

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

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI SAFRANAL'IN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Oğuzhan KESKİN

TRABZON - 2019

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

**SIÇANLARDA DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN
NEFROTOKSİSİTEYE KARŞI SAFRANAL'IN ETKİLERİNİN
HİSTOLOJİK VE FLOW SİTOMETRİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Oğuzhan KESKİN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU**

TRABZON - 2019

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan çok değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Aldülkadir KUTLU, Arş. Gör. Dr. Tuğba ZENGİN, Arş. Gör. Dr. Tuğba ARICI, Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE, Uzm. Dr. Neziha Senem ARI, Arş. Gör. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Arş. Gör. Dr. Dilan ÇETİNAVCI ve tüm bölüm arkadaşlarıma, tez çalışmamı THD-2018-7720 no'lu proje kodu ile destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Oğuzhan KESKİN

ÖZET

Sıçanlarda Doksorubisin İle İndüklenen Nefrotoksisiteye Karşı Safranal'ın Etkilerinin Histolojik ve FlowSitometrik Değerlendirilmesi

Bu çalışmada doksorubisin tedavisi nedeni ile sıçanlarda oluşabilecek nefrotoksisiteye karşı, safranal'ın etkilerinin histolojik ve flowsitometrik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda toplam 18 adet Sprague Dawley dişi sıçan kullanıldı ve 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 7 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmadı. DOKS grubuna deneyin beşinci günü tek doz 40 mg/kg doksorubisin intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. DOKS+SAF grubuna, 7 gün boyunca 200 mg/kg safranal oral gavaj ile verildi ve deneyin beşinci günü doksorubisin 40 mg/kg intraperitoneal uygulandı. Deney sonunda (8. gün) derin anestezi (ketamin 90 mg/kg) altında sıçanlar eksanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi ve sol böbrek dokuları alındı. Böbrek dokularının histopatolojik değerlendirmesi için ışık mikroskobu kullanıldı. Böbrek dokusunda apoptozu ve oksidatif stresi değerlendirmek için flowsitometrik inceleme yapıldı.

Yapılan histopatolojik değerlendirmeler sonunda DOKS grubuna ait böbrek kesitlerinde interstisyel alanda yoğun vasküler konjesyon, tübül epitel hücrelerinde dökülme, tübül epitelinde yer yer vakuolizasyon ve yer yer tübüllerde atrofi izlendi. DOKS+SAF grubuna ait böbrek dokusunda, interstisyel alanda vasküler konjesyon, tübül epitel hücrelerinde dökülme, tübül epitelinde yer yer vakuolizasyon ve yer yer tübüller atrofi izlenmekle birlikte DOKS grubu ile kıyaslandığında interstisyel vasküler konjesyonda çok daha belirgin olmak üzere histopatolojik bulgularda düzelme oldu. Morfometrik ölçümler sonucu, gruplar arasındaki tübül çapı değişiklikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Yapılan flowsitometrik inceleme sonunda DOKS grubunda apoptoz indeksi artarken DOKS+SAF grubunda DOKS grubuna göre apoptoz indeksinin azaldığı tespit edildi. Ayrıca DOKS grubunda kontrol grubuna göre antinox2/gp91phox pozitif hücre sayısında artış tespit edilirken DOKS+SAF grubunda DOKS grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi.

Elde ettiğimiz bulgular, doksorubisinin dişi sıçanların böbrek histolojisini olumsuz olarak etkilediğini, doksorubisine ek olarak safranal uygulanması ile bu olumsuz değişikliklerin histopatolojik ve flowsitometrik düzeyde düzeldiğini göstermektedir. Bu düzelmelerin safranalın antioksidan etkileri ile gerçekleşmiş olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, Nefrotoksisite, Safranal, Apoptoz, Flow Sitometri

SUMMARY

The Histological and Flowcytometric Evaluation of Effects of Safranal Against Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats

The aim of this study was to investigate the effects of safranal against nephrotoxicity due to doxorubicin treatment using histologic and flowcytometric methods in rats.

A total of 18 Sprague Dawley female rats were used and divided into three groups. The control group received no treatment for 7 days. 40 mg/kg i.p. doxorubicin as a single dose was administered to the DOX group in the fifth day of the experiment. 200 mg/kg safranal was given to the DOX+SAF group by oral gavage for 7 days and 40 mg/kg doxorubicin was administered intraperitoneally on the fifth day of experiment. At the end of the experiment (day 8), the rats were sacrificed by exsanguination method under deep anesthesia (ketamine 90 mg/kg) and left kidney tissues were removed. Light microscopy was used for histopathological evaluation of renal tissues. Flow cytometric examination was performed to evaluate apoptosis and oxidative stress in renal tissue.

As a result of histopathological evaluations, the renal sections of DOX group revealed intense vascular congestion in the interstitial area, shedding of tubular epithelial cells, vacuolization of tubular epithelium and tubular atrophy. Vascular congestion in the interstitial area, shedding of tubular epithelial cells, vacuolization of tubular epithelium and tubular atrophy are observed in renal tissues belonging to DOX+SAF group. Compared with the DOX group, histopathological findings were improved in DOX+SAF group especially in interstitial vascular congestion. As a result of morphometric measurements, statistically significant difference was not found in terms of tubule diameter between the groups. At the end of flowcytometric examination, apoptosis index increased in DOX group compared to control group and apoptosis index decreased in DOX+SAF group compared to the DOX group. In addition, in the DOX group the number of antiox2/gp91phox positive cells were increased compared to the control group and a significant decrease was found in DOX+SAF group compared to the DOX group.

Our findings show that doxorubicin administration adversely affects kidney histology of female rats and in addition to doxorubicin, safranal administration improves these changes at histopathological and flowcytometric level. It can be said that these improvements may have been caused by the antioxidant effects of safranal.

Keywords: Doxorubicin, Nephrotoxicity, Safranal, Apoptosis, Flow Cytometry

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Morfolojisi	3
2.1.1. Böbrek Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Böbrek Anatomisi	5
2.1.3. Böbrek Histolojisi	6
2.2.Dokso rubisin	13
2.2.1.Dokso rubisin'in Genel Özellikleri.....	13
2.2.2.Dokso rubisin'in Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması.....	13
2.2.3. Dokso rubisin'in Farmakokinetiği	14
2.2.4.Dokso rubisin'in Yan Etkileri.....	14
2.3.Safranal	15
2.3.1. Safranal'in Genel Özellikleri	15
2.3.2. Safranal'in Kimyasal Yapısı	15
2.3.3.Safranal'in Farmakolojik Etkileri	15
2.4. Apoptoz ve Oksidatif Stres	17
2.4.1. Apoptoz ile İlgili Genel Bilgiler	17
2.4.2. Oksidatif Stres ile İlgili Genel Bilgiler	18
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	21
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deney Çalışma Planı	21
3.3. Doku Numunelerinin Toplanması	23
3.4. Histolojik İşlemler	24
3.4.1. Formalin Tespitinin Hazırlanışı	24

3.4.2. Histolojik İnceleme için Dokuların Hazırlanması	24
3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması	26
3.4.4. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi.....	26
3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	28
3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	29
3.4.7. Histomorfometrik İşlemler	30
3.5. Flow Sitometrik İşlemler	30
3.5.1. Taze Dokudan Hücre Süspansiyonu Elde Etme	30
3.5.2. Anneksin V Yöntemi	31
3.5.3. Antinox2/gp91phox Yöntemi	32
3.5.4.Flow Sitometrik Analiz.....	33
3.6. İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Histomorfometrik Bulgular.....	35
4.2. Histomorfolojik Bulgular.....	36
4.2.1. Deney Gruplarında Histopatolojik Skorumları	36
4.2.2. Hematoksilen Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	37
4.2.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	43
4.2.4. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi.....	46
4.3. Flow Sitometrik Bulgular	49
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
7. KAYNAKLAR	58

KISALTMALAR DİZİNİ

µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre
7-AAD	: 7-amino-aktinomisin D
8-OHdG	: 8-Hidroksi-deoksiguanozin
AI	: Apoptoz indeksi
AQP-1	: Akuaporin-1
C	: Karbon Atomu
CAT	: Katalaz
Ca	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
cytb	: Sitokrom b
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOKS	: Doksorubisin
E. coli	: Escherichia Coli
FITC	: Floresan İzotiyosiyanat
GC	: Guanin Sitozin
gr	: Gram
GBM	: Glomeruler Bazal Membran
gp91phox	: Fagosit Oksidaz
GPX	: Glutatyon Peroksidaz
GSH	: Glutatyon
Jg	: Jukstaglomerular
H	: Hidrojen Atomu
H1	: Histamin 1
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Glikozile Hemoglobin
H&E	: Hematoksilen eozin
kDa	: Kilodalton
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
LSCM	: Lazer taramalı konfokal mikroskopi

MDA	: Malondialdehid
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MPO	: Miyeloperoksidaz
NaCL	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
Na/K/Cl	: Sodyum Potasyum Klor
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Azotdioksit
NOX2	: NADPH Oksidaz 2
°C	: Santigrad derece
O⁻	: Süperoksit radikali
OH	: Hidroksil radikali
ONOO	: Peroksinitrit
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ppm	: Milyonda Bir Birim (Parts Per Million)
RAAS	: Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
RONs	: Reaktif Oksijen Azot Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SAF	: Safranal
S. aureus	: Staphylococcus Aureus
S. enterica	: Salmonella Enterica
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TopoII	: Topoizomeraz II
TOS	: Total oksidan durum

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Tdt) Deoxyuridine
Triphosphate Nick End Labeling



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Deney Grupları ve Takip Çizelgesi.....	23
Tablo 2. Doku Takip Prosedürü	25
Tablo 3. H&E Boyama Prosedürü.....	26
Tablo 4. PAS Boyama Yöntemine Ait Uygulamalar ve Süreleri	28
Tablo 5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi.....	29
Tablo 6. Anneksin V Yöntemi.....	32
Tablo 7. Deney Gruplarında Tübül Çapına Ait Ortalamalar ve Standart Sapmaları.....	35
Tablo 8. Deney Gruplarına Ait Böbrek Dokusu Histopatolojik Skorlaması.....	36
Tablo 9. Deney Gruplarına Ait Flowsitometrik AI Değerleri	49
Tablo 10. Deney Gruplarına Ait Antinox2/Gp91phox Sonuçları	51

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler	22
Resim 2. Sıçanlara Orogastrik Gavaj Uygulaması	23
Resim 3. Böbreklerin Çıkartılması ve Böbreğin Makroskopik Görünümü.....	24
Resim 4. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).....	37
Resim 5. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X400).....	38
Resim 6. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).....	39
Resim 7. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X400).....	40
Resim 8. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).....	41
Resim 9. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X400).....	42
Resim 10. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (PAS, X400)	43
Resim 11. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu (PAS, X400).....	44
Resim 12. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu (PAS, X400).	45
Resim 13. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (Masson Trikrom, X400).....	46
Resim 14. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu (Masson Trikrom, X400).	47
Resim 15. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu (Masson Trikrom, X400).....	48

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Böbrekler, karın boşluğunda retroperitoneal olarak yerleşim gösteren, vertebranın iki tarafında bulunan çift organlardır. Böbreğin ana görevi, renal arter yoluyla gelen kanın ultrafiltrasyonudur. Böbrekler glomerüler filtrasyon, tübüler geriemişim ve sekresyon sonucu idrar oluşturur. Böbrekler, idrarla atılan su ve elektrolit miktarını değiştirerek vücuttaki sıvı volümünü, ozmolaritesini, elektrolit içeriğini, konsantrasyonunu ve asiditesini düzenler. Metabolik son ürünleri, çeşitli toksin ve ilaçları vücuttan uzaklaştırır. Anjiyotensinojenden anjiyotensin oluşumunu katalize eden renin, kemik iliğinde eritrosit olgunlaşmasını uyaran eritropoetin, vücuttaki kalsiyum fosfor dengesini düzenleyen Vitamin D3'ün aktif formu olan 1, 25-dihidroksivitamin D3 ve vazodilatatör etkili prostoglandin sentezini gerçekleştirir. Böbrek hücrelerinin bölünme hızı yüksek olmamasına rağmen, yüksek kan akımı ile karşılaşması, medüller interstisyumda toksinleri konsantre etmesi ve tübüler epitelde özel taşıyıcılar bulunması nedeniyle toksik hasara oldukça duyarlıdır (1-4).

Kemoterapotik ilaçlar, vücutta patolojik biçimde çoğalmakta olan kanser hücrelerini yok etmekle birlikte, aynı zamanda yüksek bölünme hızına sahip normal hücreleri de etkiler. Bu nedenle çoğu kanser kemoterapisinde kullanılan ilacının kemik iliği, kan hücreleri ve diğer hızlı çoğalan hücreler üzerine ciddi yan etkileri vardır (5).

Doksozobisin 1960'lı yılların başında *Streptomyces Peucetius*'un pigmentinden izole edilen bir antrasiklin antibiyotiktir. Kansere karşı savaşta 30 yıldan fazla kullanılmıştır. Günümüzde kimyasal olarak sentezlenmektedir. Doksozobisin hematolojik maligniteler, farklı karsinom türleri, yumuşak doku sarkomları gibi geniş kanser çeşitlerinin tedavisinde kullanılmasına rağmen kardiyotoksisite ve nefrotoksisite dahil ciddi yan etkileri nedeniyle kemoterapide kullanımı sınırlıdır (6, 7).

Doksozobisin ile indüklenen nefrotoksisitenin kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Doksozobisin ile indüklenen renal toksisite, membran lipit peroksidasyonuna yol açan serbest radikal oluşumu aracılığıyla meydana gelen multi organ hasarının bir parçası olabilir. Bazı çalışma sonuçlarına göre doksozobisin kaynaklı böbrek hasarının patogeneğinde oksidatif stres ve inflamasyonun kritik rol

oynadığı düşünölmektedir (8, 9). Bugüne kadar yapılan araştırmalarda doksorubisin tedavisine bağlı nefrotoksisiteyi azaltmak ve/veya tedavi etmek için çeşitli antioksidanlar kullanılmıştır.

Iridaceae ailesinin uzun ömürlü sapsız bir bitkisi olan *Crocus sativus* (safran), İnan, Hindistan gibi bazı ölkelerde yaygın olarak yetiştirilir. Safranal (2, 6, 6-trimetil-1, 3-sikloheksadien-1-karboksaldehit, C₁₀H₁₄O) *Crocus sativus* esaslı uçucu yağın ana bileşenidir. Safran'ın organik bir bileşeni olan safranal'ın yapılan bazı çalışmalar neticesinde çeşitli farmakolojik etkileri saptanmıştır. Bu farmakolojik etkileri arasında antikonvölzan, antioksidan, serbest radikal süpürücü, antidiyabetik ve in vitro kanser hücrelerine karşı sitotoksisite bulunmaktadır (10-14).

Bu çalışmada, doksorubisine bağlı gelişen nefrotoksisiteye karşı antioksidan özelliği olan safranalın etkilerini histolojik ve flow sitometrik olarak değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Böbrek Morfolojisi

2.1.1. Böbrek Embriyolojisi

İnsanlarda intrauterin yaşam sırasında kranio-kaudal yönde gelişen üç böbrek sistemi oluşur: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz. Pronefroz ve mezonefroz regrese olan geçici yapılardır. Metanefroz insanda kalıcı böbreği oluşturur (15).

Pronefroz

Pronefrozlar 4. haftanın başında servikal bölgede, 7 ila 10 hücre grubuyla belirir. Bu gruplar, nefrotom olarak adlandırılan daha kaudaldeki oluşmadan önce gerileyen körüklü boşaltım birimlerini oluşturur. Pronefrik kanallar kaudal olarak seyrederek sonbağırsak ve allatoisin boşaltıldığı klokeye açılır. Dördüncü haftanın sonunda pronefrik sistemin tümü kaybolur (16).

Mezonefroz

Büyük, uzamış boşaltım organı olan mezonefroz, pronefrozun kaudalinde 4. haftanın sonuna doğru ortaya çıkar. Mezonefroz kalıcı böbrek gelişip fonksiyon görene kadar 4 hafta süreyle ara böbrek olarak işlev görür. Mezonefrik böbrekte glomerül (her böbrekte 10-50) ve mezonefrik tübüller bulunur. Tübüller, pronefrozdan kaynaklanan bilateral mezonefrik kanallara açılır. Mezonefrik kanallar 12. haftanın sonuna doğru dejenere olur, fakat mezonefrik tübüller testiste efferent duktulileri oluşturur (17, 18).

Metanefroz

Kalıcı böbrek veya metanefroz, boşaltım ve toplama kısmı olmak üzere iki fonksiyonel bileşenden oluşur. Metanefroz oluşumu, indüksiyon ve sakral bölgenin intermediate mezodermi içinde bir çift yeni yapı olan üreter tomurcuklarının oluşumu ile başlar. Bir üreter tomurcuğu her bir mezonefrik kanalın kaudal kısmından yaklaşık 28. günde tomurcuklanır. 32. gün civarında her üreter tomurcuğu metanefrik mezenşim olarak adlandırılan sakral intermiat mezodermin bir kısmına penetre olur ve tomurcuk iki kola ayrılmaya başlar (19, 20).

Metanefrik mezenşim, çevre mezenşimden histolojik olarak ayrılır ve üreter tomurcuğuna bitişik olarak bulunur. Üreter tomurcuğunun metanefrik mezenşime yayılması üzerine metanefrik mezenşimden sinyaller üreter tomurcuğunun bir t-tübül içine yayılmasına ve daha sonra tekrarlayan çatal şeklinde dallanmaya neden olur. Eşzamanlı olarak üreter tomurcuğu metanefrik mezenşime karşılıklı sinyaller gönderir. Dallanan üreter tomurcuğunun ucuna bitişik olarak metanefrik mezenşim hücreleri yoğunlaşır. Pretübüler agregat olarak adlandırılan hücre yığınları mezenşimo-epitelyal dönüşüm geçirerek renal vezikül haline gelirler (21-23).

Renal vezikül spiral şeklinde kıvrılarak renal tübülü meydana getirir. Bu bölgede mezenşimal hücreler epitalyal dönüşüm göstererek podositleri oluşturur. Metanefrik mezenşimin indüklemesi ile podositlerin altına doğru gelişen vasküler endotelial hücre öncülleri glomerülü oluştururlar. Tübül ve glomerüller beraber nefronları oluştururlar. Her bir nefronun proksimal ucu bir glomerül tarafından içten girintilendirilen Bowman kapsülünü oluşturur. Her bir nefronun distal uç kısmı toplayıcı sistem ile bağlantılı haldedir. Tübüller sürekli uzayarak proksimal, distal tübül ve henle kulbunu oluşturur (16, 24).

Toplayıcı kanallar, kloaka girişine yakın mezonefrik kanalın bir çıkıntısı olan üreter tomurcuğundan gelişir. Üreter tomurcuğu distal ucu üzerine biçimlenen bir şapka gibi metanefrik dokuya penetre olur. Daha sonra tomurcuk genişleyerek renal pelvisi oluşturur (15).

Üreter tomurcuğu çatal şeklinde dallanarak 13 ve daha fazla kere bölünüp böbrek toplayıcı sistemini oluşturur. Renal pelvis major kaliks minör kaliks toplayıcı kanal ve toplayıcı tübülleri oluşturmak için tekrarlanan bölünmeler geçirir (24).

Fetal metanefroz S1-S2 vertebra seviyelerinde bulunurken, kalıcı yetişkin böbrek T12-L3 vertebra düzeyinde bulunur. Böbrek yerleşimindeki bu değişime embriyo kaudalinin metanefroza göre orantısız büyümesi neden olur. Bu esnada böbrekler 90° dönerek hilumun başlangıç pozisyonunun ventralden mediale dönmesine neden olur (25).

Dorsal aortadan arteriyal filizlerin bir serisi ile yer değiştiren böbrek revaskülarize edilir ve daha sakraldeki renal arter kaybolur. Sağ böbrek sağ tarafta karaciğerin bulunması nedeniyle genellikle sol böbrek kadar yükselmez. Böbreğin yer değiştirmesi 6 ile 9 haftalar arasında meydana gelir (26).

2.1.2. Böbrek Anatomisi

Böbrekler, normal olarak, vertebral kolonun her bir tarafında birer adet bulunan retroperitoneal organlardır. İnsanda, her böbreğin üst kutbu, 12. torasik vertebraya karşılık gelen bir seviyede bulunurken alt kutup ise, 3. lomber vertebra seviyesine karşılık gelir. Sağ böbrek genellikle sol böbreğe göre daha kaudalde yerleşim gösterir. Böbrek yetişkin insanda yaklaşık 120-170 gr ağırlığında, 11 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde ve 2.5 cm kalınlığındadır (27, 28).

Her böbrek renal kapsül adı verilen bağ dokusu kılıfı ile sarılıdır. Renal kapsülün etrafında böbreği mekanik travmadan koruyan kalın yağ dokusu bulunur. Bu tabaka adipoz kapsül olarak adlandırılır. En dışta ince fibröz bir tabaka olan ve böbreği çevre dokulara ve karın duvarına tutturarak renal fasya bulunur (29).

Her böbreğin medial tarafında renal arter ve sinirin giriş yaptığı, üreter, renal ven ve lenfatiklerin ise çıkış yaptığı hilum kısmı bulunur. Hilum, bağ dokusu ve yağdan oluşan renal sinüs olarak adlandırılan böbrekteki bir boşluğa giriştir (30, 31).

Böbrek kırmızımsı renkte ve fasülye şeklinde bir organdır. Böbrekten frontal kesit alındığında dışta korteks olarak adlandırılan bir alan ve iç kısımda ise medulla bulunur. Taze diseke edilen böbrekte korteks kırmızımsı, medulla ise kırmızı kahveringî görünür. Medulla içinde 5-11 adet konik renal piramidler bulunur. Renal piramidlerin tabanı korteks ve medulla sınırında lokalizedir. Çizgili görünüm tüz tübül ve kan damarlarının bir araya gelmesiyle oluşur. Her böbrek piramidinin ucunu huni şeklinde bir yapı olan minör kaliks çevreler. İki ila üç minör kaliks birleşerek major kaliksleri oluşturur. Böbrek iki veya üç major kaliks içerir. Major kaliksler birleşerek renal sinüste bulunan renal pelvisi oluştururlar (32-34).

Böbrek Vaskülarizasyonu

Abdominal aortadan orijine olan renal arter böbreğe yaklaştığında birçok dallanma yaparak segmental arterlere bölünür. Hiler bölgeden giren renal arter anterior ve posterior olmak üzere iki dala ayrılır. Anterior daldan orijine olan lobar arterler böbrek anterior yüzünün üst, orta ve alt bölümünü besler. Posterior dal ise böbreğin posterior yüzeyinin yarısından fazlasını besler ve bir küçük apikal segmental dala ayrılır (27, 35).

Nefronlara kan akımı

Renal arterlerden dallanan interlobar arterler renal piramitler arasında seyreder ve daha sonra korteks ve medulla arasındaki arkuat arterlere dallanır. Arkuat arterler dallanarak interlobular arterleri oluşturur ve kortekse doğru yayılır. Kortekste afferent arteriollere ayrılırlar ve afferent arteriyol glomerulus olarak bilinen karışık kapiller ağ içine bölünür. Daha sonra glomerular kapillerler yeniden birleşek efferent arteriyolu oluşturur. Daha sonra her efferent arteriyol bölünüp nefronların kıvrımlı tübüllerini saran peritübüler kapillerler olarak adlandırılan yeni bir kapiller ağ oluştururlar. Daha sonra peritübüler kapillerler yeniden bir araya gelerek arkuat venlere arkuat venler de interlobüler venlere birleşir. İnterlobüler venler de birleşerek renal venlere dökülür (36-38).

Böbreğin İnnervasyonu

Böbreğin innervasyonu otonomik sinir sisteminin renal pleksusu tarafından sağlanır. Epinefrin kullanan sempatik nöronlar böbreğin kan damarlarını innerve eder. Bu uyarılma sonucu arterlerde vazokonstriksiyon oluşur, sonucunda kan akımı ve filtrat oluşumunda azalma meydana gelir (39).

2.1.3. Böbrek Histolojisi

Böbrekler fasülye şeklinde çift organlar olup ince bir bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Her böbrek dışta korteks içte medulla olmak üzere iki bölüme ayrılır. Böbrekler yüksek vaskülarize organlar olup kardiyak outputun %25'ini alırlar. Böbreğe gelen kanın yaklaşık olarak %90'ı kortekste, %5 ila 10'u ise medullada perfüze olur. Nefron böbreğin ana fonksiyonel birimidir (40, 41).

Böbrek korteksi kapsül altında uzanır ve renal piramitler arasında Bertini böbrek kolonları olarak devam eder. Böbrek korteksinde renal korpüsküller, nefronun düz ve kıvrımlı tübülleri, toplayıcı kanallar, bağlantı tübülleri ve kan damarları bulunur. Böbrek cisimcikleri nefronun başlangıç kısmını oluşturur ve glomerül olarak adlandırılan kapiler ağ içerir. Medulladan kortekse uzanan dikey çizgiler, görünümleri nedeniyle medullar (Ferrein) çizgiler olarak adlandırılır. Yaklaşık olarak 400 ila 500 medullar ışın medulladan korteksin içine uzanır.

Medullar ışınlar proksimal ve distal túbülün düz kısımları yanı sıra toplayıcı kanalları içerir (42-44).

Her bir piramit ve tabanından kortekse uzanan korteks dokusu böbrek lobu olarak adlandırılır. Medullar ışın ve arasındaki kortikal doku ise lobül olarak adlandırılır (45).

Fonksiyonel açıdan böbrek idrar atılımı için özelleşmiş sayısız ünifer túbüllerden oluşur. Her bir ünifer túbül nefron olarak adlandırılan boşaltım bölümü ve toplayıcı túbülden oluşur (46).

Nefronun Genel Yapısı

Nefron böbreğin temel fonksiyonel ve yapısal birimidir. Böbrekte yaklaşık olarak 2 milyon nefron bulunur. Nefronlar idrar üretiminden sorumludur ve diğer bezlerin sekretuar kısımlarıyla eşdeğerdir (41).

Nefron iki kısımda incelenir. Renal korpüskül ve renal túbül sistemi. Renal korpüskül glomerül ve onu çevreleyen çift katlı epitelyal özellikte Bowman kapsülünden oluşur. Glomerül Bowman kapsülünü invajine eden globüler anastomozlaşmış kapiller ağıdır. Bowman kapsülü nefronun ilk kısmı olup glomerüler ultrafiltrat üretimi için glomerüler kapiller içinden geçen kan bu bölgede filtrasyona uğrar (47, 48).

Renal túbül sistemi renal korpüskülün idrar kutbundan çıkan proksimal kıvrımlı túbül ile başlar, devamında Henle kulpu, distal kıvrımlı túbül, renal túbül sistemini toplayıcı kanallara bağlayan bağlantı túbülleri ile sonlanır (49).

Nefron tipleri

Nefronlar, renal korpüsküllerin korteksteeki yerleşimine göre üçe ayrılır. Subkapüler yada kortikal nefronlar: renal korpüskülleri kortekste dış kısımda yer almakla birlikte Henle kulpu kısa ve sadece medullanın dış bölümüne kadar uzanır, distal düz túbül Henle gibi kıvrılır (43).

Jukstamedullar nefronlar: Renal korpüskülleri renal piramidin tabanına yakın yerleşimli olup piramidin iç kısımlarına iyi uzanan uzun Henle kulpu ve ince çıkan kolları bulunur (47).

Ara nefronlar veya midkortikal nefronlar: renal korpüskülleri korteksin orta bölümünde yerleşir ve henle kulpu orta uzunluktadır (46).

Renal korpüskül

Her nefronun başlangıcını 200 µm çapında çift katlı epitelyal Bowman kapsülü ile sarılı glomeruler kapiller yumak içeren renal korpüskül oluşturur. Kapsülün visseral kısmı pencereci glomerüler kapilleri sıkıca sarar. Dış paryetal tabaka ise kapsülün yüzeyini oluşturur ve bu iki tabaka arasındaki boşluk Bowman (idrar) boşluğudur. Renal korpüskülde afferent ve efferent arteriyolun giriş çıkış yaptığı kısım damar kutbu olarak adlandırılırken, tam karşısındaki bölge ise idrar kutbu olarak adlandırılır ve bu kutuptan proksimal kıvrımlı tübül başlar. Bowman kapsülünün paryetal tabakası tek katlı yassı epitel ile döşelidir ve dıştan bazal lamina ile desteklenirken idrar yada tübüler kutupta epitel tabakası tek katlı küboidal epitele ve proksimal tübüle dönüşür (43, 44, 48).

Böbreğin Filtrasyon Aparatı

Glomeruler filtrasyon bariyeri olarak da bilinen filtrasyon aparatı üç farklı bileşenden oluşur.

Glomeruler kapiller endoteli sayısız pencere içerir ve bu pencereler diğer kapillerlerden daha fazla, daha büyük (70 ila 90 nm çapında) ve anahatları daha düzensizdir. Bunun yanında glomerüler kapiller olarak pencereleri saran diyafram içermez. Glomerüler kapiller endotel hücreleri çok sayıda akuaporin-1 (AQP-1) su kanalları içerir (41).

Glomerüler bazal membran tipik membranlar ile kıyaslandığında çok kalın olmakla birlikte (300 nm) filtrasyon bariyerinin en önemli parçasıdır. Kanı kapsüler boşluktan ayırır ve kapiller ve podosit tarafından üretilen bazal laminanın kaynaşması ile oluşur. Kalın olması nedeniyle Periyodik Asit Schiff prosedürü ile boyanan histolojik kesitlerde belirgindir. Glomerüler bazal membran tip IV kollajen yönünden zengin olmakla birlikte yapısında siyaloglikoproteinler, heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlar, laminin, fibronektin gibi glikoproteinler bulunur. Büyük proteoglikanlar, 70 kDA'dan büyük proteinlerin geçişine izin vermez. Glomerüler bazal membran polianyonik glikozaminoglikanlar yönünden zengindir ve negatif yükleri nedeniyle yarı diyaframları gibi organik anyonların filtrasyonunu sınırlar (43, 48, 49).

Glomerüler bazal membran üç tabakadan oluşur:

Lamina rara eksterna: podosit çıkıntılarına bitişiktir ve heparin sülfat gibi polianyonlar yönünden zengindir. Lamina rara interna kapiller endotele bitişiktir ve moleküler özellikleri lamina rara eksterna ile benzerdir (46).

Lamina densa, lamina raralar arasında sıkıştırılmış olarak bulunur. Fiziksel filtre olarak işlev gören ağısı yapıda organize olmuş tip IV kollajen içerir (47).

Özetlemek gerekirse glomerüler bazal mebran fiziksel bariyer ve iyon selektif filtre olarak işlev görür ve yaklaşık olarak 70 kDa'dan veya 3,6 µm yarıçaptan büyük partiküllerin geçişine izin vermez. Yine anyonik partikül ve moleküller lamina raralarındaki polianyonik glikozaminoglikanlar nedeniyle GBM'yi geçemezler (50).

Bowman kapsülünün visseral tabakası özelleşmiş hücreler olan podositler yada visseral epitelyal hücreler içerir ve glomeruler kapillerlerin etrafına çıkıntılar uzatır. Podositlerin hücre gövdesinden çıkan primer çıkıntıları dallanarak ikincil çıkıntıları oluşturur ve bu çıkıntılar pedisel veya ayaksı çıkıntı olarak adlandırılır. Komşu podositlerin ayaksı çıkıntıları birbirleriyle iç içe geçen ayaksı çıkıntılar arasındaki boşluk yaklaşık 40 nm genişliğinde olup filtrasyon yarıkları olarak adlandırılır ve bir ultra ince filtrasyon yarık diaframı ile örtülür. Nefrin, yarık diyaframının önemli yapısal ve fonksiyonel bileşenidir. Zıt ayaksı çıkıntılardan gelen nefrin molekülleri yarık merkezinde etkileşerek her iki tarafta gözenekler ile merkezi yoğunluğu oluşturur (41, 49, 51).

Mezangium

Renal korpüskülde glomerüler bazal membran ile kapillerler arasında ek hücre grubu olan mezangial hücreler bulunur. Mezangial hücrelerle beraber matriksleri mezangiumu oluşturur. Mezangial hücreler yerleşim yerine göre ikiye ayrılır. İntraglomerüler mezangial hücreler glomerüler kapiller ile GBM arasında bulunan kontraktıl özeliği olan özelleşmiş perisit hücreleri olarak kabul edilirler (52, 53).

Ekstaglomerüler mezangial hücreler (Lacis, Polkissen hücreleri) glomerül vasküler kutbunda korpüskül dışında yerleşim gösterirler ve jukstaglomerüler aparat olarak adlandırılan yapının bir parçasını oluştururlar (54).

Jukstaglomerüler Aparat

Jukstaglomerüler aparat makula densa, jukstaglomerüler hücreler ve ekstaglomerüler mezangial hücreler olmak üzere üç kısımdan oluşur (52).

Jukstaglomerüler hücreler afferent arteriolun modifiye olmuş düz kas hücreleridir. Bu hücrelerde salgı granülleri bulunur ve çekirdekleri küreseldir. Bu hücrelerin en önemli fonksiyonu anjiyotensinojeni anjiyotensin I'e dönüştüren proteolitik enzim olan renin sentezi ve sekresyonudur (53).

Afferent arteriyole komşu olan distal düz tübüldeki epitelyum hücreleri değişikliğe uğrayarak makula densa yapısını oluşturur. Makula densa hücreleri diğer distal tübül hücrelerine göre daha dar ve uzun olmaları nedeniyle ışık mikroskopunda belirgin olarak gözlenir. Bu hücrelerin çekirdekleri kalabalık görünüşleri ve kısmen birbirleri üzerine geldikleri için makula densa olarak adlandırılmıştır (47, 54).

Ekstraglomerüler mezangial hücreler (Lacis, Polkissen hücreleri) afferent ve efferent arteriyol arasında yer alır ve bazal membranda biriken debris partükülleri fagosite ederek ortadan kaldırır (46).

Jukstaglomerüler aparat renin anjiyotensin aldosteron sistemini aktive ederek kan basıncının düzenlenmesinde görev alır. RAAS'ın aktive olması sonucu JG hücreler renin salgılar. Makula densa hücreleri tübüler sıvıdaki sodyum konsantrasyonuna duyarlıdır ve hem glomerüler filtrasyon hızını hem de JG hücrelerinden renin salınımını düzenlerler (45, 50).

Böbrek Tübülleri

Renal tübül 55 mm uzunluğunda olup, Bowman kapsülünden toplama kanalına kadar uzanan tek katlı epitelyal hücre tabası ile döşelidir. Renal tübülün primer fonksiyonu glomerüler filtrattan su, inorganik iyon ve diğer moleküllerin geri emilimi ve bazı inorganik iyonların kandan tübül lümenine direkt olarak sekresyonudur. Renal tübül kıvrımlı bir şekle ve dört ayrı bölgeye sahiptir. Her bölgenin tübüler fonksiyon içinde rolü ve histolojik görünümü farklıdır (55-57).

Proksimal tübül

Nefronun en uzun ve geniş bölümü olan proksimal kıvrımlı tübül kortekste yer alırken proksimal düz tübül medulaya doğru inerek Henlenin kalın inen parçasını oluşturur. Renal korpüskülün tübüler kutbunda Bowman kapsülünün tek katlı yassı epiteli proksimal tübülün tek katlı kübik epiteline dönüşür. Proksimal kıvrımlı tübülün kübik hücreli epitelinde yüzey özelleşmeleri vardır (47, 48).

Genellikle bir proksimal tübülün enine kesitinde 6 ila 12 arasında koyu asidofilik sitoplazmalı epitelyum hücresi bulunur. Tübüllerde epitelyum altında bazal

membran bulunur. Proksimal tübül hücreleri merkezi nükleus ve bol mitokondri nedeniyle çok asidofilik sitoplazmaya sahiptir. Hücrelerin apikal yüzeyinde geriemişimi kolaylaştıran lümen içinde belirgin bir fırçamsı kenar oluşturan çok sayıda uzun mikrovillus vardır. Mikrovillus üzerinde yer alan kalın glikokaliks tabası nedeniyle fırçamsı kenar PAS pozitif boyanır (47, 51, 52).

Hücrelerin bazal yüzünde bazal plazma membranı sitoplazmaya doğru katlanarak bazal çizgilenmeyi oluşturur ve içinde mitokondriyonlar bulunur. Hücrelerin lateral yüzeyinde tübül lümenini intersellüler boşluktan ayıran sıkı bağlantılar ve komşu hücrelerin yapışmasını sağlayıcı zonula adherens bulunur (43, 52).

Proksimal düz tübül daha kısa ve yüzeyinde daha az gelişmiş fırçamsı kenar bulunur. Bazal ve lateral membran katlantıları daha az belirgin olmakla birlikte kıvrımlı tübüle göre mitokondriyon, endozom ve lizozom sayısı azdır. Emilim fonksiyonu kıvrımlı tübüle göre daha düşük seviyededir (46).

Henle Kulpu

Proksimal kıvrımlı tübül medullaya giren daha kısa olan proksimal düz tübül ile ve daha sonra Henle kulpu ile devam eder. İnce inen kol ve ince çıkan kol ile U şeklinde bir yapıdır. İnce kollar tek katlı yassı epitel ile döşelidir. Henle kulpunun kalın kısımları alçak kübik epitel ile döşelidir. Nefronun korteks içindeki lokalizasyonuna göre Henle kulpunun uzunluğu değişmekle birlikte jukstamedullar nefronun Henle kulpu uzunken kortikal nefronun Henle kulpu ise kısadır (43, 48, 49).

Ek olarak çıkan kalın kolu döşeyen epitel hücreleri NaCl geri emilimini ve idrar konsantrasyon yeteneğini etkileyen 85 kDa ağırlığında protein olan üromodilin (Tamm-Horsfall protein) üretir (50).

Distal Tübül

Distal tübülün Henle kulpunun çıkan kolunun devamı olan düz bir kısmı ve kortekste uzanan kıvrımlı kısmı bulunmaktadır. Distal düz tübülde hücreler proksimal tübül hücrelerine göre daha az ve daha küçük mikrovillus içerir. Hücrelerin bazal katlantıları çok belirgindir ve neredeyse hücrenin luminal yüzeyine kadar ulaşır. Distal düz tübül ile kıvrımlı tübül arasında hücreler özelleşerek jukstaglomerüler aparatın yapısına katılan makula densayı oluşturur (44, 45).

Distal kıvrımlı tübül kortikal labirentlerde lokalize olup yaklaşık olarak proksimal kıvrımlı tübülün üçte biri uzunluktadır. Makula densesinin ilerisinden toplama tübülüne kadar uzanır. Distal kıvrımlı tübül hücreleri, distal düz tübül hücrelerine göre daha uzundur ve fırçamsı kenardan yoksundur. Distal tübül lümeni proksimal tübül lümenine göre daha geniş ve belirgindir. Epitel hücreleri geniş ve lateral sınırları belirgin olmamasına rağmen bazal çizgilenmeler belirgindir (52, 55).

Çekirdek hücrenin apikal bölümünde yer almaktadır ve bazen de özellikle düz segmentte hücrenin lümene doğru kabarmasına neden olur. Hücrelerin geniş bazolateral plikasyonları vardır ve bu bazal kıvrımlar ile ilişkili çok sayıda mitokondri vardır. Proksimal düz tübül hücrelerinden farklı olarak daha az sayıda ve daha az gelişmiş mikrovillus vardır (56).

Toplama Tübülleri ve Toplama Kanalları

Bağlantı tübüleri, distal kıvrımlı tübül ile kortikal toplama kanalları arasında geçiş bölgesidir. Bu segmentin epiteli distal kıvrımlı tübül hücreleri ile kortikal toplama kanallarından esas hücreler içerir (53).

Toplama kanalları ışık mikroskop altında proksimal ve distal tübülerden belirgin hücre sınırları sayesinde kolayca ayırt edilebilir. Toplama kanallarında iki çeşit hücre tipi vardır (52).

Açık hücreler, esas hücre veya toplama kanalı hücreleri toplama kanalının baskın hücre tipidir. Soluk boyanan bu hücrelerde bazal membran katlantıları, bir adet primer silyum birkaç adet mikrovillus ve küresel mitokondriler vardır (54).

Esas hücreler arasında dağılmış olarak bulunan interkalat hücreler daha koyudur, ayrıca daha bol mitokondri ve çıkıntı yapan apikal katlantılar vardır. Apikal sitoplazmalarında çok sayıda vezikül bulunur (57).

Kortikal toplama kanalları yaklaşık 40 µm çapında olmakla birlikte kortikal medullar ışıklarda bağlantı tübüllerinin bir araya gelmesiyle oluşur ve tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Her bir renal piramidin apeksine yaklaştıkça medullar toplama kanalları tekrar birleşerek idrarı direkt minor kalikse drene eden papiller kanalı (Bellini kanalını) oluşturur (51, 54).

2.2. Doksorubisin

2.2.1. Doksorubisinin Genel Özellikleri

Adriamisin veya 14-hidroksidaunorubisin olarak da bilinen Doksorubisin antrasiklin tipi bir antitümör (antineoplastik veya sitostatik) ilaç olarak kemoterapide çeşitli kanserlerin tedavileri için kullanılır. Doksorubisin 1969 yılında ilk olarak *S. peucetius* ATCC29050'den türetilen bir mutant tür olan *Streptomyces Peucetius* Subsp. *caesius* ATCC27952den izole edilmiştir. Doksorubisin klinik pratikteki majör klinik aktivite ile meme, endometriyum, ovaryum, testis, tiroid, mide, mesane, karaciğer ve akciğer kanserlerinde kullanılır. Ayrıca nöroblastom, Ewing sarkomu, osteosarkom ve rabdomyosarkom gibi yumuşak doku sarkomlarında ve bir çok çocukluk çağı kanserlerinde kullanılan en önemli anti-kanser ilaçlarından birisidir (58-61).

2.2.2. Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

Antrasiklin antibiyotiklerinin sıradışı bir şeker olan, daunosamine bağlı tetrasiklik halka yapıları vardır. Bu sınıftaki sitotoksik ajanların hepsinde elektron kazanılmasına ve kaybedilmesine izin veren bitişik halkalar üzerinde kinon ve hidrokinon kısımları vardır (62).

Doksorubisin kinon içeren tetrasiklik halka ve iki karbonlu bir yan zincirden oluşur. 13. karbon atomunda bir karbonil kısım ve 14. karbon atomunda bir primer alkol içerir. Aynı zamanda daunosamine tetrasiklik halkanın C-7 atomuna glizodik bağ ile bağlıdır (63).

Doksorubisin, DNA ile etkileşerek biyosentezini inhibe eder. Transkripsiyon sırasında DNA'nın açılmasını sağlayan topoizomerez II enziminin ilerlemesi engellenir. Doksorubisin DNA replikasyonu sırasında topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engeller ve böylece DNA replikasyonunu durdurur (64, 65).

Doksozubisin, DNA'da GC baz çiftleri içeren bölgeye bağlanır. Doksozubisin-DNA kompleks oluşumu DNA hasar cevabını aktive eder ve topoII'den bağımsız olarak hücre ölümünü indükler (66).

Doksozubisinin yapısındaki kinon NADPH oksidoredüktaz aracılığı ile semikinon radikaline dönüşür. Semikinon radikalleri DNA hasarına neden olan süperoksit ve hidrojen peroksit oluşturmak için hızla oksijenle reaksiyona girer. Ek olarak, doksozubisin bir demir şelatörüdür ve doksozubisin-demir kompleksi, hidrojen peroksinin reaktif hidroksil radikallerine dönüşümünü katalize eder. Böylece, doksozubisin aracılı serbest radikallerin salınımı DNA hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanan oksidatif strese neden olabilir. Doksozubisin tedavisi serbest radikal oluşumu ve oksidatif metabolizma artışına ek olarak, seramid seviyesini artırır (67-72).

2.2.3. Doksozubisin Farmakokinetiği

Doksozubisin gastrointestinal kanalda inaktif olması ve ekstrasvazyonun doku nekrozuna neden olması nedeniyle sadece intravenöz olarak uygulanır. Doksozubisin hızla doksozubisinol, doksozubisinon ve 7-deoksidoksozubisinona metabolize edilir. Doksozubisin ve ana metaboliti olan doksozubisinol, yaklaşık % 75 oranında plazma proteinlerine bağlanır; Kan beyin bariyerini geçmez. Dokulara afinitesi yüksek olup, salınımı yavaş olduğundan karaciğerde hızlı metabolize edilmesine rağmen vücutta dağılımı ve etkisi uzun sürer. Esas eliminasyonu karaciğerden safra yoluyla olmasına rağmen az bir miktarı da böbreklerden (% 3-10) ve dışkıyla (%40-50) atılır. İlaç dozu serum bilirubin düzeyine göre ayarlanır (73-77).

2.2.4. Doksozubisin Yan Etkileri

Doksozubisin tedavisinde sık gözlenen yan etkiler, kemik iliği baskılanması, saçlarda dökülme, mukozit, bulantı-kusma ve deri pigmentasyonunda artıştır. Doksozubisin tedavisine bağlı gelişen miyelosupresyonda lökopeni (nötropeni), trombositopeni ve anemi görülebilir. Aşırı duyarlılık (ateş, döküntü, ürtiker), tırnakların hiperpigmentasyonu, lakrimasyon ve konjonktivit de görülebilir (78-80).

Doksozobisın ekstrapazasyonu ciddi lokal doku nekrozuna yol açar. Bunun yanı sıra selülit, vezikül, tromboflebit, lenfanjit ve fleboskleroza neden olabilir (81, 82).

Kardiyotoksisite, doksozobisine bağlı gelişen en önemli ve sıklıkla doz sınırlayıcı yan etki olmakla birlikte akut, subakut ve geç dönemlerde ortaya çıkabilmektedir. Akut dönemde; aritmi, hipotansiyon ve kalp fonksiyonlarda bozulma görülebilmesine rağmen bu yan etkiler reversibldır ve kalpte kalıcı hasara neden olmamaktadır (83, 84).

Subakut dönemde kardiyomiyopatiler ortaya çıkabilmekte ve gelişen hasar irreversibldır. Geç dönem kardiyotoksisite ise tedavi sonrası 4 ile 20 yıl sonra görülmekle birlikte kardiyomiyopati ve kalp yetmezliği ortaya çıkmaktadır (85, 86).

Doksozobisın uygulaması sonrası böbrekte antioksidan parametreler azalır ve renal akut böbrek yetmezliği gelişir. Böbrekte SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan molekül düzeyleri azalırken, MDA gibi SOR molekül konsantrasyonlarında belirgin artışlar görülür (87).

2.3. Safranal

2.3.1. Safranal'ın Genel Özellikleri

Safranal, Iridaceae ailesinin uzun ömürlü sapsız bir bitkisi *Crocus sativus* (safran)'dan elde edilen, Safran esaslı uçucu yağın ana bileşenidir. Uçucu fraksiyonun % 70'i olan "Safranal" safranın aromasından sorumlu olan asıl bileşiktir. Kuhn ve Winterstein tarafından pikrocrocinin hidrolizasyonu ile safranal ilk kez elde edilmiş ve bu kimyasal madde "Safranal" olarak adlandırmıştır (10, 88, 89).

2.3.2. Safranal'ın Kimyasal Yapısı

Safranalin kimyasal formülü $C_{10}H_{14}O$, kimyasal adı 2,6,6-trimetil-1,3-sikloheksadien-1-karboksaldehid olan halkalı terpenik aldehittir. Molekül ağırlığı 150.21 g/mol ve kaynama noktası 70 °C'dir (90, 91).

2.3.3. Safranal'ın Farmakolojik Etkileri

Yapılan alışmalar neticesinde, safranalın antikonvülsan, antidepresan, yoksunluk sendromunu azaltma, pentilentetrazol kaynaklı status epileptikusta protektif etki, indometazin kaynaklı gastrik ülserle karşı protektif etki ve in vitro spesifik kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri ortaya konmuştur (92-97).

Safranalın solunum sistemi üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda antitüссif etki ve H1 reseptör inhibisyonu ile bronkodilatör etki gösterdiği bulunmuştur (98, 99).

Safranalın antidot etkilerini araştıran çalışmalar neticesinde gentamisin ve heksaklorobütadien kaynaklı nefrotoksisitede safranalın böbrek fonksiyon testlerinde düzelme sağladığı, böbrek hasarını azalttığı ve nefroprotektif olduğu bulunmuştur (100, 101).

Safranalın metabolik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada alloksan ile indüklenen diyabetik sıçan modelinde açlık kan glukozunu ve HbA1c seviyelerini düşürdüğu; SGOT, SGPT ve kreatinin seviyeleri üzerine etkisi olmadığı bulunmuştur (13).

Safranal deneysel olarak deoksikortikosteron asetat ile indüklenmiş hipertansif sıçan modelinde ortalama arteriyal kan basıncını düşürerek antihipertansif etki göstermiştir (102).

Miyokard iskemi reperfüzyon hasarında safranal infarkt büyüklüğünü azaltmış, sol ventrikül fonksiyonları ve miyokard hemodinamik durumunu düzelterek anti iskemik etki göstermiştir (103).

Safran ekstraktı ve içeriğindeki bioaktif bileşiklerin antioksidan etkilerinin araştırıldığı çalışmaya göre safranal'ın (500 ppm'de metanol solüsyonunda) %34 oranında radikal süpürücü aktivite gösterdiği bulunmuştur (12).

Safranal'ın 8 mg/ml ile 32 mg/ml konsantrasyon aralığında E. coli, S. aureus, S. aureus 6538P, S. enterica serovarları üzerine bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir (104).

2.4. Apoptoz ve Oksidatif Stres

2.4.1. Apoptoz ile İlgili Genel Bilgiler

Apoptoz, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölüm şeklidir. Apoptoz, ilk kez 1972 yılında hücre ölümleri ile ilgili yapılan morfolojik bir çalışma sonucunda Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir (105, 106).

Apoptoz iki durumda görülebilir: Fizyolojik ve Patolojik. Fizyolojik durumlarda apoptoz, artık gereksinim duyulmayan hücrelerin uzaklaştırılması ve dokudaki çeşitli hücrelerin sabit sayıda kalmasını sağlamaya hizmet eden, normal bir olaydır. Patolojik durumlarda apoptozda ise genetik olarak değişikliğe uğramış veya onarılamayacak derecede hasar görmüş hücreler ortadan kaldırılır ve inflammatuar yanıt gelişmeden doku hasarı en düşük düzeyde tutulur (107-109).

Apoptotik hücrelerde morfolojik olarak sitoplazmik hücre büzülmesi, plazma membranında tomurcuklanma, hücre membranında fosfatidilserin eksternalizasyonu, kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gözlenir. Plazma membranı apoptoz süreci boyunca sağlam kalır. Fosfatidilserin'in hücre zarının dış tabakasında ekspresyonu ölü hücrelerin proinflammatuar selüler komponent salınmadan makrofajlar tarafından erken tanınmasını sağlar (110, 111).

Apoptozis öncelikle bir proteaz ailesi olarak bilinen kaspazlar (sisteinil, aspartata özgü proteazlar) tarafından yürütülen bir süreçtir. Kaspazlar apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır. Kaspaz 2,8,9,10 apoptoz sürecinde başlatıcı iken kaspaz 3,6,7 hücre ölümünün düzenleyicisidir (112, 113).

Kaspaz aktivasyonu ile sonuçlanan iki farklı yolak mevcuttur: intrinsik veya mitokondrial yolak ve ölüm reseptörü veya ekstrinsik yolak. İntrinsik yolak farklı stres koşullarına (irradiyasyon, kemoterapi) cevap olarak mitokondri seviyesinde başlatılır. Ekstrinsik yolakta hücre yüzeyinde, ölüm reseptörleri adı verilen ve apoptozu tetikleyen büyük bölümü, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin üyesi olan moleküller aracılığı ile gerçekleşir. Metodolojiye dayanan apoptoz değerlendirilmesi 6 ana başlıkta incelenir (114-116).

Sitomorfolojik değerlendirme: Işık mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmaktadır. Işık mikroskopunda hematoksilen-eosin

boyama ile hücrede küçülme, kromatin kondansasyonu ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusda küçülme veya parçalara bölünme gibi histomorfolojik bulgular gözlenir. TEM apoptozu değerlendirmek için altın standarttır. TEM ile incelemede ultrayapısal değişiklikler gözlemlenir. Bu değişiklikler: (a) elektron yoğun çekirdek; (b) nükleer parçalanma; (c) sağlam hücre zarı; (d) düzensiz sitoplazmik organeller; (e) büyük şeffaf vakuoller; ve (f) hücre yüzeyinde kabarcıklar olarak sıralanır (117, 118).

DNA fragmentasyonu: DNA laddering tekniği apoptozun endonükleaz parçalanma ürünlerini göstermek için kullanılır. TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) metodunda enzimatik olarak DNA zincir kırıkları son etiketleme ile endonükleaz parçalanma ürünleri değerlendirilir (119, 120).

Çeşitli kaspaz aktivite analizleri kullanılarak tespit edilebilecek 13'ten fazla bilinen kaspaz (prokaspaz veya aktif sistein kaspaz) vardır. Apoptoz PCR mikroarray anahtar ligandları, reseptörleri, hücre içi modülatörleri ve transkripsiyon faktörlerini içeren en az 112 genin ekspresyonunu değerlendiren gerçek zamanlı PCR yöntemidir (121, 122).

Membran değişiklikleri: Anneksin V tönemünde, apoptotik hücrelerin dış plazma zarı üzerinde fosfatidilserin kalıntılarının eksternalizasyonu ile dokularda, embriyolarda veya kültürlenmiş hücrelerde FITC (floresan izotiyosiyanat) etiketli Annexin V'in apoptotik hücrelere bağlanması ile floresan mikroskobu, flow sitometri ve ışık mikroskobunda değerlendirilmesi sağlanır (123).

Lazer taramalı konfokal mikroskopi (LSCM) ile canlı hücrelerden elde edilen submikron ince kesitler sayesinde sitokrom c salınımı, mitokondrial geçirgenlik geçişi, iç mitokondriyal zarın depolarizasyonu, Ca^{2+} akımı, mitokondriyal redoks durumu ve ROS gibi mitokondriyal olaylar tek bir sağlam hücrede gözlemlenir (124).

2.4.2. Oksidatif Stres ile İlgili Genel Bilgiler

Oksijen, biyolojik sistemler için hem olumlu yararları hem de potansiyel olarak zararlı yan etkileri nedeniyle genellikle Janus (iki yüzlü kapılar tanrısı) gazı olarak adlandırılır. Aerobik metabolizma sırasında oksijene doğru şekilde aktarılmayan elektronlar, nedeniyle organizmada serbest radikaller oluşabilir.

Oksidatif stres reaktif oksijen türleri artışı ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stres yaşla ilgili kalp damar hastalıkları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserde rol oynar (125-128).

Serbest radikal dış yörüngelerinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron içeren reaktif ve kısa ömürlü bileşiklerdir. Oksijen ve nitrojen serbest radikaller için kaynak moleküllerdir. Oksijen kaynaklı serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS), nitrojen kaynaklı olanlar ise reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır (129, 130).

Süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) başlıca reaktif oksijen türleri'dir. Süperoksit ve hidroksil radikali serbest radikal olup hidrojen peroksit ise prooksidan özelliktedir. Süperoksit radikali hücrede moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu iç mitokondri zarında veya NADPH oksidaz, ksantin oksidaz enzimi tarafından endojen olarak oluşturulur. ROS'lar içinde yarılanma ömrü kısa ve en güçlü olan hidroksil radikalidir. Hidrojen peroksit urat oksidaz, glikoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi birçok enzim tarafında hücrede oksijene iki elektron transferi ile direk olarak oluşturulur. Serbest radikal olmadığı halde ROS olarak değerlendirilir ve serbest radikal oluşumunda önemli rol oynar. Nitrik oksit (NO), peroksinitrit (ONOO), azot dioksit (NO_2) gibi azot içeren oksidanlara reaktif azot türleri (RNS) adı verilir (131-136).

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin endojen ve eksojen kaynağı vardır. Endojen reaktif oksijen azot türleri (RONS) kaynakları arasında NADPH oksidaz, MPO, lipoksijenaz ve anjiyotensin II bulunmaktadır. NADPH oksidaz, hücresel solunum sırasında NADPH tarafından sağlanan elektronlarla moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle oluşan radikal süperoksit radikalinin (O^-) yaygın kaynağıdır. Eksojen RONS kaynakları hava ve su kirliliği, tütün, alkol, ağır veya geçiş metalleri, ilaçlar (siklosporin, takrolimus, gentamisin, bleomisin, doksorubisin), endüstriyel çözücüler, yemek pişirme (pişmiş et, atık yağ vb.) ve vücut içinde serbest radikallere metabolize olan radyasyondur (137-139).

Serbest radikal ve oksidan fazlalığı membran yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinde oksidasyon sonucunda lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Oksidatif stres protein yapılarda oksidatif modifikasyonlara yol açarak, hücre iskeletini

oluşturan protein ve enzimlerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olur. Oksidatif stres DNA'daki bazlarda çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından H atomu çıkararak, ayrıca oluşan baz radikalleri proteinlerin aromatik aminoasitleri ile kombine olarak DNA-protein çapraz bağları oluşturur (140-142).

Serbest radikallerin hücrel yapılar vereceği hasarı engellemek için antioksidanlar olarak adlandırılan savunma mekanizması vardır. Antioksidanlar, endojen ve ekzojen olmak üzere iki grupta incelenir. Endojen antioksidanlar direk olarak ROS'un nötralizasyonunda görev alan SOD, CAT, GPx ve glutasyon redüktaz gibi enzim yapısındadır. Enzim yapıda olmayan endojen amino asitler vücutta üretilen glutation, L-ariginin, koenzim Q10, melatonin, ürik asit, bilirubin, metal şelatlayıcı proteinler, transferrin gibi bileşiklerdir. Eksojen antioksidanlar E vitamini, C vitamini, karotenoidler, iz metaller (selenyum, manganez, çinko), flavonoidler, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri gibi vücutta üretilemeyen ve besinlerle veya takviye edicilerle alınabilen bileşiklerdir (143, 144).

Reaktif oksijen türleri canlı hücrelerde floresan boya bazlı assayler ile flow sitometri ve ışık mikroskopunda tespit edilebilir. Reaktif oksijen türlerinin ölçümü yerine, dolaylı olarak DNA/RNA hasarını, lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonu/nitrasyonu gösteren 8-OHdG, LPO, MDA, protein karbonil içeriği, okside protein seviyeleri analiz edilerek ölçülebilir. Vücut sıvısı ve dokularda antioksidan enzim (SOD, CAT, GPX) ölçülerek oksidatif durum değerlendirilebilir (144-152).

NADPH oksidaz, hücrelerde ROS oluşumunun majör enzimatik kaynağıdır. Elektron donörü olarak NADPH kullanarak oksijenin redüksiyonu ile süperoksit radikali oluşumunu katalizler. NADPH oksidaz enzim kompleksi, membranı kapsayan bir flavositokrom b558 (Cytb) ve sitozolik proteinler p67phox, p47phox, p40phox ve Rac içerir. NADPH oksidazın katalitik merkezi olan Cytb, iki alt birimden oluşur: gp91phox (ağır glikozile β -altbirim, Nox2) ve p22phox (küçük α -altbirim) (153-155).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak başlandı (Tarih: 27/04/2018; Protokol No: 2018/17). Bu Çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklendi (Proje No: THD-2018-7720).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deney Çalışma Planı

Araştırma için ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Spraque Dawley 18 adet dişi sıçan kullanıldı. Çalışma grubunu oluşturan sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, ad libitum beslenme şartlarında muhafaza edildi. İçme suyu olarak çeşme suyu, beslenmesi için standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş, Erzurum, Turkey) verildi. Sıcaklık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, nem % 50 ± 5 olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar çalışma süresince standart Tip III kafeslerde barındırıldı (Resim 1). Çevresel stres ve uyum problemi yaşanmaması amacıyla sıçanların bakımı, deneyin bütün uygulamaları ve sıçanların sakrifikasyonu KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkez'inde yapıldı.



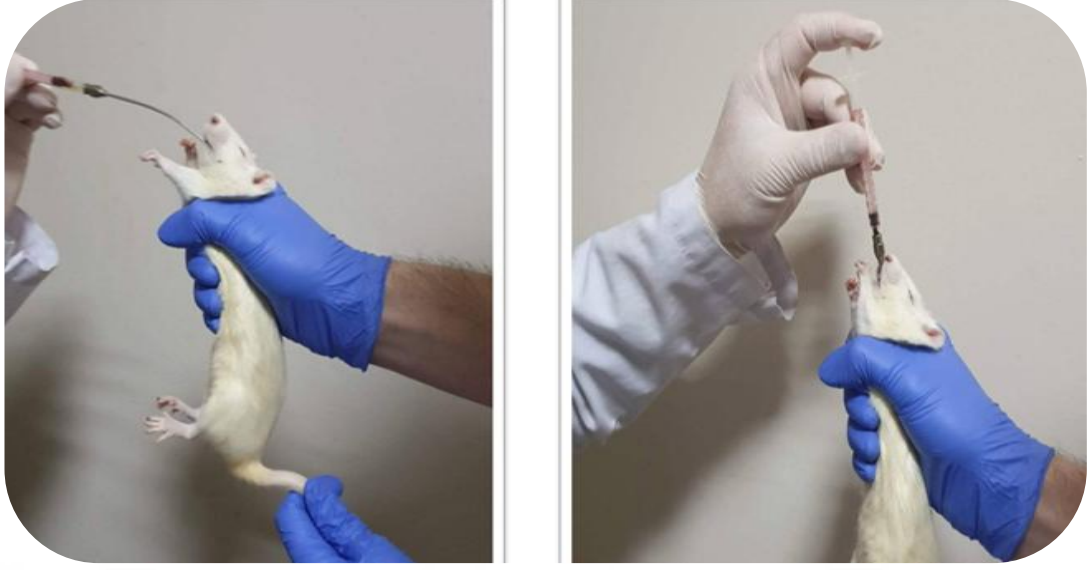
Resim 1. Sıçanların Çalışma Süresince Barındırıldığı Standart Tip III Kafesler

Sıçanlar aşağıda belirtildiği gibi 3 gruba ayrıldı. Bu çalışmada uygulanan DOKS (doksorubisin) ve SAF (safranal) dozları literatüre (156, 157) uygun olarak belirlendi.

1. Grup: Kontrol Grubu (n: 6); 7 gün boyunca sıçanlara hiçbir uygulama yapılmadı.

2. Grup: DOKS (Doksorubisin) Grubu (n: 6); Tek doz DOKS (40 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) olarak deneyin 5. günü uygulandı.

3. Grup: DOKS (Doksorubisin)+SAF (Safranal) Grubu (n: 6) ; 7 gün boyunca SAF 200 mg/kg/gün tek doz oral gavaj ile uygulandı. Deneyin 5. günü tek doz DOKS intraperitoneal olarak (40 mg/kg) uygulandı.



Resim 2. Sıçanlara Orogastrik Gavaj Uygulaması

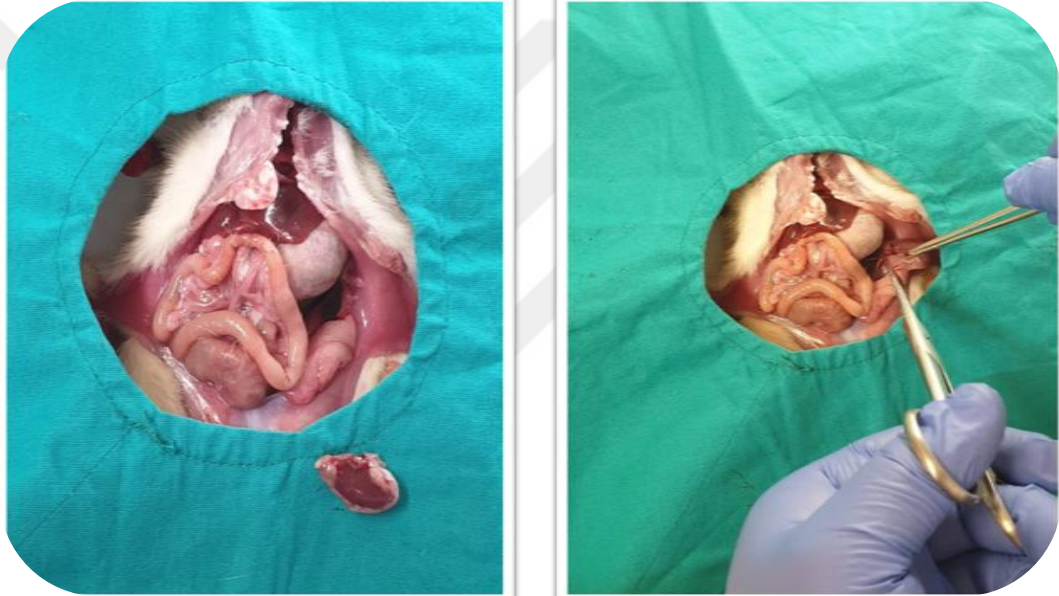
Tablo 1. DeneY Grupları ve Takip Çizelgesi

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün	6.gün	7.gün
Kontrol Grubu	-	-	-	-	-	-	-
Dokсорubisin Grubu	-	-	-	-	40mg/kg DOKS i.p	-	-
Dokсорubisin +Safranал Grubu	200 mg/kg SAF gavaj	200 mg/kg SAF gavaj	200 mg/kg SAF gavaj	200 mg/kg SAF gavaj	40mg/kg DOKS i.p +200 mg/kg SAF gavaj	200 mg/kg SAF gavaj	200 mg/kg SAF gavaj

3.3. Doku Numunelerinin Toplanması

DeneY süresinin sonunda (8. günde) sıçanlar anestezi altındayken (ketamin 90 mg/kg) abdominal aorta kesilerek kansızlaştırma yöntemi ile ötenazi yapıldı.

Abdominal periumblical bölgeden, vertikal kesi uygulanarak batın açıldı, abdominal aorta kesildi daha sonra sol böbrek çıkarıldı. Çıkarılan sol böbreklerin yarısı histolojik değerlendirmeler için formalin solüsyonunda tespit edildi, diğer yarısının ½'si flow sitometri için ayrılarak PBS solüsyonunda +4 C'de saklandı. Geriye kalan diğer parça ise ependorf tüpüne alındı ve -80 C'de saklandı. Ayrıca çalışma sonunda sıçanların karaciğer, ileum ve kalp dokuları çıkartılıp daha sonra yapılması planlanan münferit çalışmalarda histopatolojik değerlendirmeler için %10 formalin solüsyonuna konuldu.



Resim 3. Böbreğin Çıkartılması ve Makroskopik Görünümü

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Formalin Tespitinin Hazırlanışı

Dokuların tespitinde kullanılacak formalin solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı;

- Formaldehit (%37) 100 ml
- Distile su 900 ml

Formalin fiksatifini hazırlamak için önce 100 ml formaldehit ölçülü laboratuvar kabına alındı, daha sonra üzerine 900 ml distile su eklendi (158).

3.4.2. Histolojik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Laboratuvarında, formalin solüsyonuna alınan böbrek dokuları uygun şekilde kesilerek grup numaraları ve sayıları yazılarak doku takip kasetlerine konuldu. Üç gün ışık almayan kuru ve oda sıcaklığındaki ortamda saklandı. Daha sonra tam otomatik doku takip cihazında (Thermo Scientific Exelsior AS, UK) rutin gece programında takip edildi (Takip prosedürü tablo 2’de özetlenmiştir). Dokular, takip işlemi esnasında belirli sürelerde ve artan derecede alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, ksilen basamaklarından geçirilerek saydamlaşması sağlandı ve parafine gömülerek bloklar haline getirildi (159).

Tablo 2. Doku Takip Prosedürü

Kimyasal	Uygulama Süresi
1. Formalin solüsyonu	3 gün
2. % 70’lik etil alkol	1 saat
3. % 90’lık etil alkol	1 saat
4. % 96’lık etil alkol	1 saat
5. % 100’lük etil alkol	1 saat
6. % 100’lük etil alkol	1 saat
7. Ksilen	5 dakika
8. Ksilen	5 dakika
9. Ksilen	5 dakika
10. Parafin	15 dakika
11. Parafin	15 dakika
12. Parafin	15 dakika
13. Bloklama	

3.4.3. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Her gruptan alınan böbrek dokuları, formalin solüsyonunda tespit edildikten sonra yukarıdaki aşamalardan geçirildi. İlk olarak tam otomatik mikrotom (LEICA RM 2255, USA) ile dokuya ulaşana kadar parafin bloklar 20 µm'lik kesitlerle trimlendi ve dokuya ulaşınca parafin bloklardan 5 µm'lik ince kesitler alındı. Kesitler 38 °C'de Benmari içindeki sıcak su üzerinde lama daha iyi yayılmak için bekletildikten sonra lam üzerine alındı. Dokular lam üzerine alındıktan sonra Hematoksilen&Eozin (H&E) ile boyanması için zembile yerleştirildi. Daha sonra dokular otomatik lam boyayıcı (LEICA AutoStainer XL, GER) kullanılarak 45 dakika 60 °C'de deparafinizasyon işleminden geçirildi. Daha sonra önceden programlanmış boyama programı ile otomatik lam boyayıcıda boyandı. Boyama işlemi bittikten sonra kesitler çeker ocak altında entellan kullanılarak kapatıldı.

3.4.4. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Hematoksilen&Eozin boyama otomatik lam boyacı yardımı ile daha önceden ayarlanan program sayesinde yapıldı. Kesitler önce otomatik lam boyayıcıda bulunan 60 °C'lik etüv haznesinde 45 dakika deparafinizasyon için bekletildi, daha sonra boyama işlemine geçildi. Boyama işlemi tablo 3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. H&E Boyama Prosedürü

1. Ksilen	5 dakika
2. Ksilen	5 dakika
3. %100'lük etil alkol	5 dakika
4. %96'lık etil alkol	5 dakika
5. %70'lik etil alkol	5 dakika
6. Distile su	2-3 dakika
7. Hematoksilen	2 dakika
8. Çeşme suyu	3 kez batırılıp çıkarıldı.

9. Asit alkol	1 kez batırılıp çıkarıldı.
10. Çeşme suyu	3 kez batırılıp çıkarıldı.
11. Amonyaklı su	10 saniye
12. Çeşme suyu	3 kez batırılıp çıkarıldı.
13. Eozin	50 saniye
14. Çeşme suyu	3 kez batırılıp çıkarıldı.
15. % 70'lik etil alkol	2 dakika
16. % 96'lık etil alkol	5 dakika
17. %100'lük etil alkol	5 dakika
18. Ksilen	5 dakika
19. Ksilen	5 dakika

Boyama işlemi bittikten sonra boyanmış kesitler laboratuarda, çeker ocakta entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Elde edilen preparatlardan KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Mikroskopi Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japan) ataçmanlı Işık Mikroskopunda (Olympus BX 51, Japan) resimler çekildi ve değerlendirme için dijital ortama aktarıldı. Böbrek dokusunda, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon, nötrofil infiltrasyonu ve intertübüler vasküler konjesyon açısından semikantitatif olarak değerlendirmeler yapıldı. Skorlamada 0-3 arasında puanlama kullanıldı.

0: İzlenmedi

1: Hafif derecede %25'den az hasar

2: Orta derecede %25 ile %75 arası hasar

3: Şiddetli derecede %75'ten fazla hasar

Skorlama için her bir hayvana ait toplam 18 preparat X200 büyütmede değerlendirildi. Hasarı değerlendirmede korteks ve dış meduller alan esas alındı (160, 161).

3.4.5. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

PAS boyaması için hazırlanan preparatlar 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek deparafinize edildi. PAS boyama için ChemBio PAS STAIN KIT (CB6125.0100) kullanıldı. Üreticinin protokolüne uygun olarak aşağıdaki tabloda özetlenen şekilde işlemler manuel olarak uygunlandı.

Tablo 4. PAS Boyama Yöntemine Ait Uygulamalar ve Süreleri

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

Doku kesitleri çeker ocakta kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatlar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji

Anabilim Dalı Mikroskopi Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japan) ataçmanlı Işık Mikroskopunda (Olympus BX 51, Japan) değerlendirildi, fotoğraflar çekildi ve dijital ortama aktarıldı. Böbrek dokusunda glikojen birikimi, böbrek tübüleri epitel hücrelerinin mikrovillusları (firçamsı kenar) ve bazal membranları değerlendirildi (158).

3.4.6. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Masson Trikrom boyama için ChemBio Masson Trichrome boyama kiti (CB6095.0050) kullanıldı. Doku kesitleri deparinizasyon işlemi için 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildi.

Masson Trikrom Boyası Boyama prosedürü üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki şekilde uygulandı.

Tablo 5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

1.	%100'lük etil alkol	5 dakika
2.	%96'lık etil alkol	5 dakika
3.	%70'lik etil alkol	5 dakika
4.	Distile su ile yıkama	
5.	A-Bouin's fiksatif çözeltisi	1 saat 56°C'de bekletme
6.	Çeşme suyu	5 dakika yıkama
7.	5 damla B-Weigert's demirli hematoksilen A ve 5 damla C-Weigert's demirli hematoksilen B ile örtülme	10 dakika
8.	Boyaların karışması için küçük salınımlar yapılabilir.	
9.	Ayraç uzaklaştırılması	
10.	Suda yıkama yapılmadan kurutma	5 dakika
11.	10 damla D- gelincik kızılı-asit fuksin	4 dakika
12.	Ayraç uzaklaştırılması	
13.	Distile su	1 dakika
14.	10 damla E-fosfotungstik asit çözeltisi	10 dakika
15.	Ayraç uzaklaştırılması	

16. Suda yıkama yapılmadan kurutma	5 dakika
17. 10 damla F- anilin mavisi çözeltisi	5 dakika
18. Ayraç uzaklaştırılması	
19. Distile su ile yıkama	1 dakika
20. %70'lik etil alkol	1 dakika
21. %96'lık etil alkol	1 dakika
22. %100'lük etil alkol	1 dakika

Doku kesitleri manuel işlem ile boyandıktan sonra çeker ocakta kurutulup daha sonra üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı. Hazırlanan preparatlar KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Mikroskopi Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Olympus, DP 71, Japan) ataçmanlı Işık Mikroskopunda (Olympus BX 51, Japan) değerlendirildi, fotoğraflar çekildi ve dijital ortama aktarıldı. Masson trikrom boyama ile böbrek intertisyel bağ dokusunda fibrozis (kollajen sentezi) değerlendirildi (158).

3.4.7. Histomorfometrik İşlemler

Hematoksilen&Eosin ile boyanan her hayvana ait toplam 18 preparatta proksimal tübül çapı KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı Işık Mikroskopunda (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak ölçüldü. Her preparatta 5 tane tübül çapı ölçümü yapıldı

3.5. Flow Sitometrik İşlemler

3.5.1. Taze Dokudan Hücre Süspansiyonu Elde Etme

Deney hayvanlarından cerrahi olarak çıkarılan taze böbrek dokuları önce SF ile yıkandı ve kanı uzaklaştırıldı. Daha sonra taze dokular PBS solusyonuna aktarıldı.

Dokular hızlıca Flow sitometrik işlemler için, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Kültürü laboratuvarına asepti kurallarına uyularak getirildi. Laminer Hava Akım Kabininde dokulara aşağıda belirtilen işlemler uygulandı.

1. 1 gr taze doku örnekleri, her grup için ayrı bir petri kabında, 1-2 ml serum fizyolojik ortamında bistüri yardımı ile ince şekilde doğrandı.

2. Daha sonra cam petrideki dokular, plastik serum tüplerinin tabanları yardımı ile ezilerek, homojen bir solusyon haline gelinceye kadar, mekanik olarak parçalandı.

3. Bu süspansiyon 5 ml'lik enjektöre çekildi ve daha sonra enjektörün plastik ucuna DNA mesh (Spectramesh-nylon, 50 micron Backman-Coulter) geçirilerek 1,5 ml hacimli tüplere süzüldü.

4. Süzme işleminden sonra hücre süspansiyonlarının üzerine 1ml kadar soğuk PBS eklendi.

5. Hücre süspansiyonu buzdolabında işlem başlayana kadar +4 °C'de saklandı.

3.5.2. Anneksin V Yöntemi

Hücre süspansiyonu elde edildikten sonra her grup için, her bir hücre süspansiyonundan 500 µL örnek yeni ependorf tüplere aktarıldı ve BD Pharmingen PE Annexin V Apoptosis Detection Kit (Cat: 559763 Lot: 5306537) ile boyandı. Boyama işlemi aşağıda yer alan tablo 6'da özetlendiği gibi yapıldı.

Tablo 6. Anneksin V Yöntemi

1.Hücre süspansiyonu çöktürüldü	Santrifüj 1900 rpm-5 dakika
2.Süpernatant atıldı, pelet üstüne 1 ml kadar PBS eklendi	Santrifüj 1900 rpm-5 dakika
3.Süpernatant atıldı, pelet üstüne 1 ml kadar PBS eklendi	Santrifüj 1900 rpm-5 dakika
4.Süpernatant atıldı, pelet üstüne 1 ml 1x dilüe Binding Buffer eklendi.	Kitte yer alan 10x binding buffer distile su kullanılarak 1/10 oranında dilüe edildi.
5.100 µl solusyon yeni tüplere aktarıldı	
6. 5 µl PE Anneksin V ve 5 µl 7-AAD eklendi	15 dakika boyunca karanlıkta ve 25 °C’de inkübe edildi.
7. Her tüpe 400 µl 1x binding buffer eklendi	Plastik spora kondu ve karanlıkta saklandı
8.1 saat içinde flow sitometride analiz edildi.	

3.5.3. Antinox2/gp91phox Yöntemi

Hücre süspansiyonu elde edildikten sonra her grup için, her bir hücre süspansiyonundan 500 µL örnek yeni ependorf tüplere aktarıldı ve Abcam Anti-NOX2/gp91phox antibody kit (Cat: ab80508) ile boyandı.

Boyama işlemi aşağıda özetlendiği gibi yapıldı.

1. Buzdolabında saklanan hücre süspansiyonları yeni 1,5 ml ependorf tüplerine alındı.

2. Üzerine 1ml kadar soğuk PBS eklendi. Daha sonra 2000 rpm’de 5 dk boyunca santrifüjlendi.

3. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı.

4. Her tüpe fiksasyon için 100 µl paraformaldehit eklenip 15 dakika 4 °C’de bekletildi.

5. Daha sonra permeabilizasyon için her tüpe 1 ml soğuk metanol eklenip karıştırıldı. -20 °C'de 5-10 dakika bekletildi.

6. Yıkama işlemi için 2000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı ve süpernatant atıldı. Peletin üstüne 1 ml PBS eklenip vortekslendi.

7. Yıkama işlemi tekrarlandı. Süpernatant atıldı. Peletin üzerine 1ml kadar soğuk PBS, FCS ve sodyum karbonat solusyonu eklendi.

8. Yeni tüplere 100 µl hücre süspansiyonu konuldu ve üzerine 1 µl primer antikor eklendi. Hücre süspansiyonu buzdolabında +4 °C'de 30 dakika bekletilerek inkübe edildi.

9. İnkübasyon sonrası yıkama için her tüpe 1ml kadar soğuk PBS eklendi. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

10. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant atıldı ve peletin üzerine 1 ml soğuk PBS eklenip yıkama işlemi tekrarlandı.

11. Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 100 µl soğuk PBS eklendi. Üzerine 1 µl sekonder antikor eklenerek karanlık ortamda +4 °C'de inkübe edildi.

12. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi için her tüpe 1ml soğuk PBS eklenip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulandı ve süpernatant atıldı.

13. Peletin üstüne 1ml PBS eklendi ve yıkama işlemi tekrarlandı. Süpernatant atıldı.

14. Peletin üzerine 1 ml soğuk PBS, FCS ve sodyum karbonat karışımı eklendi. Flow sitometrik analiz yapılana kadar buzdolabında +4 °C'de bekletildi.

3.5.4. Flow Sitometrik Analiz

Flow sitometrik analiz, BD Accuri C6 Cytometer cihazında (488-640 nm) yapıldı ve FCM bilgisayarına aktarıldı. FCM bilgisayarına aktarılan apoptoz piki yüzde oranları, BD Accuri C6 Cytometer Software ve Multicycle DNA analiz programı kullanılarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 20, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Her bir gruba ait morfometrik ve diğer sayısal veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verildi ve Kruskal Wallis varyans analizi (post hoc olarak Bonferroni d¼zeltmeli Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı. T¼m karşılaştırmalarda $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Histomorfometrik Bulgular

Deney gruplarında tübül çapına ait yapılan ölçüm sonuçları Tablo 7'de verilmiştir. Elde edilen istatistiksel verilere göre tübül apı DOKS Grubunda Kontrol Grubuna göre artış görülmekle birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. DOKS+SAF Grubunda ise DOKS Grubuna göre azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Tablo 7. Deney Gruplarına Ait Histomorfometrik lmlerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Gruplar	Tübül apı Ortalaması (µm)	Standart Sapma
Kontrol	51,9167	5,6332
DOKS	52,5150	1,6461
DOKS+SAF	52,2117	2,4646

4.2. Histomorfolojik Bulgular

4.2.1. Deney Gruplarına Ait Histopatolojik Skorlama Sonuçları

Deney gruplarına ait böbrek dokusunda hasar değerlendirmesi için, histopatolojik skorlama yapılarak istatistik değerlendirme yapıldı. İstatistik değerlendirmelerine ait ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 8’de verildi.

Histopatolojik skorlamada kontrol grubuna kıyasla DOKS Grubunda tübüler vakuolizasyon, tübüler dilatasyon ve intertübüler vasküler konjesyonda istatistiksel olarak anlamlı belirgin bir artış gözlemlendi ($p<0.05$). DOKS+SAF Grubunda ise DOKS Grubuna kıyasla tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon ve intertübüler vasküler konjesyonda, histopatolojik skorda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Tübüler atrofi ve nötrofil infiltrasyonu DOKS Grubunda Kontrol Grubuna göre artmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. DOKS+SAF Grubunda tübüler atrofi ve nötrofil infiltrasyonu DOKS Grubuna göre azalmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Tablo 8. Deney Gruplarına Ait Histopatolojik Bulgu Skorlaması

Gruplar	Kontrol	DOKS	DOKS+SAF
Tübüler Atrofi	0,65±0,516	1,17±0,4081	0,83±0,408
Tübüler Dilatasyon	0,67± 0,516	2,50 ±0,548 ¹	0,83± 0,753 ²
Tübüler vakuolizasyon	0,50± 0,548	2,67 ±0,516 ³	1,17 ±0,408 ⁴
Nötrofil İnfiltrasyonu	0,37 ±0,408	0,67± 0,516	0,50± 0,548
İntertübüler Vasküler Konjesyon	0,67 ±0,516	2,50 ±0,548 ⁵	1,00± 0,632 ⁶

¹: Kontrol Grubuna göre DOKS Grubunda tübüler dilatasyon anlamlı olarak arttı ($p<0,05$).

²: DOKS Grubuna göre DOKS+SAF Grubunda tübüler dilatasyon anlamlı olarak azaldı ($p<0,05$).

³: Kontrol Grubuna göre DOKS Grubunda tübüler vakuolizasyon anlamlı olarak arttı ($p<0,001$).

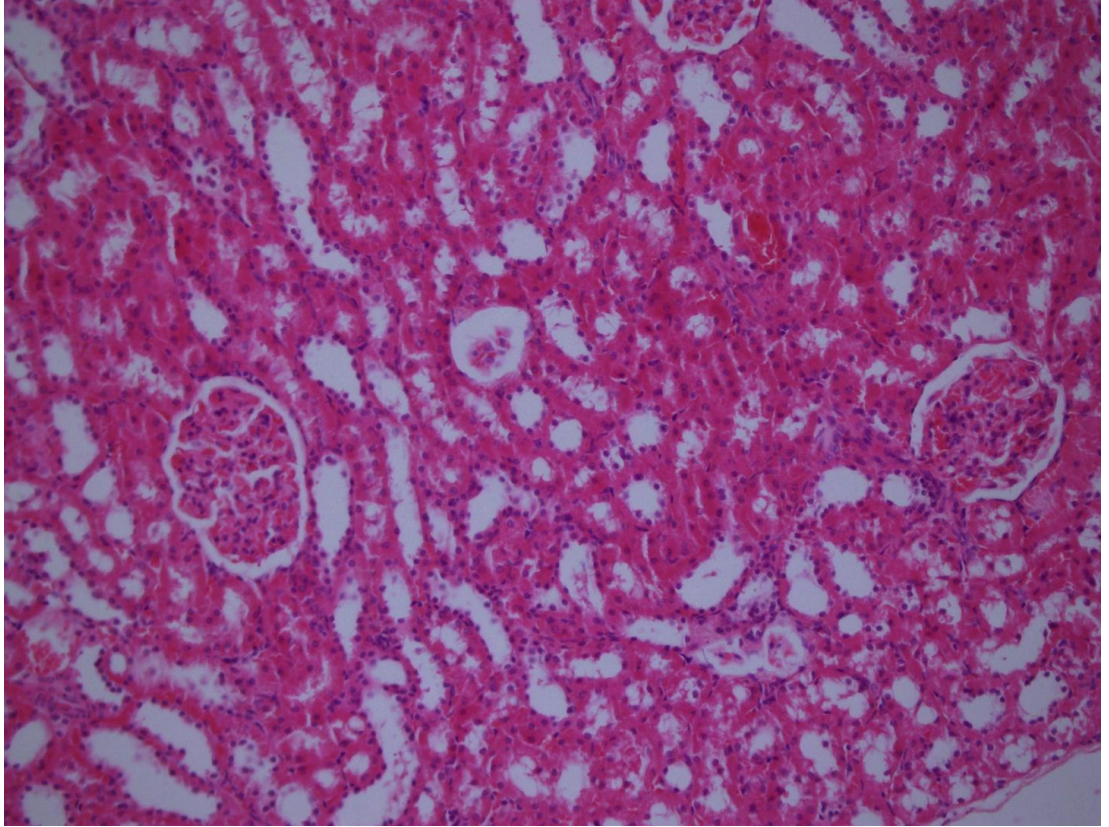
⁴:DOKS Grubuna göre DOKS+SAF Grubunda tübüler vakuolizasyon anlamlı olarak azaldı ($p<0,007$).

⁵: Kontrol Grubuna göre DOKS Grubunda intertübüler vasküler konjesyon anlamlı olarak arttı ($p<0,002$).

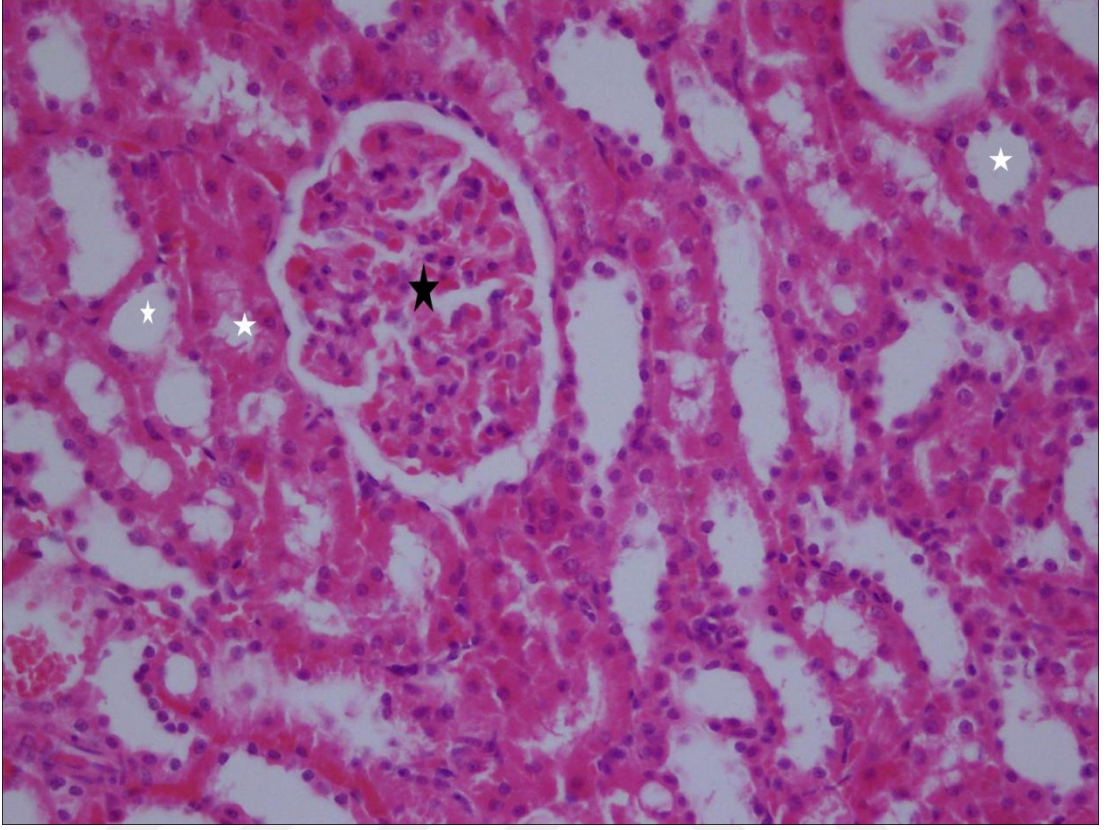
⁶: DOKS Grubuna göre DOKS+SAF Grubunda vasküler konjesyon anlamlı olarak azaldı ($p<0,017$).

4.2.2. Hematoksilen-Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

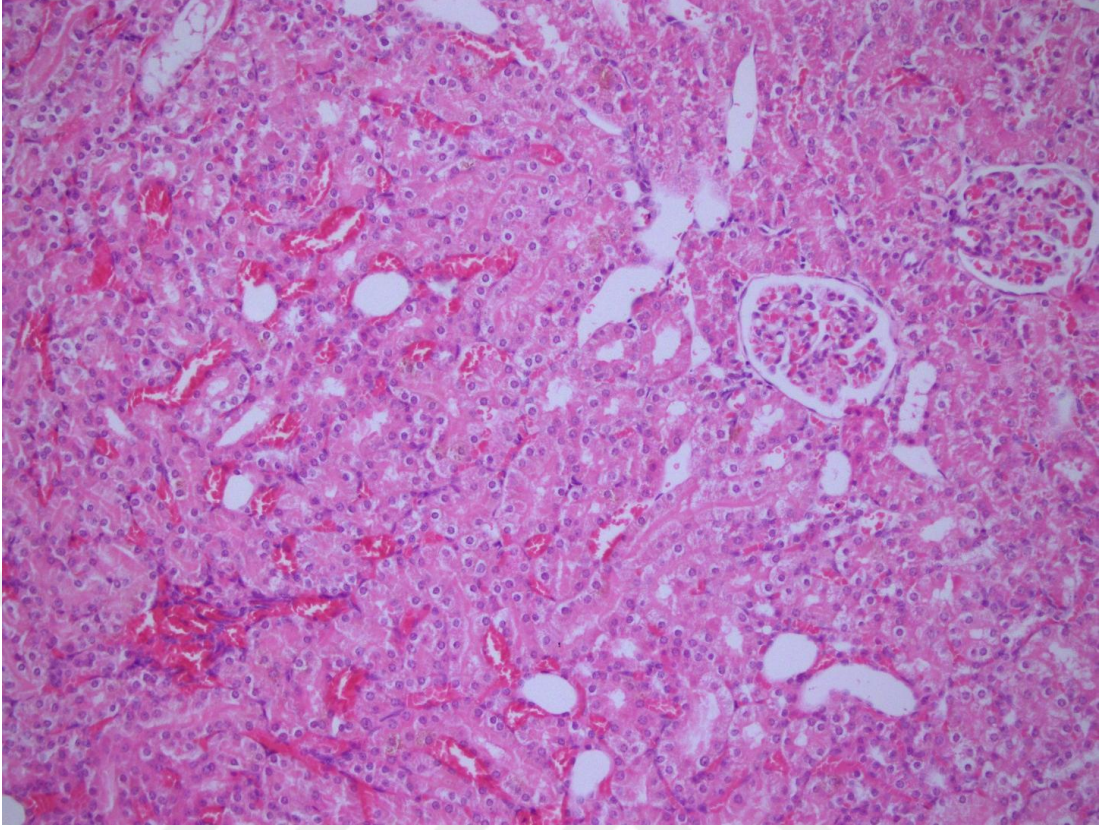
Böbrek dokusunun histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait böbrek kesitlerinde, glomerül, Bowman kapsülü, proksimal ve distal tübül normal yapıda izlendi ve herhangi bir patolojik bulguya rastlanmadı. DOKS Grubuna ait böbrek kesitlerinde tübüler dilatasyon, tübüler vakuolizasyon ve intertübüler vasküler konjesyonda belirgin bir artış izlendi. DOKS Grubunda tübüler atrofi ve nötrofil infiltrasyonunda Kontrol Grubuna oranla bir miktar artış gözlemlendi. DOKS+SAF Grubuna ait böbrek dokusunda, yer yer tübüler vakuolizasyon ve hafif düzeyde tübüler dilatasyon dışında patolojik bulgu gözlemlenmedi.



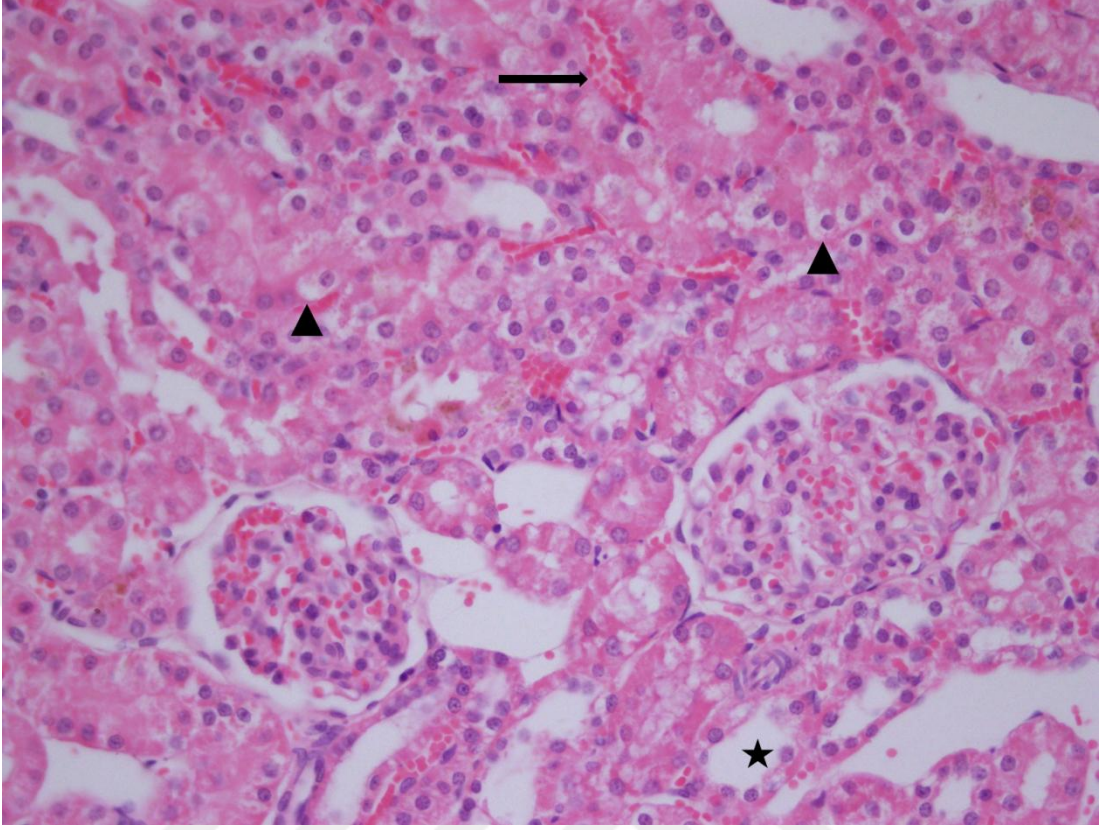
Resim 2. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).



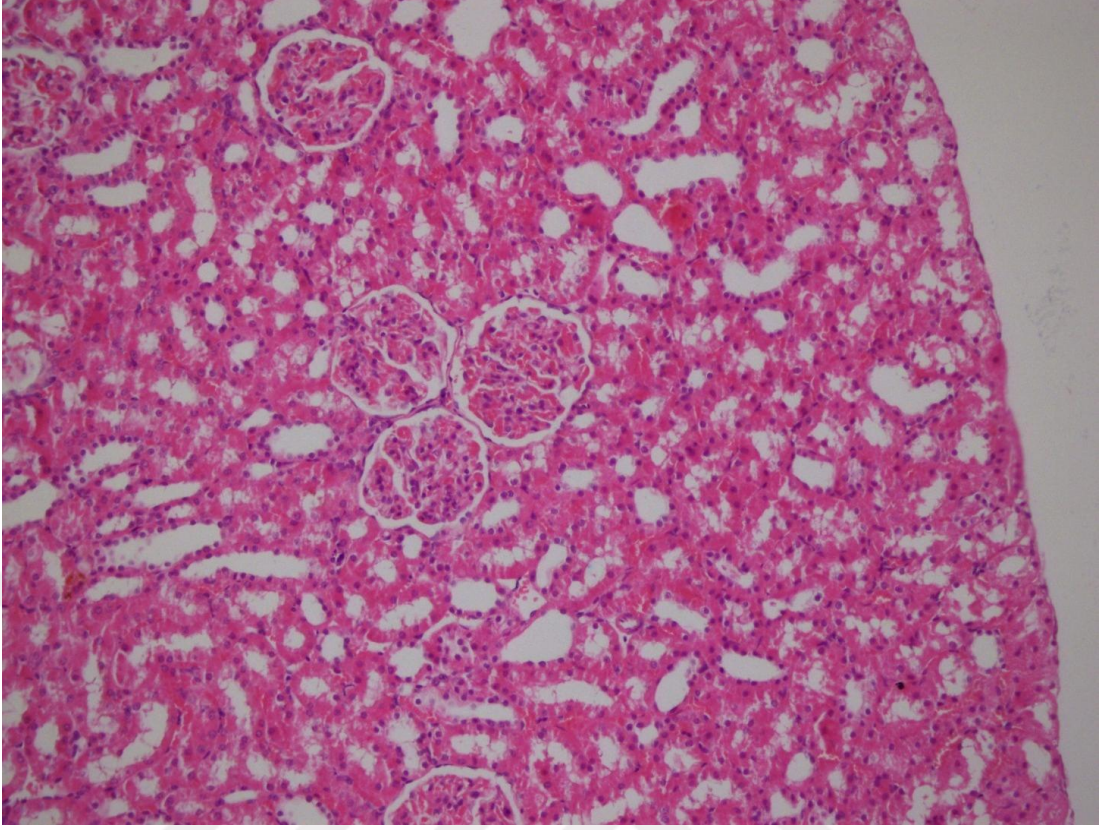
Resim 3. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Glomerül yapısı (siyah dolgulu yıldız) ve tübül yapısı (beyaz dolgulu yıldız) normal olarak izlenmektedir (H&E, X400).



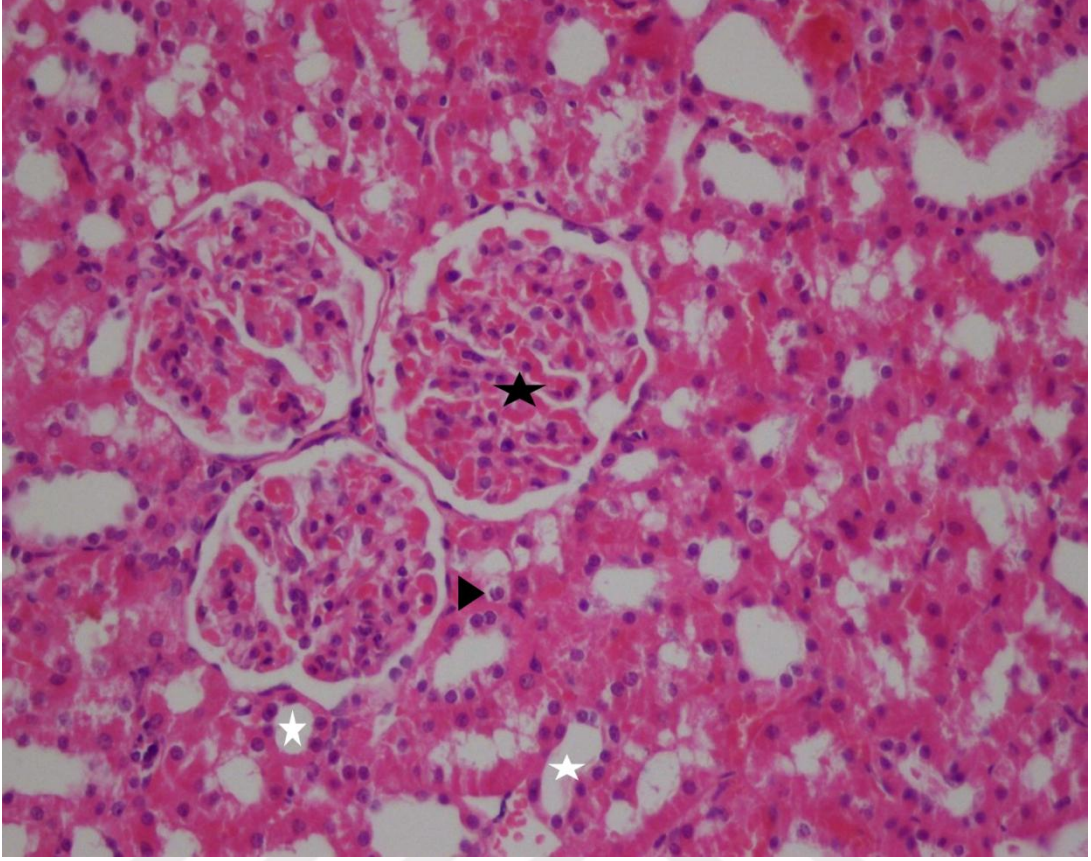
Resim 4. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).



Resim 5. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu. İntertübüler vasküler konjesyon (sağ ok), tübüler dilatasyon (siyah yıldız) ve sitoplazmik vakuolizasyon (okbaşı) izlenmektedir (H&E, X400).



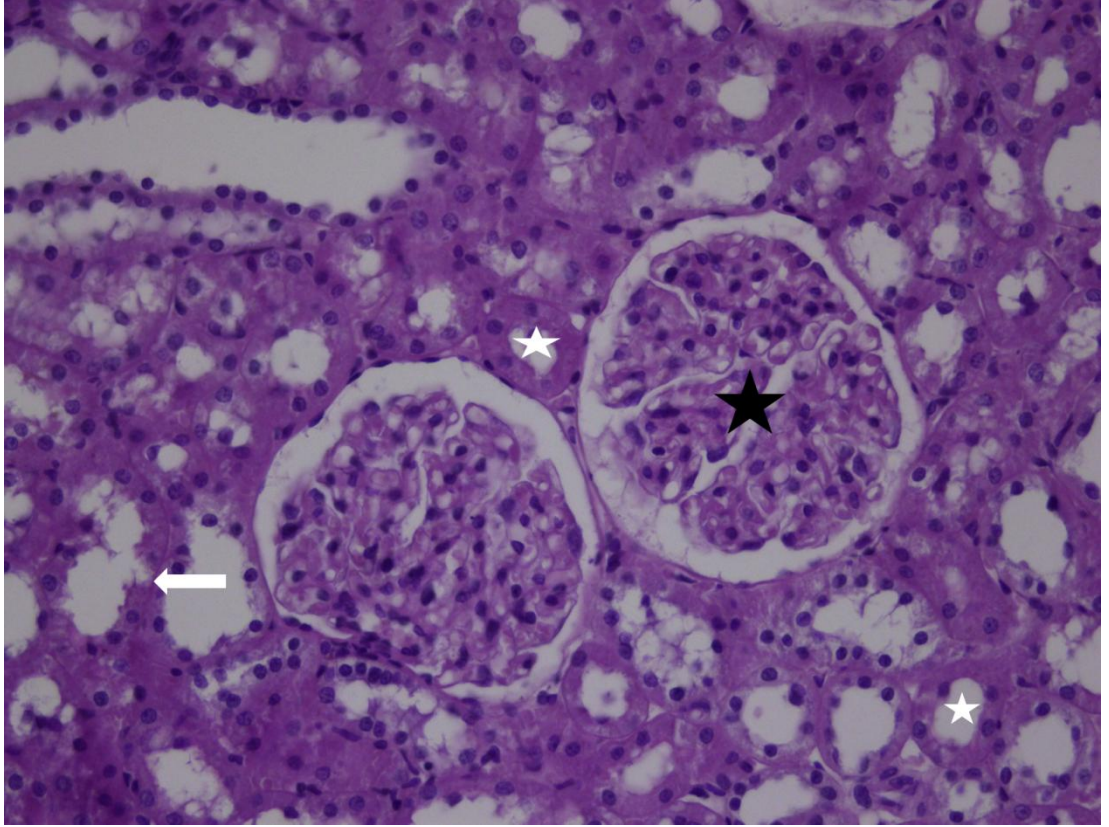
Resim 8. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu (H&E, X200).



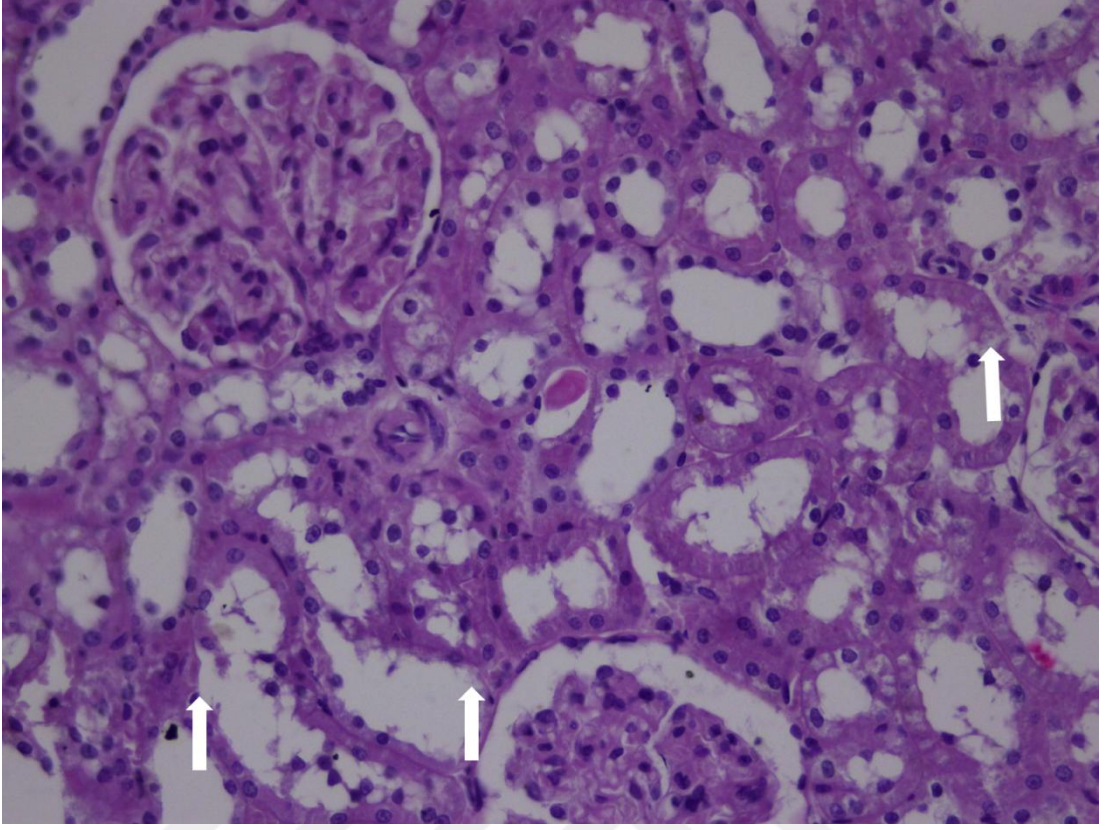
Resim 9. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Normal glomerül yapısı (siyah dolgulu yıldız), normal tübüler yapı (beyaz dolgulu yıldız) ve hafif derecede sitoplazmik vakuolizasyon (siyah okbaşı) izlenmektedir (H&E, X400).

4.2.3. PAS Yöntemi ile Boyalı Kesitlerin Histomorfolojik Değerlendirilmesi

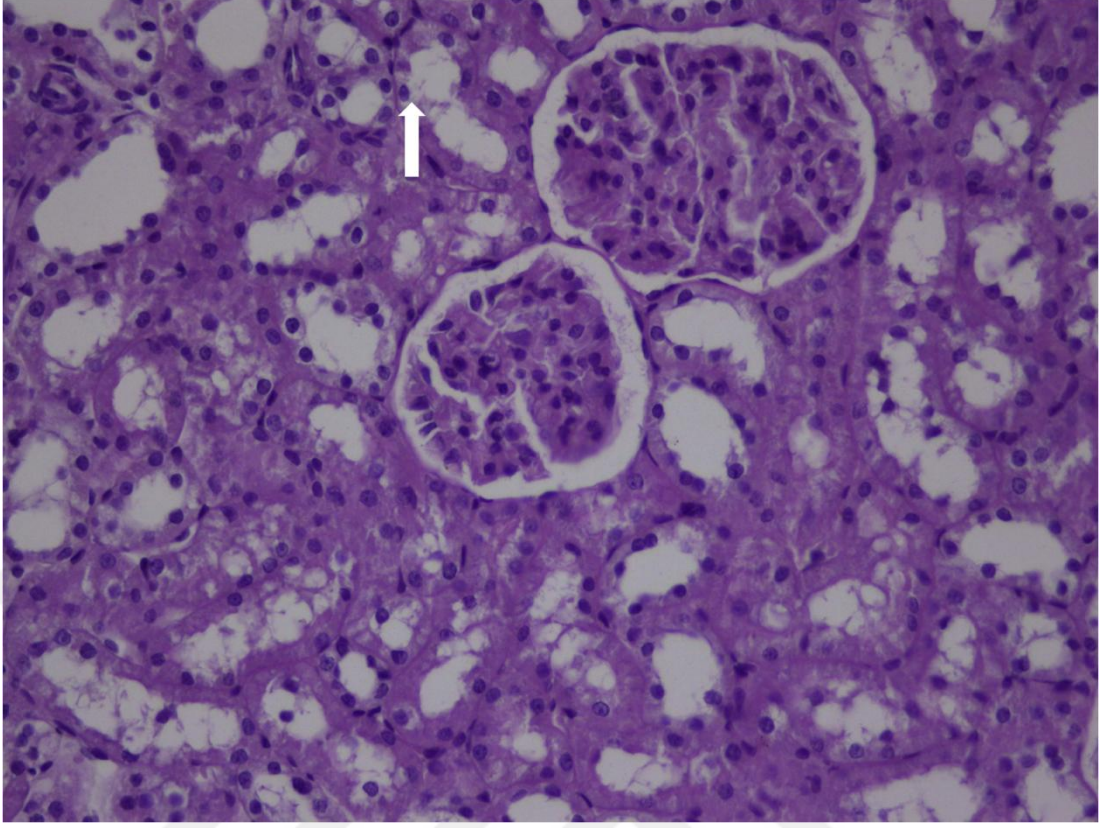
Böbrek dokusunun PAS yöntemi ile yapılan histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait böbrek kesitlerinde, glomerül, proksimal ve distal tübül normal yapıda izlendi. DOKS Grubuna ait böbrek kesitlerinde ise tübül epitelinde yaygın kesinti, vakuolizasyon gibi patolojik bulgular saptandı. DOKS+SAF Grubuna ait böbrek dokusunda, tübül epitelinde kesinti ve vakuolizasyon gibi bulgular, DOKS Grubuna göre azalmakla birlikte yer yer görüldü.



Resim 10. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Normal glomerül yapısı (siyah dolgulu yıldız), normal tübül yapısı (beyaz dolgulu yıldız) ve yer yer tübüler epitelde kesinti (sol ok) izlenmektedir (PAS, X400).



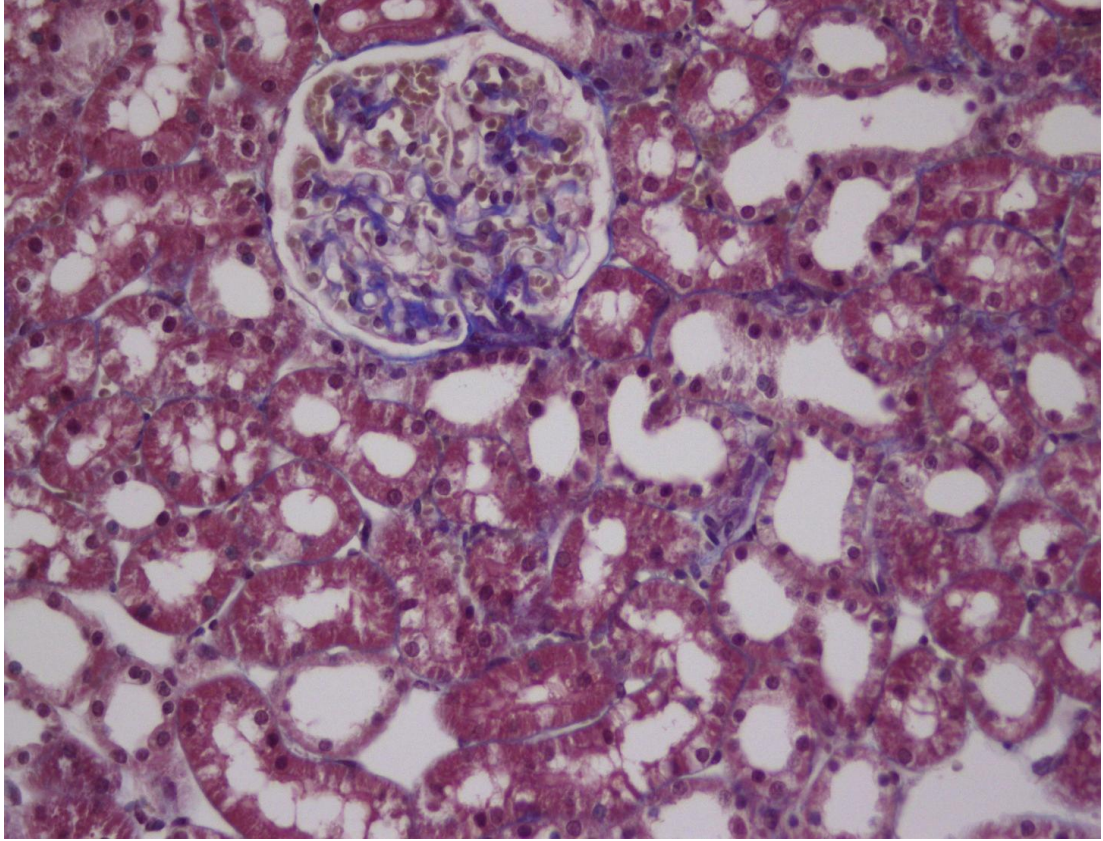
Resim 11. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Tübüler epitelde yaygın kesinti (yukarı ok) izlenmektedir (PAS, X400).



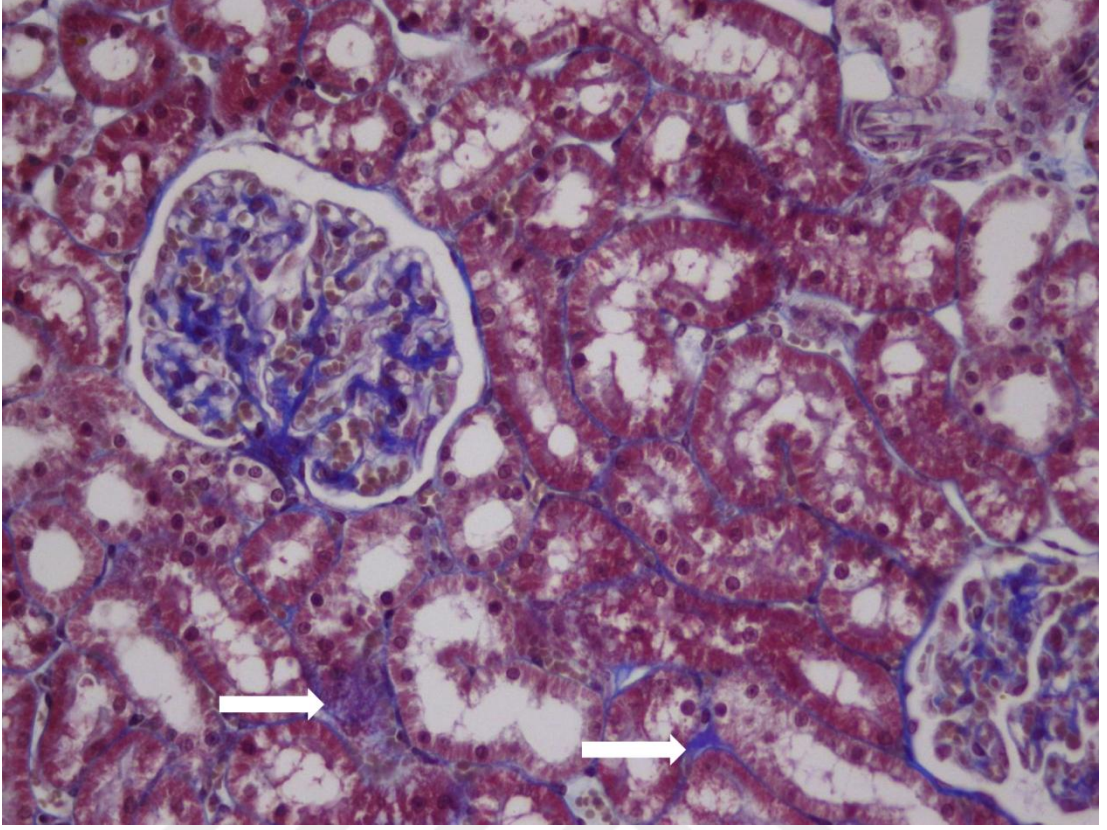
Resim 12. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Tübüler epitelde yer yer kesinti (yukarı ok) izlenmektedir (PAS, X400).

4.2.4. Masson Trikrom ile Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

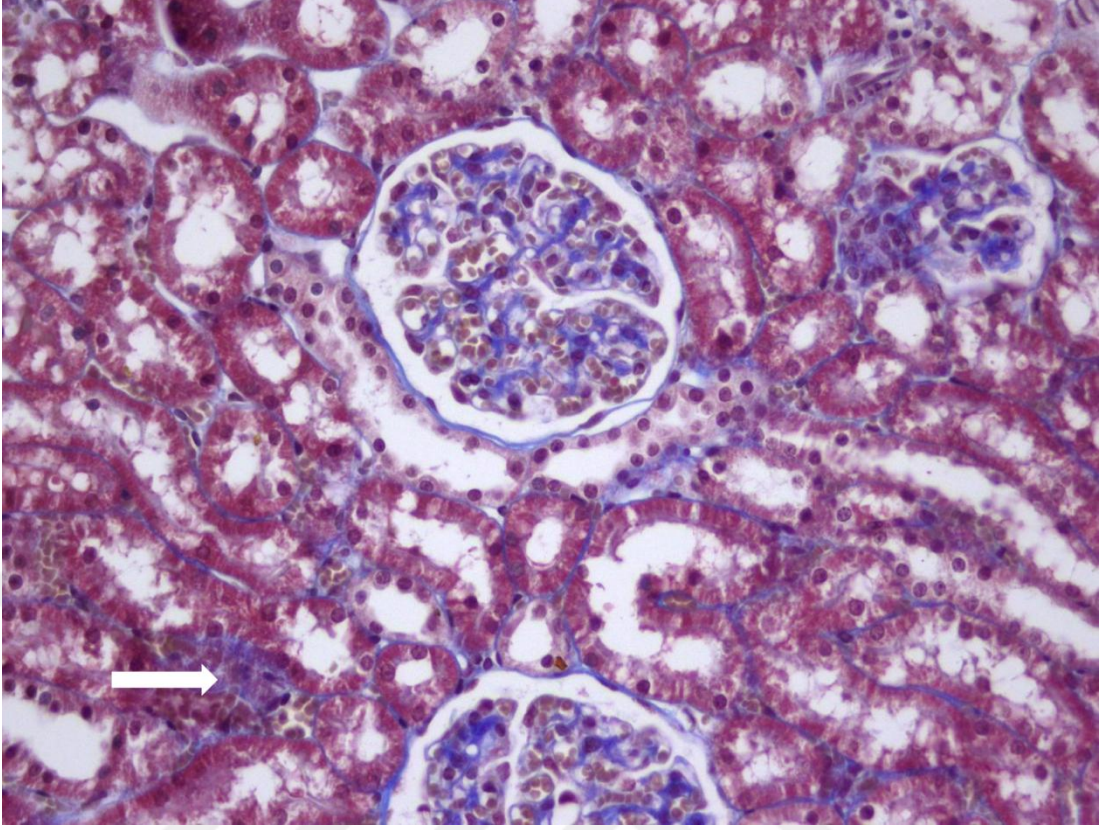
Böbrek dokusunun Masson Trikrom ile yapılan histolojik incelemesinde; Kontrol Grubuna ait böbrek kesitlerinde, glomerül, proksimal ve distal tübül normal yapıda izlendi. DOKS Grubuna ait böbrek kesitlerinde ise tübüler dilatasyon, vakuolizasyon ve intertübüler kollajen artışı gibi patolojik bulgular saptandı. DOKS+SAF Grubuna ait böbrek dokusunda, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon ve intertübüler alanda kollajen artışı gibi bulgular DOKS Grubuna göre azalmakla birlikte yer yer görüldü.



Resim 13. Kontrol Grubuna Ait Böbrek Dokusu (Masson Trikrom, X400).



Resim 14. DOKS Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Yer yer hafif derecede intertübüler kollajen artışı (sağ ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X400).



Resim 15. DOKS+SAF Grubuna Ait Böbrek Dokusu. Yer yer hafif düzeyde intertübüler kollajen artışı (sağ ok) izlenmiştir (Masson Trikrom, X400).

4.3. Flow Sitometrik Bulgular

Deney Gruplarına ait böbrek dokularında Anneksin V yöntemi ile değerlendirilen AI (apoptotik indeks) aşağıdaki tablo 9’da verildi. Apoptotik indeks değerlendirmesine göre; AI’in DOKS Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı görüldü. DOKS+SAF Grubunda AI, DOKS Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı. AI, DOKS ve DOKS+SAF Gruplarında, Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tablo 9. Deney Gruplarına Ait Flow Sitometrik AI Değerleri

Gruplar	Apoptotik İndeks % (AI)
Kontrol	0,153±0,07565
DOKS	9,909±0,84819 ^a
DOKS+SAF	5,3614±0,5654 ^b

^a: Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^b: DOKS grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

Antinox2/gp91phox

Deney Gruplarına ait böbrek dokularında antinox2/gp91phox yöntemi ile değerlendirilen oksidatif stres aşağıdaki tablo 10’da verildi. Oksidatif stres değerlendirmesine göre; antinox2/gp91phox antikoru ile bağlanan hücre sayısında DOKS Grubunda Kontrol Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış görüldü. DOKS+SAF Grubunda antinox2/gp91phox antikoru ile bağlanan hücre sayısında, DOKS Grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Antinox2/gp91phox ile bağlanan hücre sayısı DOKS ve DOKS+SAF Gruplarında Kontrol Grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Tablo 10. Deney Gruplarına Ait Flow Sitometrik Antinox2/gp91phox Sonuçları

Gruplar	Antinox2/gp91phox pozitif hücre sayısı (%)
Kontrol	0,67±0,071
DOKS	9,94±0,901 ^a
DOKS+SAF	5,399±0,464 ^b

^a : Kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

^b : DOKS grubuna göre anlamlı derecede farklılık vardır (p<0.05).

5. TARTIŞMA

Doksorubisin, antrasiklin ailesine ait, kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaçtır. Doksorubisin, 1960'larda bir mantar türü olan *Streptomyces peucetirus* variete caesiu'den üretilmiştir. Doksorubisin, meme, akciğer, mide, ovaryum, tiroid, non Hodgkin ve Hodgkin lenfoma, multipl miyelom, sarkom ve pediatrik kanserler gibi birçok kanser türü tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır. Kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar, diğer ilaçlara göre daha fazla toksik ilaçlar olmalarına rağmen kanser gibi son derece ciddi ve halen önemli bir ölüm nedenini oluşturan klinik durumunda yararlı olmaları, toksisitelerinin önemini azaltmaktadır (162-164).

Antrasiklin grubu ilaçlara bağlı gelişen ve sık gözlenen yan etkiler, kemik iliğinin baskılanması, saçlarda dökülme, mukozit, bulantı-kusma ve deri pigmentasyonunda artıştır. Doksorubisin tedavisine bağlı olarak gelişen nefrotoksisite, kardiyotoksisite ve hepatotoksisite önemli diğer yan etkiler arasındadır (165).

Doksorubisin kanser hücresinde DNA'ya interkale olur ve topoizomeraz-II-aracılı DNA onarımı bozular. Bunun yanında serbest radikallerin oluşumunu arttırarak hücrel membranlara, DNA ve proteinlere zarar verir. Doksorubisin, kararsız bir metabolit olan semikinona okside olur ki reaktif oksijen türlerinin salındığı bir süreçte tekrar doksorubisine dönüşür. Reaktif oksijen türleri, lipit peroksidasyonuna, DNA hasarına, oksidatif strese, membran hasarına yol açabilir ve hücrede apoptozu tetikler (68, 166).

Bazı çalışmalar DOX'in glomerüler podositler ile etkileşime girerek hasarlanmalarına neden olduğunu ve sonuç olarak nefropatiye yol açtığını göstermiştir. Belgelenen en yaygın olay, tüm çalışmalarda ciddi bir proteinüri varlığıdır. Böbrek dokusunun sızan proteinlerin lokal geçişine maruz kalması nefronda yapısal değişikliklere neden olarak belirgin proteinüri, steroid direnci, hipertansiyon ve yüksek oranda böbrek yetmezliğine ilerleme ile karakterize glomerüler bir hastalık olan fokal glomerüloskleroz gelişir (87, 167).

Proteinüri, podositlerin ayaksı çıkıntılarının fokal füzyonu ve şişliği, geniş glomerüler vakuolizasyon ve ilerleyici böbrek yetmezliği ilişkilidir. Daha az

yoğunlukta olmasına rağmen, diğer önemli etkiler, geniş glomerüler lezyonlar, tübüler dilatasyon, interstisyel fibroz ve inflamasyon, plazma kreatininde artış ve hipoalbüminemi, dislipidemi, hiperkoagülabilité, böbrek boyutunda artış ve glomerüler kapiller geçirgenliktir. Doksorubisinin toksisiteyi tetiklediği mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsada bazı çalışmalar onların büyük olasılıkla demir antrasiklin kompleksi oluşumunun aracılık ettiği serbest radikal üretimi ile ilişkilidir. Lebrecht ve arkadaşları doksorubisin'in mitokondriye girerek ROS ürettiğini, bunun sonucunda mitokondri disfonksiyonuna yol açan mtDNA hasarına neden olarak nefron hasarının hızlı ilerlemesine katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu hipotez Doksorubisin'in indüklediği glomerüler hasarın, ROS oluşumu ile ilişkili olduğunu gösteren Okuda ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir. Ayrıca Doksorubisin'in topoizomeraz II inhibisyonunun ve/veya oksidatif streste artış sonucu olarak mtDNA mutasyonlarını artırdığı bildirilmiştir (168, 169).

Doksorubisine bağlı gelişen toksisitenin patogenezinde oksidatif stres önemli bir mekanizmadır. Antioksidan enzimlerde azalma, lipid peroksidasyonunda artış ve serbest radikal üretiminde artma oksidatif hasarın patogenezinde önemli katkıda bulunmaktadır. Doksorubisinin önemli sitotoksik mekanizmalarından birisi DNA hasarı ve serbest radikallerin üretimini artırarak apoptoza neden olmasıdır. Doksorubisine bağlı gelişen nefrotoksisite patogenezinde rol oynayan oksidatif stresi ve apoptozu azaltmaya yönelik olarak çok sayıda antioksidan madde ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır (170, 171).

Literatürde doksorubisin rat ve farelere değişik dozlarda i.p olarak uygulanmıştır. Hassan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, bir siklooksijenaz-2 inhibitörü olan meloksikamın farelerde doksorubisin kaynaklı nefrotoksisitede olası modülatör etkilerini değerlendirmek için doksorubisin iki hafta boyunca haftada iki kez 5mg/kg dozunda uygulanmıştır. Böbrekte histopatolojik olarak vasküler konjesyon, fokal hasar ve böbrek hücrelerinde bozulma ile bazı böbrek korpüsküllerinde atrofi dışında proksimal ve distal kıvrımlı tübüllerde sitoplazmik vakuoller ve piknotik çekirdekler gözlenmiştir. Ayrıca doksorubisin grubunda antioksidan enzim seviyelerinde belirgin azalma ile birlikte caspaz-3 immünreaktivitesinde belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu bulguların meloksikam

uygulanan grupta azaldığı tespit edilmiştir (172). Biz de çalışmamızda doksorubisin uygulaması ile benzer histopatolojik bulgular tespit ettik. Ayrıca doksorubisin uygulamasının apoptozu arttırdığını flow sitometrik olarak Anneksin V yöntemi ile tespit ettik.

Yagmurca ve arkadaşları, kuersetin'in doksorubisin kaynaklı böbrek hasarına karşı koruyucu etkisini ışık mikroskopi ile değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmada tek doz 20 mg/kg doksorubisin uygulaması sonrası böbrekte tübüler dilatasyon, tübüler vakuolar değişiklikler, glomerüler vakuolizasyon, Bowman boşluğunda azalma, Bowman kapsülünde kalınlaşma ve interstisyel infiltrasyon gözlemlenmiştir (173). Biz çalışmamızda doksorubisin uygulanan grupta tübüler dilatasyon ve vakuolizasyon görmekle birlikte belirgin glomerüler patoloji saptamadık.

Rashid ve arkadaşları tarafından Wistar sıçanların böbrek ve karaciğer dokularında doksorubisin'in neden olduğu toksisiteye karşı krizinin etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. 40 mg/kg doksorubisin uygulanan grupta kreatinin ve BUN değerleri yükselmiş histolojik olarak böbrekte glomerüler ve tübüler hasar gözlenmiştir. Krizin uygulanan grupta kreatinin ve BUN değerleri düşük bulunmakla birlikte tübüler ve glomerüler hasarın azaldığı gösterilmiştir (174). Aynı doz doksorubisin uygulaması tübüler patoloji saptamakla birlikte belirgin glomerüler patoloji saptamadık.

Benzer ve arkadaşları tarafından sıçanlarda doksorubisin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı kurkuminin kemoprotektif etkilerini araştırdıkları çalışmada doksorubisin 40 mg/kg i.p tek doz olarak uygulanmıştır. Doksorubisin uygulanan grupta serum kreatinin, üre, doku MDA seviyeleri artmış bunun yanında KAT, SOD, GPX ve GSH düzeyleri ise azalmıştır. Histopatolojik olarak ciddi interstisyel hemoraji ve mononükleer hüce infiltrasyonu gözlemlendi. İmmüno Floresan analiz sonucunda doksorubisin uygulanan grupta kontrol grubuna göre ciddi kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmiştir (156). Biz de çalışmamızda doksorubisin uygulaması ile benzer histopatolojik bulgular tespit ettik. Ayrıca doksorubisin uygulamasının apoptozu arttırdığını Anneksin V yöntemi ile tespit ettik. Oksidatif hasarın DOKS uygulanan grupta arttığını antinox2/gp91phox ile flow sitometrik olarak belirledik.

El-Sheikh ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sıçanlarda doksorubisin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı koenzim Q10'nin koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada, doksorubisin 15 mg/kg i.p uygulanmıştır. Doksorubisin uygulanan grupta kreatinin, BUN ve MDA seviyeleri artmış GSH, KAT düzeyleri azalmıştır. Histopatolojik olarak Bowman boşluğunda dilatasyon, belirgin renal tübüler dejenerasyon, pul pul dökülmüş hücreler, protein kastlar ve kistik dilatasyon gözlenmiştir. İmmünohistokimyasal analiz sonucunda doksorubisin uygulanan grupta kontrol grubuna göre kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin artış izlenmiştir. Biz de çalışmamızda doksorubisin uygulaması ile benzer histopatolojik bulgular tespit ettik. Oksidatif hasarın ve apoptozun DOKS uygulanan grupta arttığını belirledik.

Su ve arkadaşları tarafından yapılan in vivo ve in vitro çalışmada doksorubisin kaynaklı nefrotoksisitede madekassoidin koruyucu etkileri araştırılmıştır. 2 hafta boyunca haftada iki kez 5 mg/kg i.p doksorubisin uygulaması ile glomerüllerde bozulma, filtrasyon boşluğunda tıkanıklık, tübüllerde fokal atrofi nekrozu ve dökülmesi ile birlikte vasküler konjesyon tespit edilmiştir. Biyokimyasal olarak doksorubisin uygulaması ile BUN ve kreatinin değerlerinde yükselme gözlenirken antioksidan enzimlerde (SOD, GSH) azalma olmuştur. Çalışmanın in vivo kısmında HK-2 hücrelerinde Anneksin V yöntemi ile flow sitometrik olarak ve TUNEL tekniği ile ışık mikroskopik olarak doksorubisin uygulamasının apoptozu arttırdığı tespit edilmiştir (175). Biz de çalışmamızda doksorubisin uygulaması ile benzer histopatolojik bulgular tespit ettik. Ayrıca doksorubisin uygulamasının apoptozu ve oksidatif hasarı arttığını tespit ettik.

Antioksidan etkisi saptanan safranal klinik ve deneysel çalışmalarda koruyucu ve tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda doksorubisin nefrotoksisitesine karşı antioksidan özelliği olan safranalın etkilerini histolojik ve flow sitometrik olarak araştırmayı amaçladık.

Ömer Hazman ve arkadaşı tarafından yapılan çalışmada Tip 2 diyabet modelinde böbrek inflamasyonu ve oksidatif stres parametreleri üzerine safranalın etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 6 hafta streptozotosin enjeksiyonu sonrası diyabet oluşan sıçanlara 4 hafta boyunca safranal uygulanmıştır. Safranal uygulanan grupta serum kreatinin, üre, TNF- α , IL-1 β seviyeleri azalmış; IL-18 ve IFN- γ seviyelerinde değişiklik olmamıştır. Histopatolojik olarak safranal tedavisi ile böbrekte interstisyel

inflamasyon ve bağ doku hücre proliferasyonu, tübüler epitelde düzleşme, intratübüler debris veya hiyalin dejenerasyonu, intraepitelyal hidropik dejenerasyon, epitel deskuamasyonu ve nekroz bulgularında diyabet grubuna göre azalma gözlenmiştir (176). Biz de çalışmamızda safranal uygulamasının, böbrek dokusunda histopatolojik olarak iyileşme sağladığını tespit ettik.

Karafakıoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sıçanlarda sisplatin kaynaklı nefrotoksisite ve oksidatif strese karşı safranalın koruyucu etkilerini araştırılmıştır. İki ayrı grupta sisplatin enjeksiyonu öncesi ve sonrası 5 gün boyunca safranal 200 mg/kg dozunda orogastrik gavaj ile uygulanmıştır. Safranal ile pretedavi grubunda kreatinin, üre sisplatin grubuna göre azalmış, GSH seviyesi artmış, MDA seviyesi değişmemiştir. Histopatolojik olarak safranal ile pretedavi grubunda intertisyal alanda inflamasyon, hemoraji ve bağ doku hücre proliferasyonunda azalma, epitel hücre dejenerasyonu ve deskuamasyonu, kistik dilatasyon ve lümeniçi debris ve tübüllerde hyalin silendir oluşumu parametrelerini içeren histopatolojik skorlamada belirgin bir azalma gözlendi. İmmünohistokimyasal analiz sonucunda, pretedavi safranal uygulanan grupta TUNEL yöntemi ile apoptozda belirgin bir azalma izlenmiştir (157). Bizim çalışmamızda da safranal uygulaması ile apoptoz indeksi azalmış, histopatolojik bulgular gerilemiş ve oksidatif hasar azalmıştır.

Sadeghnia ve ark. tarafından yapılan çalışmada kinolinik asit kaynaklı sıçan hippokampüsünde oluşan oksidatif hasara karşı safranalın koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada safranal 72.75, 145.5 ve 291 mg/kg olacak şekilde üç farklı dozda i.p olarak kinolinik asit enjeksiyonundan 30 dakika önce uygulanmıştır. Safranalın sistemik uygulaması (291 mg/kg, IP) ile etkili ve doza bağımlı kinolinik asit kaynaklı lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarını azalttığı tespit edilmiştir. Safranal ayrıca, kinolinik asit tarafından üretilen hipokampal tiyol redoks ve antioksidan durumunun azalmasını da engellemiştir (10). Biz de çalışmamızda, safranal uygulaması ile oksidatif hasarın azaldığını antinox2/gp91phox yöntemi ile flow sitometrik değerlendirme sonucunda tespit ettik.

Samarghandian ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda akciğer oksidatif hasarına karşı safranalın antioksidan aktivitesinin etkilerini araştırdıkları çalışmada 4 hafta boyunca streptozotosin diyabet modeli oluşturulan sıçanlara 3 ayrı grupta değişik dozlarda safranal (0.25, 0.50, and 0.75 mg/kg/gün) i.p olarak 4 hafta boyunca

uygulanmıştır. Safranal ile tedavi gruplarında bronkoalveolar sıvı ve akciğer dokusunda diyabetik gruba göre MDA ve NO seviyeleri düşükken SOD, GSH ve KAT seviyeleri doza bağlı olarak yüksek bulunmuştur (177). Biz de safranal uygulamasının oksidatif hasarı azalttığını flow sitometrik olarak gösterdik.

Sonuç olarak yetişkin dönemde dişi sıçanlara uygulanan doksorubisinin dişi sıçanların böbrek histolojisini olumsuz etkilediğini, safranal uygulamasının histopatolojik ve flow sitometrik düzeyde belli bir lde düzelme sağladığını söyleyebiliriz.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Doksorubisin'in yetişkin böbrek dokusundaki toksik etkilerine karşı safranalın koruyucu etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmamızın sonucunda,

- DOKS sıçan böbreklerinde:
 - Proksimal tübül epitelde düzensizliklere yol açmıştır.
 - İnterstisyel alanda vaküler konjesyonda artışa neden olmuştur.
 - Tübüler vakuolizasyon ve tübüler dilatasyonda belirgin artış gözlenmiştir.
 - Apoptoz indeksinde artışa neden olmuştur.
 - Flow sitometrik olarak nox2/gp91phox eksprese eden hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır.
- DOKS+SAF uygulanan sıçan böbreklerinde:
 - Renal tübül bazal membranında ve tübül epitelinde düzensizliklerde azalma gözlenmiştir.
 - Tübüler vakuolizasyon ve tübüler dilatasyonda belirgin azalma gözlenmiştir.
 - DOKS Grubuna göre doku apoptoz indeksinde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma meydana gelmiştir.
 - Flow sitometrik olarak nox2/gp91phox ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmıştır.

Doksorubisin kaynaklı böbrek hasarına karşı safranalın etkilerinin histopatolojik ve flow sitometrik olarak araştırıldığı bu çalışmanın bundan sonra yapılacak olan deneysel ve klinik çalışmalara yol gösterici olacağı kanaatindeyiz.

Çalışmamızın klinikte uygulanabilir olması için farklı süre ve farklı dozlarda safranal uygulaması ile yapılacak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılacak çalışmaların histopatolojik ve flow sitometrik yöntemlere ek olarak biyokimyasal ve elektron mikroskopik olarak da desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Arıncı K ve Elhan A. Anatomi. 4.baskı. Güneş Tıp Kitapevi: Ankara; 1995. 311-321
2. Koepfen BM and Stanton BA. Berne & Levy Physiology. 7.edition. Elsevier: Philadelphia; 2018. 581-602
3. Bailey M A and Unwin R J. Renal Physiology in Feehally J, Floege J, Tonelli M and Johnson R J. Comprehensive Clinical Nephrology 6.edition. Elsevier: Philadelphia;2019. 14-28.e1
4. Kintzel PE. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. Drug Safety 2001; 24:19-38.
5. Fillastre JP, Godin M. Drug-induced nephropathies. In Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, et al. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. New York: Oxford University Press;1998. 2645-2657.
6. Refaie MM, Amin EF, El-Tahawy N F and Abdelrahman AM. (2016). Possible protective effect of diacerein on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. Journal of Toxicology, 2016.
7. Park EJ, Kwon HK, Choi YM, Shin HJ and Choi S. (2012). Doxorubicin induces cytotoxicity through upregulation of perk–dependent ATF3. PloS one, 7(9), e44990.
8. El-Sheikh AA, Morsy MA, Mahmoud MM, Rifaai RA and Abdelrahman AM. (2012). Effect of coenzyme-Q10 on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. Advances in pharmacological sciences, 2012.
9. Yagmurca M, Erdogan H, Iraz M, Songur A, Ucar M and Fadillioglu E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. 2004. Clinica Chimica Acta, 348(1-2), 27-34.
10. Sadeghnia HR, Kamkar M, Assadpour E, Boroushaki MT, Ghorbani A. Protective effect of safranal, a constituent of *Crocus sativus*, on quinolinic acid-induced oxidative damage in rat hippocampus. Iran J Basic Med Sci; 2013; 16: 73-82.
11. Hosseinzadeh, H.R. Sadeghnia. Protective effect of safranal on pentylenetetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. Phytomedicine 14 (2007) 256–262.
12. Assimopoulou AN, Sinakos Z and Papageorgiou V. (2005). Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 19(11), 997-1000.

13. Kianbakht S, Hajiaghae R. Anti-hyperglycemic Effects of Saffron and its Active Constituents, Crocin and Safranal, in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Journal of Medicinal Plants* Volume 10, No. 39, 2011, 82-89.
14. Julio Escribano, Gonzalo-Luis Alonso, Miguel Coca-Prados, Jose-Antonio Fernhdez. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Letters* 100 (1996) 23-30.
15. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 12. edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA; 2012. 232-259
16. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. 6. edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2019. 358-390
17. Cochard LR. *Netter's Atlas of Human Embryology*. Updated Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2012. 157-184.
18. Moore KL, Persaud TVN and Torchia MG. *Before We Are Born*. 9. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2016. 161-188.
19. Park JM. Embryology of the genitourinary tract in Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW and Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. 11.edition. Elsevier:Philadelphia; 2016. 2823-2848.
20. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th edition. Elsevier, Philadelphia; 2016. 241-255
21. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR and Francis PH. *Larsen's Human Embryology*. 5. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2015. 375-387
22. Scott RP, Maezawa Y, Kreidberg J, Quaggin SE. Embryology of The Kidney In Skorecki K, Chertow GM, Marsden PA, Taal MW and Yu ASL. *Brenner and Rector's The Kidney*. 10. Edition. Elsevier: Philadelphia; 2016. P.2-41
23. Eşrefoğlu M. *Embriyoloji*. 1. Baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık; 2017. 126-130
24. Şeftalioğlu A. *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi*. 3. Baskı. Tıp ve Teknik Yayıncılık: Ankara; 1998. 328-342
25. Singh V. *Textbook of Clinical Embryology*. 1. edition. Elsevier; 2014. 233-245
26. Dudek RW. *Embryology*. 5. Edition. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 2011. 156-170
27. Drake RL, Vogl AW and Mitchell AWM. *Gray's Basic Anatomy*. 2. edition. Elsevier: Philadelphia; 2018. P. 207-263
28. Kelly CR and Landman J. *Netter Collection of Medical Illustrations: Urinary System*. 2. edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2012. 2-29

29. Chung KW and Chung HM. Gross Anatomy. 7. edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2012;213-243
30. VanPutte C, Regan J, Russo A. Seeley's Essentials of Anatomy & Physiology. 9. edition. McGraw-Hill Education: New York; 2016. 500-505.
31. Rizzo DC. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 4. Edition. Cengage Learning: Boston; 2016. 436-437.
32. Standring S. Gray's Anatomy-The Anatomical Basis of Clinical Practice. 41. edition. 2016;1237-1254
33. Dudek RW, Louis TM. High-yield Gross Anatomy. 5. edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2015. 138-156
34. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2014. 290-301
35. Patton KT and Thibodeau GA. Anthony's Textbook of Anatomy and Physiology. 20. edition. Mosby, Elsevier: Missouri; 2013. 970-1002
36. MacLennan GT. Hinman's Atlas of Urosurgical Anatomy. 2. editon. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2012. 151-210
37. Martini FH, Timmons MJ and Tallitsch RB. Human Anatomy. 8.edition. Pearson Education: USA; 2017. 695-714
38. Scanlon VC and Sanders T. Essentials of Anatomy and Physiology. 5. edition. F. A. Davis Company: Philadelphia; 2007. 417-438
39. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, Poe B, WiseJA, Womble M, Young KA. Anatomy and Physiology. OpenStax Rice University: Houston; 2017. 1201-1246
40. Gartner LP, Hiatt JL. Cell Biology and Histology. 7. Edition., Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore; 2015. 309-327
41. Pawlina W. Histology: A Text and Atlas. 7. edition. Wolters Kluwer: Philadelphia; 2016. 698-728
42. Dudek RW. High-Yield Histopathology. 2. edition. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 2011. 196-222.
43. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas.14. Edition. McGraw-Hill Education: USA; 2013. 393-412
44. Mishra S and Vasudeva N. Inderbir Singh's Textbook of Human Histology with Colour Atlas and Practical Guide. 7. edition. Jaypee Brothers Medical Publishers: New Delhi; 2014. 303. 2014

45. Young B, Woodford P and O' Dowd G. Wheater's Functional Histology A Text and Colour Atlas.6 edition. Churchill Livingstone Elsevier: Philadelphia; 2014. 292-317
46. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji.2. baskı. İstanbul Medikal Yayıncılık: İstanbul; 2016. 205-220.
47. Gartner LP. Textbook of Histology. 4. edition. Elsevier: Philadelphia; 2017. 499-527
48. Ovalle WK and Nahirney PC. Netter's Essential Histology. 2. Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2013. 357-380
49. Kierszenbaum AL and Tres LL. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. 4. Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2016. 439-467
50. Hall JE. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13.Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2016. 371-387
51. Kayalı H. Özel histoloji. 2. Baskı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi: İstanbul; 1989. 199-21.
52. Ash R, Morton DA, Scott SA. Histology The Big Picture. McGraw-Hill Education: New York; 2013; 197-210.
53. Lowe JS and Anderson PG. Stevens And Lowe's Human Histology. 4. Edition. Elsevier: Philadelphia; 2015. 286-318.
54. Leeson TS, Leeson CR and Paparo AA. Text/ Atlas of Histology. W. B. Saunders Company: USA; 1988. 535-568
55. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. 11. Baskıdan çeviri. Çeviri Editörleri: Solakoğlu S, Aytekin Y. Nobel Tıp Kitabevi; İstanbul; 2009. 373-391
56. Stevens A and Lowe J. Human Histology. 2. edition. Mosby Times Mirror International Publishers: Spain; 1997. 275-308
57. Fawcett DW. Bloom and Fawcett a textbook of histology. 11. Edition. Chapman & Hall: New York; 1994. 755-786.
58. Malla S, Niraula NP, Singh B, Liou K and Sohng JK. (2010). Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. Microbiological Research, 165(5), 427-435.
59. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C. Adriamycin14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. BiotechnolBioeng1969; 11(6):1101-10.

60. Tripathi KD. 2013. Essentials of Medical Pharmacology. 7. edition. Jaypee Brothers Medical Publishers: New Delhi; 2013. 857-880
61. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 14. edition. McGraw-Hill Education: USA; 2018. 964-965
62. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York; 2005. 1355-1360.
63. Minotti G, Cavaliere AF, Mordente A, Rossi M, Schiavello R, Zamparelli R, Possati G, 1995. Secondary alcohol metabolites mediate iron delocalization in cytosolic fractions of myocardial biopsies exposed to anticancer anthracyclines. Novel linkage between anthracycline metabolism and iron-induced cardiotoxicity. *J. Clin. Invest.* 95, 1595–1605.
64. Momparler RL, Karon M, Siegel SE and Avila F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, 36(8), 2891-2895.
65. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. (2010). "DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs". *Chemistry & Biology*. **17**(5): 421–33.
66. Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Kimura KI, Phillips DR and Cutts SM. (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochemical Pharmacology*, 83(12), 1602-1612.
67. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.
68. Gewirtz DA. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727–741
69. Myers C. The role of iron in doxorubicin-induced cardiomyopathy, *Semin. Oncol.* 25 (1998) 10–14.
70. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, *Pharmacogenet. Genomics* 21 (2011) 440–446.
71. Kawase M, Watanabe M, Kondo T, Yabu T, Taguchi Y, Umehara H and Okazaki T. (2002). Increase of ceramide in adriamycin-induced HL-60 cell apoptosis:

detection by a novel anti-ceramide antibody. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1584(2-3), 104-114.

72. Yang CJB, Yang YL, He SH, Miao DS, He L, Bi ZG. Exogenous cell-permeable C6 ceramide sensitizes multiple cancer cell lines to Doxorubicin-induced apoptosis by promoting AMPK activation and mTORC1 inhibition, *Oncogene* 29 (2010) 6557–6568.

73. Whalen K. Lippincot's Illustrated Reviews: Pharmacology. 6. Edition. Wolters Kluwer: Philadelphia; 2015. 587-618

74. Speth PAJ, Van Hoesel, QGCM and Haanen C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical pharmacokinetics*, 15(1), 15-31.

75. Doxorubicin injection package insert. Rockford, IL: Mylan Institutional LLC; 2016 July.

76. Rose BD editor. Doxorubicin: Drug Information. Waltham, Massachusetts: UpToDate®; accessed 31 August 2005.

77. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık: Ankara; 2012. S 363-375.

78. Bolis FM, Holcenberg JS, Poplack DG. General principles of chemotherapy in Pizzo PA, Poplack DG (eds). *Principle and Practice Pediatric Oncology*. JB. Lippincott Company, 1989: 186-189.

79. American Society of Health System Pharmacists; AHFS Drug Information 2009. Bethesda MD 2009: 1049-1051.

80. Vargel İ, Erdem A, Ertoy D, Pınar A, Erk Y, Altundağ MK, Güllü İ. Effects of growth factors on doxorubicin-induced skin necrosis: documentation of histomorphological alterations and early treatment by GM-CSF and G-CSF. *Ann Plast Surg* 2002; 49: 646-653.

81. Ritter JM, Lewis LD, Mant TGK and Ferro A. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 5. edition. Hodder Arnold: London; 2008. 367-380

82. Ener RA, Meglathery SB, Styler M. Extravasation of systemic hematooncological therapies. *Annals of Oncology*. 2004; 15: 858-862.

83. Hrdina R, Gersl V, Klimtová I, Simůnek T, Machácková J, Adamcová M. 2000. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Acta Medica* 43, 75–82.

84. Outomuro D, Grana DR, Azzato F, Milei J. Adriamycine–induced myocardial toxicity: New solutions for an old problem? *Int J Cardiol* 2007; 12: 117: 6-15.

85. Willis MS, Parry TL, Brown DI, Mota RI, Huang W, Beak JY, Sola M, Zhou C, Hicks ST, Caughey MC, D'Agostino RB Jr, Jordan J, Hundley WG, Jensen BC. Doxorubicin Exposure Causes Subacute Cardiac Atrophy Dependent on the Striated Muscle-Specific Ubiquitin Ligase MuRF1. *Circ Heart Fail*. 2019 Mar;12(3):e005234. doi: 10.1161
86. Menna, P, Salvatorelli E. (2017). Primary prevention strategies for anthracycline cardiotoxicity: a brief overview. *Chemotherapy*, 62(3), 159-168.
87. Lebrecht D, Setzer B, Rohrbach R, Walker U. Mitochondrial DNA and its respiratory chain products are defective in doxorubicin nephrosis. *Nephrol. Dial. Transplant*, 2004, 19, 329-336.
88. Tarantilis PA, Polissiou M. Isolation and identification of the aroma components from saffron (*Crocus sativus* L.). *J Agric Food Chem* 1997; 45:459–462.
89. Rezaee R, Hosseinzadeh H. Safranal: From an Aromatic Natural Product to a Rewarding Pharmacological Agent. *Iran J Basic Med Sci*; 2013; 16: 12-26.
90. Giaccio M. Crocetin from saffron: an active component of an ancient spice. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004; 44:155–172.
91. Kuhn R, Winterstein G. Picrocrocin, the terpene glucoside of saffron and the biogenesis of the carotenoid carboxylic acid. *Naturwissenschaften* 1933; 21: 527.
92. Hosseinzadeh H, Khosravan V. Anticonvulsant effects of aqueous and ethanolic extracts of *Crocus sativus* L. Stigmas in mice. *Arch Irn Med* 2002; 5:44-447.
93. Hosseinzadeh H, Karimi G, Niapoor M. Antidepressant effects of *Crocus sativus* stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. *Acta Horti* 2004; 650:435–445.
94. Hosseinzadeh H, Jahanian Z. Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res* 2010; 24:726-730.
95. Pathan SA, Zaidi SMA, Jain GK, Vohora D, Ahmad FJ, Khar RK. Anticonvulsant evaluation of safranal in pentylenetetrazole-induced status epilepticus in mice. *Int J Essential Oil Therapeutics* 2009; 3:106-108
96. Kianbakht S, Mozaffari K. Effects of saffron and its active constituents, crocin and safranal, on prevention of indomethacin induced gastric ulcers in diabetic and nondiabetic rats. *J Med Plan* 2009; 5:30-38.
97. Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez, JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1996; 100:23–30.

98. Hosseinzadeh H, Ghenaati J. Evaluation of the antitussive effect of stigma and petals of saffron (*Crocus sativus*) and its components, safranal and crocin in guinea pigs. *Fitoterapia* 2006; 77:446–448.
99. Nemati H, Boskabady MH, Ahmadzadeh Vostakolaei H. Stimulatory effect of *Crocus sativus* (saffron) on β_2 -adrenoceptors of guinea pig tracheal chains. *Phytomedicine* 2008; 15:1038–1045.
100. Boroushaki MT, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Iran J Med Sci* 2009; 34:285-288.
101. Boroushaki MT, Mofidpour H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal against hexachlorobutadiene-induced nephrotoxicity in rat. *Iran J Med Sci* 2007; 32:173-176.
102. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H, Javadpour Y. Hypotensive effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and its constituents, safranal and crocin, in normotensive and hypertensive rats. *Phytother Res* 2010; 24:990–994.
103. Bharti S, Golechha M, Kumari S, Siddiqui KM, Arya DS. Akt/GSK-3 β /eNOS phosphorylation arbitrates safranal-induced myocardial protection against ischemia–reperfusion injury in rats. *Eur J Nutr* 2011; DOI 10.1007/s00394-011-0251-y.
104. Pintado C, Miguel A, Acevedo O, Nozal L, Novella JL, Rotger R. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. *Food Control* 2011; 22:638-642.
105. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI (1997): Apoptosis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 21: 88-101. Robbins Pathology Chapter 1; P 3-42
106. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
107. Schneider AS, Szanto PA. *BRS Pathology*. 5.edition. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore; 2014. 1-12
108. Kumar V, Abbas AK and Fausto N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7.Edition. Elsevier Saunders: Philadelphia; 2005. P 3-46
109. Kemp WL, Burns DK, Brown TG. *Pathology The Big Picture*. Mc Graw-Hill Education: USA; 2008. P 1-12
110. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000. 301:5-17.
111. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell*. 2000; 104:325-328.
112. Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27:6194-6206.

113. Thornberry NA, Laxebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316.
114. Elmore S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 35(4): 495–516.
115. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626-629.
116. Guicciardi ME, Gores, Gregory J. Life and death by death receptors *FASEB J*. 2009; 23:1625-1637.
117. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 45:528-537.
118. White MK, Cinti C. A morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2004;285:105–11.
119. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980;284:555–6.
120. Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. Apoptotic detection methods—from morphology to gene. *Prog Histochem Cytochem* 2003;38:275–339.
121. Gurtu V, Kain SR, Zhang G. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 1997;251:98–102.
122. Hofmann WK, de Vos S, Tsukasaki K, Wachsmann W, Pinkus GS, Said JW, Koeffler HP. Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma detected by oligonucleotide microarray. *Blood* 2001;98:787–94.
123. Bossy-Wetzell E, Green DR. Detection of apoptosis by Annexin V labeling. *Methods Enzymol* 2000;322:15–18.
124. Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 1999;35:181–95.
125. Burton GJ. 2009. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *Journal of Anatomy*. 215(1), 27–35
126. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999.
127. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.

128. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging* 2018; 13: 757–772
129. Bast A, Haenen G, Goelmen JA. 1991. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med*. 91(3 Suppl 3): 2-13.
130. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull*. 1993; 49:481–93.
131. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Bio Med* 2000; 29: 222–230.
132. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003;552 (pt 2):335–344.
133. Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*. 2007;2(2):219–236.
134. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12:1161-1208.
135. Henzler T, Steudle E. Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *J Exp Bot* 2000; 51:2053–2066.
136. Bedard K., Krause KH. The NOX family of ROS- generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2007; 87: 245–313.
137. Salisbury D, Bronas U. Reactive oxygen and nitrogen species: impact on endothelial dysfunction. *Nurs Res*. 2015;64(1):53–66.
138. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19(9):1807–1819.
139. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem*. 2015;30(1):11–26.
140. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, pp. 1147–1150, 2007.
141. Rao RS, Moller IM. Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics* 2011; 11:4166-4173
142. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *Faseb J* 2003;17:1195-214

143. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 87, 315-424.
144. André CM, Larondelle Y, Evers D. Dietary antioxidants and oxidative stress from a human and plant perspective: A review. *Curr Nutr Food Sci*. 2010; 6:2–12.
145. Degl'Innocenti D, Ramazzotti M, Sarchielli E, Monti D, Chevanne M, Vannelli GB and Barletta E. (2019). Oxadiazon affects the expression and activity of aldehyde dehydrogenase and acylphosphatase in human striatal precursor cells: A possible role in neurotoxicity. *Toxicology*, 411, 110-121.
146. Li H, Gao A, Feng D, Wang Y, Zhang L, Cui Y, ... and Chen G. (2014). Evaluation of the protective potential of brain microvascular endothelial cell autophagy on blood–brain barrier integrity during experimental cerebral ischemia–reperfusion injury. *Translational stroke research*, 5(5), 618-626.
147. Singh A, Yashavardhan MH, Kalita B, Ranjan R, Bajaj S, Prakash H and Gupta ML. (2017). Podophyllotoxin and rutin modulates ionizing radiation-induced oxidative stress and apoptotic cell death in mice bone marrow and spleen. *Frontiers in immunology*, 8, 183.
148. Schulman A, Chaimowitz M, Choudhury M, Eshghi M and Konno S. (2016). Antioxidant and renoprotective effects of mushroom extract: implication in prevention of nephrolithiasis. *Journal of clinical medicine research*, 8(12), 908.
149. Shati AA and Alfaifi MY. (2019). Trans-resveratrol Inhibits Tau Phosphorylation in the Brains of Control and Cadmium Chloride-Treated Rats by Activating PP2A and PI3K/Akt Induced-Inhibition of GSK3 β . *Neurochemical research*, 44(2), 357-373.
150. Liu W, Liou SS, Hong TY and Liu IM. (2017). Protective effects of hesperidin (citrus flavonone) on high glucose induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for diabetic retinopathy. *Nutrients*, 9(12), 1312.
151. Yi DG, Hong S and Huh WK. (2018). Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1. *PloS one*, 13(6), e0198619.
152. Park J, Kwon OS, Cho SY, Paick JS, Kim SW. Chronic administration of atorvastatin could partially ameliorate erectile function in streptozotocin-induced diabetic rats. *PLoS One*. 2017 Feb 28;12(2):e0172751. doi: 10.1371/journal.pone.0172751. eCollection 2017.

153. Babior BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 1999, 93:1464-1476.
154. Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG and Segal AW. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353: 668–70
155. Parkos CA, Allen RA, Cochrane CG, Jesaitis AJ. (1987). Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *J Clin Invest* 80:732–42.
156. Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comaklı S, Caglayan C. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 2018, p 1-10.
157. Karafakioğlu YS, Bozkurt MF, Hazman Ö, Fıdan AF. Efficacy of safranal to cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochem J.* 2017, 20; 474 (7):1195-1203.
158. Bancroft JD, Cook HC. *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. Longman group: UK; 1994. 35-68.
159. Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık: Ankara; 2001. Bölüm 1 1-49.
160. Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, Ucar M, Irmak MK. "Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine." *Urol Res* (2006) 34: 41–46.
161. Guo SX, Zhou HL, Huang CL, You CG, Fang Q, Wu P, Wang XG, Han CM. Astaxanthin Attenuates Early Acute Kidney Injury Following Severe Burns in Rats by Ameliorating Oxidative Stress and Mitochondrial-Related Apoptosis. *Mar. Drugs* 2015, 13, 2105-2123.
162. Cortes-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7:56–60.
163. Weiss RB. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol.* 1992; 19:670– 686.
164. Doroshoow JH. Anthracyclines and anthracenediones. In BA Chabner, DL Longo (eds), *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practic*. Lippincott, Philadelphia: Williams and Wilkins, 2006: 416.
165. Gilman A, Rall T, Nies A, Taylor P. (ed.). *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Perg. Press, 1990, 8th ed. 1243.

166. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986; 83:4514–4518.
167. Wang Y, Wang Y, Tay Y, Harris D. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.*, 2000, 58, 1797-1804.
168. Davies K, Doroshow J. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria: anthracycline radical formation by NADPH dehydrogenous. *J. Biol. Chem*, 1986, 261, 3060-3067.
169. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.*, 1986, 29, 502—510.
170. El-Sayed ESM, Mansour AM and El-Sawy WS. (2017). Protective effect of proanthocyanidins against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 31(11), e21965.
171. Usta Y, Ismailoglu UB, Bakkaloglu A, Orhan D, Besbas N, Sahin-Erdemli I, Ozen S. Effects of pentoxifylline in adriamycin-induced renal disease in rats. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 840-843.
172. Hassan MH, Ghobara M an Abd-Allah GM. (2014). Modulator Effects of Meloxicam against Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 28(8), 337-346.
173. Yagmurca M, Yasar Z and Bas O. (2015). Effects of quercetin on kidney injury induced by doxorubicin. *Bratislavske Lekarske Listy*, 116(8), 486-489.
174. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Hasan SK and Sultana S. (2013). Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 23(5), 337-345.
156. Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comaklı S and Caglayan C. (2018). Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(5), 448-457.
175. Su Z, Ye J, Qin Z and Ding X. (2015). Protective effects of madecassoside against Doxorubicin induced nephrotoxicity in vivo and in vitro. *Scientific reports*, 5, 18314.
176. Hazman Ö and Bozkurt MF. (2015). Anti-inflammatory and antioxidative activities of safranal in the reduction of renal dysfunction and damage that occur in diabetic nephropathy. *Inflammation*, 38(4), 1537-1545.

177. Samarghandian S, Afshari R and Sadati A. (2014). Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats. *The Scientific World Journal*, 2014. 251378.

