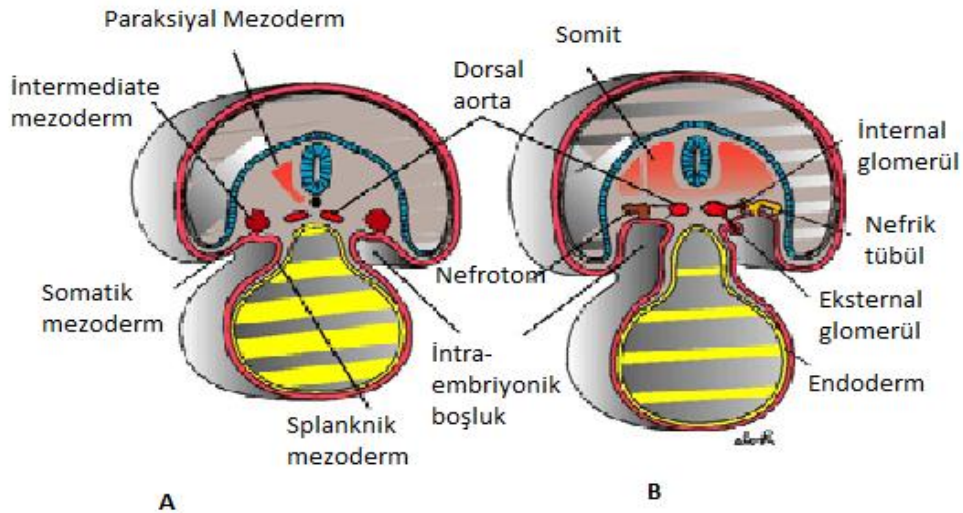
2.1. Böbrek

2.1.1. Böbreğin gelişimi

İnsanda uterus içi yaşam süresince, kranialden kaudale doğru, birbirinden farklı üç farklı böbrek tipi art arda ve bazı yönden de üst üste gelecek biçimde meydana gelir: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz. Bunlardan ilki rudimenterdir ve işlevi yoktur; ikinci sistem uterus içindeki hayatın erken devresinde uzun olmayan bir zaman işlevsel olabilir; üçüncüsü ise nihai böbrekler oluşur (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Pronefroz

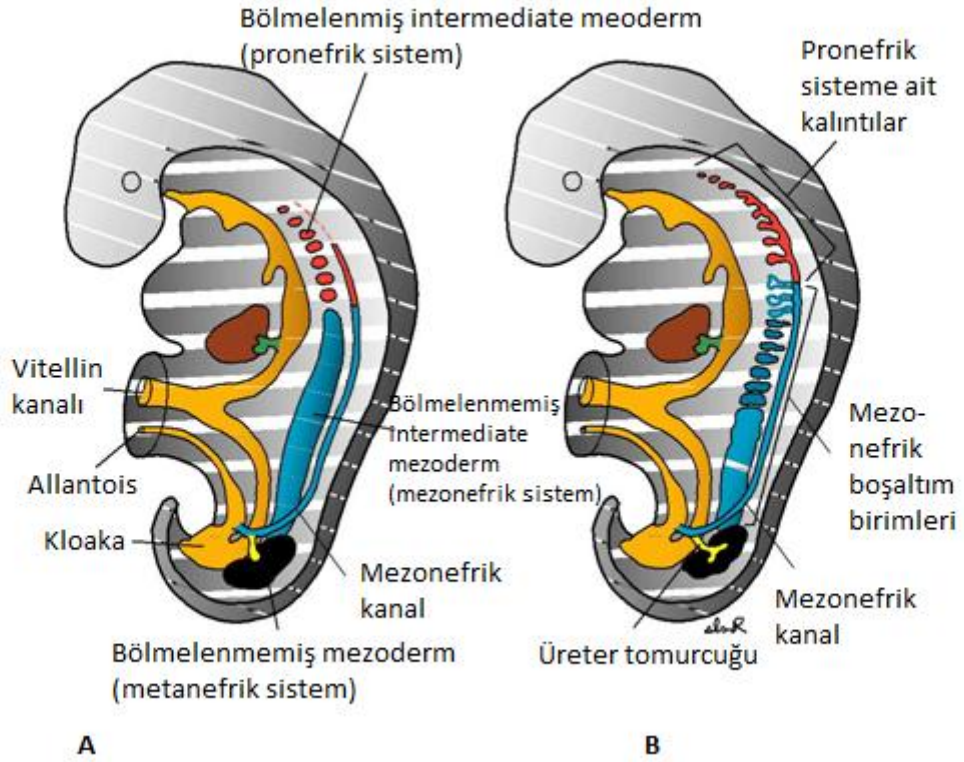
Pronefroz dördüncü haftanın başında, servikal bölgede yedi ile on arasında katı hücre birikimince görülür (Şekil 1 ve 2). Bu hücre grupları daha kaudalda olanlar oluşmadan gerileyen işlevsiz boşaltım birimlerini yani nefrotomları oluştururlar. Dördüncü haftanın sonunda pronefrik sisteme ilişkin tüm oluşumların izleri kaybolur (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).



Şekil 1. Gelişimin farklı evrelerindeki embriyolara ait nefrik tübüllerin oluşumunu gösteren transvers kesitler. A. 21. gün, B. 25. gün (Sadler, 2009).

Mezonefroz

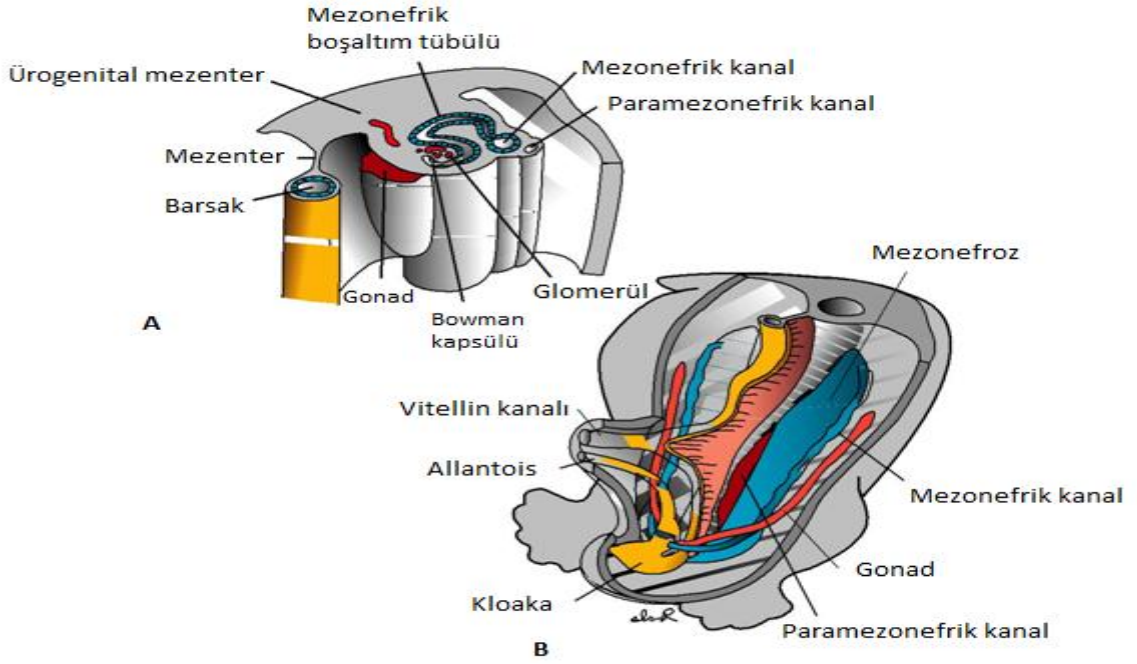
Mezonefroz ve mezonefrik arklar, üst torasik ile üst lumbar (L3) segmentlerin ara (intermediate) mezoderminden gelişirler (Şekil 2). Mezonefroza ait ilk boşaltım tübüleri gelişimin dördüncü haftası başlarında, yani pronefrik sistemin gerilemeye başladığı dönemde belirmeye başlarlar. Bu tübülerin boyu hızla uzar, kıvrılarak S şeklinde bir halka haline gelir ve medial uzantılarının ucunda kapiller bir yumaktan oluşan bir glomerül elde ederler (Şekil 3A). Tübüller glomerülün etrafında Bowman kapsülünü oluştururlar. Kapsül glomerülden oluşan yapıya renal korpüskül denir. Tübülüs lateralden, mezonefrik veya Wolffian kanalı diye tanınan uzunlamasına bir toplayıcı kanala açılır (Şekil 2 ve 3) (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).



Şekil 2. İntermediate mezoderm pronefrik, mezonefrik ve metanefrik sistemler arasındaki ilişki (A). Beş haftalık embriyoda pronefrik ve mezonefrik sistemlerin boşaltım tübüleri (B) (Sadler, 2009).

İkinci ayın ortasında, mezonefroz medyan çizginin tüm iki cephesinde iri ve yumurtamsı bir organ şekline dönüşür (Şekil 3). Bu esnada gelişmesi devam eden gonad da mezonefrozun ortasında bulunduğundan, bu iki organca meydana getirilen doku

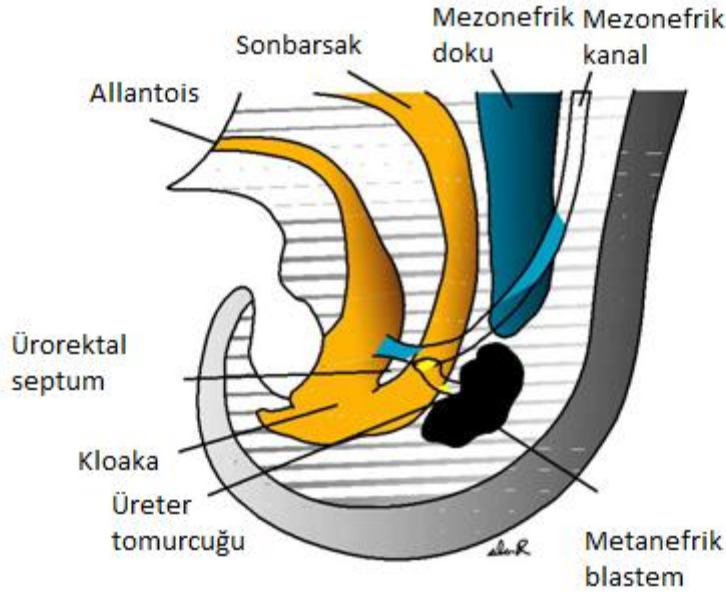
tümsekliğine ürogenital sırt denir (Şekil 3). Kaudaldeki borucuklar değişmeyi seyredirken, kranial tübüller ve glomerüllerin çoğunluğu gerileyerek ikinci ayın sonunda bütünüyle ortadan kalkarlar. Erkeklerde kaudaldeki borucukların bazıları ve mezonefrik ark üreme sisteminin meydana gelmesinde bulunmak amacıyla dururken, dişilerde bu yapılar bütünüyle yok olup giderler (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).



Şekil 3. Beş haftalık embriyonun alt torasik bölgesindeki ürogenital sırttan geçen ve mezonefrik sisteme ait bir boşaltım tübülünün oluşumunu gösteren transvers kesit (A). Gonad ve mezonefroz arasındaki ilişki (B) (Sadler, 2009).

Metanefroz: kalıcı böbrek

Üçüncü üriner, metanefroz veya nihai böbrek beşinci haftada ortaya çıkar. Mezonefrik tipte olduğu gibi, bu sistemin boşaltım birimi de metanefrik mezodermden gelişir (Şekil 4). Ancak kanal sisteminin gelişimi öbür böbrek sistemlerinden farklıdır (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).



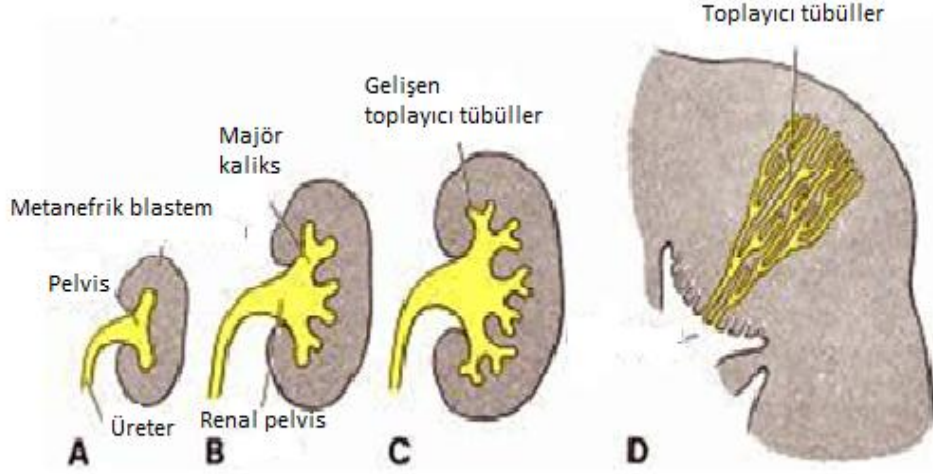
Şekil 4. Beşinci hafta ardında son barsak ve kloak arasındaki ilişki (Sadler, 2009).

Toplayıcı sistem

Kalıcı böbreğin toplayıcı kanalları, mezonefrik arkın kloakaya girdiği yere yakın bir noktada ortaya çıkan bir çıkıntıdan, üreter tomurcuğundan gelişir (Şekil 4). Bu tomurcuk, tomurcuğun distal ucuna bir şapka gibi oturmuş olan metanefrik dokuya penetre olur (Şekil 4). Nüfuz ettikten sonra üreter tomurcuğu genişleyerek ilkel böbrek pelvisini meydana getirir ve sonraki kaudal ve kranial kısımlara ayrılarak major kaliksleri meydana getirir (Şekil 5 A,B) (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Metanefrik dokuya penetre olmaları sırasında kalikslerin her biri de iki taze tomurcuk meydana getirir. Oluşan tomurcuklar 15 ve daha çok sayıda borucuk meydana getirene kadar ayrılmayı sürdürürler (Şekil 5). Bu sırada, beşinci ayın bitimine kadar çevresel yerlerde de bir miktar daha borucuk meydana gelir. İkinci nesildeki borucuklar genişleyerek, üç ve dördüncü neslin borucuklarını soğurarak böbrek leğenlerinin küçük kalikslerini meydana getirirler. Gelişmenin daha sonraki dönemlerinde, beşinci ve onun ardından gelen neslin toplayıcı borucukları anlamlı bir halde gerinirler ve küçük kalikslerin tepesinde birikerek renal piramitleri meydana getirirler (Şekil 5D). Kısaca,

üreter tomurcuğundan üreter, renal pelvis, majör ve minör kaliksler ve miktarı takribi bir ila üç milyon olan toplayıcı borucuklar büyür (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).



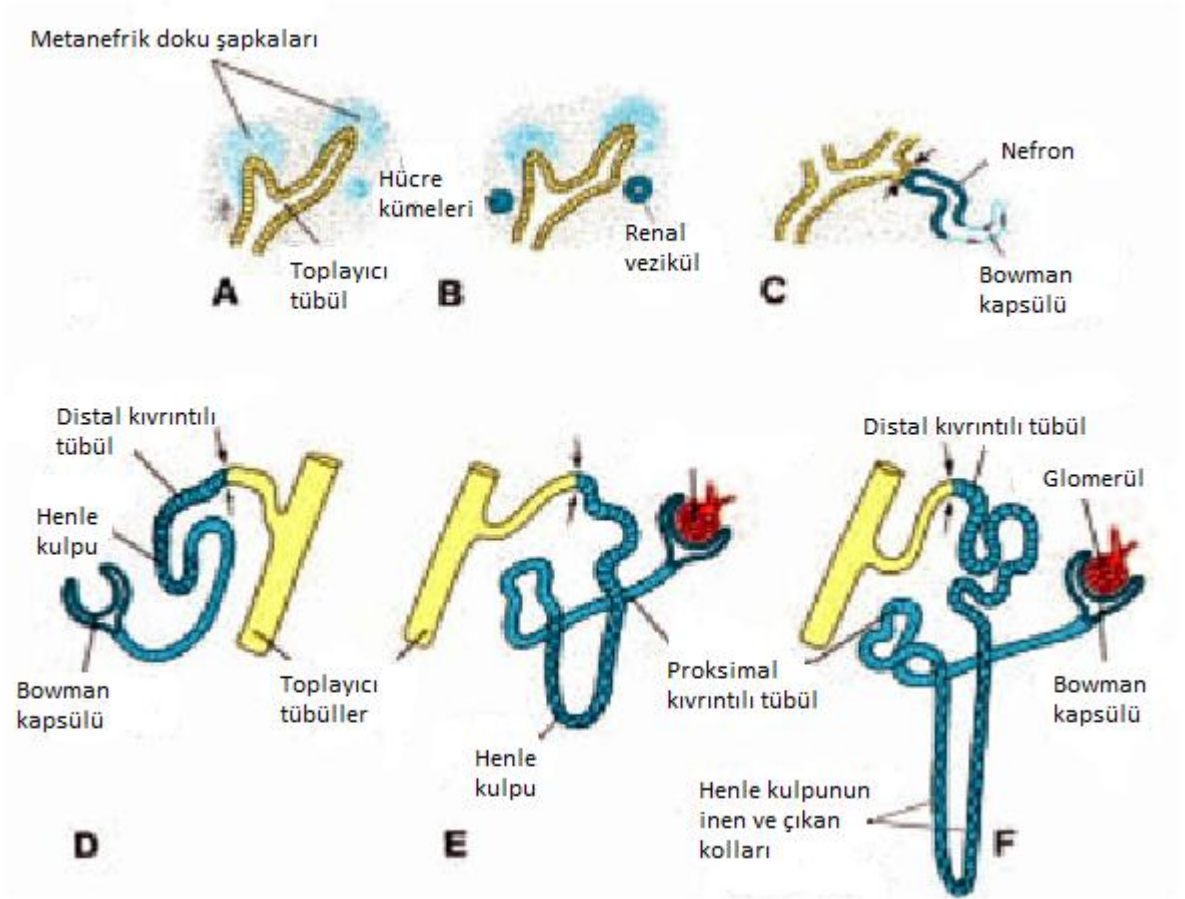
Şekil 5. Renal pelvis, kaliksler ve metanefrozun toplayıcı kanallarının gelişimi. A. Altıncı hafta, B. Altıncı haftanın sonu, C. Yedinci hafta, D. Yeni doğan (Sadler, 2009).

Boşaltım sistemi

Meydana gelen bütün yeni toplayıcı borucuğun merkezden uzak tarafı metanefrik bir doku şapkasıyla örtülür (Şekil 6A). Bahsedilen şapka içindeki hücreler, borucukların tetikleme marifetiyle renal vezikül diye tanınan ufak kesecikler meydana getirirler. Bu keseciklerden devamında S biçimli ufak borucuklar oluşacaktır (Şekil 6B,C). S'nin bir ucundaki cebin içine doğru büyüyen kapiller damarlar glomerüllere farklırlar. Tübüller glomerülleriyle birlikte nefronu veya boşaltım ünitesini meydana getirirler. Bütün nefronların merkeze yakın tarafları, glomerülce derinlemesine yaylandırılmış Bowman kapsülünü meydana getirir (Şekil 5C,D). Tübül distal kısmı ise, Bowman kapsülünden toplayıcı arklara gidişe yardımcı olacak tarzda, bu kolektörlerden biriyle temasa geçer. Boşaltıcı borucukların uzamalarını sürdürmeleriyle proksimal kıvrımlı borucuklar, Henle kulpu ve distal kıvrımlı borucukları oluşur (Şekil 6E,F). Özetle, renal oluşum iki ayrı kaynaktan gelişir: (a) ifrazat ünitelerinin meydana getirdiği

metanefrik mezoderm ve (b) toplayıcı düzenin vücuda geldiği üreter tomurcuğu (Sadler, 2009; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Nefronlar doğuma kadar oluşmaya devam ederler. Bebek doğduğunda her böbrekte yaklaşık bir milyon nefron bulunur. Böbrekler glomerüler kapillerin diferansiyasyonundan kısa bir süre sonra, gestasyonun 10. haftasından itibaren, idrar üretmeye başlarlar. Canlının doğumunda böbrekler lopçuk halindedirler. Süt çocukluğu evresinde nefronların gelişmelerini devam ettirerek büyümeleriyle beraber bu lopçuk görüntüleri yok olur. Fakat nefron miktarında artma meydana gelmez (Sadler, 2009; Eşrefoğlu, 2016).



Şekil 6. Metanefrik boşaltım biriminin gelişimi (Sadler, 2009).

2.1.2. Böbrek histolojisi

İri biçimleri fasulyeye benzeyen bu organlar, arka karın boşluğunun retroperitoneal aralıkta, omur sütununun her iki tarafında bulunmaktadır. On ikinci

torasik vertebradan (T12) üçüncü lomber vertebraya (L3) uzanırlar. Sağ böbreğin pozisyonu hafifçe daha aşağıdadır. Her böbrek yaklaşık 10 cm uzunluğunda, 6,5 cm genişliğinde (konkav kenardan konveks kenara), 3 cm kalınlığındadır (10cm x 6,5 cm x 3 cm). Böbrek üstü bezleri, vücuttaki iki böbreğin de üst kısmına yerleşmiş, renal fasiya ve koruma işlevi gerçekleştiren adipoz (yağ) dokusuna gömülmüş bezlerdir. Böbreğin orta tarafı içbükeydir ve içerisinden böbreğe ait sinirler ve damarların geçişlerinin olduğu, üreterin renal pelvis denilen genişleme göstermiş huni şekilli başlangıç kısmının gittiği hilus denilen yoğun dik bir fissür ihtiva eder. Böbrekten alınan kesit, böbrek hilusunda, renal sinus denilen kavitede bulunan bu yapılar arasındaki münasebetlerini sergiler. (Ross ve Pawlina, 2011; Eşrefoğlu, 2016).

Böbreklerin yüzeyleri bağ dokusundan meydana gelmiş bir kapsülce örtülmüştür. Kapsül iki katmandan meydana gelir: Fibroblastların ve kollojen fiberlerin meydana getirdiği dış katman ve hücresel bileşen olarak miyofibroblastların var olduğu iç katman. Miyofibroblastlarda bulunan kasılma özelliği, böbrek fonksiyonunda değişikliklere katılabilen ebat ve baskı değişikliklerine rezistans gösterimine yardımcı olabilir. Bununla birlikte spesifik rolü bilinmemektedir. Hilus bölgesinde içe dönen kapsül, sinüsü saran bağ dokusunu meydana getirdikten sonra renal pelvisin ve kalikslerin çeperini meydana getiren bağ dokusuyla ilerler (Ross ve Pawlina, 2011; Eşrefoğlu, 2016).

Koni biçiminde renal piramitleri içeren daha açık renkli kısmı olan medulada, her bir piramidin tabanı kortekse bakar ve kortikomedular sınırı oluşturur. Her bir piramidin yuvarlak tepesi renal papilayı oluşturmak üzere aşağıya renal pelvise doğru uzanır. Korteksin bir bölümü, renal kolonları oluşturmak için renal piramitlerin her iki yanına uzanır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Her bir renal papilla, idrarı papilladan toplayan huni biçimli bir minör kaliks ile çevrelenmiştir. Minör kaliksler majör kaliksleri oluşturmak üzere renal sinus içinde birleşirler. Ardı sıra majör kaliksler daha geniş huni biçimli renal pelvisi oluşturmak için birleşirler. Renal pelvis hilumdan böbreği terkeder, muskuler üreteri oluşturmak için daralır ve arka vücut duvarının iki yanı boyunca idrar kesesine doğru aşağı iner (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbreğin ürinifer tübüleri ve nefronları

Her bir böbreğin fonksiyonel birimi, bir nefron ve nefrondan süzölen içeriğın boşaldığı bir toplayıcı kanaldan oluşın mikroskobik ürinifer tübüdür. Her bir böbreğın korteksinde milyonlarca nefron bulunur. Nefron bir böbrek cisimciğı (renal korpüsköl) ve böbrek tübüleri olmak üzere iki bileşene ayrılır (Eroschenko, 2008; Eşrefoğlu, 2016).

İki tip nefron vardır: Bunlardan kortikal nefronlar böbrek korteksinde yer alır; jukstamedullar nefronlar ise korteks ile medullanın birleşme noktasına yakın yerleşmişlerdir. Tüm nefronlar idrar oluşurma fonksiyonuna katılır, ancak konsantre (hipertonik) idrar üretimi için gerekli olan böbrek medullasındaki intertisyel dokunun hipertonikliğini jukstamedullar nefronlar üretir (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek cisimcikleri

Böbrek cisimciğı (renal korpüsköl) glomeröl denilen bir kapiller yumağından ve bu kapiller yumağını kuşatan glomerölar (Bowman) kapsöl denen bir çift epitel tabakasından oluşur. Kapsölün iç ya da visseral yaprağı, ileri derecede değışikliğe uğramış dallanan epitel hücreleri olan podositlerden oluşur. Bu hücreler glomerölar kapillerle bitişiktir ve onu tamamen sararlar. Kapsölün dış ya da pariyetal yaprağı tek katlı yassı epitelden oluşur. Her bir böbrek cisimciğı kıvrımlı böbrek tübülüyle terkedilir (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek cisimciğı her nefronun başlangıç bölümüdür. Kan böbrek cisimciğinde glomeröl kapillerleri boyunca süzölür ve filtrat, glomerölar kapsölün visseral ve pariyetal yaprakları arasındaki kapsöl (idrar) boşluğuna girer. Her böbrek cisimciğı, glomerölü oluşuran arteriyal kan damarlarının girip çıktığı bir damar kutbuna sahiptir. Bunun karşıt ucu idrar kutbudur. Glomeröl tarafından üretilen filtrat, idrar kutbunda böbrek cisimciğini terkeder ve kıvrımlı böbrek tübülüne girer (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek cisimciğinde kanın süzölmesi glomerölar endotel tarafından kolaylaştırılmıştır. Glomeröl kapillerlerindeki endotel deliklidir (pencerelidir) ve

kandaki bir çok maddeye karşı oldukça geçirgendir; ancak kanın şekilli elemanlarına ve plazma proteinlerine karşı geçirgen değildir. Böylece, kapsül boşluğuna giren glomerüler filtrat idrar değildir. Proteinlerin yokluğu dışında, plazmaya benzeyen bir ultrafiltrattır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek tübülleri

İdrar kutbunda böbrek cisimciğini terkeden glomerüler filtrat, toplayıcı tübül olarak adlandırılan böbrek tübüllerine ulaşmadan önce nefronun farklı bölümleri boyunca akar. Glomerüler filtrat önce, glomerüler kapsülden toplayıcı tübüle doğru uzanan böbrek tübülüne girer. Bu böbrek tübülü, histolojik ve fonksiyonel olarak farklı bir kaç bölgeye sahiptir. Böbrek cisimciğinden başlayan böbrek tübülü parçası ileri derecede bükümlüdür, bu yüzden proksimal kıvrımlı tübül olarak tanımlanır. Başlangıçta bu tübül kortekste yer alır ve sonra Henle kulpuyla devam etmek üzere medullaya doğru iner. Henle kulpu bir kaç bölümden oluşur: proksimal kıvrımlı tübülün inen kısmı olan bir kalın parça; inen ve çıkan segmentleri olan bir ince parça; ve distal kıvrımlı tübülün çıkan kısmı olan bir kalın parça. Distal kıvrımlı tübül, proksimal kıvrımlı tübülünden daha kısadır ve daha az kıvrıntılıdır ve böbrek korteksine doğru çıkar. Glomerüler filtrat sonra, distal kıvrımlı tübülünden toplayıcı tübüle akar. Jukstamedullar nefronlarda Henle kulpu çok uzundur; böbrek korteksinden medullanın derinliklerine doğru iner ve sonra geriye kıvrılarak kortekse çıkar (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Toplayıcı tübül nefronun bölümü değildir. Çok sayıda kısa toplayıcı tübül, bir kaç tane daha geniş toplayıcı kanal oluşturmak için birleşir. Toplayıcı kanallar medullanın papillarına doğru indikçe daha da genişler ve papillar kanallar adını alır. Daha küçük toplayıcı kanallar açık renkte boyanan kübik epitelle örtülüdür. Medullanın daha derin kısımlarında, bu kanalların epiteli prizmatik epitele değişir. Her papillanın tepesinde, papillar kanallar içeriklerini minör kalikse boşaltırlar. Papilla üzerinde, papillar kanalın açılma noktalarını sergileyen alan area kribroza olarak adlandırılır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek korteksinde ayrıca, piramitlerin tabanından dik olarak kortekse uzanan daha soluk boyanan çok sayıda medulla ışınları bulunur. Medulla ışınları başlıca

toplayıcı kanallardan, kan damarlarından ve birçok nefronun düz kısımlarından oluşur (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

2.1.3. Fonksiyonel ilişkiler

Böbrek

Böbrekler homeostazisi sağlayan yaşamsal organlardır. Kan basıncını, kan kompozisyonunu ve vücudun sıvı hacmini düzenlerler. Ayrıca idrar üretir ve asit-baz dengesini sağlarlar. Böbreklerde idrar oluşumu, üç ana işlemi gerektirir: Glomerüllerde kanın filtrasyonu, besinlerin ve diğer yararlı maddelerin filtrattan reabsorpsiyonu ve metabolik artık ürünlerin ve/veya istenmeyen kimyasalların ya da maddelerin filtrat içine sekresyonu ya da ekskresyonu (atılması) (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek hücreleri renin ve eritropoitein olmak üzere iki önemli hormon üretir. Renin, böbrek glomerüllerinde uygun filtrasyon basıncını sağlamak için kan basıncını düzenler. Peritübüler kapiller ağının endotel hücreleri tarafından üretildiğine ve salındığına inanılan eritropoitein, kırmızı kemik iliğinde eritrosit yapımını uyarır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Böbrek tübülleri

Bütün nefronlar idrarın oluşturulmasında rol alır. Glomerüler filtrattan çoğu maddelerin geri emilimi, proksimal kıvrımlı tübülde gerçekleşir. Proksimal kıvrımlı tübül hücreleri, aralarında çok sayıda uzun mitokondrilerin bulunduğu, bazal hücre membranına ait sayısız derin katlantılar gösterir. Bu özellikler, moleküllerin ve/veya elektrolitlerin aktif transportunda rol alan hücreleri karakterize eder. Mitokondriler, sodyum gibi iyonları filtrattan hücre membranının öte yanına interstisyel dokuya pompalamak için gereken ATP'yi sağlar (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Podositlere ve endotel hücrelerine ek olarak, glomerüler kapillerler mezangial hücreler olarak adlandırılmış özelleşmiş hücreleri de içerirler. İdrar süzülürken, birçok makromolekül glomerülün bazal laminasında takılıp kalır. Bu engele takılıp kalan

makromoleküller, süzücü membranı tıkeyabilir. Mezangial hücreler, glomerül içi bölgelerde makrofajlar gibi davranır; filtrasyon sırasında bazal laminada biriken madde parçacıklarını fagosite ederler (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Glomerular filtrat proksimal kıvrımlı tübüle geldikçe, glukozun tümü, proteinler ve aminoasitler, karbonhidratların hemen hemen hepsi, suyun yaklaşık olarak %75-80'i ve sodyum klorid iyonları, glomerular filtrattan çevredeki peritübüler kapillerlere emilir. Proksimal kıvrımlı tübül hücrelerin yüzeyinde mikrovillusların (firçamsı kenar) varlığı, onların yüzeyini ileri derecede arttırır ve süzölmüş materyalin geri emilimini kolaylaştırır. Ayrıca, proksimal kıvrımlı tübüller belli metabolitleri, hidrojeni, amonyumu, boyaları ve ilaçları (örneğin penisilin) vücuttan glomerular filtrat içine salar. Metabolik artık ürünler olan üre ve ürik asit proksimal kıvrımlı tübüller kalır ve idrar içinde vücuttan uzaklaştırılır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Henle kulpu, böbreğin korteksinden renal papillaların tepesine doğru bir ozmotik gradiyent oluşturarak hipertonic idrar üretir. Sodyum klorid ve üre, medullanın derin kısımlarında yüksek interstisyel ozmolarite oluşturan kompleks bir karşılıklı akım artırıcı sistem aracılığı ile medullanın interstisyel dokusuna taşınır ve orada yoğunlaştırılır. Medulladaki ekstrasellüler sıvının hipertonic olması bu tübüllerde akan glomerular filtrattan suyu uzaklaştırır. Jukstamedullar Henle kulpu çok uzundur, medullanın derinliklerine uzanır ve suyun filtrattan interstisyel (ara) dokuya çıkarılması için gereken yüksek ozmotik gradiyenti sağlamaya yardım eder (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Distal kıvrımlı tübüller, proksimal kıvrımlı tübüllerden daha kısadır ve daha az kıvrımlıdır. Distal kıvrımlı tübül hücrelerinin bazolateral membranları, iki elin iç içe geçmiş parmakları gibi kenetlenmeler gösterir ve bu membran kalıntıları içinde ince uzun mitokondriler vardır. Distal kıvrımlı tübülün asıl fonksiyonu, tübüller filtrattan sodyum iyonlarını aktif olarak geri emmektir. Bu iş direkt olarak, hidrojen ve potasyum iyonlarının tübüller sıvı içine verilmesiyle bağlantılıdır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Distal kıvrımlı tübüllerde sodyumun yeniden emilmesi, adrenal korteksten salgılanan aldesteron hormonu tarafından kontrol edilir. Aldesteron varlığında, distal

kıvrımlı tübül hücreleri sodyum ve klorid iyonlarını filtrattan aktif olarak emer ve onları hücre membranının öte tarafına, peritübüler kapillerler tarafından emilerek vücuda geri döndükleri yer olan interstisyuma taşır. Böylece, distal kıvrımlı tübüllerin fonksiyonları, vücut sıvılarının asit-baz dengesini sağlamak için yaşamsaldır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Jukstaglomerüler aparat (aygıt)

Distal kıvrımlı tübüle ve böbrek cisimciğine bitişik, jukstaglomerüler aparat olarak adlandırılan özel bir hücre grubu bulunur. Bu aparat, jukstaglomerüler hücreler ve makula densa olmak üzere iki bileşenden oluşur (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Jukstaglomerüler hücreler, afferent arteriolün, glomerülü oluşturmak için glomerüler kapsüle girmeden hemen önce, duvarında yer alan değişikliğe uğramış düz kas hücrelerinin bir topluluğudur. Bu hücrelerin sitoplazması, renin enziminin membranla sarılı salgı granüllerini içerir. Makula densa, distal kıvrımlı tübülün değişikliğe uğramış hücrelerinin bir grubudur. Makula densa hücreleri ve jukstaglomerüler hücreler ince bir bazal membranla ayrılmıştır. Jukstaglomerüler hücrelerin makula densaya yakınlığı, onların fonksiyonlarının bütünleşmesine olanak tanır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Jukstaglomerüler aparatın ana fonksiyonu, glomerüler filtrasyon için böbrekte normal kan basıncını sağlamaktır. Bu aparatın hücreleri baroreseptörler ve kemoreseptörler olarak iş görür. Jukstaglomerüler hücreler, aferent arteriyol duvarındaki gerilmeye tepki vererek, sistemik kan basıncındaki değişiklikleri izler. Makula densadaki hücreler olasılıkla, glomerüler filtrat distal kıvrımlı tübül içinden akıp geçerken onun hacmindeki ve sodyum klorid yoğunluğundaki değişikliklere yanıt verirler (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Sistemik kan basıncındaki bir azalma ve/veya filtrattaki sodyum yoğunluğunda bir azalma jukstaglomerüler hücreleri, kan dolaşımına renin enzimini salmaları için uyarır. Renin, plazma proteini olan anjiyotensinojeni anjiyotensin-I'e çevirir, ardından bu da akciğer kapillerlerinin endotel hücrelerindeki bir başka enzimce anjiyotensin-II'ye

dönüştürülür. Anjiyotensin-II, aktif bir hormon ve arteriyal konstriksiyon (daralma, büzülme) yaparak sistemik kan basıncını artıran güçlü bir vazokonstriktördür (damar daraltıcı). Buna ek olarak anjiyotensin-II adrenal bez korteksinden aldosteron hormonunun salınmasını uyarır (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Aldosteron başlıca, glomerüler filtrattan sodyum ve klorid iyonlarının geri emilimini artırmak üzere distal kıvrımlı tübül hücrelerine etki eder. Su, ozmoz yoluyla sodyum kloridi takip eder ve dolaşım sistemindeki sıvı hacmi artar. Bu etkiler birlikte sistemik kan basıncını yükseltir, böbrekteki glomerüler filtrasyon oranını artırır ve daha sonraki renin salınımı için gereksinimi ortadan kaldırır. Aldosteron ayrıca, potasyum ve hidrojen iyonlarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırır ve vücutta elektrolit dengesinin sağlanması için gerekli temel bir hormondur (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Toplayıcı tübüller, toplayıcı kanallar ve antidiüretik hormon

Glomerüler filtrat, distal kıvrımlı tübülden toplayıcı tübüllere ve toplayıcı kanallara akar. Normal koşullar altında, bu tübüller suya geçirgen değildir. Ancak vücutta aşırı su kaybı olduğunda ya da dehidratasyon sırasında, azalmış su seviyesine yanıt olarak hipofizin arka lobundan (nörohipofiz) antidiüretik hormon (ADH) salınır. Bu hormon toplayıcı tübüllerin ve toplayıcı kanalların epitelin suya karşı oldukça fazla geçirgen olmasına neden olur. Sonuç olarak su, kanalları terk eder ve hipertonic interstisyuma girer. Su, interstisyumda toplanır ve peritübüler kapillerler aracılığıyla genel dolaşıma döner; toplayıcı kanallardaki glomerüler filtrat hipertonic idrar haline gelir (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

Dolaşımda ADH yokluğunda, toplayıcı tübül hücreleri suya geçirgen olmaz ve toplayıcı tübüllerde fazla hacimde su kalır. Sonuç olarak, idrar çok miktarda su içerir (Eroschenko, 2008; Dudek, 2016; Gartner, 2016).

2.2. Diklofenak Sodyum

2.2.1. Tanım

Diklofenak değişik farmasötik dozaj şekillerinde pazarlanan asetik asit türevi nonsteroidal antiinflamatuar (NSAİİ) bir ilaçtır. Sodyum tuzu olan diklofenak sodyumun gecikmeli ve normal dağılım gösteren (retard) tablet şekilleri mevcuttur. Diğer NSAİİ'lar gibi diklofenak da ağrıkesici ve ateş düşürücü etkiler sergiler. Potasyum tuzu olan diklofenak sodyumun normal dağılım gösteren draje veya tablet şekilleri ağrı ve dismenore tedavisinde endikedir. Oftalmik diklofenak sodyum katarakt ekstraksiyonundan sonra oküler enflamasyonun tedavisinde kullanılır. Gecikmeli salıveren tablet formu osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit tedavisinde kullanılır. %3'lük jeli aktinik keratoz tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2000 yılında onaylanmıştır. (Willkens, 1985; Small, 1989).

2.2.2. Etki mekanizması

Diklofenak antiinflamatuar etkisini prostaglandin sentezi için gerekli siklooksijenaz enzimini inhibe ederek gösterir. Ayrıca lökositlerin migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir; antiinflamatuar aktivitesinde bu etkisi de rol oynayabilir. Diklofenak NSAİİ'nın çoğu gibi ağrı eşiğini değiştirmez; analjezik etkileri büyük olasılıkla periferik aktivitesine bağlıdır. Antipiretik etkisi hipotalamustaki santral aktivitesi sonucu oluşan vazodilatasyona bağlı olabilir; sonuçta cilde giden kan akımı artar ve vücutta buna bağlı ısı kaybı olur. Prostaglandin sentezinin inhibisyonu böbrek fonksiyonunda ve gastrik mukozanın sitoproteksiyonunda azalmaya ve trombosit agregasyonunda inhibisyona neden olabilir (Willkens, 1985; Small, 1989).

Oftalmik NSAİİ'lar oküler cerrahi esnasında kolinerjik mekanizmalardan bağımsız olarak miyotik cevabı cevabı inhibe ederler. Diklofenak intraoküler basınç (IOP) üzerinde önemli bir etki yapmamasına rağmen, oftalmik NSAİİ'lar IOP'ta bir azalma meydana getirebilirler (Willkens, 1985; Small, 1989).

2.2.3. Farmakokinetiği

Diklofenak oral yoldan veya oftalmik çözelti halinde kullanılır. Tabletleri hızlı ve gecikmeli salıveren iki farklı formda üretilir. Oral yoldan verildiğinde gastrointestinal kanaldan tamamına yakın absorbe edilir. Karaciğerde büyük oranda ilk geçiş metabolizmasına uğradığı için biyoyararlanımı %50-60 civarındadır. Enterik kaplı tabletleri veya besinlerle birlikte alınması absorpsiyon hızını yavaşlatır, fakat absorpsiyon kapsamını etkilemez. Antiasitlerle birlikte alınması doruk konsantrasyona ulaşma zamanını etkiler. Doruk plazma konsantrasyonlarına gecikmeli salıveren potasyum tuzunun verilmesinden yaklaşık bir saat sonra (0.33-2 saat arası) ulaşılır. İki dozaj formu arasında doruk konsantrasyona ulaşma zamanı bakımından var olan bu farklılık, her ikisinin farklı endikasyonlarda kullanılmasının temelini oluşturur: Diklofenak sodyumun gecikmeli salıveren formu artrit olgularının tedavisinde kullanılırken, diklofenak potasyum ağrı ve dismenore tedavisi için endikedir (Willkens, 1985; Small, 1989).

Diklofenak vücutta geniş ölçüde dağılır; sinoviyal sıvıya önemli ölçüde geçer. Proteinlere yaklaşık olarak %99 oranında bağlanır. Anne sütüne önemli ölçüde geçmez. Karaciğerde kapsamlı ve hızlı hidrosilasyon ve konjugasyona uğrar. Eliminasyon yarı ömrü oral yoldan verildiğinde yaklaşık 1-2 saattir. Ciddi renal yetmezliği olan hastalarda yarı ömrü uzar, fakat bu genelde doz ayarlamasını gerektirmez. Hepatik yetmezlik klirensini etkilemez, ancak metabolitlerinin klirensini azaltabilir. Verilen dozunun %50-70'i idrar ve %30-35'i feçesle 96 saat içerisinde atılır. %1'den daha küçük bir kısmı değişmeden, geri kalanı ise metabolitleri veya konjuganları halinde idrarla atılır. Diklofenak safra yoluyla da atılır (Willkens, 1985; Small, 1989).

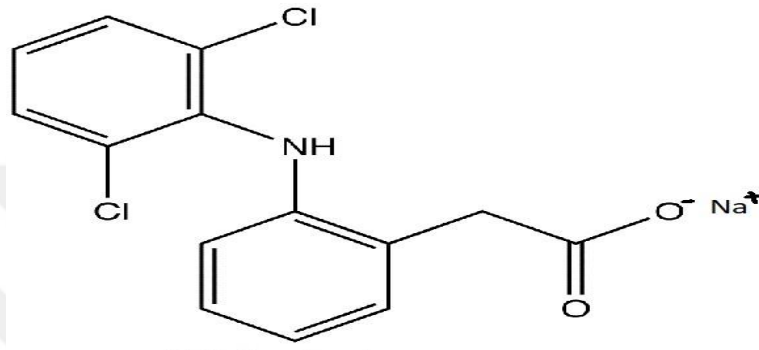
2.2.4. Fiziksel ve kimyasal yapısı

İngilizce: Sodium (2-(2,6-dichloroanilino) phenyl) acetate

Türkçe: Sodyum (2-(2,6-dikloroanilino) fenil) asetat

Tablo 1. Diklofenak sodyum.

Molekül Ağırlığı	318.13
CAS No	15307-79-6
EINECS	239-346-4
Kapalı Formülü	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$



Diklofenak sodyum

Şekil 7. Diklofenak sodyumun formülü (Small, 1989).

Rengi açık sarı ile beyaz arasında olan diklofenak sodyum, higroskopik, kristal gibi bir tozdur. Suda az çözünür; alkolde çözünür; asetonda hafifçe çözünür; eterde pratik olarak çözünmez; metil alkolde serbestçe çözünür (Willkens, 1985; Small, 1989).

Saklama Koşulları: Diklofenak sodyum uygun saklama koşulları için, hava geçirmeye dayanıklı kaptaki olmak üzere 30°C'den düşük oda sıcaklığı içerisinde korunmalıdır. Işığa karşı muhafaza edilmelidir (Small, 1989; Willkens, 1985).

Böbrek Yetmezliği: Orta dereceli böbrek yetmezliği kullanımından kaçınılmalıdır. Diklofenak orta derecede veya şiddetli renal yetmezlik durumunda mümkün olduğunca kullanılmamalıdır. Hafif böbrek yetmezliğinde doz azaltılmalıdır. Diklofenak hafif renal yetmezlik durumunda en düşük dozda kullanılmalı ve hastanın böbrek fonksiyonları izlenmelidir. Aksi halde su ve sodyum retansiyonu ve renal yetmezliğe kadar varabilecek şekilde gelişen renal fonksiyon bozukluğu görülebilir. Renal bozukluk topikal kullanım sonrasında da görülebilir (Willkens, 1985; Small, 1989).

2.3. Siklooksijenazlar

2.3.1. Eikozanoidler

1930'da Von Euler'in prostat bezinde bulduğu ve buradan esinlenerek prostaglandin adını verdiği maddenin düz kasları kastiğını göstermesinden sonra 1960'ların başlarında Bergström tarafından yapıları ve biyolojik etkileri tanımlanmıştır. Daha sonra prostasiklin, tromboksanlar, lökotrienler ve lipoksinlerin bulunmasıyla bu grup maddeleri eikozanoidler (Yunanca-20 = Eikol) adı altında toplanmışlardır (Dökmeçi, 2000).

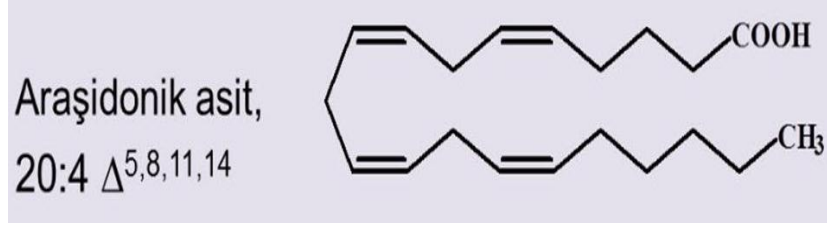
Eikozanoidler dört çift bağı olan 20 karbon atomlu bir siklopentan halkası ve ona bağlı doymamış yağ asitlerinin oksitlenmiş ürünüdürler. Eikozanoidlerin numaralanmaları yağ asidi prekürsörlerinden türeyen yan zincirler alkil grubunda bulunan çift bağın sayısına göre olmaktadır. Eikozanoidler vücutta tüm doku ve sıvılarda yaygın olarak bulunmaktadır. Çeşitli uyarımlarla sentezlenmeleri artar. Salıverildikleri hücrede ya da yakın çevresindeki hücrelerde lokal hormon olarak etki gösterirler. Hücrede depolanmazlar, sentezlendikten hemen sonra serbestlenirler (Dökmeçi, 2000).

Araşidonik asit membran fosfolipidlerinden fosfolipaz A₂ enzimi aracılığıyla ayrılır ve daha sonra siklooksijenaz, lipooksijenaz ve epoksijenazlar olmak üzere başlıca üç oksidatif yolak aracılığı ile dokulara bağlı olarak spesifik son ürünlere dönüşür (Dökmeçi, 2000).

Prostanoik asit türevi (Prostanoidler) olan prostaglandinler (PG) siklopentan halkasındaki değişikliklere göre büyük harf E, F, I, H vb. ile adlandırılırlar. Rakamlar, halkaya bağlı iki zincirde bulunan çift bağları α ve β harfleri de izomerleri belirtir (Dökmeçi, 2000).

2.3.2. Biyosentez

Eikozanoidlerin biyosentezi araşidonik asit serbestlenmesi ve aktif maddeye dönüşmesi şeklinde iki fazda oluşur (Dökmeçi, 2000)



Şekil 8. Araşidonik asit (Dökmeci, 2000).

Organizmada yağ asitleri membran fosfolipidleri (fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol) içinde büyük ölçüde birleşmiş halde bulunurlar. Metabolize olmak için yağ asitlerinin fosfolipidlerden serbestlenmesi gerekir (Dökmeci, 2000).

Yağ asitlerinin serbestlenmesinden sorumlu enzimlerden birisi fosfolipaz A₂ 'dir. Bu enzim aktivitesi glikokortikoidlerin etkisi altında serbestlenen lipokortinler tarafından inhibe edilir. Fosfolipidler üzerinde farklı yerlere etkiyen bir çok fosfolipaz bulunmaktadır (Dökmeci, 2000).

Araşidonik asit demirli metallo-metallo enzimler olan siklooksijenazlar ve lipooksijenazlar tarafından oksitlenir (Dökmeci, 2000).

2.3.3 Siklooksijenaz yolu

Siklooksijenazlar tarafından araşidonik asidin oksidasyonu, prostanoidler adı verilen PGE₂ , PGF₂ , PGI₂ (Prostasiklin ve epoprostenol diye adlandırılmaktadır) ve tromboksanların (TXA₂) prostaglandinlerin orijini olan PGH₂ ve PGB₂ endoperoksidlerin oluşmasına neden olur. Siklooksijenazlar mide, böbrek ve trombositlerde bulunan tip I (COX-1) ve fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler ve uterusunda bulunan tip II (COX-2) olarak ayrılırlar. Tip II siklooksijenazlar sitokinler ve mitojen maddeler tarafından indüklenir (Dökmeci, 2000).

Siklooksijenazların iki tipi de aspirin ve steroid olmayan antiinflamatuvar diğer ilaçlarla inhibe edilirler. Siklooksijenazların bu iki tipinden birinin ya da diğerinin spesifik inhibitörlerinin bulunması için çalışmalar devam etmektedir (Dökmeci, 2000).

Prostaglandinlerin biyosentezi tüm dokularda aynı şekilde olmamaktadır. Örneğin; tromboksanların, tromboksan sentaz etkisiyle sentezlenmesi trombositlerde olduğu halde prostaglandinlerin ve prostasiklinin vasküler endotelyumda olmaktadır (Dökmeçi, 2000).

Damar ve kapiler endotelyumuna yerleşik olan prostasiklin sentaz enzimi burada PGH_2 'yi instabil prostasikline (PGI_2) ve daha sonra da keto6-keto $PGF_1 \alpha$ 'ya dönüştürür (Dökmeçi, 2000).

Trombositlerde bulunan tromboksan sentaz PGH_2 'yi tromboksan A_2 (TXA_2)'ye dönüştürmektedir (Dökmeçi, 2000).

2.3.4. Prostaglandinlerin etkileri

PGE ve PGI_2 genellikle olumlu etkiler oluştururlar. Bu etkilerden başlıcaları:

- Vazodilatasyon
- Trombositler antiagregan etki

- PGE ve özellikle PGI_2 bilinmeyen bir mekanizmayla miyokard infarktüsünün şiddetini/tehlikesini azaltmaktadır. Aynı zamanda aterom gelişmesini de engellemektedirler.

- Böbrek kan debisini artırır.
- Gastrik salgılanmayı inhibe ederler.
- Bronkodilatördürler.

-İnterlökin-1B ve $TNF\alpha$ gibi sitokinler tarafından salgılanması uyarılan $PGF_2 \alpha$ ateş oluşmasının kaynağıdır. Ayrıca bazı hipotermi olgularında PGI_2 sentezinde bir yetmezlik olduğu da gösterilmiştir.

-Bazı prostaglandinler uyku düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar: PGE_2 uyanıklığa katkıda bulunmasına karşın PGD_2 uykuyu kolaylaştırmaktadır.

-Gebe kadında, serviks uteri genişlemesini ve uterus kasılmalarını kolaylaştırırlar. Doğum sırasında anne kanında ve amniotik sıvıda prostaglandin düzeyi yüksektir. PGF₂ α dölleme olmadığı durumlarda corpus luteum gerilemesine (Luteoliz) yol açar.

-Fetüste arteriyel kanal ya da ductus arteriosusun açık kalmasını sağlarlar. NSAİİ tarafından sentezlerinin inhibe edilmesi kapanmayı hızlandırabilmektedir (normalde doğumdan 24 saat sonra olur).

-Bunlara karşı PGE₂ baş ağrılarına neden olabilmektedir (Dökmeci, 2000).

Araşidonik asit metabolizmasında etkili ilaçlar

Prostaglandinler ve lökotrienler çok sayıda olumsuz etkilere neden olurlar. Farmakolojik yönden bunların sentezini inhibe eden maddeler bulunmuş olup tedavide kullanılmaktadır. Ancak etkilerini inhibe edebilen antagonistler henüz bulunmuş değildir. Araşidonik asit metabolizmasında rol oynayan çeşitli spesifik enzimleri inhibe eden birçok madde vardır (Dökmeci, 2000).

2.3.5. Siklooksijenaz inhibitörleri

Günümüzde tedavide kullanılan çok sayıda siklooksijenaz enzim inhibitörü ilaç bulunmaktadır. Bunlar steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) adı altında toplanırlar (Dökmeci, 2000).

Son yıllarda siklooksijenaz enziminin iki izoform şeklinde bulunduğu ortaya çıkarılmıştır; Tip I (yapıcı şekil) ya da COX-1 ve Tip II (indükleyici şekil) ya da COX-2. Tip I siklooksijenaz trombositler, damar endotelyumu, gastrik mukoza ve böbreklerde daha yoğun bir şekilde bulunmasına karşın, tip II siklooksijenaz inflamasyon reaksiyonları sırasında sitokinlerin ya da diğer inflamasyon mediyatörlerinin (mitojenler, endotoksinler) etkisiyle meydana gelmektedirler. Bu nedenle COX-2'nin selektif olarak inhibe edilmesi NSAİİ'lerin yarar/zarar oranını olumlu yönde etkilemektedir. Çünkü antiinflamatuvar (COX-2) etkinlikleri artmasına karşın gastrointestinal (COX-1) yan etkileri azalmaktadır. Siklooksijenaz enziminin bu iki izoformunun ortaya çıkarılmasından sonra COX-2 için selektif yeni NSAİİ'lerin

bulunması için çalışmalar hızlandırılmıştır. Asetil salisilik asit'in COX-1 üzerine etkisi COX-2 üzerine olan etkisinden 20-50 kez daha fazla olup, diğer NSAİİ (Diklofenak, naproksen, indometasin, ibuprofen, sulindak vb.)'lar ise ya COX-1 üzerine daha etkili ya da her iki izoform üzerine eşdeğer etkilidirler. Son yıllarda tedaviye sokulan meloksikam, nabumeton gibi yeni kuşak NSAİİ'ların COX-2 üzerine seçicilikleri daha fazladır (Dökmeci, 2000).

2.4. Stereoloji

2.4.1. Stereolojik yöntemler

Stereoloji, üç boyutlu örneklerin (biyolojik yapı, metalurjik örnek vb.) iki boyutlu kesitlerden alınan bilgilere istinat edilerek, bu örneklerin gerçekteki üç düzlemlilikleriyle ilgili değerlendirilmesini sağlayan bilimdir (Baddeley, 1991).

Stereolojik yöntemlerin esasını "Sistemik Rastgele Örneklem" (SRÖ) izlemi oluşturmaktadır. Bu örneklerle açıklama şeklinin ana özelliği, bilim adamının üzerinde çalışmayı düşündüğü yapıdan örnek tedarik etmenin ihtiyaç olduğu zamanlarda, hedef uzaydaki her alanın çalışmaya alınma olasılığına sahip olmasını sağlamaktır. Biyoloji bilimine has unsurlar, genel olarak, ihtiva ettikleri ve araştırma yapan için araştırma mevzusu olan komponentlerinin (hücreler, çekirdekler, veziküller vb.) baya iri olmalarından, çalışılan yapıya ait oluşturulan bütün parçaların araştırmaya eklenerek yorumlanması, işlevsellik açısından mümkün değildir. Mesela, insana ait neokorteksteki total sinir hücresi miktarını bulmaya yönelik bir araştırma için, hücre miktarı hesaplanacak binlerce histolojik kesit teker teker incelenme işlemi pek mümkün olamaz. Böyle bir halde alınacak olası örnekler (kesit) içerisinde tespit edilmiş oranlarda bazılarının seçilmesi daha pratik olacaktır. Böyle bir seçimin yapılması durumunda, alınan örneklerin, üzerinde çalışılan yapının en uygun temsiliyetini sağlaması için, yapının her bir tarafının aynı derecede alınma olasılığında bulunması, istatistikî açıdan bir zarurettir. Rastgele seçimle alınma işlemi de böyle bir meseleyi tamamen çözüme yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden SRÖ'nin değeri ortaya çıkar. SRÖ, daha önce tespit edilmiş sabit bir örnek alma mesafesince, birinci aralık içerisinde rastgele bir yerden başlanması suretiyle, çalışılan yapının bütününün örnekleme durumunu kapsar.

Örnekleme için önce örnekleme mesafesi tespit edilir. Örneğin her dokuzuncu parça veya kesitin seçilmesi kararlaştırıldığında ilk dokuz parçalık seri, örneklemin sistematik bölümünü, ilk mesafe içerisinde rastgele bir yerden başlanma durumuysa, ilk dokuz parça içerisinde rastgele bir tanesinin başlama yeri alınması bu parçanın akabinde gelen her dokuzuncu parçanın örnek olacak şekilde alınması örnekleme rastgelelik özellik kazandırır. İstatistiksel yaklaşımla bu şekil bir örnek alma işlemi, alınan örnek miktarının fazlalığı ile doğru orantıda oldukça, çalışılan yapıya ait her yerin örnek olarak alınma şansına sahip olacağı için benzeşik ve işe yarar bir örnekleme kazanma olasılığı da o denli yükselir (Gundersen, 1977; Gundersen ve Jensen, 1999).

Stereolojik yöntemlerde yararlanılan prensip ve metotların çoğu, SRÖ mantığının farklı uygulamaları gibi alınabilir. Partikül sayımı, cisme ait yüzey hesabı, yüzey ve hacim niceliklerinin belirlenmesinde ilk husus, çalışmaya alınan yapının tüm merhalelerinde (kısımların alınması, parçaların örneklenmesi vb.) sistemli ve tesadüfi bir şekilde örneklenmesidir (Canan ve ark., 2002).

2.4.2. Cavalieri yöntemi

Cavalieri yöntemi; ilk defa bir matematik bilimcisi olan İtalyan Bonaventura Cavalieri tarafından 17. asırda kullanılmıştır ve stereolojik metotlarda en fazla yararlanılan hacmin hesaplanması şeklindedir (Canan ve ark., 2002).

Cavalieri yöntemini pratiğe dökmek için, üzerinde çalışılacak yapı paralel olacak şekilde tümü eşit mesafede kesilmiş olarak parçalara bölünür. Parçaların her birinin aynı tarafa bakan yüzlerinin alanları makul bir metotla hesap edilir. Bütün parçalardan alınan total yüzey alan miktarıyla yapıyı bölerken kullanılan ortalama kalınlık çarpıldığında, total hacmin taraflı olmayacak bir şekilde hesap edilmesi sağlanır. Bu süreci matematiksel olarak aşağıdaki formül haline getirebiliriz:

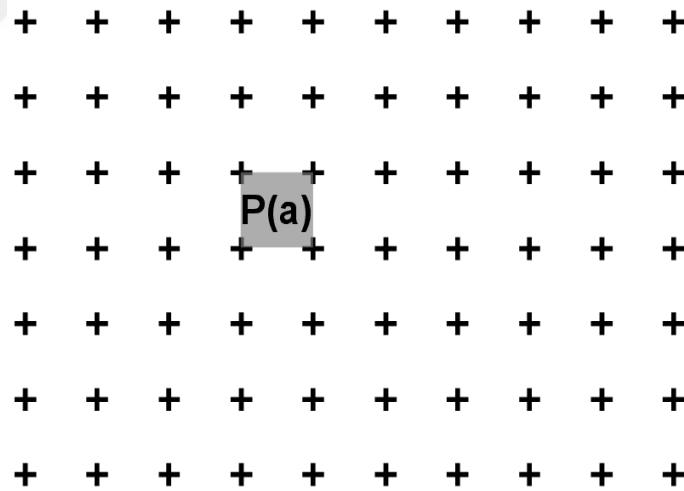
$$V_{ref} = \sum a_i \cdot t$$

Formülün içindeki V_{ref} çalışılan yapıya ait total veya başka bir ifadeyle referans hacmi; a_i , i numaralı parçaya ait yapı izdüşümü (ya da izdüşüm toplamı) yüzölçümü; t ortalama parça ya da kesit kalınlığıdır. Bu metotla, ister mikroskobik, ister

makroskobik kadranda, çevresindeki yapılar ile ilgisine bakılmaksızın, her tür yapı hacmi, sınırları belirli bir kesinlikteyse hesap edilebilir (Canan ve ark., 2002).

Hacim hesaplamaları için kesit yüzey alanlarının hesaplanması

Cavalieri hacim hesaplamasında ilk etap çalışmayı düşündüğümüz kısımların izdüşümlerinin (kesit görüntülerinin) alanlarını hesap etmektir. Bu metotla, bilgisayar yardımlı görüntü çözümü araçları sayesinde, planimetrik bir şekilde izdüşüm alanlarını direkt hesap etmektir. Bu usulle ayarı uygun halinde (kalibrasyonu) yapılmış, mikroskoptan aldığı görüntü üzerinde işlem yapabilme erkine sahip olacak şekilde yazılmış bir program vasıtasıyla, sınırları belirlenmiş rastgele bir alanın yüzölçümü yapılabilir. Bu metodun baya hızlı ve güvenli olmasına karşın, genellikle kullanılan araçların pahalı olmalarından ötürü böyle bir ekipman elde etmek zor olabilir (Canan ve ark., 2002). Stereolojik metotlarda en çok yararlanılan izdüşüm alan hesap etme pratiği, ‘Noktalı Alan Ölçüm Cetvelleri’dir.



Şekil 9. Noktalı alan ölçüm cetveli (Canan ve ark., 2002).

Noktalı alan ölçüm cetvelleri (Şekil 9), birbirlerinden eşit mesafelerde olacak şekilde dağıtılmış noktalardan (tablodaki '+'ların kollarının birleştikleri yer) meydana gelen sistematize nokta dizgeleridir. Bu tür bir dizgede, her bir + sembolünün ortasına denk gelen nokta, temsili cetvelde bir noktayken, bahsedilen noktaların her biriyle, bir birim cetvel alanı denilen dört nokta arasındaki bölümdür (P(a)). Bu şekilde birbirleri arasındaki belirli mesafesi mevcut bu tür bir noktalı alan ölçüm cetveli, yüzeyi ölçülmek

istenen yapı kesitinin veya görüntüsünün üzerine rastgele atılması suretiyle, yapıya ait kesit üzerindeki izdüşümüne denk gelen nokta miktarı, izdüşümün kesitte gösterildiği alan ölçüsü doğru oranıyla oluşacaktır (Canan ve ark., 2002). Özetle, izdüşüm büyüdükçe içerisine denk gelen nokta miktarı da o denli artacaktır.

Söz konusu noktalar belirli birim alanını ($P(a)$) gösterdiğinden, çalışılan izdüşüm alanı içerisinde bulunan nokta miktarının (ΣP_i) hesapladığımız birim alanın değeriyle çarpımı, çalıştığımız kesite ait izdüşümün total alanının (A_i) hesabını taraflı olmayacak şekilde bize verecektir (Canan ve ark., 2002).

$$A_i = \Sigma P_i \cdot P(a)$$

Bu şekilde hesap edilen bir alan ölçümü, uygulamasında basitliğinin yanı sıra istatistiki açıdan doğruya daha yakın neticeler sunacaktır. Bu cetvellerle yapılan alan hesaplamaların makul sıklıkta noktalar ihtiva eden cetvellerden yararlanıldığında, öbür görüntü çözümlemesi yapan sistemler kadar doğru neticeler sunmaktadır (Gundersen ve Jensen, 1999). Çoğunlukla, saydam bir asetata yerleştirilmiş nokta dizgeleri kâfi olabilmekte ve büyütme seviyesi doğru bir şekilde belirlendikten sonra, mikroskop ile bakılan, ekrana ya da farklı bir gösterim ortamına yansıtılan veya fotoğraflanmış tüm görüntü çeşitleri üzerinde kolaylıkla uygulama yapılabilmektedir. Unutulmaması gereken husus, cetvelde görünen noktalar arasında olan mesafenin, büyütme seviyesine göre doku düzeyine denk gelen reel uzunluk ölçüsüdür. Mikrometrik bir ölçüm cetveli kullanımı büyütme seviyesini bulmada en güvenilir yoldur (Canan ve ark., 2002).

Bir başka önemli husus kullanılan cetvelin nokta yoğunluğudur. Genel olarak, sınır uçları kompleks bir oluşum sergileyen iç içe izdüşümlerde noktalarının daha az aralıklı olanlarından yararlanmak daha uygun olabilirken, muntazam sınırlarının olduğu hatlı oluşumlarda daha fazla aralıklı noktaların kullanımı yeterli olabilmektedir. Hesap işlemlerinde nokta sıklık oranlarının artırımı hesaplamaların doğruluk katsayısını yükseltse de belirli bir yanılma marjı içerisinde, imkan dahilindeki seyrekliği en yüksek olan nokta dizgesini kullanmak bu ölçüm işlemlerinde daha mantıklı olacaktır (Canan ve ark., 2002).

Toplam hacmin hesaplanması

Total hacme ulaşmak için, öncelikle, kesitlerde ilgilenilen bölgeye ait izdüşümlerinin total alanını hesap ettikten sonra, bu total alan değerini, dilimleri ya da kesit oluşumunda yararlandığımız ortalama kesit kalınlık değeri ile çarpılması yeterlidir. Bu sayede yapıya ait total hacmin tarafsızca hesaplanması sağlanmaktadır. Kesit alım esnasında, total kesit adedinin fazla miktarda olmasından ötürü belli bir örnekleme yapılıyor ise, hacim hesap işlemlerinde bahsedilen konu bu husus göz önünde bulundurularak hesap edilmelidir (Canan ve ark., 2002).



Şekil 10. Paralel dilimlenmiş böbrek kesitleri (Pazvant ve ark., 2009).

Alan hesabı yapılan kesitlerin yüzeyindeyse dilimlerin makroskobik veya mikroskobik özellikleri önemsiz olacak şekilde, belirli ve sonu olan bir kalınlığa sahiptirler ve iki kesme düzlemiyle oluşturulmaları sağlandığında ‘üst’ ve ‘alt’ diye iki yüzeyden meydana gelirler. Cavalieri yöntemiyle hacim hesabı için, yüzeysel alan ölçümü, yapıdan alınan bütün kesitlerin daima aynı tarafa bakacak yüzlerinde gerçekleştirilmeli, bu durum (Şekil 10)’da gösterilmektedir (Canan ve ark., 2002).

Nokta sayım yöntemi ile alan ve hata miktarının hesaplanması

Genel olarak nokta sayım metoduyla hacim ya da hacim oranı hesap işlemlerinde, uygulanan metodun total değişkenlik (Hata katsayısı (HK)) miktar hesaplama işlemi bir formül ile yapılır. Burada HK %10 ve daha düşük bulunuyorsa gerçekleştirilen işlemlerin doğru olduğuna kanaat getirilir. Öbür yandan uygunluk

bulunamazsa HK elde edilene değin noktaların sıklığı veya kesit adedi değiştirilir. HK hesaplama işlemleri için sırasıyla: Karmaşıklık değeri (Noise) bulunur, toplam alan değişimi (VarSRÖ) tespit işlemleri yapılır ve toplam noktaların total değişim işlemi gerçekleştirilip HK bulunur. Bu işlem basamaklarından Noise, dilim veya kesitlere ayrılan, örneğin dilim veya kesitlerde meydana gelen kesit yüzey alanlarının karmaşıklık değerini gösteren veridir. VarSRÖ, incelenen yapıda belirli ölçüde kesitler alma neticesinde meydana gelen kesitlerin arasında hacmi hesap edilecek yapının kesilmesiyle meydana gelen alanlar arasındaki değişimine verilen addır. HK hesaplamasının son basamağı olan toplam noktaların toplam değişimi aşamasından önce toplam varyans bulunur. Bulunan toplam varyansın karekökü toplam nokta sayısına bölünerek HK hesaplanmış olur. Bunları sırayla formülize edersek:

$$(1) \text{Noise} = 0.0727x \left(\frac{b}{\sqrt{a}} \right) x \sqrt{nx \sum P}$$

Burada $\left(\frac{b}{\sqrt{a}} \right)$, dilimlere ayrılan örneğin kesit görüntülerinde ortaya çıkan ortalama izdüşüm şeklini ifade eder.

$$(2) \text{VarSRÖ} \left(\sum_{i=1}^n a \right) = \left(3x \sum P_i^2 - \text{Noise} \right) - 4x \sum P_i x P_{i+1} + \sum P_i x P_{i+2} / 12$$

Formüldeki $\text{VarSRÖ}(\sum_{i=1}^n a)$, n sayıdaki kesitte ortaya çıkan alan değişimi, $\sum P_i^2$, i numaralı kesitte sayılan noktanın karesini, $\sum P_i x P_{i+1}$, i numaralı kesitte sayılan nokta sayısının kendisinden sonraki kesitte sayılan nokta sayısına çarpılması sonucu elde edilen sayıdır. $\sum P_i x P_{i+2}$, i numaralı kesitte sayılan nokta sayısının kendisinden iki kesit sonraki kesitte sayılan nokta sayısıyla çarpılması sonucu elde edilen sayıdır.

$$(3) \text{Toplam Varyans} = \text{Noise} + \text{VarSRÖ}$$

Son olarak HK aşağıdaki formülle bulunur:

$$\text{HK} \left(\sum P \right) = \frac{\sqrt{\text{Toplam Varyans}}}{\sum P}$$

Tespit edilen HK değeri hesaplamının sonucudur ve %10'dan daha az olmalıdır.

Daha çok olması halinde elde edilen kesit adedi veya noktalı alan ölçüm cetvelindeki nokta sıklıkları değiştirilir ve amaçlanan HK elde edilir (Canan ve ark., 2002).

2.4.3. Disektör

Disektör ilk defa 1984'te Sterio tarafından tanımlanmıştır. Bu metotta; çalışılan nesnenin büyüklüğü, şekli, doku veya organ içindeki tanecik adedi, alınan parçaların yönleri, sayılacak taneciklerin büyüklüğü, doku içerisindeki meyilleri ve dokunun histolojik işlem esnasında genişleme ve büzüşmesi gibi hesaplama hatalarına neden olabilen bütün yanılma kaynaklarından bağımsız olarak 'tarafsız' şekilde hesap edilebilmektedir (Ünal ve ark., 2002).

Fiziksel disektör

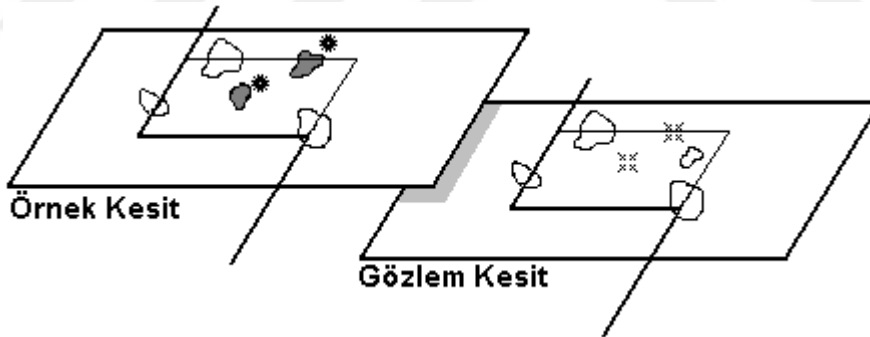
İlk meydana getirilen disektör formatıdır (Sterio, 1984). Bu metotta, birbiri ardından gelen ya da aralarında belirli bir mesafeyle ayrılmış olan iki kesit alınır, ilk kesitte mevcut olup, öbüründe var olmayan tanecikler sayıma alınır. Alınan iki parça arasındaki mesafeye "disektör yüksekliği" denir ve gerçekleştirilen işlem neticesinde, disektör yükseklikleri uzunluğunca örneklenebilen parçacık uçlarının miktarları hesaplanır. Bu bulgu da çalışmaya alınan taneciklerin sayısal yoğunluğunu (NV) bize sunar (Ünal ve ark., 2002).

Disektörün esas pratiği, aralarında minimum parçacık uzunluğundan daha düşük mesafede bulunan iki kesitin alınıp kıyas edilmeleri halidir. Bu kesitler arasındaki mesafenin, minimum partikül genişliğinden ufak olmasının sebebi, partiküllerin kesimler arasında, kesilmeden, atlanmasının önüne geçilmesi hedefidir. Sadece bir taneciğin bir kesitte tespit edilmesi, o taneciğin alınan kesit doğrultusundaki yüksekliğiyle ilişkililikten; "Bir kesitçe kesilip bir sonraki paraleline kesilmeme" olasılığı, irili-ufaklı bütün taneciklerde aynıdır (Pakkenberg, B; Gundersen, 1988). Bu bağlantıdan başlanarak, belirli bir ebatta mevcut olan total tanecik miktarı ölçülebilir.

$$N = \frac{\sum Q^-}{hx \sum a(\text{çer})} \times V(\text{ref})$$

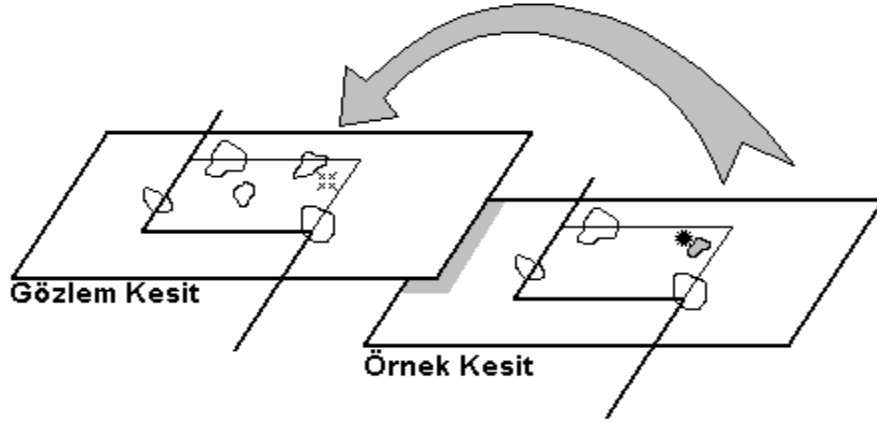
Burada, N , total partikül miktarını; Q^- , disektör partiküllerinin miktarını; h , alınan parçalar arasındaki uzaklığı (Disektör yüksekliğini); $a(\text{çer})$, sayım esnasında yararlanılan tarafsız sayım çerçeve alanını ve $V(\text{ref})$ ise, incelenen yapının total (ya da referans) hacmini göstermektedir. Söz konusu formülden $V(\text{ref})$ değeri çıkartılırsa, neticede bulunacak değer, total hacim hesap edilmediğinden partiküllerin nümerik yoğunluğu olacaktır. Ancak çoğu halde, sayısal yoğunluk değeri, total partikül adedi değişimiyle alakalı direkt bilgi sunmadığından, bilhassa karşılaştırmalı araştırmalarda söz konusu değer kullanılması ve bununla bağlantılı biyolojik değerlendirmeler yapılması sakınca arz edebilmektedir (Ünal ve ark., 2002).

Disektör partikülü, disektör metodu aracılığıyla yapılan sayım esnasında sayılabilen partiküllere verilen addır. Fiziksel disektörde, sayımda kullanılan parça ikililerinden biri örnek kesit ve diğeryse gözlem kesiti olarak kullanıma alınır. Söz konusu kesitler gözlemlenir ve örnek kesitte var olup, gözlem kesitinde var olmayan partiküller, disektör partikülü olarak sayım işlemlerine eklenir ve “ Q^- ” işaretiyle gösterilir. Bunlar, disektör yüksekliği içinde örneklenebilmiş olan partikül terminalleridir (Şekil 11) (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 11. Fiziksel disektör uygulaması (Ünal ve ark., 2002).

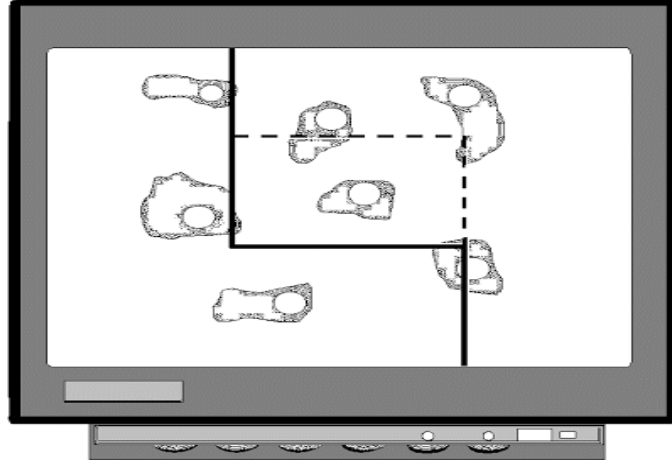
Disektör sayımı esnasında, gözlem ve örnek kesitleri, buldukları durumları değiştirilip, yani, gözlem kesiti olarak alınan kesit örnek; örnek kesitiyse gözlem kesiti olarak yorumlanıp, iki taraflı sayım da yapılabilir. Bu sayede, ek kesit almayı gerektirmeden disektör adedinin fazlalaştırmasını, böylece daha çok örnekte çalışmanın yapılması sağlanmış olunur (Şekil 12) (Ünal ve ark., 2002).



Şekil 12. Disektör örneklerinin sayısını arttırmak üzere, kesitlerin rolleri değiştirilerek iki yönlü bir disektör sayımı uygulanması (Ünal ve ark., 2002).

Tarafsız sayım çerçevesi

Partikül sayımı yapmada partikül izdüşümlerinden faydalanılan durumlarda, kesitlerde meydana gelen partikül izdüşümlerinin belirli bir bölgede sınırlandırılarak sayılma işleminin yapılması gerekir. Böylece, izdüşüm sınıflandırmalarının ne tür kurallara göre sınırlandırılması gerektiği hususu belirir. Klasik halde uygulanan daha önceki yöntemlerde, kare ya da dikdörtgen yapısındaki bir çerçeve izdüşümler üzerine kondurularak, direkt çerçeve içerisine denk gelen partikül izdüşümlerinin sayılması, oldukça yaygın olarak kullanılmış bir metottur. Sonraki zamanlarda, bu tür bir sayımın partikül adedini daha çok hesaplamaya sebebiyet verdiği anlaşılınca, bu defa da basit bir şekilde ortadan, köşegenlerinden biri tarafınca ikiye ayrılan bir sayım çerçevesinin kullanımına başlanmıştır. Bu çerçeveye ait sayım kuralıysa, çerçeve kenarlarının bir yarısına denk gelen partiküllerin sayılarak, öbürüne denk gelenlerin sayım işlemine alınmaması şeklindedir. Fakat bu çerçevenin de gerçek partikül değerini veremediği sonradan tarafsız sayım çerçevesinin ortaya çıkışıyla görülmüştür. Sayım çerçevelerinden meydana gelen bu tarz sayım hatalarının nedeni, “kenar etkisi” denilen bir etki ile tanımlanmaktadır. Özetle kenar etkisi, sayım çerçevelerinden herhangi birisi kullanıma alındığında, çerçevenin içerisine denk gelen partiküllerin sayılmasında bir problem olmadığı halde, çerçeve kenarları ile kesişen partiküllerin hangi kaidelere göre yorumlanması gerektiği problemine vurgu yapmaktadır. 1970’lerde Gundersen tarafından getirilmiş tarafsız sayım çerçevesi, yapılan hesaplamalarla, kenar etkisini en doğru şekilde yok eden özelliklere haizdir (Gundersen, 1977; Ünal ve ark., 2002).



Şekil 13. Ekran üzerine yerleştirilmiş bir tarafsız sayım çerçevesi

Tarafsız sayım çerçevesi (Şekil 13), yaygın kullanılan biçimiyle, bir düz ve kalın, bir de kesikli ve ince iki tip çizgiyle işaretlenen dört kenarı olan basit bir kare ya da dikdörtgendir. Görünürde çok fazla bir değişiklik olmamasına karşın, sayımda kullanılan kurallar bakımından diğer çerçevelerden farklılık göstermektedir. Esası, kesikli ve ince çizgiler “dahil” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Başka bir deyişle kesikli çizgilere denk gelen izdüşümler sayıma alınırken, devamlı çizgilere denk gelen izdüşümler sayıma alınmaz. Tarafsız sayım çerçevesinin en önemli farklılığı, yasak kenarlarının uzantılarıdır. Söz konusu uzantılar, çerçevenin konulduğu görünüm alanının bütününe kapsayacak bir biçimde uzatılırlar (Ünal ve ark., 2002).

Tarafsız sayım çerçevesi, partikül sayımında, mevcut durumdaki en etkili ve doğru sayım çerçevesidir. Geometrik hesaplamalara bu çerçevenin partikül izdüşümlerini en doğru şekilde sayılmasında aracılık ettiği ispatlanmıştır (Gundersen, 1977; Ünal ve ark., 2002).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Yaptığımız çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi (YYÜ) Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden edinilen, 150-200 g arasında değişen ağırlıkta, çalışma evvelinde hiç çiftleşmemiş, erişkin 12 adet Wistar albino dişi sıçandan yararlanıldı. Çalışma için Van YYÜ Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 28.07.2016 tarih ve 2016/07 sayılı kararı ile izin alındı.

Çiftleşme için her bir kafeste üçer dişi ve birer erkek sıçan olmak üzere 24 saat süre ile aynı kafeste tutuldular, bu sürenin sonunda her bir dişi sıçan ayrı kafeste olmak üzere doğum yapmalarına kadar beslendiler. Sıçanlar; diklofenak sodyum ve kontrol olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tartımları her gün yapılan sıçanların kilolarındaki yükselme hamileliklerinin belirtisi olarak alındı ve akabindeki gün vaginal plak gözlenen dişi sıçanlarda, hamileliğin sıfırinci '0.' günü olarak alındı. Standartlara uygun bir şekilde su ve yemleri verilen sıçanlar, doğal ışık ve karanlık döngüsüyle (21 ± 2 °C) izleme alındı. Çiftleşmeden sonra diklofenak sodyum grubu sıçanlarına gebeliklerinin beşinci günüyle beraber i.p. (intraperitoneal) yolla 15 gün boyunca günde bir defa 1 cc (1 mg/kg) diklofenak sodyum (Voltaren 75 mg/3 ml ampul, CIBA GEICY, İstanbul) enjeksiyonu yapıldı. Kontrol grubu sıçanlara ise bir işlem yapılmadı.

Hayvanlar enjeksiyon boyunca her gün tartılıp ağırlıkları kayıt altına alındı. Sıçanlar doğuma yaklaşınca her biri ayrı bir kafese nakledildi. Doğum sonrası (üç ile dört haftalık) yavrular erkek ve dişi olarak ayrılıp farklı kafeslere alındı. Eril sıçanda perine dişi olana göre daha geniş, dişideyse perine aralığı daha dar olmasına göre ayırma gidildi. Buna göre dişi ve eril ayrımı perine mesafeleri incelenerek gerçekleştirildi. Dört haftalık sıçanlardan (Şekil 14), 6 adet diklofenak sodyum grubu ve 6 adet kontrol grubu oluşturuldu.

Dişi yavru sıçanlar ketalar anestezisi 50 mg/kg ile derin anestezide alınıp transkardiak sol kalpten bir tüp aracılığıyla perfüzyonu sağlandı (Şekil 15). Kalbin sol ventrikülüne ise 0.5 ml'lik heparin verildi. Daha sonra serum fizyolojik verilmeye başlandığı anda kalbe ait sağ kulakçık kesisi oluşturularak berrak akkan meydana

gelinceye kadar kan boşalınca %10 nötral tamponlu formaldehit ile tespiti gerçekleştirildi. Vücudun söz konusu bölgeleri beyazlaşıncaya değin işlemin devamı sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak hayvan adedi, kesit sayısı ve örneklemenin belirlenmesi için pilot çalışma yapıldı. Literatürde yapılacak bir stereolojik çalışmada yaklaşık 0,05'lik bir hata katsayısı elde etmek için hesaplamalara göre her grubun en az beş hayvandan oluşması gerektiği bildirilmektedir (Cruz-Orive ve Weibel, 1990). Bu bilgiye dayanarak çalışma gruplarındaki sayıların yeterli olduğu belirlendi. Doğan 12 adet (6 adet kontrol ve 6 adet diklofenak sodyum olmak üzere) dört haftalık yavru sıçanlar gruplandırıldı. Daha sonra bu gruplardan sağ böbrekler alınarak %10'luk nötral tamponlu formaldehitte fikse edildi.



Şekil 14. Deney hayvanları



Şekil 15. Perfüzyon uygulanması

3.2. Yöntem

3.2.1. Histolojik doku takip işlemleri, kesit alma ve dokuların boyanması

Dokular nötral tamponlanmış %10'luk tamponlu formalin çözeltisinde 24 saat fiksasyon sağlandı. Tespit akabinde dokular Leica ASP 300 (Leica microsystems, Germany) otomatik vakumlu doku takip cihazında takip edildikten sonra parafin bloklarına gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan Leica RM 2125 RT (Leica microsystems, China) marka rotary mikrotom cihazıyla kesit alma işlemleri yapıldı (Şekil 16). Kesit alma işleminde rastgele başlanıp 40 μm kadar ilerlendikten sonra, her 200 μm 'da bir, kalınlığı 4 μm olan kesitler polilizinli lamlara alındı (Birinci kesit ile ikinci kesit arasında 200 μm olacak şekilde). 6 diklofenak sodyum grubu ve 6 kontrol grubu olmak üzere 12 böbrekten ortalama beş kesit alınarak toplamda 60 kesit meydana getirildi. Bu kesitler ikili halde olmak üzere 30 adet polilizinli lama alındı. Kesitler alındıktan sonra 30 dk etüvde bekletildi. Primer antikor olarak COX-2 monoklonal antikor (SP21) (Dilüsyon: 1/50, Catalog number MA5-14568, ThermoFisher Scientific, USA) kullanıldı. Van YYÜ Tıbbi Patoloji Laboratuvarında bulunan immünohistokimya otomatik boyama sistemi (Ventana Benchmark XT) ve Ultraview Dab Detection Kit Ventana kullanılarak uygun pozitif kontroller eşliğinde boyama yapıldı.



Şekil 16. Kesit alınan mikrotom (Leica Model 2125RT Çin, Nussloch).



Şekil 17. Sayımda kullanılan fotoğraf ataçmanlı araştırma ışık mikroskobu (Carl Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany)).

İmmünohistokimyasal değerlendirmede Olympus BX53F (Olympus, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu, Stereolojik analizler için Carl Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) araştırma ışık mikroskobu kullanıldı (Şekil 17). Kesit aldığımız

Rotary mikrotom (Leica Model 2125RT, China (Nussloch) Şekil 16’da görülmektedir.

COX-2 immünohistokimyasal incelemede böbrekte maküla densa, proksimal tübül, distal tübül, korteksteki tübüller, medulladaki tübüller, toplayıcı tübüller ve glomerüler alanlarda boyanma yoğunluğu değerlendirildi. Boyanma yoğunlukları; Boyanma yok: (-), Zayıf boyanma: (+), Orta derecede boyanma: (++) ve Kuvvetli boyanma: (+++) olarak değerlendirildi.

3.2.2. Hücre sayısının hücre izdüşümü sayısına göre analizi

Hücre sayısının izdüşüm sayısına göre hesaplandı. Hacim hesaplanmasında total doku hacim oranları noktalı alan cetveliyle ölçüldü. Cavaileri prensibi kullanıldı. (Howard ve Reed, 1998; Gundersen ve ark., 1999). Tanecik sayımlarında immunohistokimya kiti yüksek maliyeti olduğundan ardışık kesit alınamadı. Fiziksel disektör metodu yerine tek kesit sayım için kullanıldı. Burada tarafsız sayım çerçevesinde yapılan tanecik sayımları, diğer bir ifadeyle izdüşüm sayılarının belirlenmesi için büyütme objektif x100 (NA:1.25) kullanıldı. Fotoğraflar için Canon DS126191, No: 3650625172, Taiwan kullanıldı.

3.2.3. İstatistiksel analiz

Çalışmamızda kontrol ve diklofenak sodyum olarak alınan iki grup üzerinde meydana getirilen değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edilmiştir. Grupların karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (SPSS for Windows, ver.24) istatistik paket programları kullanılmıştır.

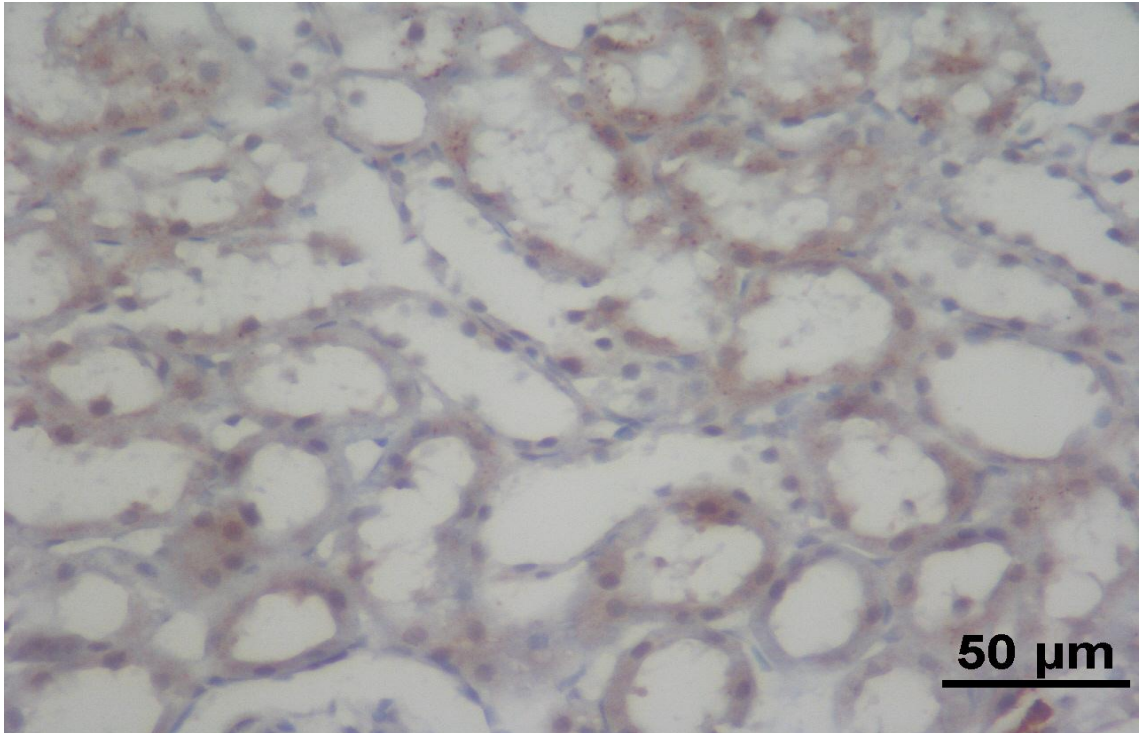
4. BULGULAR

4.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızın immünohistokimyasal değerlendirmesinde; böbreğin maküla densa, proksimal tübül, distal tübül, korteksteki tübüller, medulladaki tübüller, toplayıcı tübüller ve glomerüller bölgelerinde ışık mikroskobu altında COX-2 ekspresyonu gözlemlenmiştir (Şekil 18).

Bu bölgelerdeki boyanma yoğunluğu derecelendirilirken; "0 = Boyanma yok", "1 (+) = Zayıf boyanma", "2 (++) = Orta derecede boyanma", "3 (+++) = Kuvvetli boyanma" ve "X = Alan / Doku yok" olarak ölçü kabul edilmiş ve bu sayede yoğunlukların skorlanmasına gidilmiştir (Tablo 2).

Yapılan gözlemlerde hem prenatal diklofenak sodyum uygulanan hem de kontrol grubu postnatal sıçan böbreklerinin maküla densa, proksimal tübül, distal tübül, korteksteki tübüller, medulladaki tübüller, toplayıcı tübüller ve glomerüllerinde takribi olarak boyanma, yoğunlukları değişen derecelerde olmak üzere değerlendirilmiştir.



Şekil 18. DR2-3P, diklofenak grubu ikinci sağ böbrek kesiti, (40x).

Tablo 2. Böbrek kesitlerinin boyanma dereceleri.

Böbrek Kesiti	Maküla Densa	Proksimal Tübül	Distal Tübül	Korteksteki Tübüller	Medulladaki Tübüller	Toplayıcı Tübüller	Glomerüller
CR-1-1	3	2	2	2	X	X	0
CR-1-2	3	2	2	2	0	3	0
CR-1-3	3	2	1	2	1	1	0
CR-1-4	3	2	2	2	X	X	0
CR-1-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-1-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-2-1	3	2	1	2	0	2	0
CR-2-2	3	2	2	2	1	3	0
CR-2-3	2	1	1	1	1	X	0
CR-2-4	3	1	1	1	X	X	0
CR-3-1	3	2	1	2	X	X	1
CR-3-2	3	2	1	2	1	3	0
CR-3-3	3	2	2	2	1	2	1
CR-3-4	3	2	2	2	1	X	1
CR-3-5	3	2	2	2	X	X	0
CR-3-5	3	2	2	2	X	X	0
CR-4-1	3	1	1	1	0	X	0
CR-4-2	3	2	1	2	0	X	0
CR-4-3	3	2	1	2	1	2	0
CR-4-4	3	2	1	2	1	3	0
CR-4-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-4-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-5-1	3	1	1	1	X	X	0
CR-5-2	3	2	1	2	0	2	0
CR-5-3	3	2	1	2	0	3	0
CR-5-4	3	1	1	1	0	X	0
CR-5-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-5-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-6-1	3	1	1	1	X	X	1
CR-6-2	3	2	1	2	1	X	0
CR-6-3	3	2	1	2	1	3	0
CR-6-4	3	2	1	2	1	X	1

Tablo 2'nin devamı arka sayfadır.

Tablo 2 (devamı). Böbrek kesitlerinin boyanma dereceleri.

Böbrek Kesiti	Maküla Densa	Proksimal Tübül	Distal Tübül	Korteksteki Tübüller	Medulladaki Tübüller	Toplayıcı Tübüller	Glomerüller
CR-1-1	3	2	2	2	X	X	0
CR-1-2	3	2	2	2	0	3	0
CR-1-3	3	2	1	2	1	1	0
CR-1-4	3	2	2	2	X	X	0
CR-1-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-1-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-2-1	3	2	1	2	0	2	0
CR-2-2	3	2	2	2	1	3	0
CR-2-3	2	1	1	1	1	X	0
CR-2-4	3	1	1	1	X	X	0
CR-3-1	3	2	1	2	X	X	1
CR-3-2	3	2	1	2	1	3	0
CR-3-3	3	2	2	2	1	2	1
CR-3-4	3	2	2	2	1	X	1
CR-3-5	3	2	2	2	X	X	0
CR-3-5	3	2	2	2	X	X	0
CR-4-1	3	1	1	1	0	X	0
CR-4-2	3	2	1	2	0	X	0
CR-4-3	3	2	1	2	1	2	0
CR-4-4	3	2	1	2	1	3	0
CR-4-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-4-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-5-1	3	1	1	1	X	X	0
CR-5-2	3	2	1	2	0	2	0
CR-5-3	3	2	1	2	0	3	0
CR-5-4	3	1	1	1	0	X	0
CR-5-5	3	1	1	1	X	X	0
CR-5-6	X	X	X	X	X	X	X
CR-6-1	3	1	1	1	X	X	1
CR-6-2	3	2	1	2	1	X	0
CR-6-3	3	2	1	2	1	3	0
CR-6-4	3	2	1	2	1	X	1

Tablo 2'nin devamı arka sayfadır.

Tablo 2 (devamı). Böbrek kesitlerinin boyanma dereceleri.

Böbrek Kesiti	Makula Densa	Proksimal Tübül	Distal Tübül	Korteksteki Tübüller	Medulladaki Tübüller	Toplayıcı Tübüller	Glomerüller
CR-6-5	3	2	1	2	X	X	0
CR-6-6	3	2	1	2	X	X	1
DR-1-1	3	0	0	0	X	X	0
DR-1-2	3	1	0	1	0	2	0
DR-1-3	3	2	1	2	0	2	0
DR-1-4	3	1	1	1	0	X	0
DR-1-5	3	1	0	1	X	X	0
DR-1-6	3	0	0	0	X	X	0
DR-2-1	3	1	1	1	0	3	0
DR-2-2	3	1	1	1	0	2	0
DR-2-3	3	2	1	2	0	X	0
DR-2-4	3	1	1	1	X	X	0
DR-2-5	3	1	1	1	X	X	0
DR-2-6	X	X	X	X	X	X	X
DR-3-1	3	0	0	0	X	X	0
DR-3-2	3	1	1	1	X	X	0
DR-3-3	3	2	1	2	0	3	0
DR-3-4	3	2	1	2	0	2	0
DR-3-5	3	1	1	1	1	X	0
DR-3-6	3	0	0	0	X	X	0
DR-4-1	3	2	1	2	X	X	0
DR-4-2	3	2	1	2	0	2	0
DR-4-3	3	1	1	1	0	1	0
DR-4-4	3	1	1	1	1	X	0
DR-4-5	3	0	0	0	X	X	0
DR-5-1	2	0	0	0	X	X	0
DR-5-2	3	1	1	1	X	X	0
DR-5-3	3	1	1	1	1	3	1
DR-5-4	3	2	1	2	1	3	1
DR-5-5	3	2	1	2	X	X	0
DR-5-6	3	0	0	0	X	X	1
DR-6-1	3	2	1	2	X	X	0

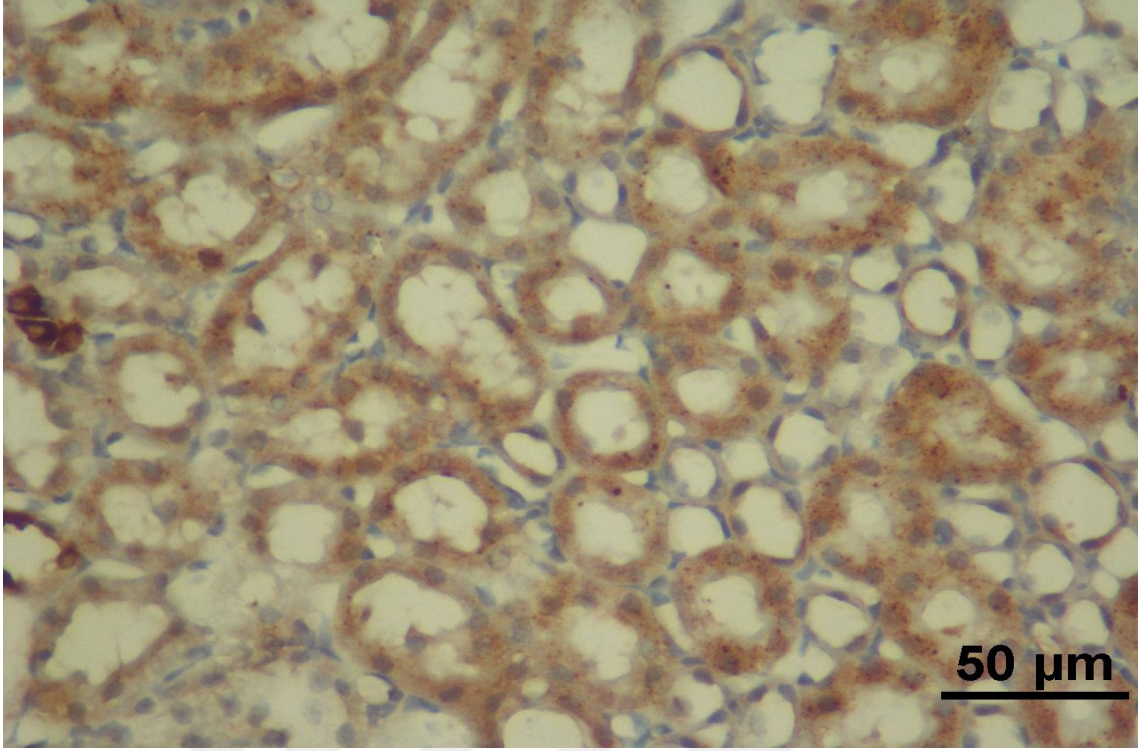
Tablo 2'nin devamı arka sayfadadır.

Tablo 2 (devamı). Böbrek kesitlerinin boyanma dereceleri.

Böbrek Kesiti	Maküla Densa	Proksimal Tübül	Distal Tübül	Korteksteki Tübüller	Medulladaki Tübüller	Toplayıcı Tübüller	Glomerüller
DR-6-2	3	2	1	2	1	2	0
DR-6-3	3	2	1	2	0	2	0
DR-6-4	3	1	1	1	X	X	0
DR-6-5	3	0	0	0	X	X	0
DR-6-6	X	X	X	X	X	X	X
CR ort	3.0	1.7	1.3	1.7	0.6	2.5	0.2
DR ort	3.0	1.1	0.7	1.1	0.3	2.3	0.1

İncelemede COX-2 boyanma derecelerinin hem diklofenak sodyum hem de kontrol grubu böbreklerinin maküla densa ve toplayıcı tübüllerinde diğer bölgelere nispeten daha yüksek olduğu görülmüştür.

Gözlemde kullanılan skorlama yöntemiyle yapılan değerlendirmede; maküla densa haricindeki bahsedilen diğer tüm bölgelerde, kontrol grubuna nazaran diklofenak sodyum grubun COX-2 ortalama boyanma yoğunluğunun daha az olduğu tespit edilmiş olup; proksimal tübül, distal tübül ve korteksteki tübüllerde boyanma yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla en farklı skorla boyanma azlığı tespit edilmiştir (Tablo 3).

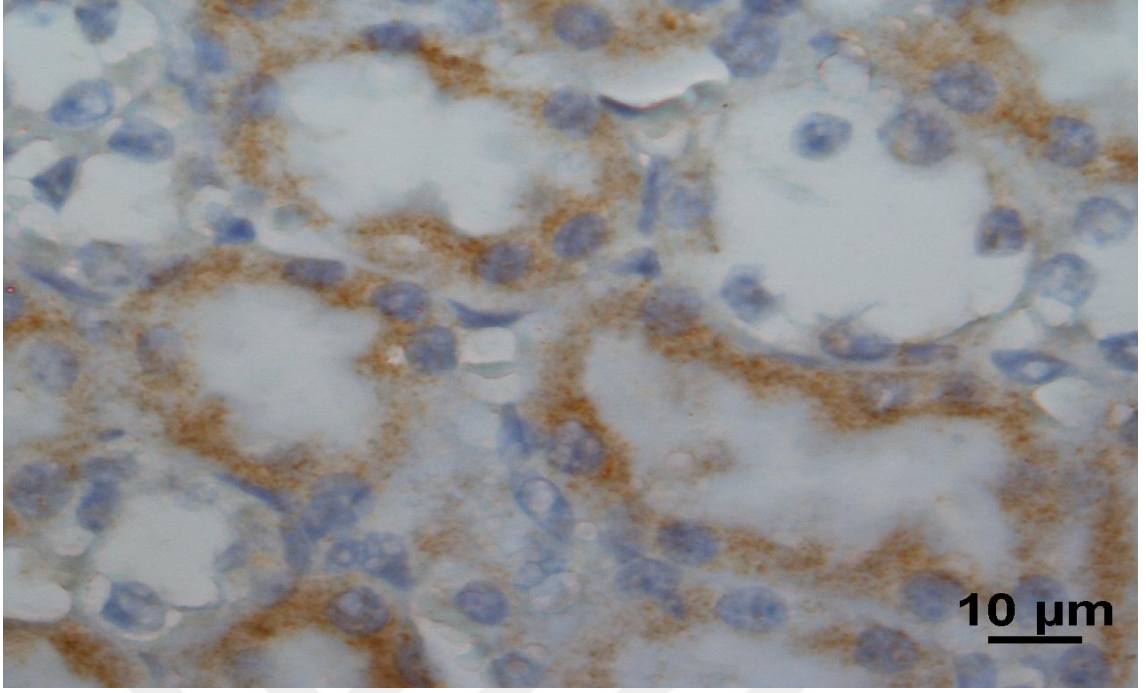


Şekil 19. CR1-1P, kontrol grubu birinci sağ böbreğin kesiti, (40x)

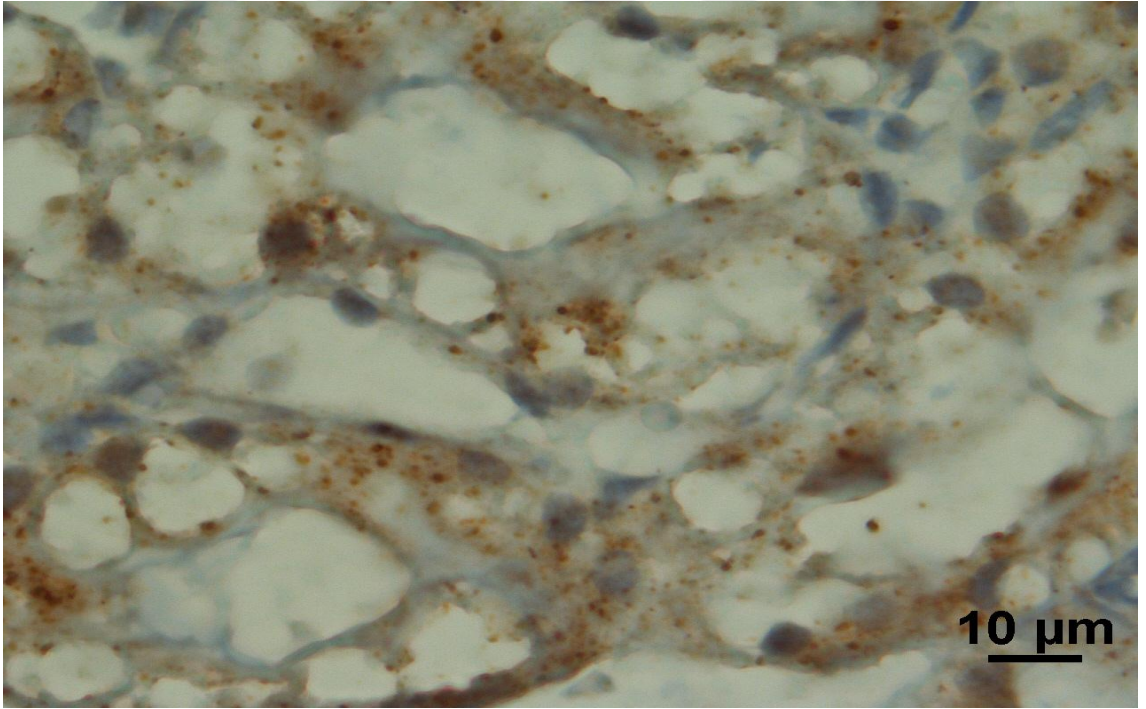
4.2. Hücre Sayısının Hücre İzdüşüm Sayısına Göre Analiz Bulgular

Yaptığımız çalışmada hücre sayımı için CR-1 böbreğinden alınan beş kesitten ilk üçü hücre sayım çerçevesinde 64; CR-1 böbreğinin son iki kesiti ile CR-2, CR-3 ve CR-4 böbreklerinden alınan kesitler 96; CR-5, CR-6 ve diğer tüm diklofenak sodyum grubu böbreklerinden alınan kesitler 128 adım atlanarak 100x büyütme ile çekilip, 1 183 görüntü elde edildi (Şekil 20-21). Elde edilen fotoğrafların tamamı 62500 µm kareli alanlı tarafsız sayım çerçevesi ile değerlendirmeye alındı. Fotoğraflarda tarafsız sayım çerçevesinde COX-2 tespit edilmiş olan tüm hücreler sayıldı. COX-2 tarafından nüfuz edilmiş 2229 adet hücre tespit edildi.

Kantitatif analiz çalışmalarında, örnekleme ve sayım metotlarından meydana gelen total yanılma niceliğinin istatistiksel bir deyişi olan hata katsayısı (HK) dikkate alınarak örnekleme sıklığı ve ölçüm yoğunluğu denetlenebilir (Gundersen ve ark., 1999). Örnekleme stratejisinin uygunluğu analizinde fikir veren hata katsayısının 0.05 değerinde olması yeterli olmaktadır. Analizlerimizin Değişim Katsayıları (DK) bulguları Tablo 3 ve Tablo 4'te görülmektedir.



Şekil 20. CR4-3P, kontrol grubu dördüncü sağ böbreğin kesiti, (100x)



Şekil 21. DR2-3P, diklofenak grubu ikinci sağ böbreğin kesiti, (100x)

Tablo 3. Kontrol ve diklofenak grubu böbreklerin HK değerleri

Böbrek	HK (Hata Katsayısı)
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -1 (CR-1)	0.03
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -2 (CR-2)	0.03
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -3 (CR-3)	0.03
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -4 (CR-4)	0.02
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -5 (CR-5)	0.02
Kontrol Grubu Sağ Böbrek -6 (CR-6)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -1 (DR-1)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -2 (DR-2)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -3 (DR-3)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -4 (DR-4)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -5 (DR-5)	0.02
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek -6 (DR-6)	0.02

Tablo 4. Kontrol ve diklofenak grubu böbreklerin DK değerleri

Böbrek	DK (Değişim Katsayısı)
Kontrol Grubu Sağ Böbrek (CR)	0.4
Diklofenak Grubu Sağ Böbrek (DR)	0.2

Çalışmamızda kontrol ve diklofenak olarak alınan iki grup üzerinde meydana gelen değişkenler için tanımlama yapan istatistikler; ortalama, medyan, standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak bildirildi. Grupların karşılaştırmaları için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hesaplama işlemlerinde istatistik açıdan anlamlılık seviyesi 0.05 alınıp ve yapılan hesaplama işlemleri sonucunda gruplar arasındaki fark ($p < 0,05$) istatistiki açıdan anlamlı (önemli) bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 5. Grupların volüm ve hücre sayılarına göre karşılaştırılması (SPSS)

		Ort.	Medyan	Std. Sap.	Min.	Max.	*p
Hücre Sayısı (COX)	Grup	CR	2.26	2.10	.64	1.65	3.45
		DR	1.35	1.27	.38	.97	1.97
Nokta Sayısı (Böbrek Volüm)	Grup	CR	158.96	156.68	13.56	146.78	180.75
		DR	173.94	176.75	11.19	156.64	184.33

*Mann-Whitney Test

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

COX-2; sığır, küçükbaş hayvan, kenevir, köpek ve kemirgenler dahil birçok hayvan türünde ve yetişkin insanlarda, podositler ve arteriyal düz kas hücrelerinde, makula densa ve kortikal Henle kulpunun yükselen kalın parçası hücrelerinin etrafında, medular intertisyel hücreler ve ayrıca medular vaza rektada lokalizediler (Guan ve ark., 2017).

Çalışmamızda COX-2 ekspresyonu, incelediğimiz her iki grup böbrek dokularının aynı bölgelerinde varlığı tespit edildi. Farklı grup böbreklerinde boyanma dansiteleri farklı olmakla birlikte; böbreklerin makula densa, proksimal tübül, distal tübül, korteksteeki tübüller, medulladaki tübüller, toplayıcı tübüller ve glomerüllerinde COX-2 tespit edildi.

Yeni doğan hayvanlarda yapılan birçok çalışmada, COX izoformları gelişmekte olan böbrekte tespit edilmiştir. Örneğin, yeni doğan sıçanlarda, Stubbe ve arkadaşları COX-1 ekspresyonunun renal medullanın aksine renal kortekste gelişim süresince sabit kaldığını göstermiştir. COX-1 ekspresyonu doğum sonrası ilk haftadan dördüncü haftaya kadar sekiz kat artar. COX-2 ekspresyonu için ise, yeni doğan sıçanlarda doğum sonrası gelişimlerinin ikinci haftadan üçüncü hafta süresince kortekste bir artışının olduğu tespit edilmiştir (2003).

COX-2 ekspresyonunun en yüksek görüldüğü dönem doğum sonrası 14. gündür, COX-2 mRNA düzeyi kortekste medullaya oranla on kat fazladır. Zhang ve arkadaşları (1997) sıçan böbreğindeki COX-2 ekspresyonu, organogenez döneminde hiçbir ekspresyon bulunmayan makula densada 20. günde başladığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, embriyonik günden itibaren hem dallanma toplama kanallarının (üreter tomurcukları) hem de S şeklindeki gövdelerin (mezenkim) hücreleri içinde yaygın sitoplazmik boyama vardır. 20. embriyonik günde yoğun COX-2 pozitif tübüler epitel hücrelerinin odakları, makula densa hücrelerine bitişik kalın yükselen kolu içinde bulunur. Ekspresyon ilk önce jukstamedüller nefronlarda bulunmuştur, ancak santrifüjlü nefron gelişimi ile, COX-2 pozitif hücrelerinin dışa doğru korteks içine hareketinin olduğu tespit edilmiştir. Glomerüllerin vazkularizasyonundan sonra, COX-2 pozitif hücreleri ilk olarak makula densanın etrafında görülür ve daha sonra gelişmekte olan

sıçan böbreği Henle kulpunun yükselen kalın kolunda sonraki yedinci günden onuncu güne sayıları artar. COX-2 seviyesinin gestasyon boyunca artması yaşamın erken döneminde böbrekte gelişimsel veya fonksiyonel olarak rollerinin bulunduğu dair kanıttır (Komhoff ve ark., 1997).

Çalışmamızda, COX-2 boyanma yoğunluğu olarak her iki grup böbreklerinin toplayıcı tübülleri ve maküla densasında diğer bölgelere göre daha fazla yoğunlukta olduğu görüldü. Kontrol grubu böbreklerinin COX-2 tarafından nüfus edilen hücre miktarının daha yüksek olduğu dolayısıyla prenatal uygulanan diklofenak sodyumun postnatal böbreklerde bir inhibisyon gerçekleştirdiği görüldü.

Skorlama metoduyla yapılan analizde; incelenen böbreklerin hemen hemen bütün kısımlarında kontrol grubunun ortalama COX-2 ekspresyon boyanma yoğunluğunun diğer diklofenak sodyum grubuna kıyasla daha fazla olduğu görülmüş; maküla densadaki boyanma yoğunluğu her iki denek grubunda aynı derecede boyandığı bulunmuştur. Diklofenak sodyum grubuna nazaran, kontrol grubu böbreklerinin COX-2 ekspresyon boyanma yoğunluklarının en farklı skorla yüksek olduğu bölgeler: proksimal tübül, distal tübül ve korteksteki tübülde olduğu görüldü.

Renal fizyoloji kısmen siklooksijenaz bağımlı bir sistemdir. Böbrekler hem COX-1 hem de COX-2 enzimlerini eksprese eder. Bir çalışmada, renal kortekste diklofenak sodyumun, bir diüretik olan furosemid ile veya furosemidsiz bir şekilde farelere verilmesinin plazma renin aktivitesi, serum ve ürin elektrolitleri, kreatin kleransı ile COX-1 ve COX-2 ekspresyonları üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Denekler G1, G2, G3 ve G4 olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Bunlardan G1 (plasebo) grubuna yedi gün boyunca intraperitoneal (IP) 2 ml/kg %0,9 NaCl ve dördüncü günden başlamak üzere beş gün boyunca intramüsküler (IM) 0,1 ml/kg NaCl; G2 (furosemid) grubuna yedi gün boyunca (IP) 20 mg/kg furosemid ve dördüncü günden başlamak üzere beş gün boyunca (IM) 0,1 ml/kg NaCl; G3 (furosemid ve diklofenak) grubuna yedi gün boyunca (IP) 20 mg/kg furosemid ve dördüncü günden başlamak üzere beş gün boyunca (IM) 2,5 mg/kg diklofenak sodyum; G4 (diklofenak) grubuna yedi gün boyunca (IP) 2 ml/kg %0,9 NaCl ve dördüncü günden başlamak üzere beş gün boyunca (IM) 2,5 mg/kg diklofenak sodyum verilmiştir. Araştırma neticesinde plasebo (G1) grubu vücut ağırlığının artarken diğer üç grubun azaldığı

görülmüştür. Diklofenak grubunda ağırlık kaybı ilacın anorektik etkisine bağlı olabileceği savunulmuştur. Ayrıca COX-1 türevi prostaglandin inhibisyonunun bir sonucu olarak diklofenak tarafından indüklenen gastrointestinal toksisitenin ağırlık değişikliklerine katkıda bulunabileceğine değinilmiştir (Besen ve ark., 2009).

Prenatal dönemde uygulanmış diklofenak sodyum ve melatoninin böbrek üzerinde etkilerini amaçlayan başka bir araştırmada, fiziksel disektör ve Cavalieri prensibi kullanılarak glomerül yoğunluğu ve böbreğin volümetrik parametleri değerlendirilmiştir (Khoshvakhti ve ark., 2015). Stereolojik sonuçlar gebelik süresince diklofenak sodyum uygulamasının ortalama böbrek hacminin, glomerül sayısal yoğunluğun ve toplam glomerül miktarının azalmasına yol açtığını göstermiştir. Buna ek olarak diklofenak ile melatoninin kullanımının yukarıda bahsedilen negatif etkileri düzelttiği gösterilmiştir. Ayrıca diklofenak verilen grubun böbreklerinde bağ dokuda artış ve nefronlarda dejenerasyon tespit edilmiştir. Fakat diklofenak ile melatonin kullanımının böbrekteki bu patolojik değişiklikleri önlediği tespit edilmiştir. Stereolojik sonuçlarda, diklofenak sodyum grubunun böbreklerdeki proksimal ve distal tübüllerin toplam hacmi kontrol ve plasebo grubuna göre anlamlı bir düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ortalama glomerül hacimlerinde kontrol ve diklofenak grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür. Ayrıca diklofenak sodyum grubunun glomerül hacmi ve yoğunluğunda diğer gruplara nazaran anlamlı derecede bir azalma olduğu görülmüştür (Khoshvakhti ve ark., 2015).

Bir çalışmada sıçanlarda stereolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak diklofenak kaynaklı akut nefrotoksitenin etkileri değerlendirilmiştir (Bolat ve Selçuk, 2013). Fareler dört eşit gruba ayrılarak 0, 10, 50 ve 100 mg/kg gibi değişik dozajlarda intraperitoneal olarak diklofenak verilip, kesimden sonra sol böbrekler stereolojik olarak değerlendirilmiştir. Anlamlı olmamakla beraber, total böbrek ve medulla volümleri düşme eğilimi gösterirken, buna karşın özellikle 50 mg/kg diklofenak zerk edilmiş grupta pelvik volümün artma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Buna paralel olarak bu gruptaki fare böbreklerinin medulla fraksiyonları düşerken, pelvik fraksiyonlarının diğer gruplara nazaran arttığı görülüp bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Bolat ve Selçuk, 2013).

Civcivlerde, yüksek doz (200 veya 400 mg/kg) asetil salisilik asit (ASA) veya sodyum salisilat (SS) uygulamasının vücut üzerinde ağırlık artışı (kilo alımı), kan biyokimyası, beyaz ve kırmızı kan hücre miktar ve patolojilerine etkisinin çalışıldığı bir araştırmada; 400 mg/kg ASA veya SS dozunun kütle kilo alımını düşürdüğü tespit edilmiştir. Böbrek / vücut ağırlığı oranı doza bağlı olarak artmış, ancak serum kreatinin ve ürik asit konsantrasyonları etkilenmemiştir (Pozniak ve ark., 2012).

Gebelik sürecince diklofenak sodyum verilen sıçanların yavrularının karaciğer, böbrek ve testis dokuları üzerindeki postnatal etkilerini inceleyen bir araştırmada (Gökçimen ve ark., 2001), gebeliklerinin beşinci gününden 20. gününe kadar her gün bir mg/kg diklofenak sodyum enjekte edilen diklofenak grubu olan 25 sıçan ile bir cm³/kg fizyolojik serum enjekte edilen kontrol grubu olan 25 sıçandan meydana gelen yavruları doğumlarından dört hafta sonra anestezi altında perfüze edilerek, 20'si diklofenak grubundan 20'si kontrol grubundan olmak üzere toplamda 40 adet yavrudan dokular alınıp fikse edilmiştir. Daha sonra rutin işlemler geçirilip mikroskop altında incelenmiştir. Işık mikroskobu altında yapılan incelemede her iki grup arasında böbrek dokularında morfolojik olarak bir değişim görülemedi. Dolayısıyla tüm grup yavrularında böbreğin morfolojisi üzerinde diklofenak sodyumun kapsamlı bir etkisi bulunamamıştır.

İstatistiksel olarak böbrek volümü hesaplanma neticesinde, diklofenak sodyum grubu böbreklerin böbrek volümünün diğer kontrol grubu böbrek volümlerinden daha yüksek olduğu tespit edildi.

NSAİİ'lar prostaglandinlerin biyolojik oluşumlarını baskılayarak, plasental bariyeri geçip cenin dolaşımına dahil olarak zehirli etkilerini farklı doku ve organlarda gösterirler (Kayaalp, 2012). NSAİİ kullanımından dolayı en fazla etkilenen organlar böbrekler ve karaciğerdir. Bu anlamda cenin ve yeni doğmuşlarda ciddi yan etki ve sakatlıklara sebebiyet verebilirler. PG sentezini düşürdüklerinden ötürü rahmin tonus ve kasılmaları azalır. Bundan dolayı NSAİİ kullanımları doğum suresinin ve de doğumun uzamasına sebep olabilir (Turner ve Collins, 1975). NSAİİ'lar PG sentez durdurucuları olduğundan cenine ait böbreklerdeki etkilerine bağlı olarak oligohidroamniosa ve böbrekte yan etkilere neden olabilirler. Bununla beraber duktus arteriosusun kapanmasına, böylelikle pulmoner arter basıncının yükselmesine sebep olabilirler

(Özbudak ve ark., 2016). Yeni doğanlarda karaciğere giden kanın oksijence yetersiz oluşu, bunun sonucunda karaciğer parankiminde bozulmalar gözlenmiştir (Gökçimen ve Malas, 2003).

Çalışmamızın COX-2'nin eksprese olduğu dokuların kantitatif metotlar sayesinde yapılan değerlendirmesinde, istatistiki anlamsal değer olarak, kontrol grubu böbreklerinde COX-2 ekspresyonunun mevcut olduğu hücre adedinin diklofenak sodyum grubu sıçan böbreklerinin dokularındaki COX-2 eksprese hücre sayılarından daha fazla olduğu tespit edildi. Bu da prenatal anneye uygulanan diklofenak sodyumun böbrek COX-2 ekspresyonunun postnatal yavru sıçan istatistiksel olarak anlamlı oranda inhibisyona neden olduğunu gösterdi.

Hamilelik esnasında diklofenak sodyum verilen yavru farelerin karaciğer, böbrek ve erbezlerindeki olası etkileri incelemeyi amaçlanan bir araştırmada, diklofenak uygulanan farelerde gebeliğin anlamlı bir şekilde uzadığı görülmüştür. Erkek ve dişi fare yavrularının karaciğerleri, böbrek ve testislerinde morfolojik olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiş, diklofenak sodyumun bunların üzerinde anlamlı bir morfolojik etkisi saptanamamıştır (Gökçimen ve ark., 2001).

Yaptığımız çalışmada, incelenen böbrek dokularındaki COX-2 ekspresyonu daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmektedir. Gebeliklerinde COX-2 inhibitörü olarak verdiğimiz diklofenak sodyumun yeni doğan dört haftalık sıçan böbreklerinde hem stereolojik hem de immünohistokimyasal skorlama tekniğiyle COX-2'nin inhibe edildiği görülmüş, bu sonuç daha önceki çalışmalar ile benzer doğrultuda olduğu anlaşılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarca, COX-2'nin gestasyon boyunca ve doğumdan hemen sonradan itibaren normal sıçan böbreklerinde arttığının tespiti bu hususta daha ileri çalışmaların yapılmasını önemli kılmaktadır. COX-2 inhibisyonu hakkında yapılan bazı çalışmalarda böbrek volümlerinde istatistiki anlamlı bir değişim gözlenemezken, bazılarında inhibisyon etkisinden dolayı ortalama volümün azaldığı, proksimal ve distal tübüllerde volüm artışı görülmüş yine başka bir çalışmada böbrek/vücut ağırlığı oranının arttığı tespit edilmiştir. İstatistiki açıdan anlamlı bulunan total böbrek volümünün diklofenak sodyum grubunda arttığını tespit etmemiz söz konusu durumun tekrardan çalışılmasının kayda değer olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla çalışmamız sonucunda bir sonraki araştırmada:

Gebelik süresince COX-2 inhibitörü NSAİİ uygulanarak postnatal yavrularda total volüm hesaplaması için ileri çalışma yapılması; deneysel olarak prenatal COX-2 inhibitörü NSAİİ kullanılıp, yaşa bağlı olarak COX-2 ekspresyonunun incelenmesi; böbrek damar volümü ile COX-2 ekspresyon ilişkisinin araştırılması; prostatta COX-2 inhibitörlerinin ekspresyona olan etkilerinin incelenmesi; kanser-COX-2 ilişkisinin araştırılması önerilebilir.



KAYNAKLAR

- Baddeley A. *Spatial Statistics and Digital Image Analysis*. Washington: National Research Council; 1991. Chapter 10, Stereology; 181-216.
- Besen A, Köse F, Paydaş S, Gönlüşen G, İnal T, Doğan A ve ark. The effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium on the rat kidney , and alteration by furosemide. *Int Urol Nephrol*. 2009;41(4):919–926.
- Bolat D ve Selcuk ML. Stereological and biochemical evaluation of diclofenac-induced acute nephrotoxicity in rats. *Revue Méd Vét*. 2013;164(6):290-294.
- Börekçi E. Orta Anadolu'da Üçüncü Basamak Bir Hastanede Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaç Reçeteleme Tercihleri. *J Contemp Med*. 2017; 7(2):203–207.
- Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S ve ark. Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem, Cavalieri Prensibi. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002;22(1): 7–14.
- Dawood MY. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and reproduction. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;169(5):1255–1265.
- Dede H, Uzel M, Melek İ, Okuyucu E. Gebelikte izlenen primer baş ağrıları ve bu nedenle reçete dışı ilaç kullanımını. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg*. 2015;5 (18):26–33.
- Dökmeci İ. *Farmakoloji Temel Kavramlar*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti; 2000.
- Dudek RW. *BRS Embriyoloji*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2016.
- Eroschenko VP. *diFiore Histoloji Atlası.10*. Ankara: Palme Yayıncılık; 2008.
- Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016.
- Gartner LP. *BRS Hücre Biyolojisi ve Histoloji*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık; 2016.
- Glover D, Rybeck B, Tracy T. Medication use in a rural gynecologic population: prescription, over-the-counter, and herbal medicines. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(2):351–357.
- Gökçimen A, Malas M. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların gebelikteki toksisite ile ilgili literatürlerin gözden geçirilmesi. *Süleyman Demirel Univ Tıp Fak Derg*. 2003;10(3):50–52.
- Gökçimen A, Aydın G, Karaöz E, Malas MA, Öncü M. Effect of diclofenac sodium administration during pregnancy in the postnatal period. *Fetal Diagn Ther*. 2001;16(6):417–422.
- Guan Y, Chang M, Cho W, Zhang Y, Redha R, Davis L ve ark. Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am J Physiol*. 2017;273(1):F18–F26.
- Gundersen HJ, Jensen E. The efficiency of systematic sampling in sterology and its prediction. *J Microsc*. 1999;193(3):199-211.

- Gundersen H. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles, the edge effect. *J Microsc.* 1977;111(2):219–223.
- Hersh EV, Pinto A, Moore PA. Adverse drug interactions involving common prescription and over-the-counter analgesic agents. *Clin Ther.* 2007;29(11):2477–2497.
- Karakoç Ş, Çölçimen N, Rağbetli MÇ. An investigation of the effects of diclofenac sodium applied to pregnant rats on postnatal uterus: A stereological study. *Van Tıp Derg.* 2018;25(2):155-159.
- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2012.
- Khoshvaghti H, Yurt K, Altunkaynak B, Türkmen A, Ayrancı E, Aydın I ve ark. Histopathological alterations kidney in adult male rats that prenatally exposed to diclofenac sodium: A histopathological study. *J Exp Clin Med.* 2014;31(2):133.
- Khoshvakhti H, Yurt K, Altunkaynak B, Türkmen A, Elibol E, Aydın I ve ark. Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney : a stereological and histopathological study Effects of melatonin on diclofenac sodium treated rat kidney: a stereological and histopathological study. *Ren Fail.* 2015;37(8):1379-1383.
- Komhoff M, Grone HJ, Klein T, Seyberth HW. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1997;272(4):F460–F468.
- Özbudak H, Ünal A, Sabuncuoğlu S. Gebelikte non-steroidal antiinflamatuvar ilaçların kullanımının değerlendirilmesi. *Marmara Pharm J.* 2016; 20(2):64–71.
- Pai A. Keeping kidneys safe: The pharmacist's role in NSAID avoidance in high-risk patients. *J Am Pharm Assoc.* 2015;55(1):e15–e25.
- Pakkenberg B, Gundersen H. Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc.* 1988;150(1):1–20.
- Pazvant G, Şahin B, Kahvecioğlu KO, Güneş H, İnce NG, Bacınoğlu D. The volume fraction method for the evaluation of kidney: A stereological study. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2009; 56(1):233-239.
- Pozniak B, Switala M, Bobrek K. Adverse effects associated with high-dose acetylsalicylic acid and sodium salicylate treatment in broilers. *Br Poult Sci.* 2012;53(6):777-783
- Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.* 7. Philadelphia: Wolters Kluver; 2011.
- Sadler TW. *Langman's Medical Embryology.* 11. Philadelphia: Wolters Kluver; 2009.
- Schoenfeld A, Bar Y, MP. Nsaids: maternal and fetal considerations. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1992;28(3-4):141–147.
- Small R. Diclofenac sodium. *Clin Pharm.* 1989;(8):545–548.


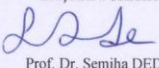
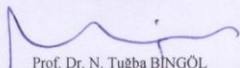
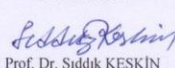
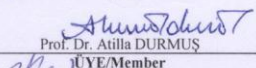
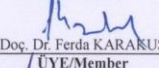
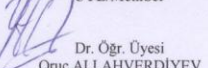
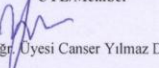

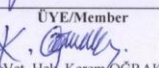
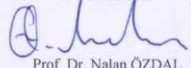

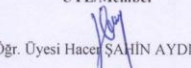
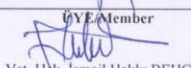
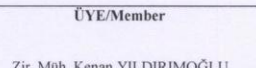
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134(2):127–136.
- Stubbe J, Jensen BL, Bachmann S, Morsing P, Skøtt O. Cyclooxygenase-2 contributes to elevated renin in the early postnatal period in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(5):R1179–R1189.
- Tillett J, Kostich LM, VandeVusse L. Use of over-the-counter medications during pregnancy. *J Perinat Neonatal Nurs.* 2003;17(1);3–18.
- Turner G, Collins E. Maternal effects of regular salicylate ingestion in pregnancy. *Lancet.* 1975;306(7930):335–338.
- Uyemura SA, Santos AC, Mingatto FE, Jordani MC, Curti C. Diclofenac sodium and mefenamic acid: potent inducers of the membrane permeability transition in renal cortex mitochondria. *Arc Biochem Biophys.* 1997;342(2):231–235.
- Ünal B, Aslan H, Canan S, Şahin B, Kaplan S. Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafı) metotların önemli hata kaynakları ve çözüm önerileri. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;22(1):1–6.
- Ünal B, Canan S, Aslan H, Şahin B, Çataloluk O, Kaplan S. Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metotlar: fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri.* 2002;22(1):15-24.
- Warden S. Cyclo-Oxygenase-2 inhibitors musculoskeletal injuries. *Sports Med.* 2005;35(4):271–283.
- Willkens RF. Worldwide clinical safety experience with diclofenac. *Semin Arthritis Rheum.* 1985;15(2):105–110.
- Zenker M, Klinge J, Kruger J. Severe pulmonary hypertension in a neonate caused by premature closure of ductus arteriosus following maternal treatment with diclofenac: a case report. *J Perinat Med.* 1998;26(3):231–234.
- Zhang MZ, Wang JL, Cheng HF, Harris RC, McKanna JA. Cyclooxygenase-2 in rat nephron development. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1997;273(6):F994–F1002.

ÖZGEÇMİŞ


1987 yılında Siirt İlinin Kurtalan İlçesine bağlı Kayabağlar beldesinde doğdu. İlköğrenimini Kayabağlar beldesinde tamamladı. Ortaöğrenimini ise 75. Yıl Sağlık Meslek Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında Dicle Üniversitesi Siirt Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu lisans, 2015 yılında Anadolu Üniversitesi AÖF Adalet önlisans, 2017 yılında Siirt Üniversitesi Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu Uygulamalı İngilizce ve Çevirmenlik önlisans, 2019 yılında Anadolu Üniversitesi AÖF Uluslararası İlişkiler lisans programlarından mezun oldu. 2013 yılında Van YYU Tıp Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. Halen Siirt İl Sağlık Müdürlüğü, Kamu Hastaneler Hizmetleri Başkanlığı, Evde Sağlık Hizmetleri biriminde Sağlık Memuru olarak görev yapmaktadır.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi

	VAN YÜHADYEK VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ	
VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY) ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE	
Araştırmanın Adı <i>Research Title</i>	Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Sıçanlarda Renal Cox-2 Dağılımının Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması <i>A Stereological Study Of Renal Cox-2 Expression In Rats Treated Prenatally With Diclofenac Sodium</i>
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / Chief investigator : Prof. Dr. Murat Çetin RAĞBETLİ Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Yük. Lis. Öğr. Murat SEVEN
Araştırmanın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date:</i>	28.07.2016
Araştırmanın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date:</i>	28.01.2017
Proje Süresi / <i>Total Time of Project:</i>	6 Ay
Proje No / <i>Project Number:</i>	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available):</i>	
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding:</i>	
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30/05/2019 tarih ve 2019/05 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 30/05/2019 (decision number 2019/05)	
	BAŞKAN/CHAIR  Prof. Dr. Semiha DEDE
ÜYE/Member  Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL ÜYE	ÜYE/Member  Prof. Dr. Sıddık KESKİN ÜYE/Member
ÜYE/Member  Prof. Dr. Atilla DURMUŞ ÜYE/Member	ÜYE/Member  Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ ÜYE/Member
ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Oruc ALLAHVERDİYEV ÜYE/Member	ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Canser Yılmaz DEMİR ÜYE/Member
ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ONALAN ÜYE/Member	ÜYE/Member  Vet. Hek. Kerem ÖĞRAK ÜYE/Member
ÜYE/Member  Prof. Dr. Nalaj ÖZDAL ÜYE/Member	ÜYE/Member  Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN ÜYE/Member
ÜYE/Member  Dr. Öğr. Üyesi Hacer ŞAHİN AYDINYURT ÜYE/Member	ÜYE/Member  Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET ÜYE/Member
ÜYE/Member  Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU ÜYE/Member	

EK 2. Tez Orijinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 13/06/2019

Tez Başlığı/Konusu: Prenatal Uygulanan Diklofenak Sodyumun Postnatal Siçanlarda Renal COX-2 Dağılımının Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması.

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 52 sayfalık kısmına ilişkin, 13/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 (Dört)'tür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Murat SEVEN

Öğrencinin Adı Soyadı	Murat SEVEN
Anabilim Dalı	: Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji
Öğrenci No	011932710008
Programı	<input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANISMANIMIN UYGULAMA Prof.Dr. Murat ÇELİK	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR Dr.Öğr.Üyesi Hacer SAĞIN AĞDINYURT