

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN
BÖBREK VE MESANE HASARINA KARŞI KLOORJENİK ASİT'İN
ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN

TRABZON-2023

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİD İLE OLUŞTURULAN
BÖBREK VE MESANE HASARINA KARŞI KLOORJENİK ASİT'İN
ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN

Tez Danışmanı Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU

TRABZON-2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecimin her aşamasında tecrübesiyle daima yol gösteren, ilgi ve alakasını her zaman hissettiğim kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU'na, uzmanlık eğitimim boyunca geniş bilgi ve deneyimiyle birlikte anlayışını bizlerden esirgemeyen Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, çok değerli Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalından değerli hocalarım Prof. Dr. Yüksel Aliyazıcıoğlu ve Doç. Dr. Selim Demir'e, tez deneyimde büyük katkıları olan çalışma arkadaşlarıma teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, emek ve özverileriyle bugünlere gelmeme vesile olan annem Asiye YILMAZ, babam Aydın YILMAZ'a ve kardeşlerime, tez çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen eşim Dr. Oğuzhan DOĞAN ile bu süreci benimle paylaşan kızım Eflin Sare DOĞAN'a teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN

ÖZET

Sıçanlarda Siklofosfamid ile Oluşturulan Böbrek ve Mesane Hasarına Karşı

Klorojenik Asit'in Etkileri

Amaç: Bu çalışmada; sıçanlarda siklofosfamid (CP) uygulanması ile oluşan böbrek ve mesane hasarına karşı klorojenik asit (CGA)'ın profilaktik etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

Metot: Araştırmada kullanılan 18 adet Sprague Dawley ırkı erkek sıçan rastgele 3 eşit gruba (kontrol (K), CP ve CP+CGA) ayrıldı. Tüm denekler; deneyin 1. günü ve sakrifikasyonun uygulandığı 8. gün tartıldı. Kontrol grubuna; deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük oral 2 cc PBS ve 7. gün tek doz intraperitoneal (i.p.) 2 cc SF uygulandı. CP grubuna deneyin 7. gününde 2 cc SF içinde 150 mg/kg tek doz i.p. CP uygulandı. CP+CGA grubuna deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük oral gavaj yoluyla 2 cc PBS içinde 100 mg/kg CGA ve 7.günde 2 cc SF içinde 150 mg/kg tek doz i.p. CP uygulandı. Böbrek ve mesane dokuları; ışık mikroskopik değerlendirme için hematoksilen ve eozin (H&E), periyodik asit-Schiff (PAS) ve TUNEL boyama yöntemi ile boyandı. Biyokimyasal olarak böbrek ve mesane dokularında; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), miyeloperoksidaz (MPO) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), total antioksidan durum (TAS), total oksidan durum (TOS) seviyeleri ve oksidatif stres indeksi (OSİ) belirlendi. Böbrek fonksiyon değerlendirmesi için serum BUN ve kreatinin ölçümü yapıldı.

Bulgular: Deneyin 8. gününde; en düşük böbrek, mesane ve vücut ağırlıklarının CP+CGA grubunda olduğu görüldü. Böbrek dokusunun H&E ile boyalı kesitlerinde; CP grubunda tübüller ve glomerüllerde dejenerasyon, ödem ve hemorajide belirgin bir artış mevcuttu. PAS ile boyanan kesitlerde, Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma-ayrılma, tübül bazal membranlarında düzensizlikler ve proksimal tübülde fırçamsı kenar kayıpları belirgindi. Mesane dokusunun H&E ile boyalı kesitlerinde; CP grubunda mukozada ödem, hemoraji, ülserasyon, inflamatuvar hücre artışı ve epitelde dökülme mevcuttu. PAS ile boyanan kesitlerde ise bunlara ilave olarak epitelde glukozaminoglikan (GAG) tabakasında bölgesel kayıp gözlemlendi.

Böbrek ve mesaneye ait tüm bu patolojik bulgular CP+CGA grubunda anlamlı olarak azalmıştı. Böbrek ve mesanede, apoptotik indeks CP grubunda en yüksekti. Biyokimyasal parametrelerde CP grubunun böbrek dokularında MDA, TOS, OSİ, MPO ve TNF- α değerlerinde artma, ancak TAS, GSH ve SOD değerlerinde ise azalma mevcuttu. Serum BUN ve kreatinin seviyeleri de CP grubunda yüksekti. CP+CGA grubunda; CP grubunda artmış olan tüm parametrelerin azaldığı; GSH'ın ise arttığı görüldü. Mesane dokusunda ise CP grubunda MPO, MDA, TNF- α ve OSİ değerlerinde artış gözlenirken, SOD seviyesinde düşüş gözlemlendi. CP+CGA grubunda bu değerler normale yaklaşmıştı.

Sonuçlar: Elde ettiğimiz bulgulara göre CP'nin; böbrek ve mesanede yapısal ve biyokimyasal olarak tespit edilebilen hasara neden olduğu ve oral yolla profilaktik CGA kullanımının bu hasarı önlediği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Böbrek, klorojenik asit, mesane, oksidatif stres, siklofosfamid

SUMMARY

Effects of Chlorogenic Acid against Cyclophosphamide-Induced Kidney and Bladder Damage in Rats

Purpose: In this study; it was aimed to investigate the prophylactic effects of chlorogenic acid (CGA) against kidney and bladder damage caused by cyclophosphamide (CP) administration in rats, histologically and biochemically.

Method: 18 Sprague Dawley male rats used in the study were randomly divided into 3 equal groups (control (C), CP and CP+CGA). All subjects; were weighed on the 1st day of the experiment and the 8th day of sacrifice. To the control group; starting from the 1st day of the experiment, 2 cc of PBS was administered orally daily for 7 days, and a single dose of 2 cc of SF was administered intraperitoneally (i.p.) on the 7th day. A single dose of 150 mg/kg i.p. CP in 2 cc SF was administered to the CP group on the 7th day of the experiment. The CP+CGA group was administered 100 mg/kg CGA in 2 cc PBS via daily oral gavage for 7 days starting from the 1st day of the experiment, and a single dose of 150 mg/kg i.p. CP in 2 cc SF was administered on the 7th day. For light microscopic evaluation, kidney and bladder tissues were stained with hematoxylin and eosin (H&E), periodic acid-Schiff (PAS) and TUNEL staining methods. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) levels and oxidative stress index (OSI) were biochemically determined in kidney and bladder tissues. Serum BUN and creatinine also were measured for renal function evaluation.

Results: On the 8th day of the experiment; the lowest kidney, bladder and body weights were observed in the CP+CGA group. In H&E stained sections of kidney tissue; there was a significant increase in degeneration, edema and hemorrhage in the tubules and glomeruli in the CP group. In the sections stained with PAS, thickening-separation of the parietal leaf of Bowman's capsule, irregularities in the tubule basement membranes, and loss of brush borders in the proximal tubule were evident. In H&E stained sections of bladder tissue; in the CP group, there were

edema, hemorrhage, ulceration, increased inflammatory cells and epithelial shedding in the mucosa. In addition, regional loss in the glycosaminoglycan (GAG) layer in the epithelium was observed in the sections stained with PAS. All these pathological findings of the kidney and bladder were significantly reduced in the CP+CGA group. The apoptotic index in the kidney and bladder was highest in the CP group. In biochemical parameters, there was an increase in MDA, TOS, OSI, MPO and TNF- α values in the kidney tissues of the CP group, but a decrease in TAS, GSH and SOD values. Serum BUN and creatinine levels were also high in the CP group. In the CP+CGA group, while GSH decreased, all parameters that increased in the CP group were observed to decrease. In the bladder tissue, an increase was observed in MPO, MDA, TNF- α and OSI values in the CP group, while a decrease was observed in the SOD level. These values in the CP+CGA group were close to normal.

Conclusion: According to our findings, it may be said that CP causes structural and biochemically detectable damage in the kidney and bladder, and oral prophylactic CGA use may prevent this damage.

Key Words: Kidney, chlorogenic acid, bladder, oxidative stress, cyclophosphamide

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek ve Mesane.....	3
2.1.1. Böbrek Anatomisi	3
2.1.2. Böbrek Histolojisi	5
2.1.3.Böbrek Embriyolojisi	10
2.1.4. Mesane Anatomisi.....	13
2.1.5. Mesane Histolojisi.....	13
2.1.6. Mesane Embriyolojisi	14
2.2. Oksidatif Stres.....	15
2.3. Apoptoz.....	20
2.4. Siklofosfamid	21
2.4.1. Genel Bilgiler	21
2.4.2. Emilim, Metabolizma, Atılım	22
2.4.3. Tıpta Kullanım Endikasyonları	23

2.4.4. Yan Etkileri	24
2.5. Klorojenik Asit.....	25
3. MATERYAL ve METOD.....	29
3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek	29
3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı	29
3.3. Histolojik İşlemler.....	31
3.3.1. Formalin Solüsyonunun Hazırlanışı.....	31
3.3.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması.....	31
3.3.3 Işık Mikroskopik İnceleme için Uygulanan Boyama Yöntemleri	33
3.4. Böbrek ve Mesane Dokusunun Biyokimyasal Değerlendirmesi	37
3.5. İstatiksel Analiz.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Deneklerin Vücut, Böbrek ve Mesane Ağırlıkları	43
4.2. Histolojik Bulgular.....	44
4.2.1. H&E Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgu ve Skorlar	44
4.2.2. PAS Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgu ve Skorlar	53
4.2.3. TUNEL Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgular.....	57
4.3. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları	61
4.3.1. Serum Biyokimyası.....	61
4.3.2. Doku Biyokimyası	62
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	78
7. KAYNAKLAR	80

KISALTMALAR DİZİNİ

μL	: Mikrolitre
μmol	: Mikromol
3-CQA	: 3-Kafeoilkinik asit
4-OHCP	: 4-hidroksisiklofosfamid
ACE	: Anjiotensin konverting enzim
ADH	: Antidiüretik hormon
AI	: Apoptotik indeks
AQP	: Aquaporin
APAF	: Apoptotic protease activating factor
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
BAX	: Bcl-2 ilişkili X protein
BMP	: Kemik morfogenetik proteini
CASP3	: Kaspaz 3
CAT	: Katalaz
CGA	: Klorojenik asit
Cl	: Klorür
CP	: Siklofosfamid
Cu-Zn-SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
CYP	: Sitokrom
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
GDNF	: Glial cell derived neurotrophic factor
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GRX	: Glutasyon redüktaz
gr	: Gram
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₃PO₄	: Fosforik asit

H&E	: Hematoksilen eozin
HGF	: Hepatosit growth factor
HOCl	: Hipokloröz asit
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
i.p.	: İntraperitoneal
JAK-STAT	: Janus kinase-Signal transducers and activators of transcription
JG	: Jukstaglomerüler
K	: Kontrol
Kaspaz	: Sistein aspartik proteaz
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MAP1LC3B	: Mikrotübül ilişkili protein 1A/1B hafif zincir-3B
ml	: Mililitre
MDA	: Malondialdehit
MET	: Mesenchymal epithelial transition
Mn-SOD	: Manganez süperoksit dismutaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
MPO- H₂O₂-Cl	: Miyeloperoksidaz hidrojen peroksit klorid
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen
NF-κB	: Nükleer faktör kappa b
Nrf2/ARE	: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element
O₂	: Oksijen
OH⁻	: Hidroksil
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻	: Süperoksit
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PARP	: Poli-ADP riboz polimeraz
PAS	: Periyodik asit Schiff
PAX	: Paired box gen
PBS	: Phosphate buffered saline

pg	: Pikogram
RET	: Rearranged during transfection
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksid dismutaz
TAS	: Total antioksidan seviyesi
TBA	: Tiobarbitürik asit
TLR	: Toll like reseptör
TOS	: Total oksidan seviyesi
TNF-α	: Tümör nekroz factor alfa
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
WT	: Wilms tümör süpresör
WNT	: Wingless/int1

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: Enzimatik savunma sistemleri	19
Tablo 2: CP kaynaklı mesane toksisitesi	25
Tablo 3: CGA'nın etkileri	28
Tablo 4: Doku takip cihazında standart doku takip prosedürü.....	32
Tablo 5: Boyama cihazında kullanılan H&E boyama prosedürü.....	33
Tablo 6: PAS boyama protokolü	34
Tablo 7: TUNEL boyama protokolü	36
Tablo 8: Deney gruplarına ait deneklerin günlere göre ağırlık değişimi	43
Tablo 9: Deneklerin böbrek ve mesane ağırlık verileri.....	44
Tablo 10: Böbrek dokularının histopatolojik skorları	45
Tablo 11: Mesane dokularının histopatolojik skorları.....	50
Tablo 12 Deney gruplarına ait böbrek ve mesane dokularındaki apoptotik indeks (%)	57
Tablo 13: Deney gruplarına ait serum BUN ve kreatinin değerleri	61
Tablo 14: Böbrek biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi	62
Tablo 15: Mesane biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Böbreğin longitudinal kesiti	4
Şekil 2: Glomerülün yapısı	7
Şekil 3: ROS türler arası geçiş dizisi	16
Şekil 4: CP metabolitleri	23
Şekil 5: CGA'nın kimyasal yapısı	26
Şekil 6: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği	38
Şekil 7: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği	39
Şekil 8: Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği	39
Şekil 9: GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği	40
Şekil 10: TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği	41
Şekil 11: MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği	41
Şekil 12: Deney gruplarına ait deneklerin günlere göre ağırlık değişimi (K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu)	43
Şekil 13: Deney gruplarına göre deneklerin böbrek ve mesane ağırlıkları	44
Şekil 14: Deney gruplarına ait böbrek dokularının histopatolojik hasar skorları	45
Şekil 15: Deney gruplarına ait mesane dokularının histopatolojik hasar skorları	50
Şekil 16: Böbrek ve mesane dokusunda apoptotik indeks (%)	57
Şekil 17: Grupların serum BUN ve kreatinin değerleri	61
Şekil 18: Böbrek biyokimyası sonuçları	63
Şekil 19: Mesane biyokimyası sonuçları	65

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1: Mesanenin histolojik yapısı (Kontrol grubuna ait kesitte tunika mukoza (değişici epitel, lamina propria), tunika muskularis, tunika seroza gösterilmektedir (H&E X 100)	14
Resim 2: Sıçanlara orogastrik gavaj ve intraperitoneal girişim uygulanması.....	30
Resim 3: Deneklere ait böbrek ve mesane dokularının çıkarılması.....	31
Resim 4: K grubuna ait böbrek kesiti. Böbrek cisimciği (mavi renkli altı uçlu yıldız), ve kapsül yapısı (mavi renkli ok) normal görünümde izlendi (H&E, X200).....	46
Resim 5: K grubuna ait böbrek kesiti. Böbrek cisimciği (mavi renkli altı uçlu yıldız), distal tübül (mavi renkli beş uçlu yıldız) ve proksimal tübül (mavi renkli dört uçlu yıldız) yapıları normal görünümde izlendi (H&E, X400).....	46
Resim 6: CP grubuna ait böbrek dokusu. Glomerüllerde dejenerasyon (altı uçlu yıldız), Bowman boşluğunda genişleme (üçgen) ve tübül epitelinde vakuolizasyon (yukarı ok), dökülme ve dejenerasyon (sola ok), cast formasyonu (beş uçlu yıldız) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) gözlemlendi (H&E, X200).	47
Resim 7: CP grubuna ait böbrek dokusu. Glomerüllerde dejenerasyon (altı uçlu yıldız), tübülde genişleme (beşgen) ve epitelinde dökülme ve dejenerasyon (sola ok), vakuolizasyon (yukarı ok), cast formasyonu (beş uçlu yıldız) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) gözlenmektedir (H&E, X400).....	47
Resim 8: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu. Tübül epitelinde dökülme ve dejenerasyon (sola ok), tübülde cast formasyonu (beş uçlu yıldız) azalmıştı. (H&E, X200).	48
Resim 9: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu. Siklofosfamid grubuna kıyasla tübül epitelinde dökülme ve dejenerasyon (sola ok), vakuolizasyon (yukarı ok) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) daha az izlendi (H&E, X400).....	48
Resim 10: K grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epitel (kırmızı sola ok) ve lamina propria (kırmızı dört uçlu yıldız) normal histolojik görünümüne sahipti (H&E, X100).....	51

Resim 11: CP grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epitelinde dökülme (kırmızı çentikli ok), lamina propriada yoğun hemoraji, inflamatuvar hücre artışı ve ödem (kırmızı beş uçlu yıldız) izlenmektedir (H&E, X100).	51
Resim 12: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epitelinde dökülme (kırmızı çentikli ok), lamina propriada ödem (kırmızı çift uçlu ok) ve hemoraji (kırmızı beş uçlu yıldız) izlenmektedir (H&E, X100).	52
Resim 13: K grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Tübül bazal membranları (turuncu çentikli ok), proksimal tübül fırçamsı kenarları (turuncu yukarı ok) ve Bowman kapsülü paryetal yaprağı (turuncu sağa ok) düzenli görünümde izlenmektedir (PAS, X400).	54
Resim 14: CP grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma-ayrılma (yeşil sağa ok) tübül bazal membranında düzensizlikler (yeşil yukarı ok) ve proksimal tübülde fırçamsı kenar kayıpları (yeşil çentikli ok) ve izlenmektedir (PAS, X400).	54
Resim 15: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Bowman kapsülü paryetal yaprağı (yeşil sağa ok) ve tübül bazal membranı (yeşil yukarı ok) CP grubuna kıyasla daha düzgün görünümdeydi (PAS, X400).	55
Resim 16: K grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epitel (kırmızı sola ok) ve lamina propria (kırmızı dört uçlu yıldız) normal histolojik görünüme sahipti (PAS, X200).	55
Resim 17: CP grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epitelinde dökülme, dejenerasyon ve yer yer GAG kaybı (kırmızı çentikli ok), lamina propriada yoğun ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre artışı (kırmızı dört uçlu yıldız) izlenmektedir (PAS, X200).	56
Resim 18: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epitelinde dökülme (kırmızı çentikli ok) ve dejenerasyon, lamina propriada ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre (kırmızı dört uçlu yıldız) görülmekle birlikte CP ye göre azalmıştı (PAS, X200).	56
Resim 19: K grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).	58
Resim 20: CP grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve artmış TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).	58

- Resim 21: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) (turuncu çentikli ok) hücreler ve CP grubuna göre azalmış TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), izlenmektedir (TUNEL, X400)..... 59
- Resim 22: K grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400). 59
- Resim 23: CP grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve artmış sayıda TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400)..... 60
- Resim 24: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve CP grubuna göre azalmış sayıda TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400)..... 60

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Siklofosfamid (CP); pediatrik ve erişkin malignitelerinde sıklıkla kullanılan, antitümör aktiviteye sahip alkilleyici ajanlardan biridir. CP'nin düşük dozlarda kullanımıyla oluşan immünsüpresif etkisi; romatoid artrit, sistemik lupus eritematosus gibi çeşitli otoimmün hastalıklarda kullanımına olanak sağlamıştır (1,2).

CP gibi kemoterapötik ilaçların asıl hedefi, hızla çoğalmakta olan malign hücreler olsa da; sağlıklı hücreler de bu toksik etkiden nasibini almaktadır (3). Bu sitotoksik etki; sıklıkla DNA'da ve proteinlerde alkilasyon ve çapraz bağlar oluşturan aktif metabolitlerin sayesinde gerçekleşir (4). CP, karaciğerdeki sitokrom P450 başta olmak üzere birçok mitokondriyal enzim sisteminde aktif metabolitler olan fosforamid hardalı ve akroleine dönüşür (2). Akrolein, hücrelerde ölüm reseptör yolunu tetikleyerek apoptoza ve reaktif oksijen radikallerinde artışla oksidatif hasar ve inflamasyona sebep olmaktadır (1). Akroleinin ürotoksik etkisi sonucu histopatolojik olarak; böbrek tübüllerinde dilatasyon ve hidropik dejenerasyon, tübül epitelinde nekroz, mesane epitelinde ülserasyon, kanama ve inflamasyonda artış gözlenebilir (5, 6). CP ve metaboliti akrolein; mesanede de mukozal hasara ve hemorajik sistite neden olabilir (7, 8). Üriner sistem ve özellikle böbrekler üzerindeki bu sitotoksik etkiler, serum üre ve kreatinin değerlerinde de artışa yol açabilir (6).

CP'nin çeşitli sistemler üzerine olan oksidatif stres kaynaklı olumsuz etkilerini azaltmak için sıklıkla meyve ve sebzelerde bulunan antioksidanlar denenmiştir. Klorojenik asit (CGA) de; yeşil kahve çekirdeği, yaban mersini, elma, domates, patlıcan gibi insan diyetinde yaygın olarak tüketilen sebze ve meyvelerde bolca bulunan bir antioksidandır (9). CGA, hidroksisinnamik asid ile kinik asitin esterleşmesiyle oluşan polifenollerden biridir (10). Yapılan çalışmalarda CGA'nın oksidan aktiviteyi azaltıcı, apoptozu ve inflamasyonu baskılayıcı özellikleri olduğu gösterilmiştir (11, 12)

İngilizce ve Türkçe literatürde, CP'nin indüklediği böbrek ve mesane hasarına karşı oral kullanılan CGA'nın etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya

rastlanamamıştır. CP'nin indüklediği böbrek ve mesane hasarına karşı parenteral yolla kullanımdan daha kolay ve non invaziv olan oral CGA kullanımının muhtemel olumlu etkilerinin ortaya konulmasının literatüre önemli katkılar sağlayacağına inanmaktayız.

Bu sebeple çalışmamızda; CP'nin böbrek ve mesanede oluşturduğu yıkıcı etkiye karşı güçlü antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik etkilere sahip CGA'nın oral kullanımının profilaktik etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarımızın; daha sonra bu konuda yapılacak deneysel ve klinik çalışmalar açısından temel teşkil etme potansiyeline sahip olduğunu düşünmekteyiz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek ve Mesane

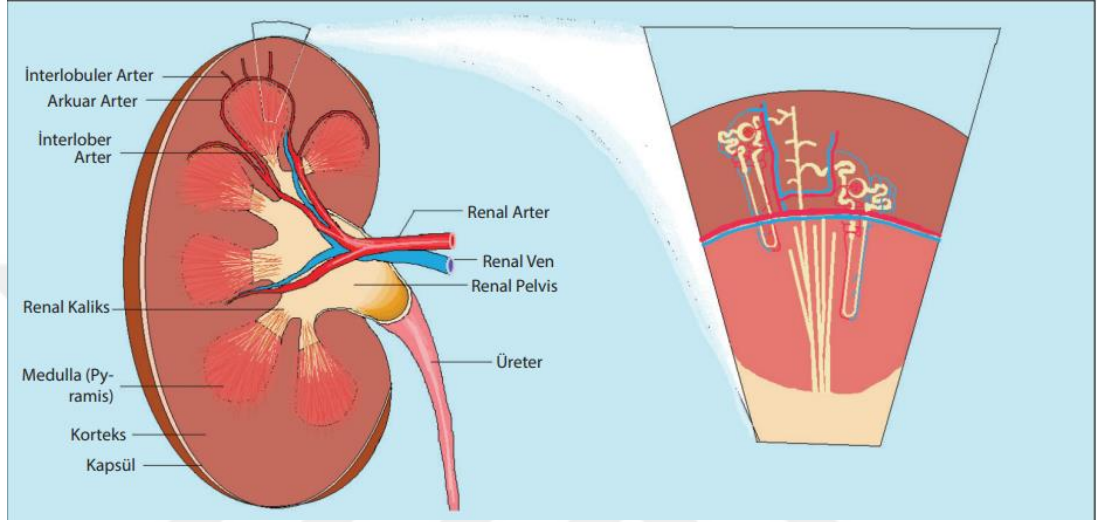
2.1.1. Böbrek Anatomisi

Böbrekler; peritonun arka boşluğunda, vertebral kolonun her iki yanında yer alan ve adipoz doku yapısındaki perirenal fasya ile çevrili olan organlardır. Böbrek, dıştan böbrek kapsülü ile sarılıdır. Perirenal fasya ile kapsül arasında gevşek bir bağ dokusu vardır (13).

Sol böbrek, T12 ve L3 vertebra seviyesinde bulunmaktadır ancak sağ böbrek, karaciğer sebebiyle sol böbreğe göre yaklaşık 2 cm aşağı yerleşimlidir. Yetişkinlerde her böbrek yaklaşık olarak 11 cm uzunluğunda, 6 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığındadır. Ortalama böbrek ağırlığı kadınlarda 135 gr, erkeklerde ise 150 gr'dır. Sağ böbrek üst komşuluğunda karaciğer, sol böbrek üst komşuluğunda ise dalak bulunur. Böbreğin iç bükey medial tarafında; arter, lenfatik ve sinirlerin girdiği ven ve üreterin çıktığı renal hilum bulunur (14, 15).

Sağ böbreğin üst polünün küçük bir alanı sağ suprarenal bez ile, geniş bir alanı ise periton ile ayrılmış karaciğerin sağ lobu ile ilişkilidir. Medialden duodenumun retroperitoneal inen kısmı ile direkt ilişkilidir. Sağ böbreğin alt ön yüzeyi; lateralden retroperitoneal sağ kolon flexurası ile, medialden ise intraperitoneal (i.p.) ince bağırsak ile temas halindedir (14). Sol böbreğin üst polünün küçük bir alanı sol suprarenal bez ile ilişkilidir. Anterior yüzeyin lateral yarısı, periton ile ayrılmış dalak ile ilişkilidir. Sol böbrek, merkezde retroperitoneal pankreas ve dalak damarları ile direkt temas halindedir. Bunun üzerinde suprarenal bez ve dalak arasında üçgen şeklinde bir alan bulunur. Bu üçgen bölge periton ile ayrılmış mide ile temas halindedir. Sol böbreğin lateral kenarı, retroperitoneal sol kolik fleksura ve inen kolon ile direkt temas halindedir. Medial kenarın büyük bir kısmı, i.p. jejunum lupları ile ilişkilidir.

Sağ ve sol böbrekler birbirine benzer yapıdadır ve posteromedial yüzeyleri periton olmadan adipoz dokuya gömülüdür. Böbreklerin konum olarak üst tarafında diyafram, medial ve lateral tarafında ise psoas majör, quadratus lumborum, transversus abdominis kası, subkostal damarlar, iliohipogastrik ve ilioinguinal sinirler bulunur (14, 16, 17).



Şekil 1: Böbreğin longitudinal kesiti (15)

Böbrek; hem renk hem fonksiyon bakımından makroskopik olarak içte medulla ve dışta korteks olmak üzere iki kısımda incelenir (Şekil 1). Böbrek medullası renk olarak daha soluktur. Medullada her böbrekte ortalama 10-20 tane olan toplayıcı kanallar ve Henle kulpunu içeren, tabanı kortekse bakan böbrek piramitleri bulunur. Toplayıcı kanallar piramitlerin uçlarından renal pelvise açılır. Renal kolonlar, korteksten renal piramitlerin arasına uzanır. Her böbreğin piramit sayısı kadar lobu vardır ve her lob, bir grup toplayıcı tübül ve nefronlardan oluşur. Her bir nefron; glomerüler kapiller yumağı çevreleyen Bowman kapsülü, proksimal tübül, Henle kulpu ve toplayıcı kanallara boşalan distal tübülden oluşur. İdrar oluşumu kortekste başlar, tübüller ve toplayıcı kanallardan Bellini papiller kanalına akar. Ardından önce minör, sonra majör kalikslere ve majör kalikslerin birleşerek oluşturduğu üreter üst ucunun bir uzantısı olan renal pelvise ve oradan üretere akar. Son olarak da üreterden mesaneye boşalır (18).

2.1.2. Böbrek Histolojisi

Böbrekler; fasülye şekline sahip ve bağ dokusu yapısında kapsül ile sarılı vasküler organlardır. Kapsül, dışta düzenli dizilmiş kollajen liflerden ve aralarına serpiştirilmiş fibroblastlardan oluşur. İç tabakada ise kasılmaya yardımcı miyofibroblastlar bulunur. Böylece kapsül gerilmeye dirençli olup böbrek fonksiyonundaki değişikliklere böbreğin uyum göstermesini sağlar.

Böbreğin medialinde bulunan ve topladığı idrarı üretere ileten renal pelvis, böbrek içinde kaliks majör adı verilen 2-3 parçaya ayrılır. Kaliks majör de birkaç küçük kaliks minörden oluşur. Böbrek parankimi, dışta kapsüle yakın kısımda korteks ve içte medulla olmak üzere iki kısımda incelenir (19-21). Medulla; nefronların düz tübülleri, toplayıcı tübüllerin devamı ve özel bir kapiller ağ olan vaza rektanin eşlik etmesiyle oluşur. İnsan böbreğinde sıklıkla 8-12 arasında; en fazla ise 18 adet piramit görülebilir, bu piramidlerin uç kısımları papilla olarak adlandırılır ve papillalar minör kalikse (calices renalis minores) açılır. Piramidlerin lateralinden korteks dokusu medullaya uzanarak Bertini sütunlarını meydana getirir (19). Renal korteks, piramidlerin tabanı ile dış yüzey arasında kalan ve piramidler arasında uzanan doku parçalarını içerir. Medüller ışınlar, kortekste ki nefronları boşaltan Henle kulpları ve toplayıcı kanalların paralel gruplarından oluşur. Medüller ışınların oluşturduğu renal piramidler ve üzerindeki kortikal parankim birlikte bir böbrek lobunu oluşturur (20, 21).

i) Nefron

Nefron; böbreğin fonksiyon olarak sekretuar bez yapılarına karşılık gelen ve idrar üretiminden sorumlu olan yapısal ve fonksiyonel birimdir. Nefron; böbrek cisimciği ve tübül sistemden oluşur (19).

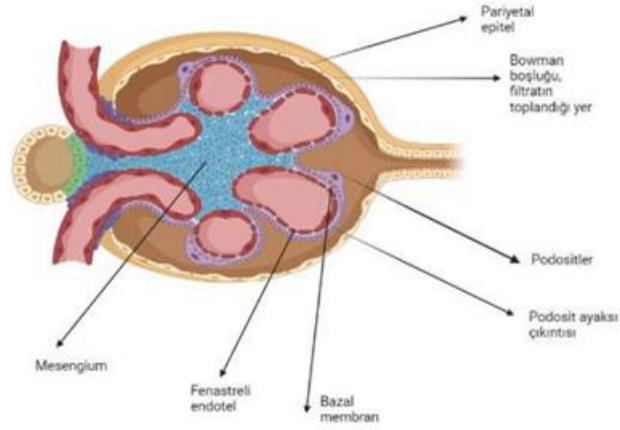
ii) Böbrek Cisimciği

Böbrek cisimciği, glomerüler kapiller ağı ve onu saran kupa benzeri çift katlı epitelden oluşan Bowman kapsülünü içerir (19, 20). Kapsülün iki tabakası arasında, böbrek tübül lümeni ile devam eden idrar boşluğu bulunur. Bowman kapsülü,

glomerüler kapillerden süzülen kanın ultrafiltratı oluşturmaya başladığı ilk kısımdır. Afferent ve efferent arteriyollerin Bowman kapsülünün paryetal tabakasından giriş ve çıkış yaptıkları kısma damar kutbu, bu bölgenin karşı kısmına ise idrar kutbu denilmektedir. Afferent arteriyol; vasküler kutuptan girerek anastomoz yapan kılcal damar ağını (glomerül) oluştururken nispeten daha küçük çaptaki efferent arteriyol ile de drenaj sağlanır (21, 23) (Şekil 2).

Bowman kapsülünün paryetal tabakası; tek katlı yassı epitelden oluşurken, iç visseral tabakası podosit adı verilen yıldızsı özel hücrelerden oluşur (20, 23). Glomerül kapilleri pencereci ve diyafram içermeyen endotel ile döşelidir. Glomerül kapillerindeki endotel hücreleri, glomerül bazal membranı ve podositler; glomerülde filtrasyon bariyerini oluşturmaktadır. Glomerül bazal membranı endotel ve podositin bazal laminalarının kaynaşmasıyla oluşur. Bazal membran kapilleri çepeçevre sarmaz arada kalan boşluklar mezangiyum ile doldurulur (21, 23). Bazal membran, fibronektin, laminin gibi glikoproteinler, heparan sülfat gibi proteoglikanlar ve tip 4 kollajenden zengindir. Periyodik asit -Schiff (PAS) yöntemi ile boyanan glomerüler bazal membran; podosit uzantılarına komşu lamina rara eksterna, kapiller endoteline komşu lamina rara interna ve iki lamina rara arasındaki lamina densa olmak üzere 3 tabakadan oluşur (22). Lamina densa, yoğun merkezi tabaka iken, iki taraflı komşuluğunda, heparan sülfat gibi negatif yüklü moleküllerin geçişini engelleyen, endotel altında lamina rara interna ve podositleri destekleyen lamina rara eksterna bulunur (21, 23, 24).

Bowman kapsülünün iç yaprağını oluşturan yıldızsı hücreler olan podositler, glomerül kapilleri çevresine verdikleri uzantılar yoluyla bağlantı kurarlar. Her podositin hücre gövdesinden; glomerül kapillerini saran çok sayıda birincil uzantı çıkar ve her birincil uzantıdan da interdijitasyon yaparak birbiri içine geçmiş ikincil uzantılar (pedisel veya ayaksı uzantı) çıkar. Kaynaşan komşu ayaksı uzantılar arasında, yaklaşık 40 nm genişliğinde filtrasyon yarığı oluşur. Filtrasyon yarığı, membranöz yarık diyaframıyla örtülüdür ve bu diyaframının düzgün çalışması için nefrin, NepH-1, NepH-2, P-kadherin gibi çeşitli kompleks faktörler gereklidir. Bu faktörlerin de desteğiyle filtrasyon yarığı seçici geçirgen bir filtre olarak çalışmaktadır (19, 22, 23).



Şekil 2: Glomerülün yapısı (25)

iii) Mezangiyum

Renal korpüsküldeki intraglomerüler mezangiyal hücreler ve ekstrasellüler matriks; mezangiyumu oluşturmaktadır. İntraglomerüler mezangiyal hücreler, glomerülün intertisyel hücreleridir. Fagositoz, sekresyon, destek, hücre proliferasyonu ve bazal membran rejenerasyonu gibi çeşitli görevleri vardır (22, 23, 26). Modifiye düz kas hücresi özelliği sergilemesi sebebiyle birçok vazoaaktif ajan etkisi ile kasılıp gevşeyebilir ve böylece glomerüler filtrasyon da lokal olarak değiştirilmiş olur.

Renal korpüskül dışında damar kutbu boyunca yer alan mezangiyal hücrelere ise ekstraglomerüler mezangiyal (lakis) hücreleri denir. Lacis hücreleri, jukstaglomerüler (JG) aparatın bir parçasıdır (21, 26).

iv) Jukstaglomerüler Aparat

JG aparat; Lacis hücreleri, makula densa ve JG hücrelerden oluşmaktadır. Makula densa; distal tübülün afferent arteriyol ile temas bölgesinde, daha uzun ve dar şekle farklılaşan tübül epitel hücrelerinin yoğunlaşarak sıkı şekilde paketlenmesiyle oluşur. Bu hücreler, kemoreseptör olarak, distal tübüldeki Na^+ iyonlarının konsantrasyonuna duyarlıdır. Lacis hücreleri konik kütle olarak adlandırılır. Tabanı makula densaya bitişik olup, afferent ve efferent arteriyol arasında yer alır. Bu hücreler makula densadaki Na^+ konsantrasyonuna bağlı glomerüler kan akışını kontrol eden tübüloglomerüler geri bildirim mekanizmasına

katkı sağlar. Lacis hücreleri, makula densada oluşan bu sinyalleri intraglomerüler mezangial hücrelere ileterek kılcal damarların kasılıp gevşemesine sebep olabilir (21, 24).

JG hücreler ise aynı bölgedeki afferent arteriyolün tunika medyasındaki farklılaşmış düz kas hücreleridir. JG hücre sitoplazması membrana bağlı matür ve immatür renin salgılarını içerir. Arteriyol basıncının azalmasıyla afferent arteriyolde baroreseptör ve JG hücreler otonomik olarak uyarılır. Uyarılan JG hücrelerden renin salgılanır. Renin karaciğerde üretilen anjiotensinojeni anjiotensin I'e dönüştürür. Anjiotensin I, akciğerden salınan anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından anjiotensin II'ye dönüştürülür. Anjiotensin II ise adrenal korteks tarafından aldosteron salınımını uyararak, periferik kan damarlarını daraltarak ve Na^+ iyonlarının distal tübülden yeniden emilimini sağlayarak üç şekilde kan basıncını artırır. Aldosteron da, distal kıvrıntılı tübüllerde Na^+ ve suyun geri emilimiyle kan basıncının artırılmasına yardımcı olur. Böylelikle JG aparat, renin-anjiotensin-aldosteron sistemini aktive ederek kan basıncının ve sıvı elektrolit dengesinin düzenlenmesini sağlar (23, 24, 27).

v) Proksimal Tübul

Nefronun en uzun parçası olan proksimal tübül; kortekste kıvrıntılı iken medullaya indikçe düzleşir. Malpighi cisimciğinin paryetal yaprağının tek katlı yassı epitel, proksimal kıvrıntılı tübülde tek katlı kübik epitele dönüşerek devam eder. Proksimal tübülün epitel, tek katlı kübik epitelden oluşsa da alçak silindirik epitel de içerebilir. Epitel hücresi bazal plazma zarının katlanmasıyla oluşan sitoplazmik katlantılar ve buralara yerleşen çok sayıdaki mitokondri, ışık mikroskopunda bazal çizgilenmeler olarak görülür. Çok sayıda mitokondri içeren tübül epitelinin; yoğun eozinofilik olduğu görülür. Apikal hücre zarında ise plazma zarının yüzey alanını 20 kat artıran çok sayıda mikrovillusa sahip fırçamsı kenar bulunur. Fırçamsı kenar, glomerüler filtratta süzülen temel malzemelerin emilinde önem arz eder. Lateral hücre membranları arasında sıkı bağlantılar (zonula okludensler) bulunur. Plazma membranlarının iç içe girmesi nedeniyle lateral hücre sınırları belirgin değildir (27, 28).

Proksimal tübül, glomerüler ultrafiltratın %60'tan fazlasını geri emer. Geri emilim iyon pompaları, iyon kanalları, taşıyıcılar, enzimler gibi hem aktif hem de pasif taşıma yoluyla gerçekleşir. Su ve suda çözünen bazı maddeler ozmotik gradiyent yoluyla hücreler arası geçiş yapar. Bir transmembran proteini olan aquaporin (AQP) 1 de hücre membranında su kanalı olarak görev yapmaktadır. Fırçamsı kenar ve bazolateral katlantıların ikisi de birçok tipte transmembran protein içerir. Proksimal tübül mikrovilluslarında Adenozin trifosfatazlar (ATPazlar), peptidazlar ve yüksek konsantrasyonda disakkarit içeren glikokaliks bulunur. Bu sebeple fırçamsı kenarlar PAS boyama yöntemi ile yoğun boyanırlar. Aminoasit ve glukoz geri emilimi, aktif Na⁺ transportuna bağlıdır. Proteinler ve büyük peptitler ise endozomlar yardımı ile endositoza uğrar (20, 22, 27-29).

vi) Henle Kulbu

Henle kulbu "U" şeklinde, olup tek katlı kübik epitelden oluşan inen kalın kol (proksimal düz tübül), tek katlı yassı epitele dönüşerek devam eden ince inen kol, ince çıkan kol ve kortekse doğru yükselerek tek katlı kübik epitele dönüşen çıkan kalın koldan (distal düz tübül) meydana gelir (22, 28).

Nefronların büyük kısmını oluşturan kortikal nefronlar, korteksin periferinde kısa Henle kulbuna sahipken; daha az sayıda olup kortikomedüller bileşkeye yakın bulunan jukstamedüller nefronlar ise uzun Henle kulbuna sahiptir (20). İnen ince kol, yüksek su geçirgenliğine sahip olup daha az miktarda sodyum klorür (NaCl) ve üre gibi çözünmüş maddeleri medullaya geçirir. Çıkan ince kol ise yüksek NaCl geçirgenliğine sahiptir (19). Böylece medullar hipertonsite sağlanmış olur (30). Çıkan kalın kol epitel hücreleri ise üromodilin (Tamm-Horsfall proteini) salgılayarak üriner konsantrasyonu etkiler (19).

vii) Distal Tübül

Henlenin çıkan kalın kolu kıvrıntılı distal tübül ile devam eder. Distal tübül, proksimal tübüle göre daha kısa olup tübülleri çok daha geniş lümenli ve daha az eozinofiliktir. Tübül epiteli, basit küboidal epitelidir ve çekirdekleri apikal bölgelerde lümene doğru çıkıntı yapabilir (22). JG aparatının bir parçası olan makula densa hücreleri ise diğer distal tübül hücrelerine göre daha prizmatik olup sıkı

düzenlenmiştir (23). Distal tübülde, adrenal korteksten salgılanan aldosteron vasıtasıyla Na^+ iyonları tübüler sıvıdan yeniden emilirken H^+ veya K^+ iyonu salgılanır (24).

viii) Toplayıcı Tübüller

Bağlayıcı tübüller olarak başlayan toplayıcı tübüller, distal kıvrıntılı tübülü toplama kanalına birleştirir. Toplayıcı tübüller tek katlı kübik epitelden oluşur. Medullada bu kanallar birleşerek daha geniş çap kazanır. Epitel hücrelerinin çapı artarak prizmatik hücrelere dönüşür. Böbrek piramidinin apeksine yaklaştıkça, medüller toplayıcı tübüller birleşerek tek bir papiller kanalı (Bellini kanalı) oluşturur (23, 24).

Toplayıcı kanallar, açık (esas) ve koyu (interkale) olmak üzere iki tip hücreden oluşan epitelle döşelidir. Esas hücrelerde, Antidiüretik Hormon (ADH) tarafından kontrol edilen çok sayıda AQP 2 bulunur. Böylece suyun, ihtiyaç halinde, toplayıcı kanallardan hızlıca intertisyuma ve ardından vaza rekta ile kana geçişi sağlanır. İnterkale hücreler ise daha az sayıda olup, tübüllerden H^+ ve HCO_3^- salgılayarak idrarın alkali ya da asidik olmasını sağlar (19).

2.1.3.Böbrek Embriyolojisi

Ürogenital yapılar; embriyonik dönemin gastrulasyon aşamasında paraksiyal ve lateral mezoderm arasında bulunan ara (intermediate) mezodermden gelişir (29). Ara mezoderm; dorsal aortanın iki yanında dorsal vücut duvarı boyunca mezodermal ürogenital kabartıyı oluşturur. Ürogenital kabartının lateralinde üriner sistemin gelişeceği kısım nefrojenik kordon veya kabartı; medialinde genital sistemin gelişeceği kısım gonadal kabartı görülür (27, 31).

Üriner sistem genital sistemden daha erken gelişmeye başlar. İntrauterin dönem boyunca pronefroz, mezonefroz ve metanefrozlar olarak adlandırılan üç farklı böbrek sistemi birbiri ardı sıra kranialden kaudale doğru gelişir (27). İnsanlarda işlevsel olmayan pronefrozlar; dördüncü haftanın başlarında embriyonun

servikalinde ve 7-10 adet solid hücre kümesi şeklinde ortaya çıkar, kör boşaltım yapılarını (nefrotom) oluşturur ve dördüncü haftanın sonunda kaybolurlar. (27, 29).

Nefrotomlar kloakaya doğru gelişirken bir çift primer nefrik kanala bağlanırlar. Kemik morfogenetik protein (BMP) düzeyinin azalmasıyla Paired box gen (Pax)-2 ve Pax-8 ekspresyonu artar ve ara mezoderm özelleşir. Ara mezodermin Lim-1'i indüklemesiyle mezenkimal hücreler primer nefrik kanallarda toplanmaya başlar. Primer nefrik kanallar inferior olarak uzadıkça ara mezodermal hücreler Pax-2 ekspresyonu ile epitelyal tübüllere dönüşür. (29, 32).

Mezonefrozar; pronefrozarın gerilemesiyle pronefrozarın kaudalinde üst torasik ve üst lomber segmentlerin ara mezoderminden gelişir ve kalıcı böbrekler oluşana kadar embriyoda fonksiyon görürler. İlk mezonefrik tübül yapıları 4. hafta civarında belirir. Tübüller hızla uzayarak kıvrılır ve medialde, yumak halindeki kapillerden oluşan glomerülü sararak Bowman kapsülünü meydana getirir (27, 29). Bowman kapsülünün glomerülü sarmasıyla renal korpuskül oluşur. Renal korpuskülleri oluşturan her bir mezonefrik tübülün lateral ucu embriyo karın arka duvarı iki yanında uzanan mezonefrik kanallara (Wolf kanalı); onlar da kaudalde kloakaya açılır. Bu arada mezonefrik tübüller bir yandan kaudale doğru gelişimlerine devam ederken diğer yandan kranialden başlayarak dejenere olurlar ve ikinci ayın sonunda mezonefrik kanal ve kaudalde kalmış olan az sayıdaki tübül; kadınlarda gerilerken, erkeklerde başta testisin olmak üzere genital sistem oluşumuna katılır (29, 33).

Metanefrozlar, diğer bir deyişle kalıcı böbrekler, intrauterin beşinci haftada gelişmeye başlar (27, 29). Metanefrozların gelişimi, metanefrik mezemkimden gelen sinyallerin mezonefrik kanallardan bir çift üreter tomurcuğunun oluşumunu indüklemesiyle başlar (33, 34). Üreterik tomurcuk, mezonefrik kanalın kloakaya yakın kısmında bulunan divertiküldür. Üreter tomurcuğu uzayarak metanefrik mezenkim içerisine ilerler. Mezenkim hücreleri üreter tomurcuğu etrafında metanefrojenik blastemi oluşturur.

Mezenkimal dokudan eksprese edilen Wilms tümör süpressör 1 (WT1) üreter tomurcuğuna cevap verebilmesi için metanefrik blastemi hazır hale getirir ve ilave olarak üreterik tomurcuğun uyarılıp gelişmesinde rol alan glial cell derived

neurotrophic factor (GDNF) ve hepatosit growth factor (HGF) yapımını da organize eder. Üreter tomurcuğu epiteli de hem kendi gelişiminde ve dallanmasında rol oynayan hem de mezenkim ve epitel arasındaki sinyal etkileşimini sağlayacak olan HGF için mesenchymal epithelial transition (MET) geni reseptörü, GDNF için rearranged during Transfection (RET) reseptörlerini oluşturur. Üreter tomurcukları tarafından mezenkimal doku fibroblast growth factor 2 (FGF2) ve kemik morfojenik proteini 7 (BMP7) vasıtasıyla uyarılır ve metanefrik mezenkimde proliferasyon artarken apoptoz baskılanır (29).

Metanefrik mezenkim içine dalmış olan üreter tomurcuğunun dallanıp uzamasıyla; üreter, renal pelvis, kaliks majör, kaliks minör ve toplayıcı tübüller gelişir. Dallanan her bir toplayıcı tübülün son kısmı ile etrafındaki metanefrik blastem hücreleri arasındaki etkileşimler sonucu uyarılan metanefrik mezenkim hücreleri gruplaşarak küçük veziküler yapılar (metanefrik vezikül) oluştururlar. Sonra bu veziküller, tübüler yapı (metanefrik tübül) kazanırlar. Metanefrik tübüllerin proksimalinden Bowman kapsülü, proksimal renal tübüller ve Henle'nin inen kulbu; distalinden Henle'nin çıkan kulbu ve distal renal tübüller gelişir (27, 33). Tübüllerin proksimaline doğru kapillerin büyümesiyle glomerüller oluşur ve Bowman kapsülü glomerülleri yay şeklinde sarar. Tübüller ve glomerülden oluşan bu boşaltım birimi nefron olarak adlandırılır. Nefron oluşurken mezenkimal dokuda gerçekleşen epitelyal doku dönüşüm; metanefrik mezenşimde Pax2 ve WNT4 (Wingless/int1-4) üretimi artışını sağlayan WNT9B (Wingless/int1-9B) ve WNT6 (Wingless/int1-6)'nın üreter tomurcuğu tarafından eksprese edilmesiyle kontrol edilir. Pax2, tübül oluşumu için mezenkimi yoğunlaştırırken; WNT4 ise yoğunlaşan mezenkimden tübül oluşumunu sağlar.

Sonuç olarak böbreğin boşaltım birimleri metanefrik blastemden, toplayıcı sistemi üreterik tomurcuktan yani paraksiyal ve lateral mezoderm arasında bulunan ara (intermediate) mezoderminden köken alır (27, 29, 32).

Primordiyal kalıcı böbrekler; oluşumları sırasında pelvik bölgenin derinlerinde ve sakrumun ventralinde bulunurlar. Böbrekler, karın ve pelvisin genişlemesiyle yukarı ve laterale yer değiştirir. Bu yer değişiminde, böbreklerin kaudal kısımlarının kraniale doğru büyümesi de etkilidir. Sonuçta L4 seviyesinden

T12-L1 seviyesine çıkar, laterale kayarak böbreküstü bezleriyle birleşir ve 90° medial hatta dönüş yaparak hiluslarını anteromedial hatta yöneltmiş olurlar (27, 32).

2.1.4. Mesane Anatomisi

İdrarın depolandığı içi boş kaslı bir organ olan mesane, küçük pelviste symphysis pubicanın arkasında yer alır. Erkeklerde önde prostat arkada rektum; kadınlarda uterus ve vajina ön komşuluğunda bulunur.

İdrarın dolması ile genişleyebilen mesane kapasitesi ortalama 600-800 cc'dir. Mesanenin dış duvarını oluşturan düz kas lifleri idrar boşaltımına yardımcı olur. Mesanenin iç yüzeyini oluşturan mukoza, mesanenin dolum kapasitesine göre değişen epitel yapısına sahiptir. Üretra ve iki üreterin arasında kalan alana trigonum adı verilir ve bu alan düz bir yapıya sahiptir. Üreterler mesane arkasından oblik geçerek mesane içerisinde kısa bir mesafe kat ederler. Miksiyon sırasında mesane duvarlarının kasılması üreterin distal uçlarını kasarak sfinkter görevi görür. Böylece idrarın mesaneden üretere geri dönmesi önlenir.

Mesane boynunda bulunan düz kaslardan oluşan sfinkter, otonom sinir sistemi tarafından inerve edilir. Alt taraftaki sfinkter ise irade dahilinde çalışan çizgili kaslardan oluşur. Sempatik sistem mesane duvarlarını gevşetirken sfinkterleri kasar. Parasempatik sistem etkisi ile tam tersi etki gerçekleşir (35, 36).

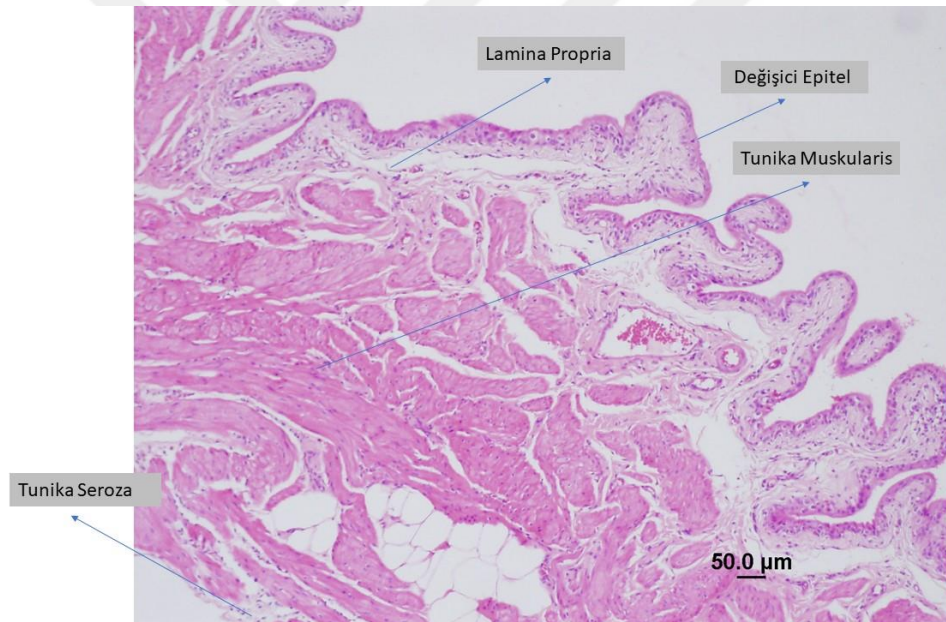
2.1.5. Mesane Histolojisi

Mesane; idrarın miksiyona kadar geçici olarak depolandığı fibromusküler bir organdır. İçte lümene komşu mukoza, ortada farklı yönlerde yerleşmiş kalın düz kas tabakası içeren muskuler ve en dışta yerine göre seroza veya adventisya tabakalarından oluşan üç kısımda incelenir. T. mukoza, mesane idrarla dolduğunda kaybolan çok sayıda mukozal kıvrım içerir. İdrarla dolduğunda epitel incelik; bunun sebebi epitel hücrelerinin şekil değiştirme ve birbiri üzerinde kayma özelliğine sahip olmalarıdır. Değişici epitel (ürotel) idrarda oluşan ozmotik değişikliklere ve toksik maddelere karşı koruyucudur. Bu koruyucu etkide, ürotelin lümene en yakın

hücreleri olan bir ya da çok çekirdekli yapıdaki şemsiye hücreleri de etkilidir. Ürotelin hemen altında lamina propria olarak tanımlanan kan damarları ve sinir lifleri içeren subepitelyal bağ doku bulunur (37).

Mesane kas tabakası; içte longitudinal, ortada sirküler, dışta longitudinal olmak üzere 3 katlıdır. Mesanenin boşaltılmasında etkili olduğu için detrüsör kas olarak da adlandırılır. Trigonum alanında tunika muskularis üretranın iç sfinkterini oluşturur. Düz kas demetleri arasında çok sayıda kan damarı, otonom sinirler ve gangliyonlar bulunur.

Mesanenin üst ve yan yüzeylerindeki en dış seroza tabakası visseral peritonken, geri kalan bölgelerde (retroperitoneal kısımda) sadece bağ dokusundan ibaret olan adventisyadır (21, 22, 24, 36, 38) (Resim 1).



Resim 1: Mesanenin histolojik yapısı. Kontrol grubuna ait kesitte tunika mukoza (değişici epitel, lamina propria), tunika muskularis, tunika seroza gösterilmektedir (H&E X 100).

2.1.6. Mesane Embriyolojisi

Embriyonal gelişimin 4. haftasında ilkel son bağırsağın genişlemiş son bölümü olan kloaka; ürorektal septum tarafından primitif anal kanal ve ürogenital sinüse ayrılır (39). Ürogenital sinüs 3 kısımda incelenir. Mesanenin büyük kısmını

oluşturan ürogenital sinüsün vezikal kısmı, allantois ile bağlantılıdır. Ürogenital sinüsün pelvik parçasından erkekte, mesane boynundaki üretra ve üretranın prostatik kısmı gelişirken; kadında, mesane boynu altında üretranın tamamı oluşur (40). Son olarak fallik kısımda klitoris ve penisi oluşturan genital tüberküle doğru büyüyerek gelişir. Mesanenin büyük kısmı ürogenital sinüsün vesikal parçasından köken alırken, üreterlerin açıldığı trigon olarak adlandırılan bölge mezonefrik kanalların kaudal ucundan köken alır. Mesane epitelinin tamamı ürogenital sinüsün vezikal parçasının endoderminden gelişmektedir. Mesane duvarının diğer tabakaları ise komşu splanknik mezenkimden gelişir (27).

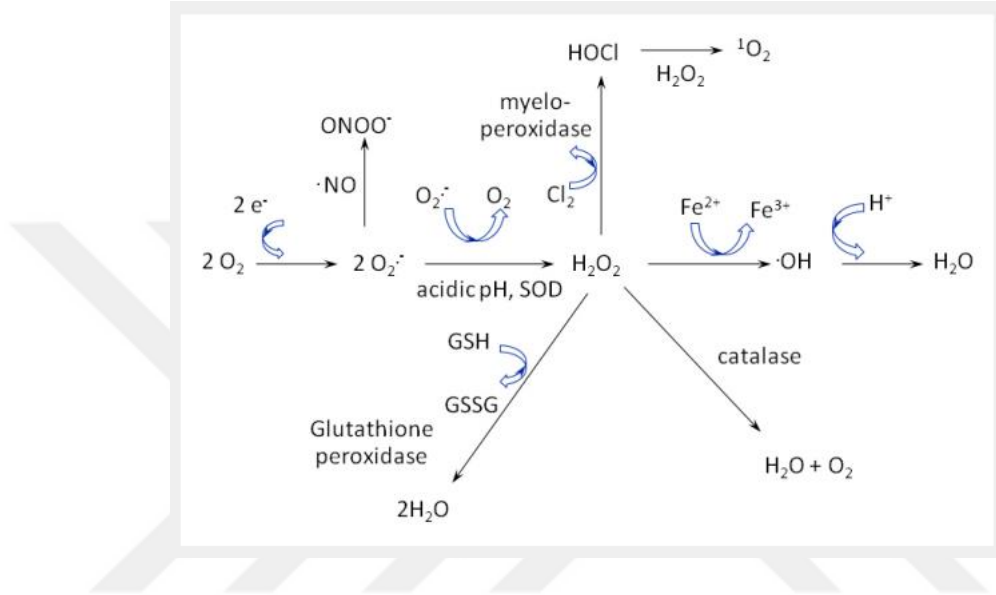
Ürogenital sinüsün vezikal parçası ile bağlı olan allantois, oblitere olarak urakus adı verilen fibröz kordon haline dönüşür (27,29). Urakus, mesane apeksinden göbeğe kadar uzanır ve yetişkinlerde ise median umbilikal ligamente dönüşür. Median umbilikal ligament, yetişkinlerde mesane apeksi ile karın duvarının posterior yüzü arasında uzanır. Böbreklerin yükselişi sırasında üreterlerin açılma yeri superior ve laterale kayar. Yenidoğanda ve çocuklarda mesane abdomen içinde yerleşiktir; ortalama 6 yaş civarında pelvis majöre iner, ergenlikte ise artık pelvis minördedir. (27).

2.2. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, oksidan üretim hızı ile yıkım hızı arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan bir durumdur. Oksidan moleküller olan reaktif oksijen türleri (ROS), hücredeki antioksidan mekanizmalarla dengelenemeyecek seviyede arttıkları zaman hücrede hasara yol açabilir (41).

İnsan gibi aerobik organizmalar, enerjilerini organik substratların moleküler oksijen (O_2) ile oksidasyonundan üretirler (42). Bu nedenle de fizyolojik olarak tüm hücrelerde solunum ve metabolik olaylar sırasında hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\cdot$), singlet oksijen (1O_2) ve süperoksit ($O_2^\cdot$) gibi kararsız moleküller olan reaktif oksidanlar yani ROS üretilir (43). Bu kararsız moleküller, çeşitli reaksiyonlarla bir türden diğerine dönüşürler. İlk reaksiyon $O_2^\cdot$ oluşturmak için O_2 'ye bir elektron transferidir. $O_2^\cdot$ oluşumu, serbest bir elektronun moleküler O_2 'ye transferi yoluyla iç mitokondriyal zarda bulunan elektron taşıma zinciri (ETZ)'nin belirli bölgelerinde gerçekleşir. ETZ kompleks 1 ve kompleks 3'te $O_2^\cdot$ 'in çoğunluğu

üretir. Ardından O_2^- , mitokondriyal süperoksit dismutaz (SOD) tarafından H_2O_2 'ye çevrilir. Peroksidazlar da H_2O_2 'yi hipokloröz asit (HOCl) ve 1O_2 'ye dönüştüren reaksiyonu katalize ederler. O_2^- , nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girdiğinde ise oldukça reaktif bir ürün olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Haber-Weiss reaksiyonu ile, O_2^- ve H_2O_2 'den demir iyonu katalizörü kullanarak hidroksil radikalleri üretilir (41, 44) (Şekil 3).



Şekil 3: ROS türler arası geçiş dizisi (41)

ROS; protein fosforilasyonları, iyon kanalları ve transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi gibi normal fizyolojik olaylarda görev alır. Hücresel düzeydeki etkileriyle büyümeyi, apoptozu ve hücresel sinyalizasyonu düzenlerken; sistemsel düzeydeki etkileriyle de kan basıncını, bilişsel işlevleri ve bağışıklığı düzenler.

ROS'un miktarı, normal şartlarda doğal antioksidan mekanizmalarla dengelenir ancak bu dengeyi sürdürmek her zaman mümkün olmayabilir (41). Bozulan denge ROS artışına ve bu da oksidatif strese neden olur. Fizyolojik olarak patojen mikroorganizmalara karşı savunma ve hücresel sinyalizasyon gibi olaylarda rol alan ROS; kontrolsüz arttığında hücre içi proteinler, membran lipitleri ve nükleik asitlerle kolaylıkla reaksiyona girerek geri dönüşü olmayan hasara yol açabilir (43). Böylece oluşan oksidatif stres, tüm organ sistemlerini etkileyen genel yaşlanma süreci ve hücre ölümü ile ilişkilidir. Ayrıca ateroskleroz, hipertansiyon, kanser ve Alzheimer hastalığı gibi birçok hastalığın oluşumunda da rol oynar (41).

Artmış ROS, hücre içi lipid ve proteinlerin çift bağ içeren gruplarına ve DNA bazlarının çift bağlarına saldırıp bir hidrojen atomu kopararak oksidasyon reaksiyonlarını başlatır. Doymamış yağ asitlerinin yapısından bir hidrojen atomunun ayrılmasıyla oluşan lipid radikalının oksijen ile reaksiyona girmesiyle lipid peroksi radikali oluşur. Zincir reaksiyonlarla oluşan lipid hidroksi peroksitler, demir ve bakır iyonlarının da katkılarıyla lipid peroksidasyonuna ivme kazandırır. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu ile dokularda oluşan oksidatif hasarın ölçümünde kullanılan belirteçlerden biridir (45, 46).

HOCl veya hipotiyosiyanit gibi reaktif oksidanları üreten miyeloperoksidaz (MPO); birçok inflamatuvar olay ve kardiyovasküler hastalıkla ilişkilendirilen ve nötrofiller tarafından büyük miktarlarda üretilen bir hem proteinidir. Nötrofillerin azurofilik veya birincil granüllerinde depolanır, O_2^- ve H_2O_2 dahil olmak üzere bir dizi reaktif oksidan üreten MPO, fagozomlar içine alınan mikroorganizmaları öldürür. MPO, hem fagolizozomal bölmeye hem de dış ortama salınır. Memeli peroksidazları arasında H_2O_2 'yi kullanarak klorürü (Cl), HOCl'ye oksitlemesi MPO için ayırt edicidir. HOCl' de enzimleri inaktive ederek, proteinlere çapraz bağlanarak, aminoasitleri okside ederek ve lipidleri klorlayarak nötrofillerin neden olduğu doku hasarına katkıda bulunur. Ek olarak aromatik bileşikleri hidroksile eder, çok sayıda fenolü ve anilinleri serbest radikallere okside eder ve oksidatif öldürücü etkisi yüksektir. Bu toksik etkileri ile reperfüzyon hasarı, romatoid artrit, astım, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi patolojilerde nötrofil aracılı hasara sebep olur. Hücrelerin HOCl'ye bağlı hücre ölümü, hücrenin tipine, zamana ve doza bağlı şekilde farklı yollarla olur. MPO- H_2O_2 -Cl sistemi oksidan aracılı antimikrobiyal savunmada olduğu gibi böbreğin dejeneratif ve immünolojik hastalıklarının ilerlemesinde de rol oynar (47- 49). İnflamatuvar hasarda rol alan moleküllerden tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) ise bağışıklık ve inflamatuvar yanıtı regüle eden, hücre apoptozunu ve programlı hücre ölümünü başlatabilen, lenfosit ve makrofajlardan salınan bir sinyal molekülüdür (50). TNF- α biyolojik aktivasyonu için tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) 1 ve TNFR 2 olmak üzere iki tip reseptöre bağlanır. TNFR 1 çeşitli hücrelerde eksprese edilerek inflamatuvar yanıtı artırırken, TNFR 2 immün hücrelerden ve endotelial hücrelerden eksprese edilerek hücrelerin çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlar (51). ROS artışıyla Nükleer faktör kappa B (NF- κ B)

aktivasyonu gerçekleşir. TNF- α başta olmak üzere inflamatuvar hücre ekspresyonu artar ve inflamatuvar hücreler dokularda birikmeye başlar. (52,53).

Böbrek hasarında üremik toksinler; nikotinamid adenin dinükleotit fosfat hidrojen (NADPH) oksidazı aktive ederek ROS artışına sebep olur. Ek olarak üremik toksinlerin lipopolisakkaritler ile uyarılan makrofajlarda ROS üretimini ve inflamatuvar yanıtı artırdığı görülmüştür (54, 55). ROS, böbreklerde glomerüler bazal membran geçirgenliğini doğrudan etkileyebileceği gibi glomerüler filtrasyonu da değiştirebilir. ROS üretimi ile oluşan oksidatif stres; endotelde, tübül epitel hücrelerinde, podositlerde, mezangial hücrelerde otofaji ve apoptozu indüklerken, profibrotik yolların aktivasyonu ile glomerüloskleroz oluşumunu teşvik eder. (56, 57). Yüksek ROS düzeyi mesane epitelinde de oksidatif dengeyi bozar. Lipitler, proteinler ve DNA'da hasara neden olarak hücre ölümüne sebep olur (58).

i) Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Antioksidanlar, eşlenmemiş elektrona sahip serbest radikallerin sebep olduğu hasarlardan hücreleri koruyabilen maddelerdir. Organizmaya dışarıdan alınan (eksojen) ya da organizmanın kendisine ait olan (endojen) antioksidanlar mevcuttur. Endojen antioksidanlar da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler. Enzimatik antioksidanlar; SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX) ve glutatyon redüktaz (GRX)'dir. Enzimatik olmayan antioksidanlar da lipoik asit, glutatyon (GSH), L-arginin, ürik asit ve bilirubin gibi metabolik antioksidanlardır. Organizmaya dışarıdan alınan eksojen antioksidanlar ise; genellikle besin kaynaklı olup günlük diyet ile alınan; vitamin E, vitamin C, karotenoidler ve eser elementleri (Se, Cu, Zn, Mn) gibi yapıları içerir (54, 59).

SOD enzimi, Manganez SOD (Mn-SOD) ve Bakır-çinko SOD (Cu-Zn-SOD) olarak yapı ve kofaktörler bakımından farklılık gösteren enzimatik protein ailesidir. O_2^- radikalleri; SOD aktivitesi ile kendiliğinden H_2O_2 'ye dönüşür. SOD enzimi inflamasyonu; ROS bileşiklerini ortadan kaldırarak, T hücresi, makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreleri gibi immün hücreleri modüle ederek ve hücre sinyal kaskadlarını Toll benzeri reseptör (TLR), NF- κ B, Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT)'nü düzenleyerek önler (60). CAT enzimi, bir önceki reaksiyonun son ürünü olan H_2O_2 'yi uzaklaştırır. H_2O_2 'yi su ve oksijene

indirgeyerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. H_2O_2 , MPO ilişkili oksidan madde üretiminde de rol aldığı için CAT aktivasyonu ile MPO'nun substratı azalmış olur (61). CAT; hidrojen peroksidin hasar verici özelliğinden hücreleri korurken, hücrelerde oksidatif strese karşı tolerans kazanma ve hücrelerde adaptif etki oluşturmada fayda sağlar. CAT, her alt birimde ferriprotoporfirin içeren tetramerik yapıya sahip bir enzimdir. Hayvanlarda H_2O_2 ; CAT ve GPX tarafından detoksifiye edilir (54, 62). Memeli dokularında peroksizomlarda yoğun bir şekilde bulunan CAT aktivitesi, karaciğer ve eritrositlerde en yüksek, böbrek ve yağ dokusunda da nispeten yüksektir (63, 64) (Tablo 1).

Tablo 1: Enzimatik savunma sistemleri (45)

ENZİMATİK SAVUNMA SİSTEMLERİ	
Süperoksit dismutaz	$2 O_2^- \xrightarrow[SOD]{2H^+ \rightarrow O_2} H_2O_2$
Katalaz	$2H_2O_2 \xrightarrow{Katalaz} 2H_2O + O_2$
Glutasyon peroksidaz	$GSH + HSG \xrightarrow[2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O]{Glutasyon peroksidaz} GSSG$
Glutasyon redüktaz	$NADPH + H^+ + GSSG \xrightarrow{Glutasyon redüktaz} NADP^+ + 2GSH$

GPX, her dört özdeş biriminde enzimatik aktivite için gerekli selenyum içeren peroksidaz grubu enzimdir. GSH, sıklıkla redükte formda bulunur. GPX, GSH kullanarak hidroksi peroksitlerin indirgenmesini katalize eder ve hücreleri oksidatif hasara karşı korur. GSH metabolizması en önemli antioksidan savunma mekanizmalarından biridir. Memelilerde her dokuda farklı seviyelerde olan beş GPX

izoenzimi vardır. GPX1 izoenzimi; eritrosit, böbrek ve karaciğerde görülürken GPX4; böbrek epitel hücreleri ve testiste ağırlıklı olarak bulunur. Glutasyon E ve C vitamini gibi eksojen antioksidanları indirgenmiş halde tutabilir, C vitaminini yeniden üretebilir (54, 62).

2.3. Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda, mitozla çoğalan hücre miktarı ile vücutta hasarlı ya da gereksiz olduğu için uzaklaştırılan hücre miktarı denge halinde tutulmaya çalışılır. Bu hasarlı veya gereksiz hücrelerin uzaklaştırılmasında, hücrelerin kendi yıkımını programladığı bir ölüm formu olan apoptoz da görev alır. Apoptoz; protein sentezi, spesifik hücresel sinyaller, proteinler gerektiren ve hücrenin kendini kontrollü bir şekilde yok ettiği hücre ölümüdür (65). Apoptoz kelimesi sonbaharda yaprakların düşmesini tanımlamak için kullanılan Yunanca “ayrı” anlamına gelen “apo” ve “düşmüş” anlamına gelen “ptosis” kelimelerinden türetilmiştir. Apoptoz terimi ilk olarak 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından hücrelerin fizyolojik ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (65, 66).

Apoptoz; embriyogenez, normal doku döngüsü, immün gelişim/savunma ve tümör oluşumuna karşı korunmada çok önemli rol oynar (65). Hayvanlarda; mitozun düzenlendiği ve mitoz sırasında hücresel anormalliklerin tespiti ile programlanmış hücre ölümünün başlatıldığı mekanizmalar çok sayıda düzenleyici gen mevcuttur. Bu düzenleyici genlerin bazıları mitozu uyarırken, diğerleri mitozu inhibe eder ya da apoptozu başlatır. Kontrolsüz hücre çoğalması, kanser gibi ölümcül hastalıkların gelişimine; aşırı hücre ölümü ise Alzheimer, Parkinson veya romatoid artrit gibi hastalıklara neden olabilir. Apoptoz; işte bu aşırı hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlayan önemli bir kontrol mekanizmasıdır (66).

Apoptoza giden hücrede başlangıçta hücre hacminde azalma veya büzülme, piknotik çekirdek oluşumu ve nükleer zar boyunca kromatinin yoğunlaşması görülür. Ardından karyoreksis (çekirdek parçalanması), hücre yüzeyinde veziküller, kabarcıklar ve sonunda zarla çevrili küçük hücresel fragmanlar yani apoptotik cisimlerin oluşumu izlenir. (65, 67).

Apoptoz, kaspazlar olarak bilinen sistein-aspartik proteazların aktifleştirilmesiyle başlar. Hücre hasarlandığında, inaktif prokaspazlar aktifleşerek

aktif kaspazları oluşturur. İlk aktive olan başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), cellat kaspazları (kaspaz 3, 6 ve 7) aktive ederek hücreyi ölüm yoluna sokarlar (66, 68).

Apoptozun intrinsik yolu, mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır. Hipoksi, radyasyon ve toksik ajanlara maruz kalma gibi etkenler apoptozu başlatabilir. İlave olarak sağlıklı hücrede antiapoptotik bcl 2 aile üyelerince inhibe edilen puma, noxa ve bax (Bcl-2 ilişkili X protein) gibi hücre içi proapoptotik moleküller de büyüme faktörleri, hormonları ve sitokinlerin yokluğunda aktif hale gelerek apoptozu başlatabilir. Sonuç olarak mitokondriden sitokrom C'nin salınımı ve APAF-1 (Apoptotic protease activating factor) ile etkileşimiyle kaspaz 9 aktive edilir ve sonra kaspaz 3'ün aktivasyonu sağlanır. Ekstrinsik yol diğer adıyla apoptozun ölüm reseptör yolunda ise ölüm reseptörleri; TNF- α ve Fas ligandı ile bağlanarak prokaspaz 8'i ve son olarak kaspaz 3'ü aktive eder (66, 69, 70). Ekstrinsik ve intrinsik yol aktivasyonu ile oluşan kaspaz 3; poli-ADP riboz polimeraz (PARP), gelsolin, β -catenin gibi hücrel substratların parçalanmasına yol açar. Sonuç olarak cellat kaspazların aktivasyonu; DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin yok edilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, fagositik hücreler için ligand ekspresyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu ile seyreden hücre ölümüne neden olur (66, 69).

2.4. Siklofosamid

2.4.1. Genel Bilgiler

CP, kimyasal olarak (2-[bis(2-chloroethyl) amino] tetrahydro2H-1,3,2-oxazophosphorine 2-oxide) tanımlanan bir nitrojen mustard türevidir (71). İlk olarak 1954'te Friedman ve Seligman tarafından karsinom tedavisinde etkinliği gözlemlenmek için kullanıldı. CP'nin içeriğindeki nitrojen atomuna bağlı fosfat varlığında nitrojen mustard parçasının inaktif olduğu varsayılıyordu. Özellikle bağırsak ve mide karsinomalarında fosfamidaz etkinliği yüksek olduğundan, fosfat bağının ayrılmasıyla CP'nin tümör içerisinde yüksek etkinlik göstereceği düşünülüyordu (72). Ardından Almanya'da Asta-Werke Company'deki bilim insanları 1950'li yıllarda bir dizi fosforile nitrojen hardalı sentezlediler. Preklinik testlerde en yüksek terapötik indekse CP'nin sahip olduğu bildirildi. Çalışmalarda

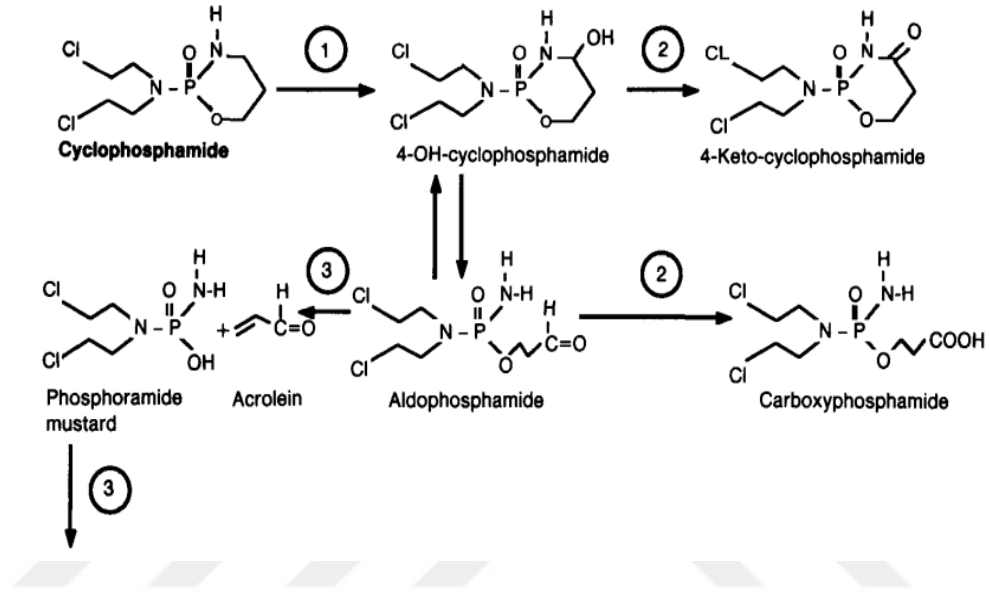
CP'nin birçok malignitede etkili olduğu kanıtlandı ve hastalar tarafından da iyi tolere edildiği fark edildi. Diğer alkileyici ajanlara göre daha az gastrointestinal ve hematolojik toksisite oluşturmaması ve immünsüpresif özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaya başlandı (73, 74).

2.4.2. Emilim, Metabolizma, Atılım

CP, suda veya alkolde çözünebilen bir monohidrat yapısında olup, ticari olarak da tablet formunda ya da intravenöz ve oral uygulama için çözünebilen toz halinde saklanan bir bileşiktir. Uygulama yolu ve dozu, kullanım gerekçesine göre değişmektedir. İmmünoşüpresif etki için veya bazı malignitelerin tedavisinde 100-200 mg dozlarda oral verilebilir. İntravenöz olarak daha yüksek dozlarda kullanımı tercih edilir. İlaç, absorpsiyonu sonrasında karaciğerde ilk geçişte metabolize edilerek aktive edilir. CP'nin aktive olmasıyla etkisi sistemik hale gelir ve biyoyararlanımı da %100'e yakındır. CP'nin yaklaşık %20'si proteine bağlıdır ve bu oran doza bağlı değişiklik göstermez. Metabolitleri proteine daha yüksek oranda bağlanır fakat oran olarak %67'yi geçmez (74). İlacın metabolizasyonu ağırlıklı olarak karaciğerde gerçekleşse de eritrositler ve tümör hücrelerinde de gerçekleşebilir.

CP'nin karaciğerde sitokrom P450 tarafından aktive edilmesiyle, 4. karbon atomu hidroksile edilerek 4-hidroksisiklofosamid (4-OHCP) oluşur (75). CP, hepatik olmayan enzimler tarafından hidroksile edilerek ve aldehit dehidrogenaz tarafından oksidasyona uğratarak aldofosamid, ketosiklofosamid ve karboksifosamid gibi inaktif metabolitler oluşturur. Aldehit dehidrogenazlar neoplastik hücrelerde ve birçok dokuda bulunur. Aldofosamid, 4-OHCP ile denge halinde iken spontan β eliminasyonu ile fosforamid hardalı ve akroleini serbest bırakır. Akrolein, konjugasyon yoluyla hücresel GSH'ı tüketerek CP kaynaklı hücre hasarına sebep olabilir. 3-hidroksipropilmerkaptürik asit olarak idrarla atılır. GSH; reaktif elektrofilleri detoksilye ederek hücreleri 4-OHCP'e karşı korur. Aksi takdirde akrolein DNA ve proteinlere kovalent bağlanarak DNA zincirleri arası ya da DNA-protein arası çapraz bağlanmalara sebep olur. Ayrıca akrolein; DNA ve RNA sentezinde, hücre zarı bütünlüğü ve metabolizmasında görevli önemli proteinleri inaktive edebilir. Akrolein'in CP uygulamasından sonra CYP (sitokrom) enzim içeriğini ve aktivitesini azalttığı da gösterilmiştir (74-76). Hem 4-OHCP hem de fosfaramid

hardalı in vivo ve in vitro sitotoksik iken 4-OHCP fizyolojik pH'ta alkilleyici değildir. Bu sebeple fosforamid mustard; nihai alkilleyici metabolit olarak kabul edilirken 4-OHCP ise; fosforamid mustardı alkilasyonun gerçekleşeceği hücelere taşıyan molekül olarak işlev görür. CP'nin yüksek sitotoksite seçiciliği ve özgülüğü 4-OHCP'nin fosforamid mustardı uygun hedeflere ulaştırmasından kaynaklanmaktadır (74,76) (Şekil 4).



Şekil 4: CP metabolitleri (74)

Uygulanan CP dozunun yaklaşık %20'den azı değişmeden idrarla atılırken, %4'ü safra ile atılır. CP'nin yarı ömrü 6-9 saat arasında değişirken, klirens değeri yaklaşık olarak 1,8-5,5 L/sa/m²'dir. Tekrarlanan doz uygulamalarında ilaç kendi metabolizmasını indükler ve metabolit oluşumu artar, yarılanma ömrü azalır ardından klirens artar. Metabolizmanın oto indüksiyonu, ilaç uygulamasından 12 ila 24 saat sonra ortaya çıkar, 3 hafta içinde tersine döner (75).

2.4.3. Tıpta Kullanım Endikasyonları

CP, kanser kemoterapisinde yaygın kullanılan bir ajandır. Burkitt lenfoma, multiple miyelom, over karsinomu gibi malignitelerde tek başına kullanılabileceği gibi; meme kanseri, lösemi, lenfoma, akciğer kanseri gibi malignitelerde ise diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Wegener granulomatosis, sistemik lupus eritematozis, nefrotik sendrom ya da organ ve ilik nakli gibi durumlarda immünosupresif olarak da kullanılmaktadır (77, 78).

2.4.4. Yan Etkileri

Sık kullanılan bir kemoterapötik olan CP; hematopoetik sistem, gonadlar, gastrointestinal sistem ve genitoüriner sistem epiteli gibi hızla çoğalan dokular için oldukça toksiktir. CP'nin başlıca doz sınırlayıcı yan etkisi miyelosupresyondur. Oluşan lökopeni ve granülositopeni sonrasında patojen bakteriler ve fırsatçı mikroorganizmalara duyarlılık artar. Trombositopenik etkisi sadece yüksek dozlarda görülür (76, 79). CP'nin diğer yaygın yan etkileri ise mide bulantısı, kusma, alopesi, immünsüpresyon ve gonadal hasardır (76).

Ürotoksisite, pulmoner ve kardiyak toksisite ise en sık görülen organ spesifik hasarlardandır. CP kaynaklı hemorajik sistit insidansı ortalama %78 olarak bildirilmiştir ve ürotelyum hasarından başlıca CP'nin akrolein metaboliti sorumlu tutulmaktadır. Akrolein, idrar ile atılırken ürotelyum ile direkt temas halindedir. Ürotelyumun, idrar ile altta yatan hücreler arasında bariyer fonksiyonunun bozulmasıyla toksinler mesane duvarına ilerleyerek harabiyete sebep olur. CP kaynaklı mesane hasarında; klinik olarak şiddetli sistit semptomları mevcutken histolojik olarak, inflamasyon ve hemorajinin baskın olduğu yoğun epitel hasarı görülür (80,81) (Tablo 2). Akrolein, ROS ve NO üretimini artırıp, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve ATP'nin tükenmesine sebep olarak mesanede nekrotik hücre ölümüne sebep olmaktadır. CP kaynaklı ürotoksisite; klinikte sıklıkla hemorajik sistit şeklinde ortaya çıksa da CP, böbrek ve üst idrar yollarında da hasara neden olabilir. Akroleinin renal hücreleri alkilasyonu sonucunda akut böbrek yetmezliği kaynaklı tübüler disfonksiyonun yanı sıra glomerüler filtrasyonda da azalma gözlenir. Yapılan çalışmalarda CP uygulama sonrasında, böbrekte oksidatif stresin arttığını, SOD, CAT, GPX ve GRX gibi çeşitli antioksidan enzim aktivitelerinin ise azaldığını tespit etmişlerdir (55, 78, 82) İlacın yüksek ya da orta dozlarda kullanılmasıyla da uygunsuz ADH sendromu ve hiponatremi gelişimi tespit edilen çalışmalar mevcuttur (83).

CP kaynaklı akciğer hasarı ise ürotoksisiteye kıyasla oldukça az görülür. İnterisyel pnömoni ve pulmoner fibrozis CP kaynaklı akciğer hasarı ile en ilişkili durumlardır. Yüksek CP dozlarında ise hepatik hasar ve kardiyak toksisite de görülebilir. CP'nin uzun dönem yan etkileri ise; reproduktif sistem hasarı (azospermi,

ovaryan yetmezlik vb.), teratojenik ve onkojenik etkileridir. Bu toksik etkiler, tedavi süresi ve doza bağımlıdır (76, 80) (Tablo 2).

Tablo 2: CP kaynaklı mesane toksisitesi (80)

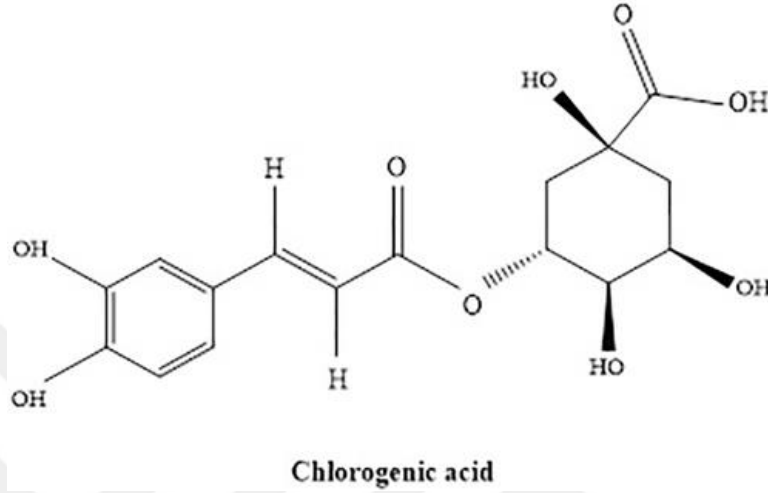
Klinik Belirtiler	Histopatolojik değişiklikler
Gross hematüri	Eksantrik çekirdek
İdrar yaparken tahriş olma, yanma	Hiperkromatik nükleus, polimorfonükleer lökosit
İdrara sık çıkma	Nükleer piknozis
Dizüri	Vakuolizasyon
Sıkışma	Nekrotik sistit
İdrar kaçırma	Mukozada soyulma
Gece sık idrara çıkma	Yoğun eksuda kaplı mukoza

2.5. Klorojenik Asit

Fenolik bileşikler, insanda oksidan ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengeyi koruyarak oksidatif stresle mücadelede önemli rol oynayan yapılardır. Fenolik bileşikler birden fazla hidroksil grup içeren aromatik halkaya sahiptirler ve fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, tanninler olarak sınıflandırılırlar. Fenolik asitler benzoik asit ve sinamik asitlerin türevidir. En yaygın bulunan hidroksisinnamik asitler; kafeik asitler, kumarik ve ferrulik asitlerdir (84). Fenolik bileşiklerin önemli bir sınıfını hidroksisinnamik asitlerin ana temsilcisi, kafeik asit ve kinik asidin esteri olan CGA oluşturur.

CGA, eski terminolojiye göre “3-Kafeoilkinik asit (3-CQA)” terimi ilk kez 1846’da Payen tarafından kullanıldı. Yaklaşık bir yüzyıl sonra Fischer ve arkadaşları 1932’de CGA’nın yapısını tanımladı. Ardından diğer izomerleri peşpeşe tanımlandı

(85). Kahve, insan diyetinde önemli bir CGA kaynağıdır. Farklı kahve özleri genellikle farklı CGA'lar içerir ve yeşil kahve çekirdekleri, en fazla CGA bulunduran yenilebilir bitkilerdir (86). Diğer CGA kaynakları ise; elma, şeftali, yaban mersini, erik, enginar ve patlıcandır (87) (Şekil 5).



Şekil 5: CGA'nın kimyasal yapısı (88)

İnsan çalışmaları, CGA'nın bir kısmının mideden erkenden emildiğini göstermektedir. Geri kalan CGA, ileum ve jejunum hücrelerini geçerek hepatik portal dolaşıma girer ve karaciğerde bir dizi enzimatik reaksiyona uğrar. Ek olarak bağırsak mukoza hücrelerinde ve lümende bulunan enzimler tarafından hidrolize edilebilir veya sülfat ya da glukuronik asit ile konjuge edilerek elimine edilebilir. Ardından kolonda absorpsiyona uğrar (89).

Son yıllarda klinik ve bilimsel çalışmalar CGA'nın; lipid ve glukoz metabolizmasında etkili olduğunu, kardiyovasküler hastalıklarda, karaciğer hasarında ve nörotoksisite tedavisinde başarılı sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. CGA veya metabolitlerinin kan-beyin bariyerini geçerek nöroprotektif sonuçlar ürettiği bildirilmiştir (Tablo 3). Mantarlar, bakteriyel toksinler, farmasötikler, metaller, pestisitler vb. gibi çeşitli kimyasalların neden olduğu toksisitelere karşı da CGA'nın koruyucu etkileri bulunmaktadır (88).

CGA, vücutta antioksidan aktivite başta olmak üzere antibakteriyel, antienflamatuar ve antipiretik etkiye sahiptir (86, 90). CGA'nın antioksidan aktivitesi, orto-dihidroksil veya 4-hidroksi-3-metoksil grubunun varlığına

bağlanmıştır. CGA'nın antioksidan etkisi ile radikal yakalama etkinliği iki mekanizmada açıklanmaktadır. Birincisi serbest radikalın CGA'dan bir hidrojen atomu çıkardığı hidrojen atomu transfer reaksiyonu; ikincisi serbest bir radikalın CGA'ya bağlanarak ara ürün ürettiği eklenti oluşumudur (88). CGA, oluşan oksidatif stresi azaltmak için antioksidan enzim düzeyini yukarı regüle ederek ROS aracılığıyla üretilen NF- κ B ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) aktivasyonlarını baskılar. (91). Antienflamatuar etki olarak da Nitrik oksit sentaz (iNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim ve IL-6, IL-1 β , TNF- α gibi proinflamatuar sitokinlerin düzeyini azaltabilir (92).

CGA, hücrelerin kaderini iki ayrı mekanizma yoluyla etkiler. Oksidatif stresten hasar görmüş hücrelerde, antiapoptotik sinyal üretimini desteklerken; kanser hücrelerinde apoptotik sinyal üretimini tetikler. Bir çalışmada apoptoz ve otofajinin CP kaynaklı hasar görmüş böbrekte, Mikrotübül ilişkili protein 1A/1B hafif zincir-3B (MAP1LC3B), bax, p53 ve kaspaz 3 (CASP3) gibi sinyal ekspresyonların baskılanması ile inhibe edildiği görülmüştür. Hücre döngüsünün ilerlemesinde önemli rolü olan siklin D1 ekspresyonunun ise CGA tedavisi sonrasında belirgin şekilde arttığı görülmüştür. Kronik myeloid lösemi (KML) hücre hatlarında ise sağlıklı hücrelerin tersine apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile ters farmakolojik etki görülmüştür (85,93-95). Yapılan diğer çalışmalarda CGA'nın antitümör etkisinde Nrf2/ARE (nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element) yolağını aktive edilmesinin de etkili olduğu gözlemlenmiştir (96).

CGA bakterilerde antibakteriyel aktivitesini sıklıkla hücre zarının yapısını bozarak gösterir. Bir başka antibakteriyel etkisi ise hücre içi reaktif oksijen türlerini tüketerek bakteriyel hücre içi önemli sinyal yollarını bozduğu ve bakteriyel hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir (97).

Tablo 3: CGA'nın etkileri (85)

Santral sinir sistemi	İnmeye karşı koruyucu etki, antiamiloidojenik etkiler, bilişsel performansı geliştirici etki
Gastrointestinal sistem	Pankreatik lipaz ve amilaz aktivitesini inhibe eder, insülin sekresyonunu modifiye eder, karaciğerden glukoz çıkışını azaltır, karaciğer trigliserit (TG) seviyesini düşürür, bağırsağa glukoz alımını azaltır, bağırsak bariyerini geliştirir, bağırsak mikrobiyotasını modifiye eder
İskelet sistemi	İskelet kasında uyarılmış glukoz taşınımı ve azalmış TG seviyesi
Kardiyovasküler sistem	Hipertansiyon gelişimini engeller, miyokardiyal fibroziste azalma, plazma TG ve kolesterol seviyesinde azalma
Üriner sistem	Böbrek hasarı oluşturan oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve otofajiye karşı koruyucu etki

3. MATERİYAL ve METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Finansal Destek

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak başlandı (Tarih: 19/01/2021; Protokol No: 2021/61). Bu çalışma, KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2022-10159).

3.2. Deney Hayvanları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırma için ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen Sprague Dawley ırkı 18 erkek 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, sınırsız beslenme şartlarında muhafaza edildi. İçme suyu olarak çeşme suyu, beslenmesi için standart sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi Tic. A.Ş., Erzurum, Türkiye) verildi. Sıcaklık $22\pm2^{\circ}\text{C}$, nem $\%50\pm5$ olacak şekilde ayarlandı. Sıçanlar, çalışma süresince standart Tip III kafeslerde barındırıldı (Resim 2). Sıçanların bakımı, deneyin bütün uygulamaları ve sıçanların sakrifikasyonu KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılarak sıçanların, çevresel stres ve uyum problemi yaşamaması amaçlandı.

Deneyin ilk günü 1. gün olarak kabul edildi ve bu çalışmada uygulanan CP (Endoxan, Baxter -Eczacıbaşı İlaç Pazarlama, İstanbul, Türkiye) ve CGA (C3878-1g, Sigma-Aldrich, Co. Almanya) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (99,100). Ortama ve birbirlerine alışmalarını sağlamak için deneyden bir hafta önce sıçanlar aşağıda belirtildiği üzere üç gruba ayrıldı ve her bir grup ayrı kafeslere yerleştirildi.

1. Grup, Kontrol (K) grubu (n:6): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük oral gavaj ile 2 cc phosphate buffered saline (PBS) (Oksoit Limited, İngiltere) ve 7. gün tek doz i.p. 2 cc serum fizyolojik (SF) uygulandı.

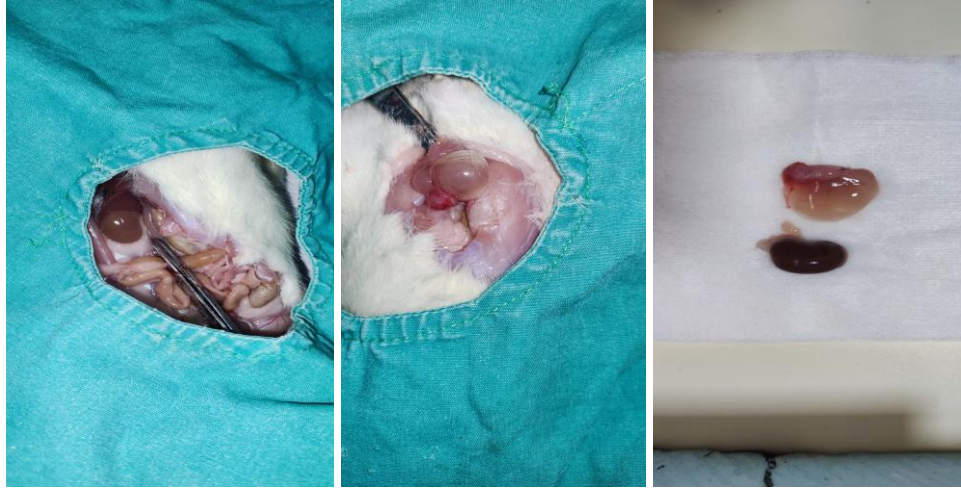
2. Grup, CP grubu (n:6): Deneyin 7. gününde 2 cc SF içinde 150 mg/kg tek doz i.p. CP uygulandı.

3. Grup, CP + CGA grubu (n:6): Deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük oral gavaj ile 2 cc PBS içinde 100 mg/kg olacak şekilde CGA ve 7. günde 2 cc SF içinde 150 mg/kg tek doz i.p. CP uygulandı (Resim 2).



Resim 2: Sıçanlara orogastrik gavaj ve intraperitoneal girişim uygulanması

Denekler, deneyin 1. günü ve sakrifikasyonun gerçekleştiği 8. günde sakrifikasyondan önce tartıldı. Deney bitiminde sıçanlar, derin anestezi altındayken (ketamin 90 mg/kg ip) dekapitasyon yoluyla sakrifiye edildi. Alınan kan örnekleri biyokimyasal parametreler için EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)'lı tüplere konuldu ve abdominal bölge orta hattın açılarak sağ böbrekleri ve mesaneleri çıkartılıp ayrı ayrı tartıldı (Resim 3). Alınan sağ böbrek ve mesanenin birer yarısı histopatolojik değerlendirme amacıyla her bir denek için numaralanarak hazırlanmış cam kavanozlardaki %10'luk formalin solüsyonuna tespit için alındı. Sağ böbreğin ve mesanenin diğer yarısı ise biyokimyasal değerlendirmeler için SF ile yıkanarak eppendorf tüplerine alınıp derin dondurucuda -80°C'de saklandı.



Resim 3: Deneklere ait böbrek ve mesane dokularının çıkarılması

3.3. Histolojik İşlemler

3.3.1. Formalin Solüsyonunun Hazırlanışı

Deneyden bir gün önce her bir denek için numaralı cam kavanozlara %10'luk formalin solüsyonu hazırlanarak konuldu. Gerekli olan %10'luk formalin hazırlanırken her 100 mililitre (ml) için ölçü kabına 10 ml formaldehit solüsyonu ve 90 ml distile su eklenmiştir.

3.3.2. Işık Mikroskobik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların histolojik takip, kesit alma ve boyama işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Uygun şekilde küçük hacimlere kesildikten sonra %10'luk formalin solüsyonuna alınan böbrek ve mesane dokuları; kasetlerin üzerine grup adı ve numaraları yazılarak 7 gün ışık almayan, kuru ve oda sıcaklığında ortamda saklandı. Ardından Tablo 4'te anlatıldığı sıra ve sürelerle tam otomatik doku takip cihazında (Thermo Scientific Exelsior AS, İngiltere) alkol ve ksilen serilerinden geçirilerek önce dehidrate edilip sonra şeffaflaştırıldı (Tablo 4). Takip cihazından alınan dokular, doku gömme cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) parafin bloklar haline getirilip oda

sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra bu bloklar, kesit alabilmek için +4 °C’ de buzdolabında soğutuldu. Soğutulan bloklardan, tam otomatik mikrotom (Leica RM 2255, Almanya) yardımı ile, bloktan dokuya ulaşana kadar önce 20 µm’lik kesitler alındı. Dokuya ulaştıktan sonra ise 4-5 µm’lik seri kesitler alınarak benmari içerisindeki 37 °C sıcak suya konuldu ve kırışıklıkların açılması beklendi. Açılan kesitler, hematoxilen eozin (H&E), PAS ve terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) boyama için suyun içerisinde ayrı lamalar üzerine alındı.

Tablo 4: Doku takip cihazında standart doku takip prosedürü

	Uygulama	Süre
1.	Formaldehit	1 saat
2.	Alkol (30°C)	50 dakika
3.	Alkol (30°C)	1 saat
4.	Alkol (30°C)	1 saat
5.	Alkol (30°C)	1 saat
6.	Alkol (30°C)	1 saat
7.	Alkol (30°C)	1,5 saat
8.	Ksilen (30°C)	1 saat
9.	Ksilen (30°C)	1 saat
10.	Ksilen (30°C)	1 saat
11.	Parafin (58°C)	1 saat
12.	Parafin (58°C)	1 saat
13.	Parafin (58°C)	1,5 saat

3.3.3 Işıık Mikroskobik İnceleme için Uygulanan Boyama Yöntemleri

H&E Boyama: Lam üzerine alınan dokular zembile dizilerek otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Leica, Almanya) Tablo 5’ deki prosedürle H&E boyası ile boyandı (Tablo 5). Boyama işleminden sonra preparatlar kapama medyumu damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Tablo 5: Boyama cihazında kullanılan H&E boyama prosedürü

	Uygulama	Süre
1.	Fırın (60°C)	45 dakika
2.	Ksilen	5 dakika
3.	Ksilen	5 dakika
4.	Ksilen	5 dakika
5.	%100 Alkol	5 dakika
6.	%96 Alkol	5 dakika
7.	%70 Alkol	5 dakika
8.	Distile Su (Yıkama)	1 dakika
9.	Hematoksilen	2 dakika
10.	Distile Su (Yıkama)	1 dakika
11.	Asit Alkol	1 saniye
12.	Distile Su (Yıkama)	1 dakika
13.	Amonyaklı Su	10 saniye
14.	Distile Su (Yıkama)	1 dakika
15.	Eozin	1,5 dakika
16.	Distile Su (Yıkama)	1 dakika
17.	%96 Alkol	5 saniye
18.	%100 Alkol	5 dakika
19.	Ksilen	5 dakika
20.	Ksilen	5 dakika

Böbrek dokularının değeriendirilmesi için H&E boyalı her bir kesitte seçilen 5 farklı alanda ışık mikroskobu ile; proksimal ve distal tübüllerde dejenerasyon, Bowman kapsülü ve glomerüllerde dejenerasyon ve böbrek dokusunda ödem ve/veya

hemoraji gibi histolojik parametreler değerlendirilerek her bir hasar için yarı kantitatif (0: Hasar yok, 1: Hafif hasar, 2: Orta derecede hasar, 3: Şiddetli hasar) skorelama yapıldı (101). Mesane dokusundaki histopatolojik değişiklikler ise Grade1; Normal epitel, dokuda ödem, ülserasyon, kanama veya herhangi bir inflamasyon yok, Grade 2: Hafif ödem ve inflamasyon, dokuda kanama veya ülserasyon yok, Grade 3: orta derecede ödem ve inflamasyon, epitelde düzleşme ve rejenerasyon, fokal ülserasyon ve hafif kanama, Grade 4: Şiddetli ödem ve inflamasyon, mukozal erozyonlar, yaygın ülserasyon ve kanama (102).

PAS Boyama: PAS boyama için hazırlanan preparatlar zembile dizilerek otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) öncelikle deparafinize edilerek PAS boyası (PAS Stain Kit RRSK15, Atom Scientific, İngiltere) ile firmanın önerileri doğrultusunda Tablo 6’ daki protokole göre manuel olarak boyanıp medyum damlatılarak lamel ile kapatıldı. Bu boyama ile boyanmış böbrek preparatlarında; böbrek tübüllerindeki bazal membran ve proksimal tübül epitel hücrelerinin fırçamsı kenarların; mesanede ise epitel yüzeyinde bulunan glikozaminoglikan tabakasının bütünlüğü değerlendirildi (103).

Tablo 6: PAS boyama protokolü

	Uygulama	Süre
1.	Periyodik Asit Schiff Çözeltisi (A)	10 dakika
2.	Distile Su (Yıkama)	2 dakika
3.	Schiff Ayırıcı McManus (B)	20 dakika
4.	Distile Su (Yıkama)	2 dakika
5.	Sodyum Metabisülfid Çözeltisi (C)	2 dakika
6.	Tespit Çözeltisi (D)	2 dakika
7.	Distile Su (Yıkama)	2 dakika
8.	Mayer Hemalum Çözeltisi (E)	3 dakika
9.	Distile Su (Yıkama)	5 dakika
10.	%70 Etanol	30 saniye
11.	%96 Alkol	30 saniye
12.	%100 Alkol	30 saniye
13.	Ksilen	1 dakika

TUNEL Boyama: Pozitif şarjlı lama alınan dokular, zembile dizilerek otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) deparafinize edildikten sonra Tablo 7’deki protokole göre TUNEL boyama tekniği ile boyandı, hematoksisilenle de zemin boyaması yapılarak lamel ile kapatıldı. Değerlendirmede TUNEL tekniği ile boyanan preparatlarda; X400 büyütmede 5 farklı alanda 100 hücre sayılarak apoptotik ve normal hücreler kaydedildi ve apoptotik indeks (AI) hesaplandı. (AI=TUNEL (+) hücre sayısı/toplam hücre sayısı x 100) (104).



Tablo 7: TUNEL boyama protokolü

	Uygulama	Özellikli Ortam	Süre
1.	Phosphate Buffered Saline (PBS)	-	2x5 dakika
2.	Hydrogen Peroxide Block (Thermo Scientific/TA-125-HP)	-	15 dakika
3.	Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
4.	PBS	-	2x5 dakika
5.	Ultra V Block (Thermo Scientific/TA-125-UB)	-	10 dakika
6.	Enzyme Solution (TdT) + Label Solution (fluorescein-dUTP) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	1,5 saat
7.	PBS	-	2x5 dakika
8.	Converter Peroxidase (antifluorescein antibody-peroxidase) (Roche/11684817910)	37 °C, nemli	30 dakika
9.	PBS	-	2x5 dakika
10.	DAB Kromojen Kit (Thermo Scientific/TA-125-HD)	Karanlık	2 dakika
11.	Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
12.	Hematoksilen	-	2 dakika
13.	Distile Su (Yıkama)	-	5 dakika
14.	%70 Etanol	-	5 dakika
15.	%96 Etanol	-	5 dakika
16.	%100 Etanol	-	5 dakika
17.	Ksilen	-	5 dakika

3.4. Böbrek ve Mesane Dokusunun Biyokimyasal Değerlendirmesi

Doku Örneklerinin Hazırlanışı

Böbrek ve mesaneden alınan dokuların her birinden yaklaşık 30'ar mg'lık kesimler yapıldı. Sonrasında bu dokular homejenizatör (IKA Ultra-Turrax T-25, Staufen im Breisgau, Almanya) yardımıyla 2 mL fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içerisinde 9500 rpm'de homojenize edildi. Homojenatlar 1800xg'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlarda MDA, SOD, CAT, GSH, TNF- α , MPO, TOS (Total oksidan seviyesi), TAS (Total antioksidan seviyesi) parametrelerin ölçümü gerçekleştirildi.

Doku örneklerindeki protein miktarları üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ticari kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, Cat No: 23227, Rockford, IL, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dokularda MDA ve ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kitleri kullanılarak ölçülen tüm biyokimyasal parametrelerin seviyeleri, standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak "mg protein" başına olacak şekilde verildi.

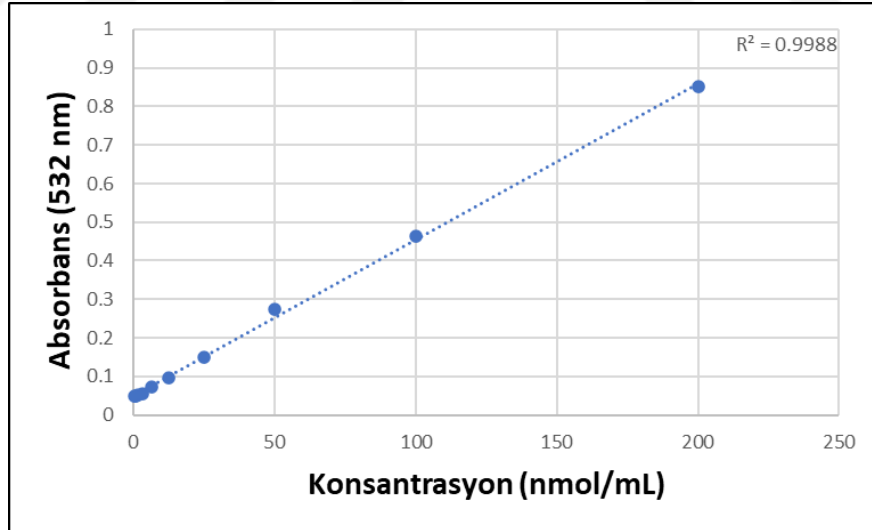
MDA Düzeylerinin Belirlenmesi: MDA ölçümü, Mihara ve Uchiyama yönteminde modifikasyon yapılarak gerçekleştirildi. Bu metot ile, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu sonucu oluşan molekül renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülür.

Doku MDA ölçümünde ilk olarak doku homojenizasyon tamponu hazırlandı. Fosfat tampon çözeltisinden (PBS) 0.01 M hazırlamak için; 900 mL saf su bulunan behere 10 adet PBS tableti (Medicago, Uppsala, İsveç) eklenerek çözülmesi sağlandı. Çözeltinin pH'ı, pH metrede (Hanna Instrument, HI9321, ABD) 7.4'e ayarlanıp çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Başka bir beherde %1'lik H₃PO₄ (Fosforik asit) çözeltisi hazırlamak için 20 mL saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H₃PO₄ (Sigma, St. Louis, MO, ABD) ilave edilerek son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

TBA çözeltisi hazırlamak için ilk olarak 0.67 g TBA (Sigma, St. Louis, MO, ABD) tartıldı. TBA, 50 mL saf su ve 50 mL asetik asit (Sigma, St. Louis, MO, USA) ile magnetik bar yardımıyla karıştırılarak çözme işlemi tamamlandı. Son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

Standart çözeltiler hazırlamak için 0.01 M 50 mL HCl (Sigma, St. Louis, MO, ABD) çözeltisine 82.5 µL 1,1,3,3 tetrametoksipropan (Sigma, St. Louis, MO, ABD) eklenerek çözelti 50 °C’de 1 saat bekletildi. Hazırlanan ana stok çözeltisinden çeşitli oranlarda dilüsyonlar yapılarak; 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78 ve 0.39 nmol/mL’lik standart çözeltiler ve kör hazırlandı.

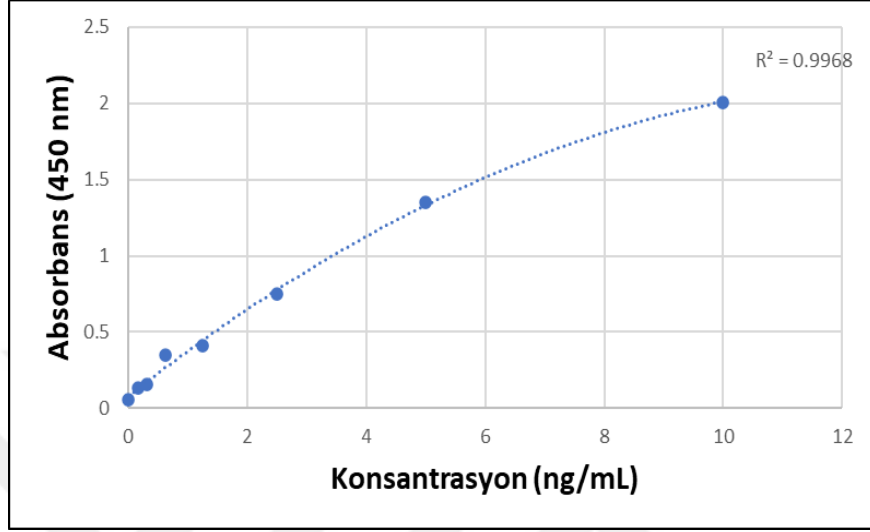
Doku MDA ölçümü için ise 500 µL homojenata 3 mL %1’lik H₃PO₄ eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan karışıma 1 mL %0.672’lik TBA eklenip karıştırılarak 60 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Süre sonunda tüpler oda sıcaklığında soğutularak 1800xg’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımlardan 200’er µL alındı. Mikropleyt okuyucu ile spektrofotometrede (Versamax, Molecular Devices, California, ABD) 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapmak için 96 kuyucuklu pleyte alınan süpernatant koyuldu. Elde edilen standart absorbans sonuçları ile konsantrasyon verileri grafiğe geçirilerek MDA standart grafiği oluşturuldu (Şekil 6). Bu grafikten ve dokulardaki protein miktarından yararlanılarak doku MDA düzeyleri nmol MDA/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 6: Doku MDA ölçümünde kullanılan standart grafiği

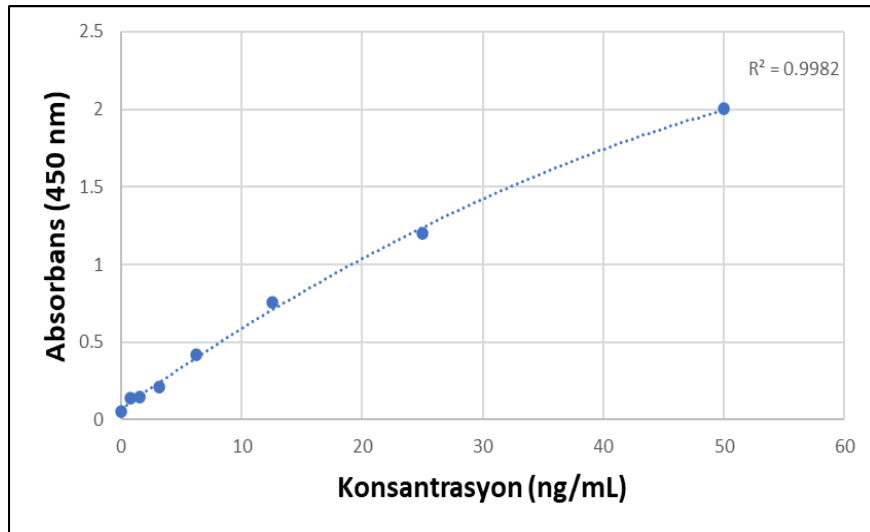
Doku SOD Enzim Seviyelerinin Belirlenmesi: Doku örneklerinde SOD enzim seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem,

Cat No: BLS-8178Ra, Boston, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 7’de gösterildi.



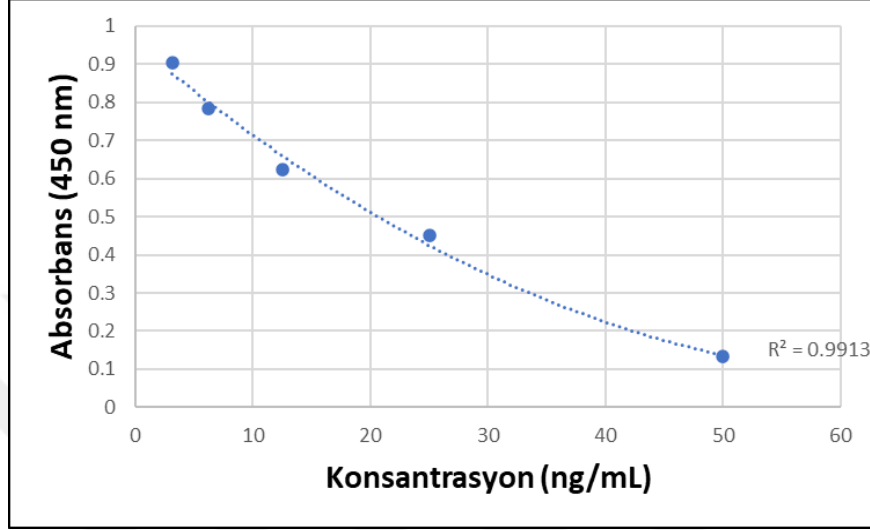
Şekil 7: Doku SOD ölçümünde kullanılan standart grafiği

Doku CAT Seviyelerinin Belirlenmesi: Doku örneklerinin CAT seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Cat No: BLS-5986Ra, Boston, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 8’de gösterildi.



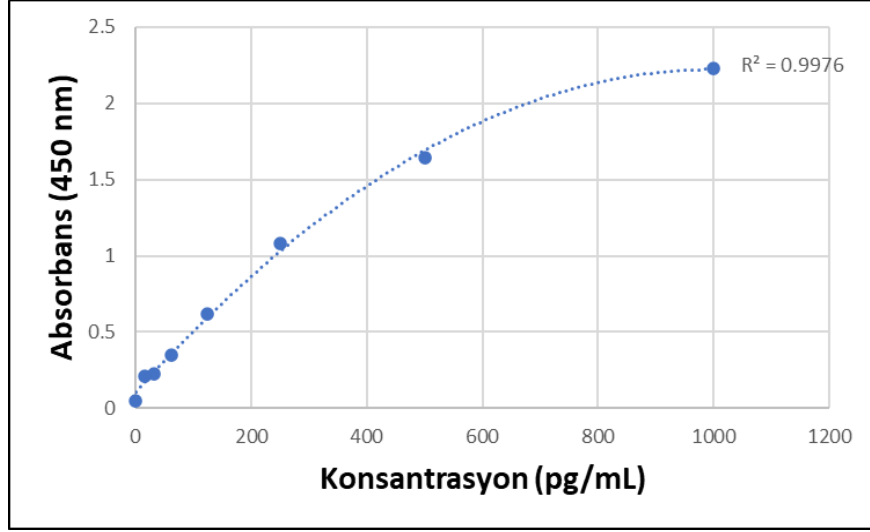
Şekil 8: Doku CAT ölçümünde kullanılan standart grafiği

Doku GSH Seviyelerinin Belirlenmesi: Doku örneklerinin GSH seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Cat No: BLS-8577Ra, Boston, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 9’da gösterildi.



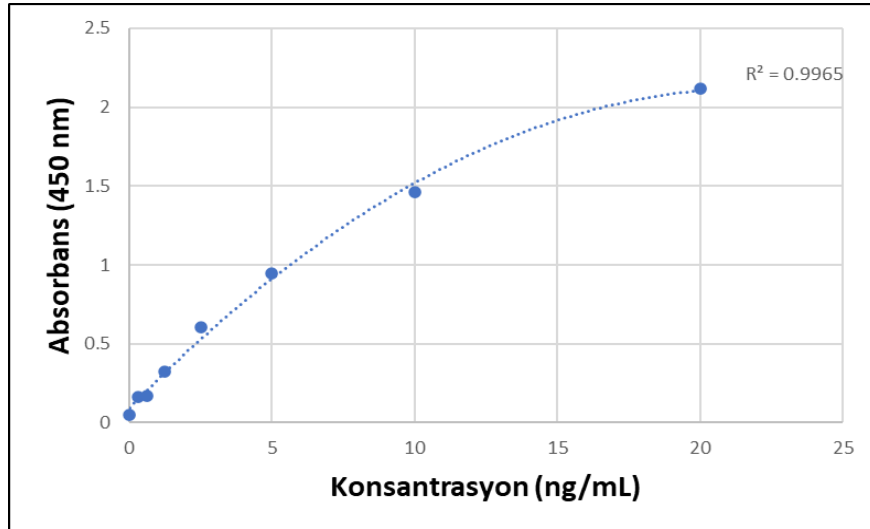
Şekil 9: GSH ölçümünde kullanılan standart grafiği

Doku TNF- α Seviyelerinin Belirlenmesi: Doku örneklerinin TNF- α seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Cat No: BLS-1396Ra, Boston, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar pg/mg protein birimiyle verildi. TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 10’da gösterildi.



Şekil 10: TNF- α ölçümünde kullanılan standart grafiği

Doku MPO Seviyelerinin Belirlenmesi: Doku örneklerinin MPO seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda ELISA kit (Bostonchem, Cat No: BLS-1661Ra, Boston, ABD) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar ng/mg protein birimiyle verildi. MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği Şekil 11’de gösterildi.



Şekil 11: MPO ölçümünde kullanılan standart grafiği

Total Oksidan Durumun (TOS) Belirlenmesi: Doku örneklerindeki TOS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0024, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri/L birimiyle verildi.

Total Antioksidan Durumun (TAS) Belirlenmesi: Doku örneklerindeki TAS seviyeleri, üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kolorimetrik kit (Rel Assay Diagnostics, Cat No: RL0017, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi ve sonuçlar mmol troloks eşdeğeri/L birimiyle verildi.

Oksidatif Stres İndekslerinin (OSİ) Hesaplanması: Doku örneklerindeki OSİ seviyeleri; $OS = [(TOS, \mu\text{mol eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol troloks eşdeğeri/L})] \times 100$ formülü kullanılarak hesaplandı (106).

3.5. İstatiksel Analiz

İstatistiksel olarak grupların veri analizi IBM SPSS versiyon 23.0 kullanılarak yapıldı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Gruplar arası istatistiksel fark Kruskal Wallis Testi ile normal dağılıma uymayan ikiden fazla parametrenin değerlendirilmesi Mann Whitney U testi ile yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Deneklerin Vücut, Böbrek ve Mesane Ağırlıkları

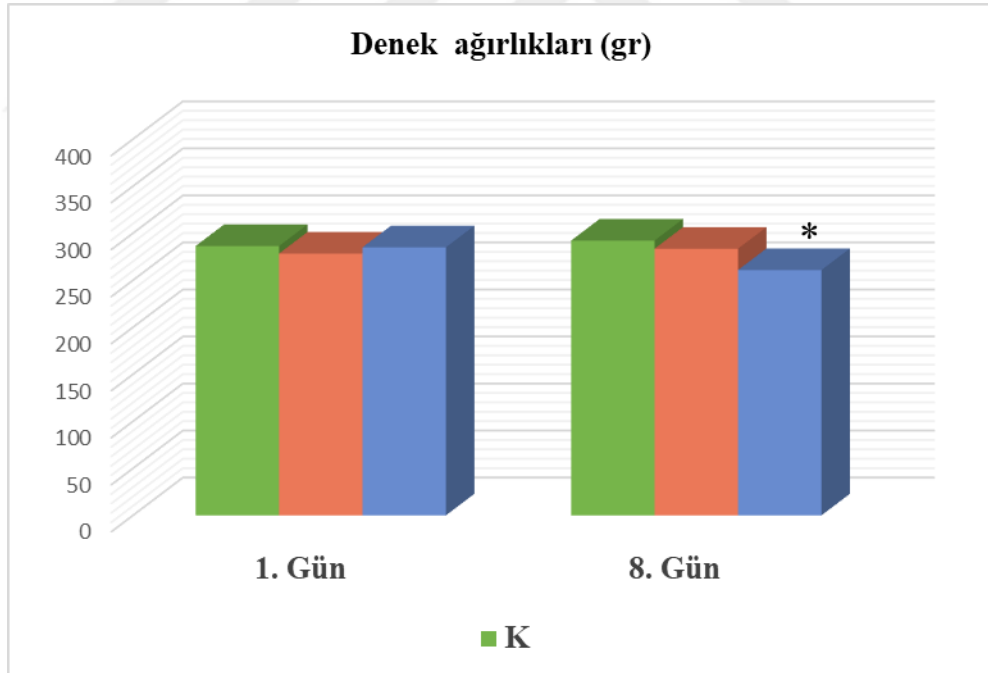
Deneklerde, ilk gün yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark mevcut değildi. Deneyin 8. gününde yani deney sonunda yapılan vücut ağırlık ölçümleri değerlendirildiğinde CP+CGA grubunda K grubuna göre azalma olduğu gözlemlendi. ($p<0,02$) (Tablo 8) (Şekil 12).

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
Deneyin 1. Günü	286,33±23,03	278,33±11,69	285±22,80
Deneyin 8. Günü	292,16±24,29	283,5±20,81	260,83±17,27*

*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (Ort. $\pm$ SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu

Tablo 8: Deney gruplarına ait deneklerin günlere göre ağırlık değişimi



Şekil 12: Deney gruplarına ait deneklerin günlere göre ağırlık değişimi (K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu)

Deney esnasında eksize edilip tartılan böbrek ve mesane dokularının ağırlıkları değerlendirildiğinde; CP grubunda K grubuna göre istatistiksel olarak fark

yaratmasa da bir artış mevcuttu. CP+CGA grubunda ise CP grubuna kıyasla böbrek ve mesane ağırlıklarında azalma olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,04$ ve $p<0,01$). CP+CGA grubu mesane dokularının ağırlıkları, K grubuna göre de düşüktü ($p<0,01$) (Tablo 9) (Şekil 13).

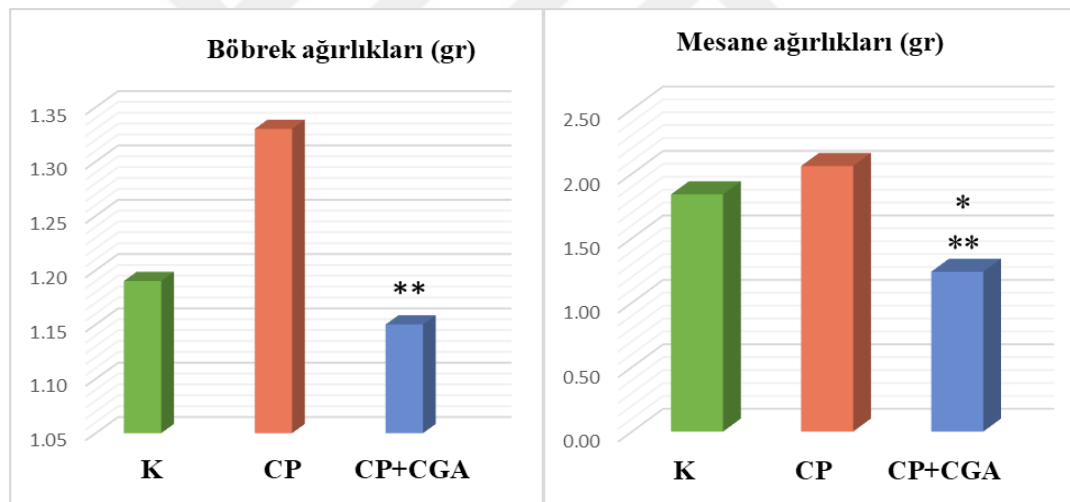
Tablo 9: Deneklerin böbrek ve mesane ağırlık verileri

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
Sağ Böbrek Ağırlığı	1,19±0,09	1,33±1,14	1,15±0,10**
Mesane Ağırlığı	1,84±0,13	2,06±0,33	1,24±0,25*, **

*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

**CP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



Şekil 13: Deney gruplarına göre deneklerin böbrek ve mesane ağırlıkları

4.2. Histolojik Bulgular

4.2.1. H&E Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgu ve Skorlar

Böbrek dokusuna ait H&E ile boyalı histolojik kesitlerin incelemesinde; K grubunda; Bowman kapsülü, glomerül, proksimal ve distal tübül yapıları normal görünümde izlendi (Resim 4, 5). CP grubuna ait böbrek kesitlerinde; K ve CP+CGA grubuna kıyasla tübüller ve glomerüllerde dejenerasyon, ödem ve hemorajide belirgin bir artış mevcuttu. Tübül epitelinde vakuoler değişiklikler, dejenerasyon ve

konjesyon izlendi (Resim 6, 7). CP+CGA grubunda ise CP grubunda görülen tübüler dejenerasyon, ödem, hemoraji ve glomerüler dejenerasyon nispeten azalmıştı (Resim 8, 9).

Böbrek dokusu histopatolojik skorlamasında; CP grubunda K grubuna göre tübüler dejenerasyon, glomerüler dejenerasyon, ödem ve hemorajide istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi (hepsi için $p<0,01$). CP+CGA grubunda da K grubuna göre tübüler dejenerasyon, glomerüler dejenerasyonda artış mevcuttu (sırasıyla $p<0,02$ ve $p<0,01$). Ancak CP+CGA grubunda; tübüler dejenerasyon, glomerüler dejenerasyon, ödem ve hemoraji gibi tüm patolojiler için CP grubuna göre azalma olduğu görüldü (hepsi için $p<0,02$) (Tablo 10) (Şekil 14).

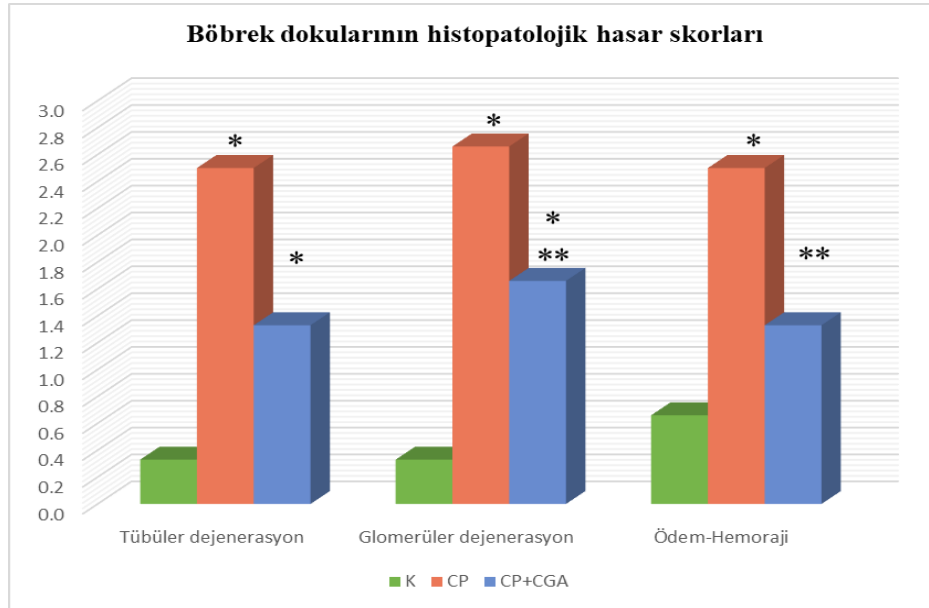
Tablo 10: Böbrek dokularının histopatolojik skorları

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
Tübüler Dejenerasyon	0,33±0,51	2,5±0,54*	1,33±0,51*,**
Glomerüler Dejenerasyon	0,33±0,51	2,66±0,51*	1,66±0,51*,**
Ödem-Hemoraji	0,66±0,81	2,5±0,54*	1,33±0,81**

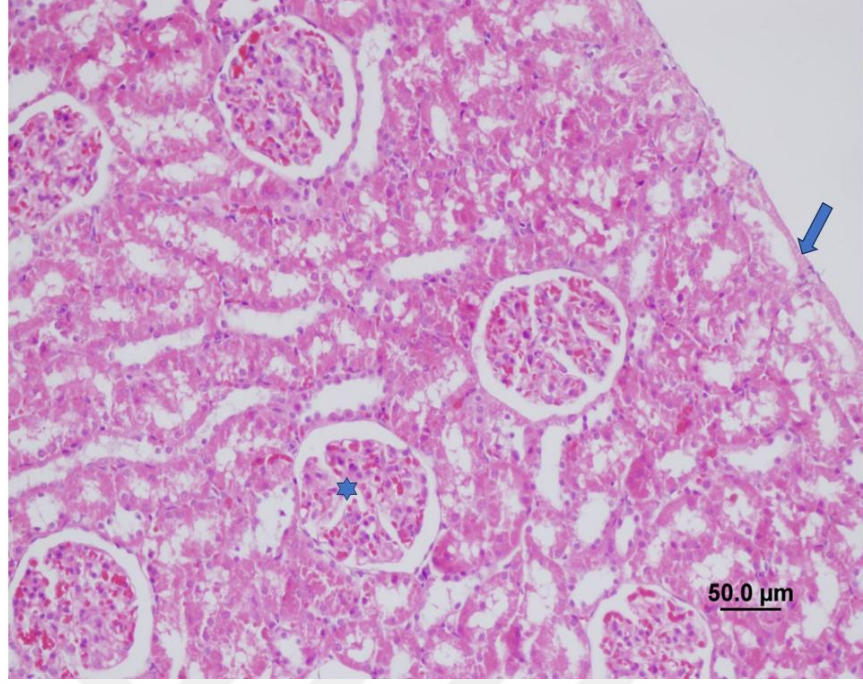
*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

**CP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

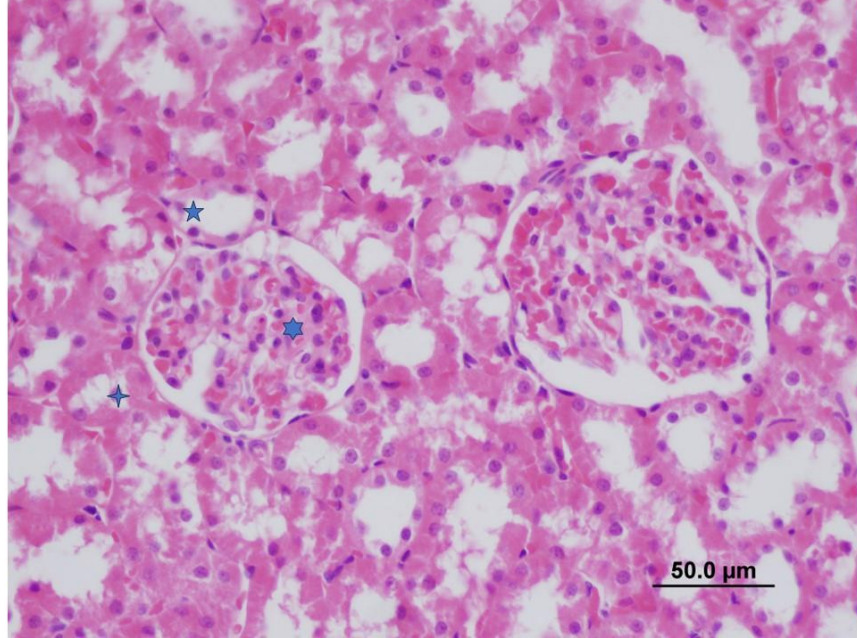
Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



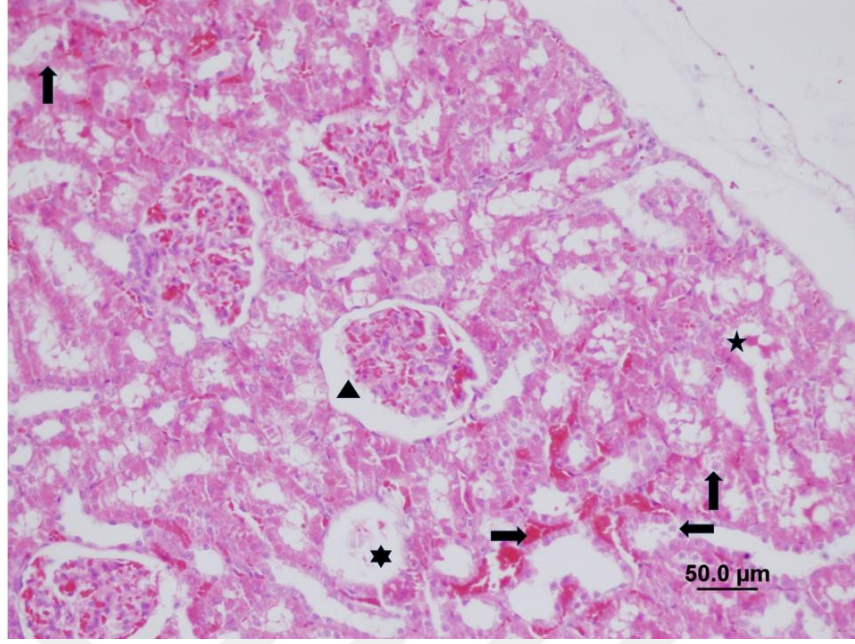
Şekil 14: Deney gruplarına ait böbrek dokularının histopatolojik hasar skorları



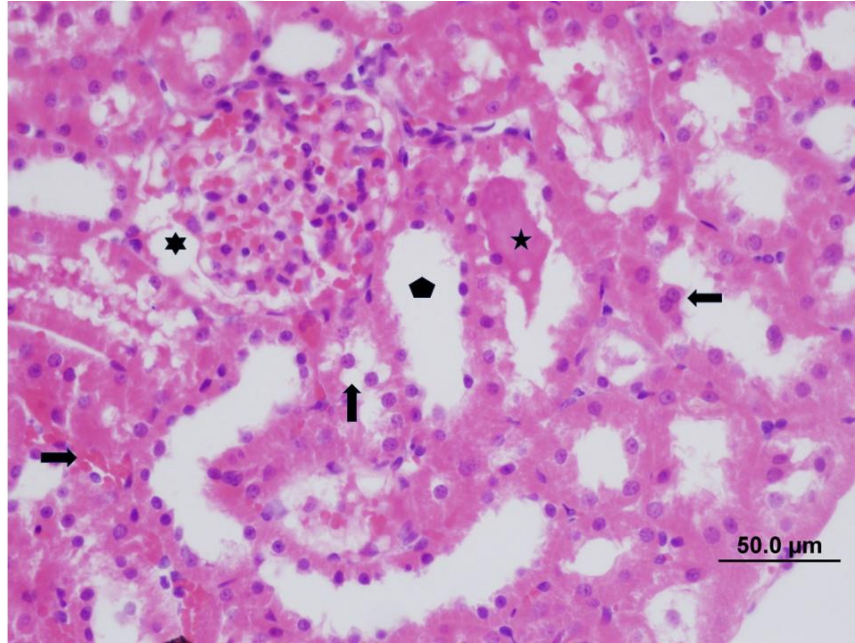
Resim 4: K grubuna ait böbrek kesiti. Böbrek cisimciği (mavi renkli altı uçlu yıldız), ve kapsül yapısı (mavi renkli ok) normal görünümde izlendi (H&E, X200).



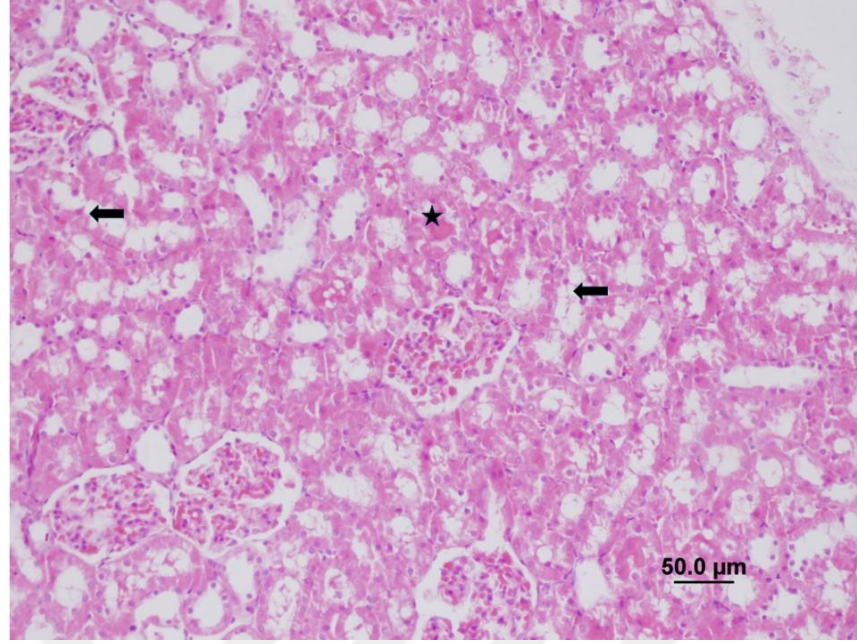
Resim 5: K grubuna ait böbrek kesiti. Böbrek cisimciği (mavi renkli altı uçlu yıldız), distal tübül (mavi renkli beş uçlu yıldız) ve proksimal tübül (mavi renkli dört uçlu yıldız) yapıları normal görünümde izlendi (H&E, X400).



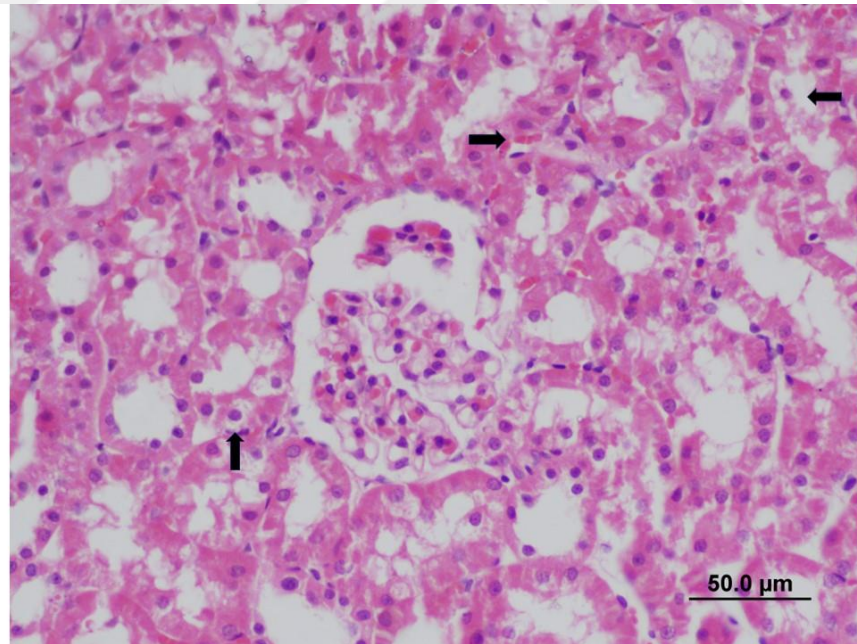
Resim 6: CP grubuna ait böbrek dokusu. Glomerüllerde dejenerasyon (altı uçlu yıldız), Bowman boşluğunda genişleme (üçgen), tübül epitelinde vakuolizasyon (yukarı ok), dökülme ve dejenerasyon (sola ok), cast formasyonu (beş uçlu yıldız) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) gözlemlendi (H&E, X200).



Resim 7: CP grubuna ait böbrek dokusu. Glomerüllerde dejenerasyon (altı uçlu yıldız), tübülde genişleme (beşgen) ve epitelinde dökülme, dejenerasyon (sola ok), vakuolizasyon (yukarı ok), cast formasyonu (beş uçlu yıldız) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) gözlenmektedir (H&E, X400).



Resim 8: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu. Tübül epitelinde dökülme ve dejenerasyon (sola ok), tübülde cast formasyonu (beş uçlu yıldız) azalmıştı (H&E, X200).



Resim 9: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu. Siklofosfamid grubuna kıyasla tübül epitelinde dökülme ve dejenerasyon (sola ok), vakuolizasyon (yukarı ok) ve intertübüler hemoraji (sağa ok) daha az izlendi (H&E, X400).

Mesane dokusuna ait H&E ile boyalı histolojik kesitlerin incelemesinde; K grubunun mesanelerinin mukoza tabakasını oluşturan epitel ve hemen altında yer alan lamina propria normal görünümdeydi (Resim 10). CP grubuna ait mesane kesitlerinde K ve CP+CGA grubuna kıyasla belirgin olarak mesane mukozasında ödem, hemoraji, ülserasyon ve inflamatuvar hücre artışı, epitelde dökülme ve dejenerasyon görüldü (Resim 11). CP+CGA grubunda, CP grubunda görülen tüm bu patolojik bulgular, nispeten daha hafiflemişti (Resim 12).

Mesane dokusunda yapılan histopatolojik hasar skorlamasında ise; CP ve CP+CGA gruplarına ait hasar skorları K grubuna göre yüksek bulundu (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,01$). Ancak CP+CGA grubunun hasar skoru CP grubuna kıyasla belirgin olarak düşüktü ($p<0,01$) (Tablo 11) (Şekil 15).

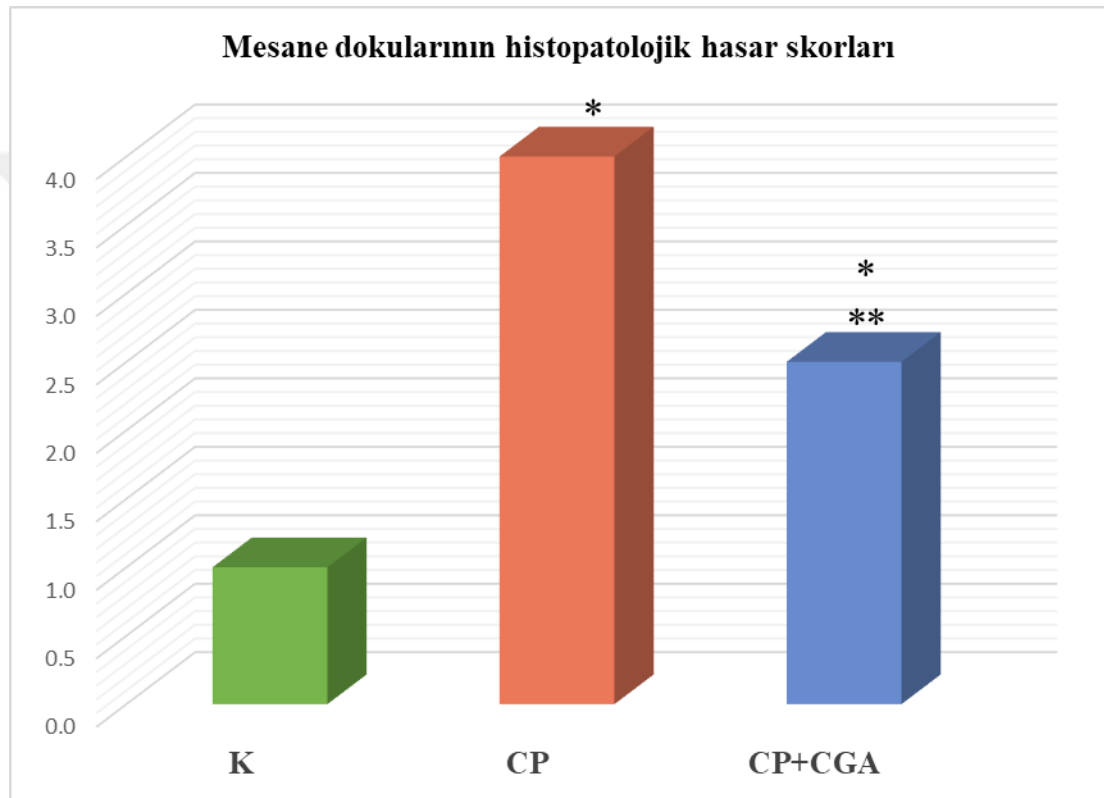
Tablo 11: Mesane dokularının histopatolojik skorları

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
Histopatolojik hasar skoru	1±0,0	4±0,0*	2,5±0,54*,**

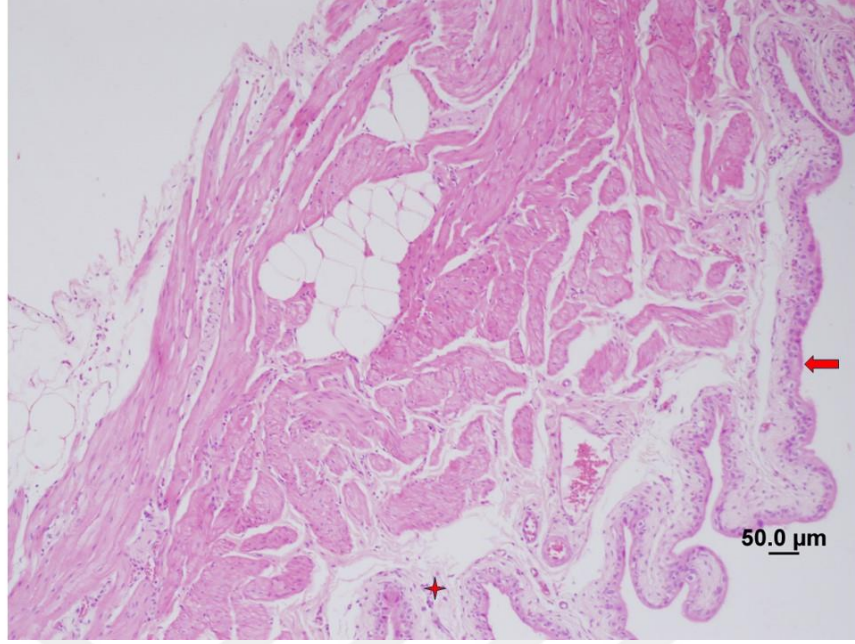
*K grubuna göre anlamlı (p<0,05)

**CP grubuna göre anlamlı (p<0,05)

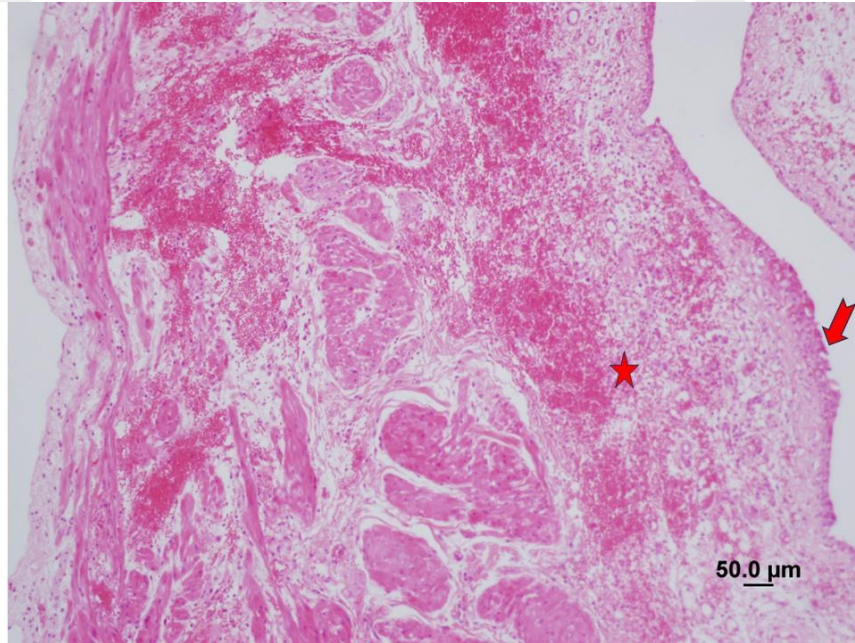
Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



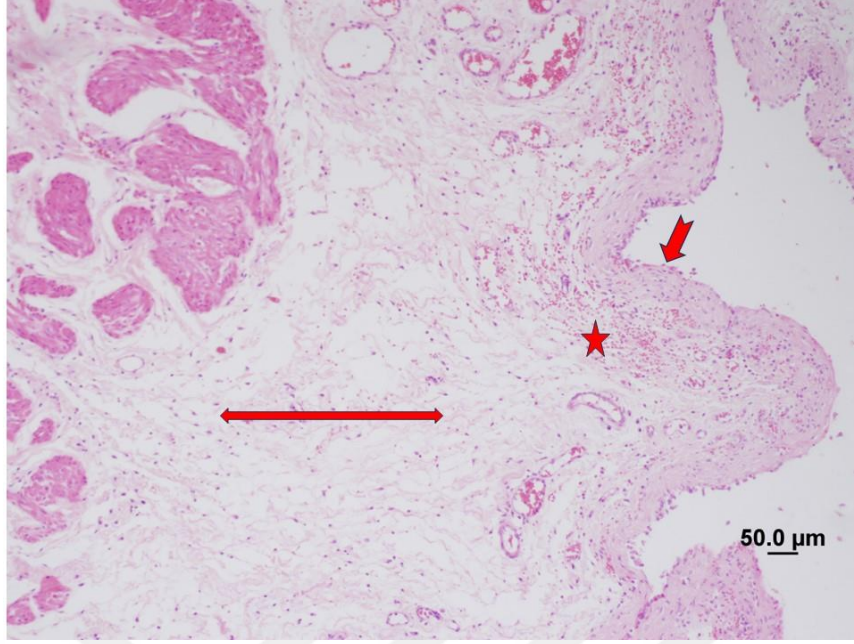
Şekil 15: Deney gruplarına ait mesane dokularının histopatolojik hasar skorları



Resim 10: K grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epiteli (kırmızı sola ok) ve lamina propria (kırmızı dört uçlu yıldız) normal histolojik görünümüne sahipti (H&E, X100).



Resim 11: CP grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epitelinde dökülme (kırmızı çentikli ok), lamina propriada yoğun hemoraji, inflamatuvar hücre artışı ve ödem (kırmızı beş uçlu yıldız) izlenmektedir (H&E, X100).

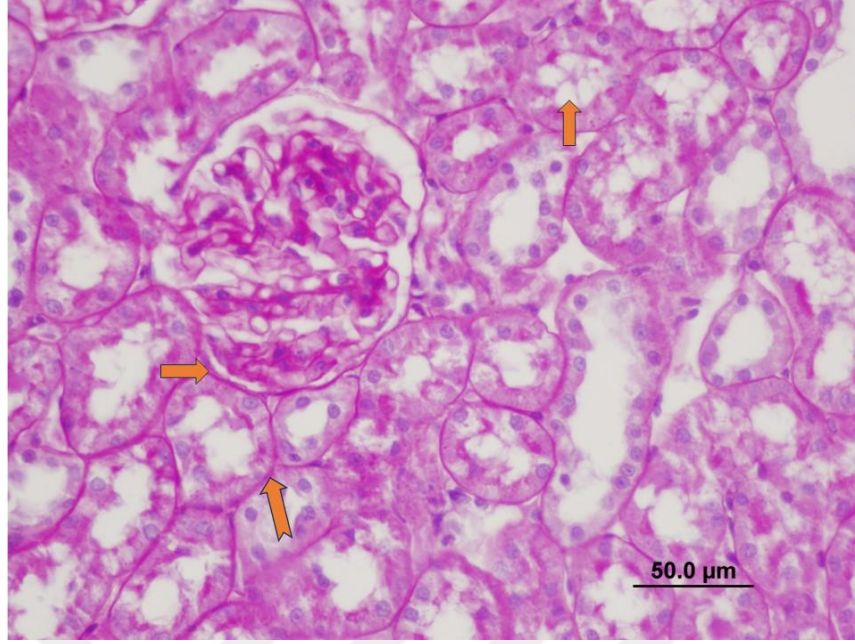


Resim 12: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu H&E boyama. Mesane epitelinde dökülme (kırmızı çentikli ok), lamina propriada ödem (kırmızı çift uçlu ok) ve hemoraji (kırmızı beş uçlu yıldız) izlenmektedir (H&E, X100).

4.2.2. PAS Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgular

Böbrek dokusunun PAS yöntemi ile boyanan kesitlerinin incelemesinde de H&E ile boyalı kesitlere benzer bulgular mevcuttu. K grubuna ait böbrek kesitlerinde; glomerül, proksimal ve distal tübül yapıları normal görünümde olup PAS (+) boyanan Bowman kapsülü paryetal yaprağı, tübül bazal membranları, proksimal tübül fırçamsı kenarları düzenli ve normaldi (Resim 13). CP grubuna ait böbrek kesitlerinde ise glomerüllerde dejenerasyon, Bowman aralığında genişleme, tübül epitelinde dökülme ve vakuolizasyon mevcuttu. İlave olarak PAS (+) boyanan Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma-ayrılma, tübül bazal membranlarında düzensizlikler ve proksimal tübülde fırçamsı kenar kayıpları belirgindi (Resim 14). CP+CGA grubunda ise PAS (+) yapılarda görülen değişiklikler ve tüm patolojiler CP grubuna kıyasla azaldı (Resim 15).

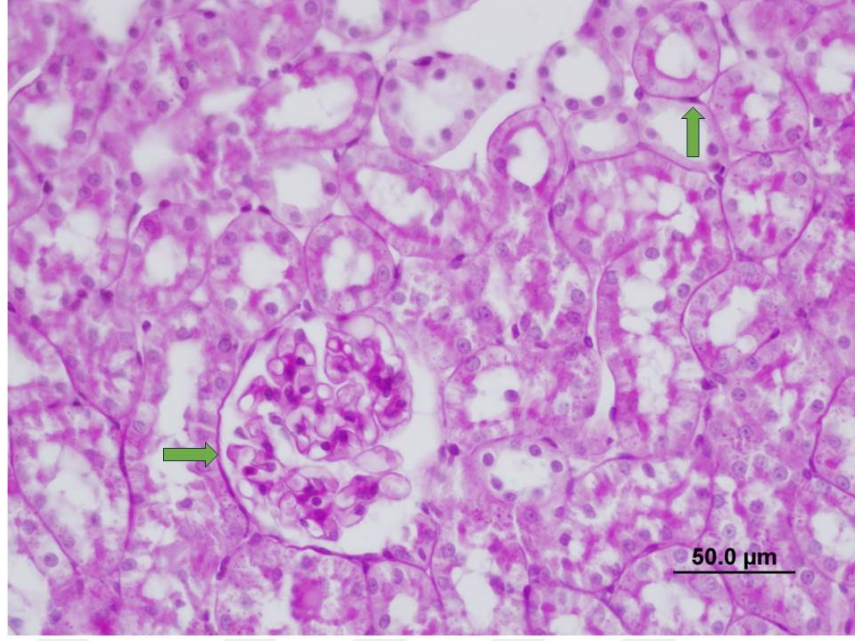
Mesane dokusunun PAS yöntemi ile boyanan kesitlerinde de H&E boyalı kesitlere benzer şekilde K grubuna ait mesane mukoza epiteli ve üzerindeki PAS (+) boyanan GAG tabakası kesintisiz ve düzgün görünümde izlendi (Resim 16). CP grubuna ait mesane epitelinde dökülme, GAG tabakasında belirgin bölgesel kayıplar mevcuttu (Resim 17). CP+CGA grubunda ise epitelin ve PAS (+) GAG tabakasının CP grubuna kıyasla daha düzenli olduğu ve daha fazla devamlılık arz ettiği görüldü (Resim 18).



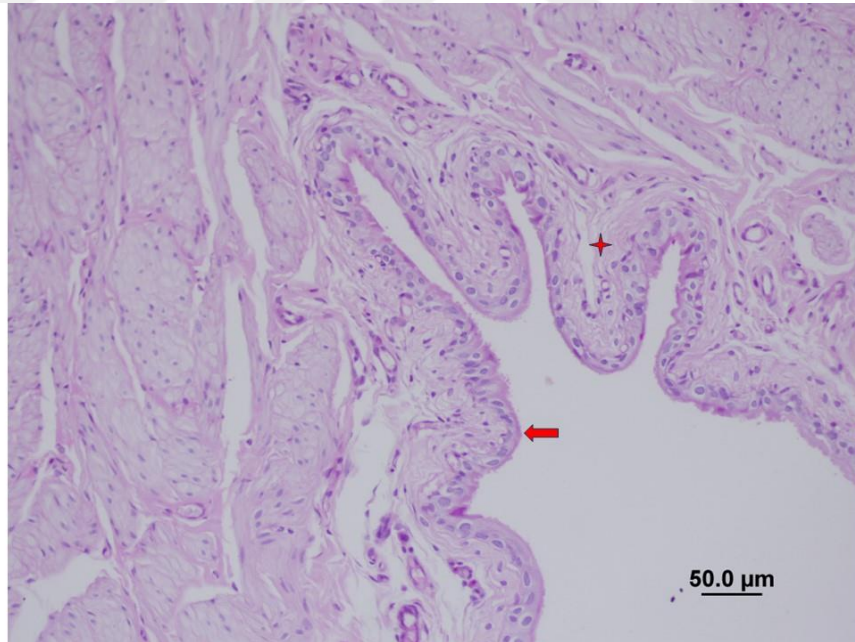
Resim 12: K grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Tübül bazal membranları (turuncu çentikli ok), proksimal tübül fırçası kenarları (turuncu yukarı ok) ve Bowman kapsülü paryetal yaprağı (turuncu sağa ok) düzenli görünümde izlenmektedir (PAS, X400).



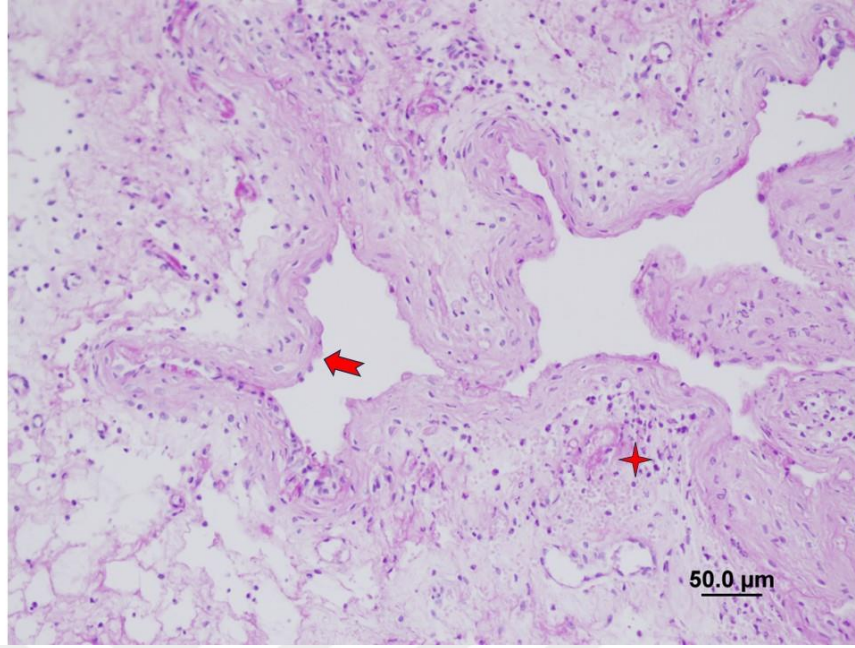
Resim 13: CP grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma-ayrılma (yeşil sağa ok) tübül bazal membranında düzensizlikler (yeşil yukarı ok) ve proksimal tübülde fırçası kenar kayıpları (yeşil çentikli ok) izlenmektedir (PAS, X400).



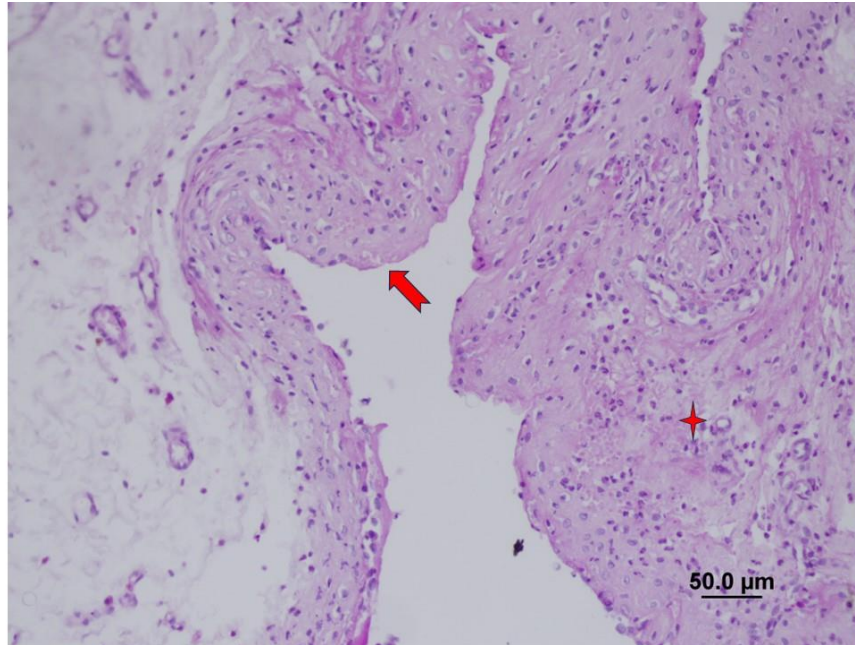
Resim 14: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu PAS boyama. Bowman kapsülü paryetal yaprağı (yeşil sağa ok) ve tübül bazal membranı (yeşil yukarı ok) CP grubuna kıyasla daha düzgün görünümdeydi (PAS, X400).



Resim 15: K grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epiteli ve üzerinde GAG tabakası (kırmızı sola ok), lamina propria (kırmızı dört uçlu yıldız) normal histolojik görünümüne sahipti (PAS, X200).



Resim 16: CP grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epitelinde dökülme, dejenerasyon ve yer yer GAG kaybı (kırmızı çentikli ok), lamina propriada yoğun ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre artışı (kırmızı dört uçlu yıldız) izlenmektedir (PAS, X200).



Resim 17: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu PAS boyama. Mesane epitelinde dökülme ve dejenerasyon (kırmızı çentikli ok), lamina propriada ödem, hemoraji ve inflamatuvar hücre (kırmızı dört uçlu yıldız) görülmekle birlikte CP ye göre azalmıştı (PAS, X200).

4.2.3. TUNEL Yöntemi ile Boyanan Kesitlerdeki Histolojik Bulgular

TUNEL boyalı preparatlarda yapılan apoptoz değerlendirmesi sonucunda; CP grubunun böbrek ve mesane dokularındaki apoptotik indeks (AI) K grubuna göre anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,01$ ve $p<0,01$). Hem mesane hem de böbrek dokularında CP+CGA grubunda da K grubuna göre AI'da artış mevcuttu ($p<0,02$, $p<0,02$). Ancak CP+CGA grubunun böbrek ve mesane dokularının AI değeri, CP grubuna göre belirgin olarak azaldı ($p<0,01$ ve $p=0,04$) (Tablo 12) (Resim 19-24) (Şekil 16).

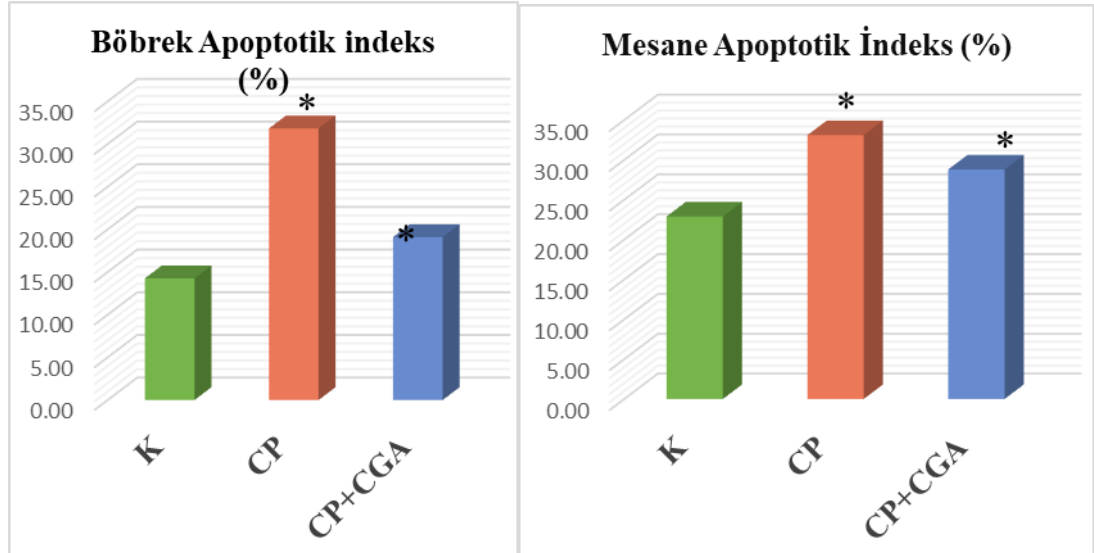
Tablo 12: Deney gruplarına ait böbrek ve mesane dokularındaki apoptotik indeks (%)

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
Böbrek Dokusunda Apoptotik İndeks (%)	14,26±1,81	31,83±4,51*	19,10±3,14*,**
Mesane Dokusunda Apoptotik İndeks (%)	22,90±3,91	33,10±4,06*	28,80±1,95*,**

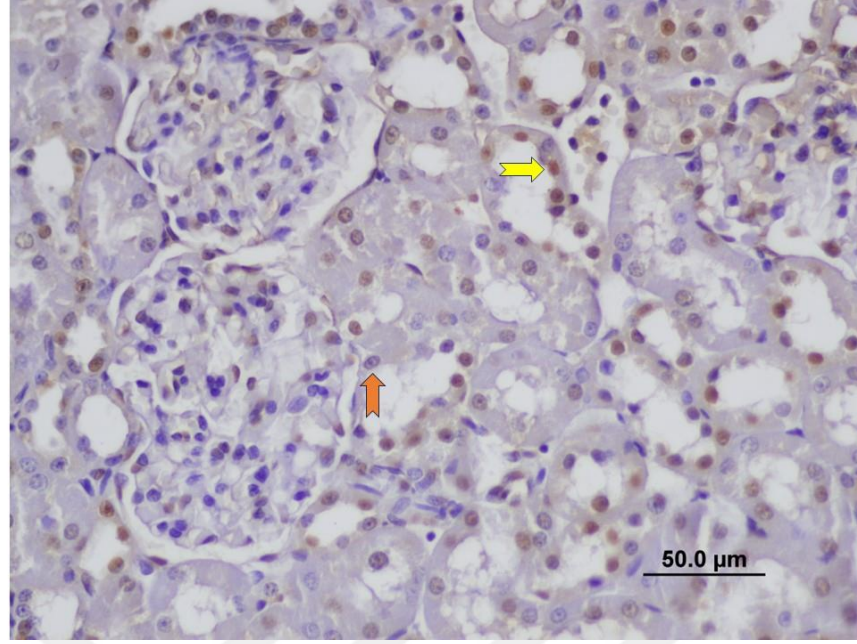
*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

**CP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

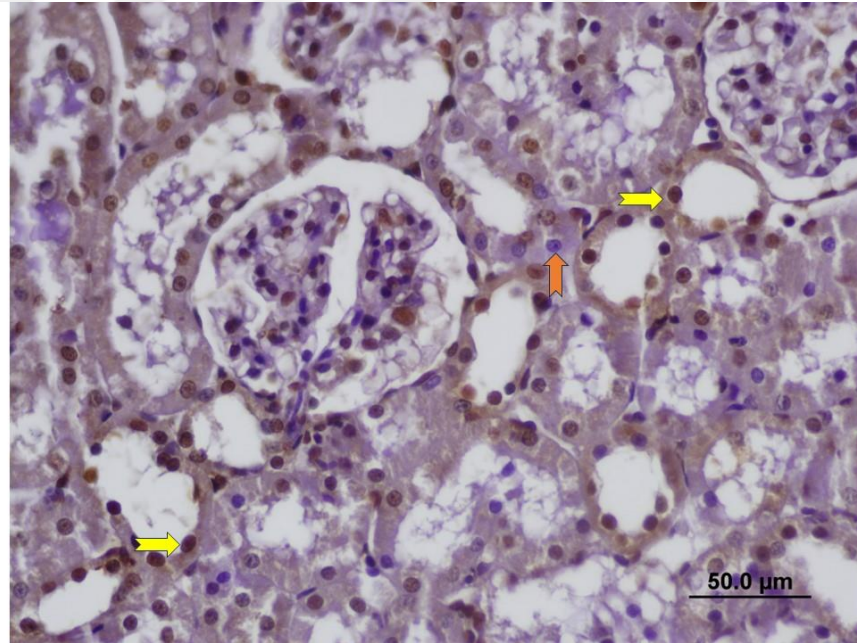
Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



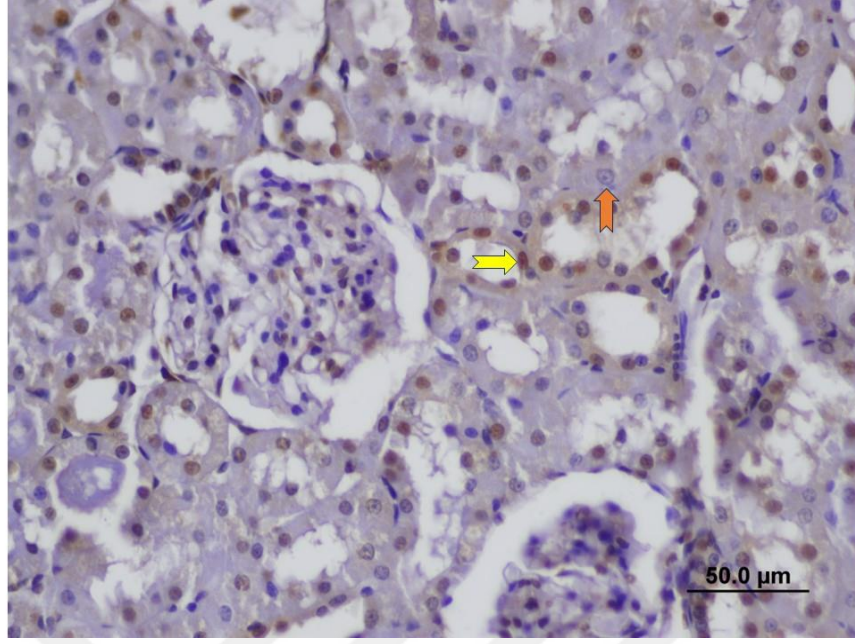
Şekil 16: Böbrek ve mesane dokusunda apoptotik indeks (%)



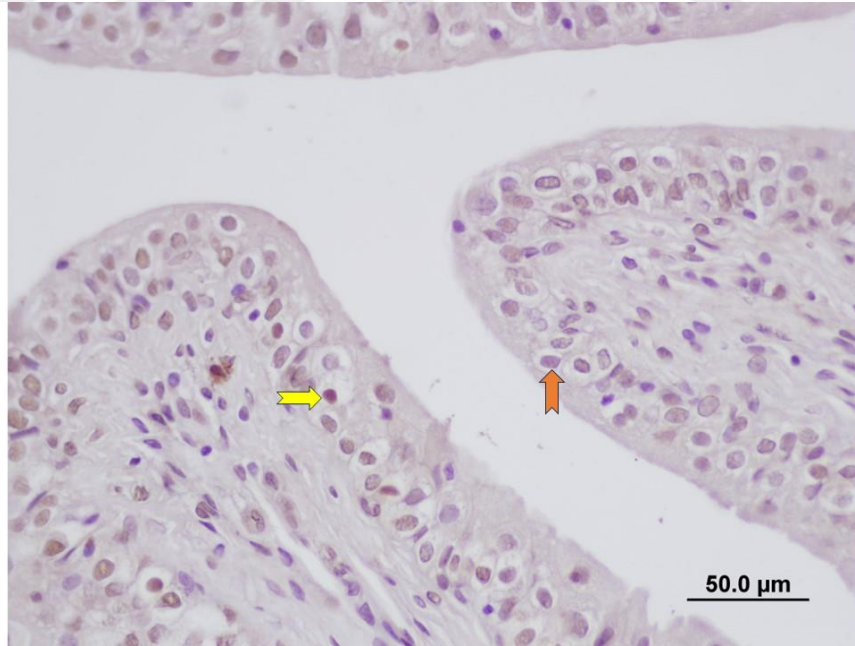
Resim 18: K grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).



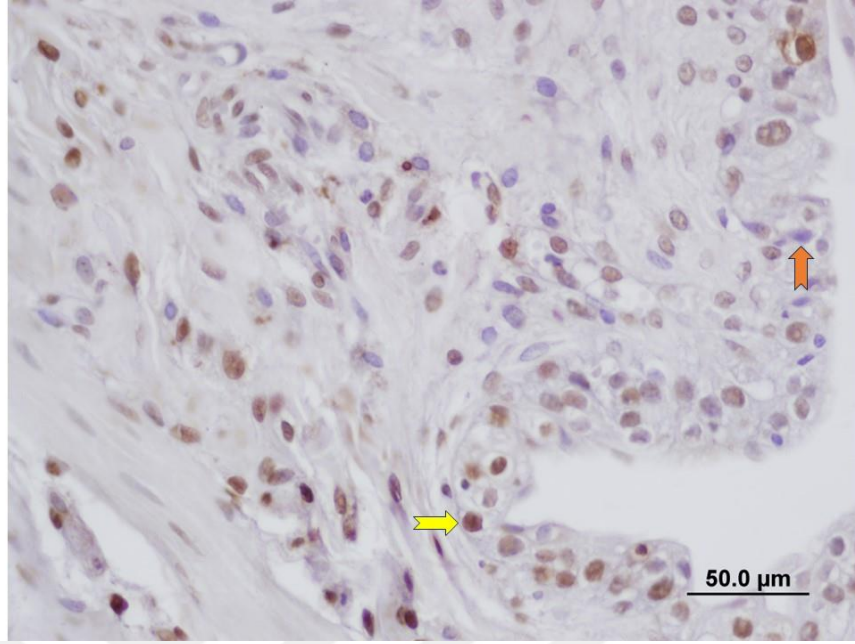
Resim 19: CP grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve artmış TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).



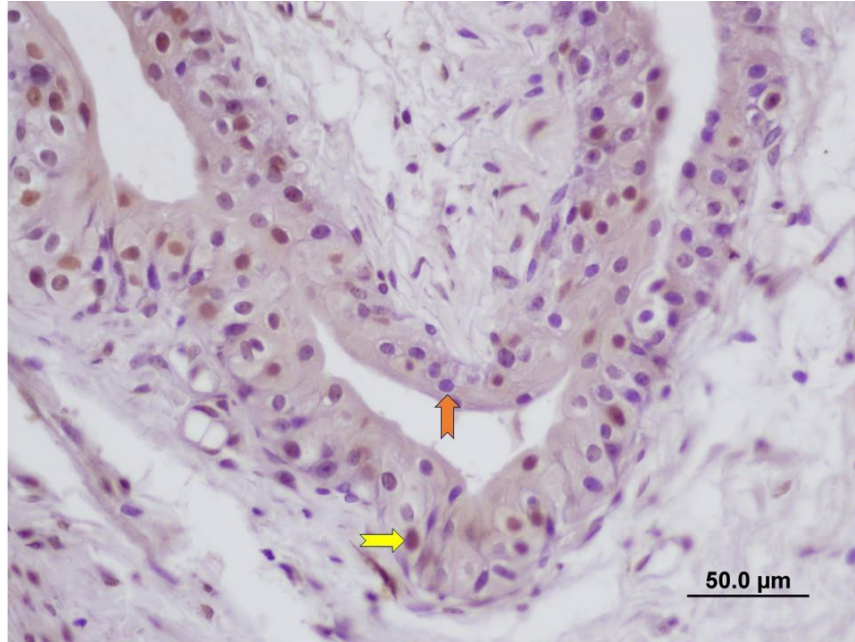
Resim 20: CP+CGA grubuna ait böbrek dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) (turuncu çentikli ok) hücreler ve CP grubuna göre azalmış TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 21: K grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok), TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 22: CP grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve artmış sayıda TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 23: CP+CGA grubuna ait mesane dokusu TUNEL boyama. TUNEL (-) hücreler (turuncu çentikli ok) ve CP grubuna göre azalmış sayıda TUNEL (+) hücreler (sarı çentikli ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).

4.3. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları

4.3.1. Serum Biyokimyası

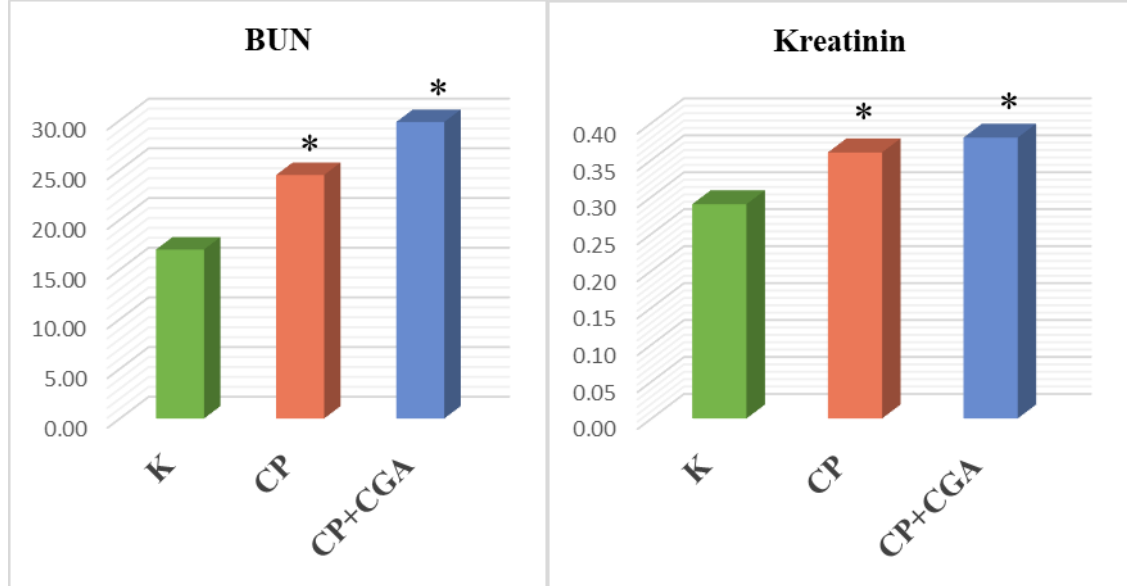
Deneklerden alınan serum üre, kreatinin sonuçları değerlendirilmiş ve Tablo 13'te gösterilmiştir. CP ve CP+CGA gruplarında BUN ve kreatinin değerleri K grubuna göre yüksekti ($p<0,01$ ve $p<0,01$) (Şekil 17).

Tablo 13: Deney gruplarına ait serum BUN ve kreatinin değerleri

	K Ort±SD	CP Ort±SD	CP+CGA Ort±SD
BUN	17±1,26	24,50±3,67*	29,83±7,85*
Kreatinin	0,29±0,014	0,36±0,033*	0,38±0,06*

*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Veriler, ortalama ± standart sapma (Ort.± SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



Şekil 17: Grupların serum BUN ve kreatinin değerleri

4.3.2. Doku Biyokimyası

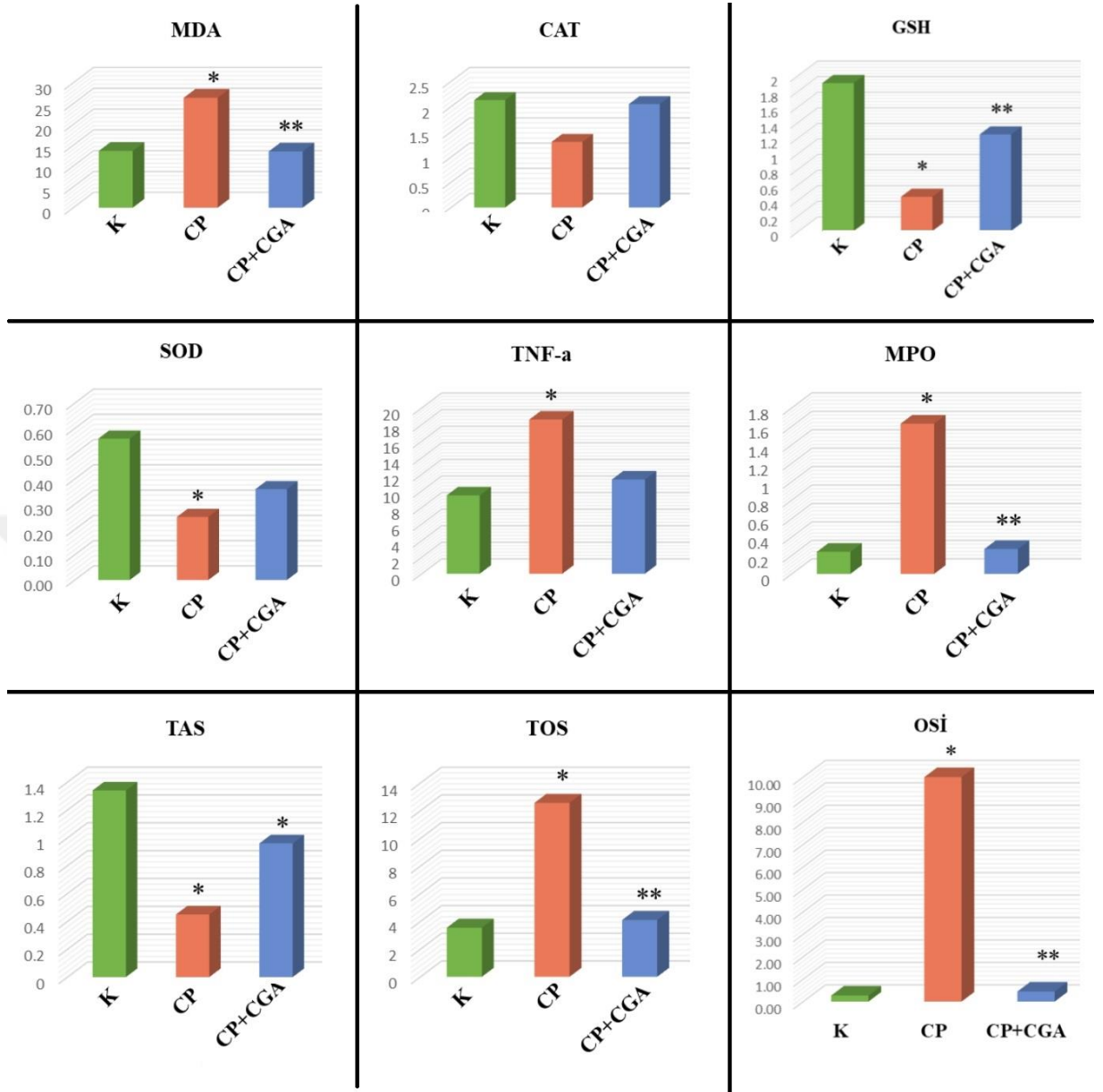
Deney gruplarından alınan böbrek ve mesane doku örneklerinde MDA, SOD, CAT, GSH, TNF- α , MPO, TOS, TAS, OSİ çalışılmış ve sonuçlara ilişkin bilgiler Tablo 14 ve 15'te verilmiştir. CP grubunun böbrek dokularında MDA, TOS, OSİ, MPO ($p<0,01$) ve TNF- α ($P=0,01$) değerleri; K grubuna göre anlamlı olarak artarken TAS, GSH ve SOD değerlerinde ise azalma mevcuttu (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,01$, $p=0,02$). CP+CGA grubunda; CP grubuna kıyasla böbrek dokusu MDA, TOS, MPO ve OSİ değerlerinde anlamlı derecede düşüş gözlenirken (hepsi $p<0,02$); GSH değeri ise yükseldi ($p<0,01$). İlave olarak CP+CGA grubunun böbrek dokusu TAS değerleri de K grubuna göre yükseldi ($p=0,04$) (Şekil 18)

Tablo 14: Böbrek biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi

	K Ort $\pm$ SD	CP Ort $\pm$ SD	CP+CGA Ort $\pm$ SD
MDA	13,64 $\pm$ 1,32	26,41 $\pm$ 8,95*	13,51 $\pm$ 6,94**
SOD	0,56 $\pm$ 0,24	0,25 $\pm$ 0,15*	0,36 $\pm$ 0,08
CAT	2,13 $\pm$ 0,85	1,30 $\pm$ 0,37	2,05 $\pm$ 0,93
GSH	1,9 $\pm$ 0,9	0,44 $\pm$ 0,28*	1,24 $\pm$ 0,54**
TNF- α	9,45 $\pm$ 3,9	18,6 $\pm$ 11,61*	11,37 $\pm$ 7,02
MPO	0,24 $\pm$ 0,11	1,63 $\pm$ 0,35*	0,27 $\pm$ 0,05**
TOS	3,55 $\pm$ 0,65	12,57 $\pm$ 7,39*	4,11 $\pm$ 1,26**
TAS	1,34 $\pm$ 0,19	0,45 $\pm$ 0,38*	0,96 $\pm$ 0,27*
OSİ	0,27 $\pm$ 0,07	10,11 $\pm$ 15,24*	0,45 $\pm$ 0,19**

*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$); **CP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (Ort. $\pm$ SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



Şekil 18: Böbrek biyokimyası sonuçları

Mesane dokusundan alınan örneklerde, K grubuna kıyasla CP grubunun MPO, MDA, TNF- α ve OSİ değerlerinde artış gözlenirken (hepsi $p<0,01$) SOD seviyesinde anlamlı düşüş mevcuttu ($p<0,01$). CP+CGA grubunda ise CP grubuna kıyasla MDA, MPO, TNF- α ve OSİ seviyelerinde anlamlı düşüş görülürken (hepsi $p<0,01$) SOD seviyesinde anlamlı artış mevcuttu ($p<0,01$). (Şekil 19)

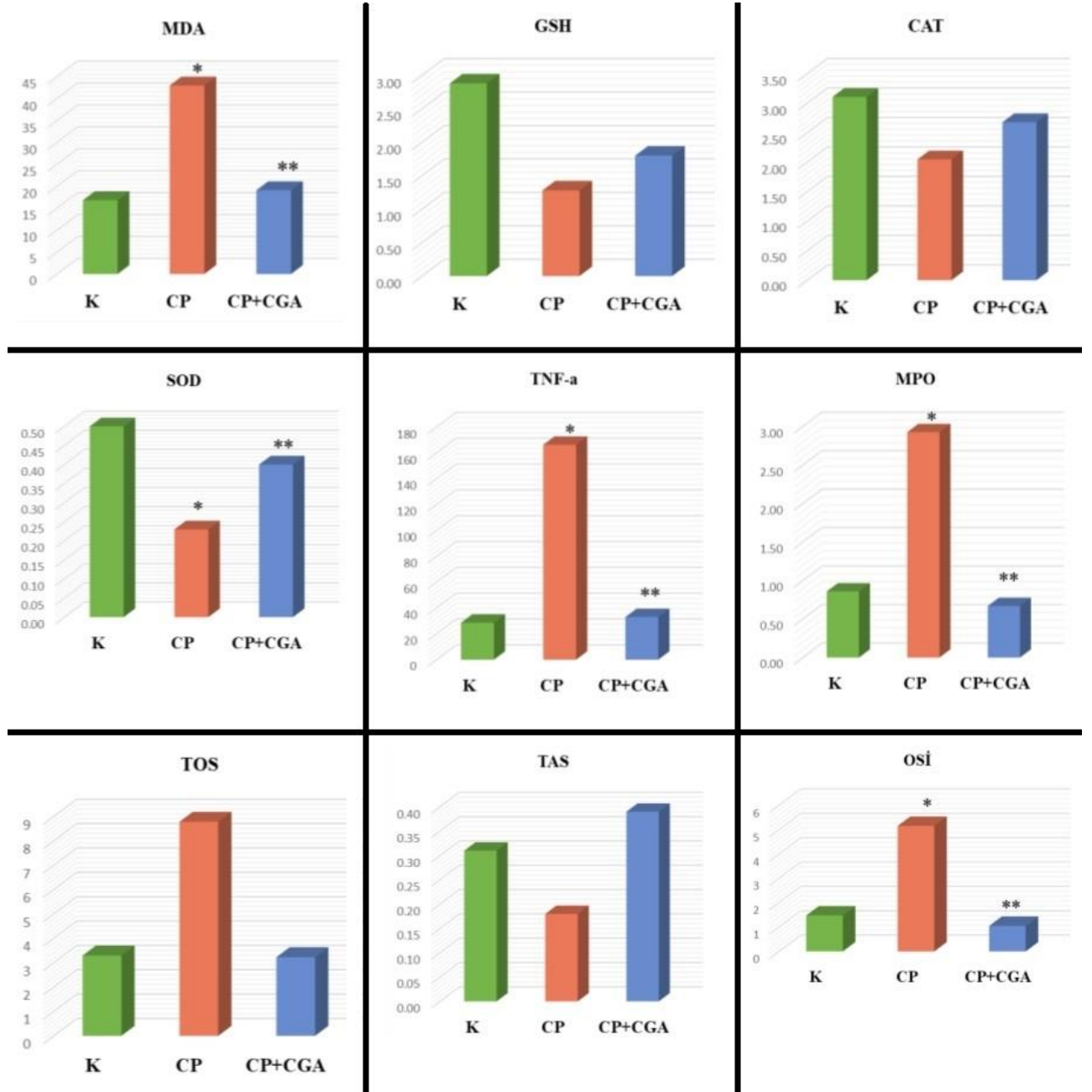
Tablo 15: Mesane biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi

	K Ort $\pm$ SD	CP Ort $\pm$ SD	CP+CGA Ort $\pm$ SD
MDA	16,84 $\pm$ 8,23	42,99 $\pm$ 9,87*	19,11 $\pm$ 4,52**
SOD	0,5 $\pm$ 0,17	0,23 $\pm$ 0,03*	0,4 $\pm$ 0,05**
CAT	3,11 $\pm$ 2,4	2,05 $\pm$ 0,93	2,68 $\pm$ 0,99
GSH	2,88 $\pm$ 1,99	1,28 $\pm$ 0,65	1,8 $\pm$ 0,87
TNF- α	28,66 $\pm$ 9,94	166,34 $\pm$ 58,61*	33,03 $\pm$ 6,86**
MPO	0,86 $\pm$ 0,18	2,93 $\pm$ 2,57*	0,67 $\pm$ 0,19**
TOS	3,3 $\pm$ 1,41	8,79 $\pm$ 5,37	3,23 $\pm$ 0,59
TAS	0,31 $\pm$ 0,2	0,18 $\pm$ 0,1	0,39 $\pm$ 0,21
OSİ	1,48 $\pm$ 0,92	5,16 $\pm$ 1,94*	1,05 $\pm$ 0,54**

*K grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

**CP grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (Ort. $\pm$ SD) olarak verilmiştir. K: Kontrol grubu, CP: Siklofosfamid grubu, CP+CGA: Siklofosfamid+Klorojenik asit grubu



Şekil 19: Mesane biyokimyası sonuçları

5. TARTIŞMA

CP, 50 yılı aşkın süredir başta solid tümör ve lenfoma olmak üzere birçok neoplastik hastalıkta antitümör etkisinden; sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklar, kan ve kemik iliği transplantasyonunda ise immünsüpresif etkisinden faydalanmak için tek başına ya da kombine olarak kullanılabilen oksazafosforinler sınıfına ait alkileyici bir ajandır (80). Oksazofosforinlerin etki mekanizması hücre döngüsüne özgü olmayıp, DNA alkilasyonu ile DNA sentezinin inhibisyonu ve hücre ölümü ile olmaktadır. CP, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile 4-hidroksisiklofosamid ve aldofosfamide metabolize edilip ardından aktif metabolitler akrolein ve fosforamide dönüştürülür. CP'nin antineoplastik etkilerinden fosforamid; toksik yan etkilerinden ise akroleinin sorumlu olduğu düşünülmektedir (74, 104). CP'nin de aralarında olduğu alkileyici ajanlar; DNA ve proteinler gibi biyolojik moleküllere kovalent bağlanarak hücrelerde apoptoz ve nekroza neden olurken, DNA'yı metilleyerek replikasyon hatalarına da yol açabilir. Yani CP, bir yandan mitoz bölünmeye engel olarak antineoplastik etki gösterirken; öte yandan hücrelerde kromozom kırıklarına, mitotik anomalilere ve mutasyonlara da neden olabilir (105-107).

CP'nin doz sınırlayıcı yan etkisi miyelosupresyon olmakla birlikte, mide bulantısı, kusma ve saç dökülmesi de sık görülen yan etkilerdendir. Uzun vadeli komplikasyonlar arasında ise infertilite ve sekonder malignite insidansında artış yer almaktadır. Akut lösemi, CP kullanımına bağlı en sık görülen sekonder malignite olup mesane kanseri de görülebilen bir diğer sekonder malignitedir. İlave olarak, kemik iliği transplantasyonu gibi yüksek doz CP kullanımı gerektiren durumlarda miyokardiyal nekroza bağlı kalp yetmezliğinin görüldüğü kardiyotoksisite meydana

gelebilir. Hemorajik sistit de klinikte CP kullanımını kısıtlayabilen önemli yan etkilerdendir. CP kullanımında görülen; hemorajik sistitin muhtemel nedeni akroleindir (74, 104). İlave olarak akrolein, CP kullanımında oluşan nefrotoksisitenin de muhtemel nedeni olarak görülmektedir (108).

CP kullanımı sırasında gelişen birçok organ hasarından; CP'nin ve akrolein gibi CP metabolitlerinin yol açtığı direkt sitotoksik etkilere ek olarak, ROS kaynaklı oksidatif stresin de sorumlu olabileceği düşünülmektedir (108-110). İlave olarak CP uygulanması; SOD ve CAT gibi antioksidatif enzimlerde ve GSH' da azalmaya neden olabilir (107, 111). Böbrek ve mesanede çeşitli faktörlerin etkisiyle oluşan hasarlarda; ROS birikiminin kritik bir öneme sahip olduğu endojen ve eksojen antioksidanların bu birikimi dengelemede rol oynadığı düşünülmektedir (110, 112). CP aracılı toksisitede de dokularda artan oksidatif stres ve azalan endojen antioksidan sistemleri dengelemek önemlidir; bundan dolayı CP kaynaklı böbrek ve mesane toksisitenin azaltılabilmesi için oksidan-antioksidan dengenin sağlanmasına yönelik farklı antioksidan maddelerin denendiği bilimsel çalışmalar günümüzde de devam etmektedir (7,113).

Antioksidan bileşiklerden biri olan CGA, başta yeşil kahve olmak üzere elma, kiraz, böğürtlen, domates, patates gibi birçok sebze ve meyvede bulunabilen bir polifenoldür. CGA vücutta kardiyovasküler sistem, sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde koruyucu etki, glikoz ve lipit metabolizması üzerinde düzenleyici etki gösterir. Bu etkilerini; antihipertansif, antilipidemik ve antidiyabetik özelliklerinin yanında güçlü antioksidan, antienflamatuar, antiapoptotik özellikleri vasıtasıyla da gösterir (85). CGA'nın, bu antioksidan ve antiapoptotik özellikleri sayesinde böbrekte de oksidatif stres kaynaklı hasarı önleyebileceği düşünülebilir (114). İlave

olarak CP kaynaklı mesane hasarını azaltmada antiapoptotik ve antienflamatuar etkinliği gösterilmiştir (93). Bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda; antioksidan, antienflamatuar ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu bilinen bir polifenol olan CGA'nın; CP'nin neden olduğu böbrek ve mesane hasarına karşı olası koruyucu etkilerini biyokimyasal ve histolojik olarak araştırmayı amaçladık.

CP, özellikle kronik uzun süreli kullanımda vücut ağırlığında azalmaya neden olabilir (115). Alabi ve ark. (2021) ise CP uygulama sonrası vücut ağırlığındaki azalmayı, toksisitenin sebep olduğu anoreksiye bağlamıştır (116). Bundan dolayı; alışmamızda CP verilen grubun vücut ağırlığında azalma olmayışı; sakrifikasyonun CP verilmesinden 24 saat sonra gerçekleşmesine, iştah değişikliği veya emilim bozukluğu için yeterli süre olmayışına veya tek doz CP verilmesine bağlanabilir. CP grubu böbrek ve mesane ağırlıklarındaki kontrole göre anlamlı olmayan artışın nedeni ise dokularda tespit edilen ödem ve inflamasyon olabilir.

Oksidatif stres, hücrede oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanabilir. Normalde fizyolojik olarak da üretilen ROS'un; herhangi bir sebeple hücrede aşırı artışı veya hücredeki endojen antioksidan mekanizmaların artan ROS'u dengelemede yetersiz kalmaları, oksidatif strese neden olabilir (45). İlave olarak sigara, evre kirliliği ve radyasyon gibi ekzojen kaynaklar da oksidatif stresi artırabilir (54). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlar da dokular için oksidatif stres kaynağı olabilir (117). Çeşitli çalışmalarda, bir kemoterapötik olan CP ve metabolitlerinin de reaktif oksijen türlerinin (ROS) (O_2^- anyonları, OH^- radikalleri ve H_2O_2) artışına neden olabildiği gösterilmiştir. CP uygulama sonrası artan ROS; hücrelerde lipid peroksidasyonunu indükleyerek önemli bir oksidatif stres göstergesi olan MDA'da artışa yol açabilir. (6, 8, 118, 119).

Biz de çalışmamızın CP grubunun böbrek ve mesane dokularında literatüre benzer şekilde belirgin MDA artışı tespit ettik (8, 118). İlave olarak CP uygulaması; dokularda oksidatif stres göstergelerinden olan TOS ve OSI'de de artışa neden olabilir (7, 120). Güneş ve ark. (2018), CP uygulanan sıçanların böbrek; Akbaş ve ark. (2022) ise mesane dokularında TOS ve OSI'nin yükseldiğini bildirmişlerdir (120, 122). Literatüre benzer şekilde bizim çalışmamızda da, mesane dokusundaki TOS artışında istatistiksel fark olmamakla birlikte, hem böbrek hem de mesane dokularında TOS ve OSI seviyelerinde artış mevcuttu. Bu nedenle CP'nin; bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde böbrek ve mesane dokularında oksidatif stresi indüklemiş olabileceğini düşündük.

Oksidatif stresi önlemek üzere dokularda; ROS ile savaşan GSH, SOD ve CAT gibi endojen antioksidanlar mevcuttur ve bunlar, serbest radikalleri temizleme ve zararsız hale getirme görevini üstlenirler (45). Bu antioksidanların veya TAS seviyelerinin ölçümü dokudaki antioksidan durum ve oksidatif stresin şiddeti hakkında bize bilgi verebilir. Literatürde, CP uygulamasının birçok doku antioksidanında düşüşe neden olabildiği gösterilmiştir (7, 121, 122). Ayrıca CP metaboliti akroleinin GSH ile bağlanıp hücre içindeki GSH seviyesini düşürerek GSH bağımlı antioksidan sistemi bozabildiği bildirilmiştir (108, 123). Bir çalışmada; tek doz 200 mg/kg CP uygulaması sonrası sıçan böbrek ve mesane dokularında SOD ve TAS seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (7). Ayrıca Alabi ve ark. (2021) üç gün 50 mg/kg CP verdikleri sıçanların böbrek ve Saima ve ark. (2023) ise üç gün 150 mg/kg CP verdikleri sıçanların mesane dokularında; SOD, CAT, GSH düzeylerinin azaldığını bildirdiler (116, 121).

Bizim çalışmamızda da, tek doz i.p. 150 mg/kg CP uygulaması literatürle uyumlu olarak böbrek ve mesane dokularında değerlendirilen SOD, CAT, GSH, TAS seviyelerinde belirgin azalmaya neden oldu. Ancak bu azalma böbrek için sadece CAT ve mesane için CAT, GSH ve TAS seviyelerinde anlamlı fark oluşturmadı. Çalışmamızda doku antioksidanlarında görülen azalmanın; artan oksidatif stresi dengelemek için antioksidanların aşırı kullanımına veya oksidatif stres nedeniyle bozulan antioksidan yapımına bağlı olabileceğini düşündük.

ROS artışı, antioksidanlarla dengelenemez veya kontrol edilemez hale gelirse dokularda hasar ve inflamasyonu tetikleyebilir (124, 125). Lokal doku hasarı, başta doku makrofajları olmak üzere birçok hücrede bir polipeptid yapılı sitokin olan TNF- α ' da artışa yol açabilir. İlave olarak TNF- α da, dokuda ROS artışını ve inflamasyonu indükleyebilir (125). Ayrıca ROS kaynaklı inflamatuvar hücre salınımı MPO yolağını da aktive eder (126). Nötrofiller ve monositlerde eksprese edilen bir peroksidaz ailesi üyesi olan MPO da inflamasyon ve oksidatif stresin belirteci ve aracısıdır (127). Dokularda oksidatif stresi ve doku hasarını indükleyen CP'nin; MPO ve TNF- α düzeylerinde artışa neden olacağı düşünülebilir. Nitekim, He ve ark. (2015) CP kaynaklı sistit modeli oluşturdukları çalışmalarında; MPO ve TNF- α düzeylerinde artış olduğunu gözlemlediler (61). Sharma ve ark. (2017) ile Goudarzi ve ark. (2017) ise CP uyguladıkları grupların böbrek dokularında MPO ve TNF- α düzeylerinde artış bildirdiler (128,129). Bizim çalışmamızda da literatüre benzer şekilde CP grubunun hem böbrek hem mesane dokularına ait MPO ve TNF- α seviyelerinde ciddi bir artış mevcuttu. Bu artışın; CP tarafından redoks dengesinin bozulmasına ve onun indüklediği lokal doku hasarı ve inflamasyona bağlı olabileceğini düşündük.

Oksidatif stres; dokularda yol açtığı inflamasyon ve lokal doku hasarının yanında; hücrelerde de apoptozu indükleyebilir (124). CP' nin de böbrekte apoptoz artışına neden olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (130-132). CP böbrek dokusunda olduğu gibi mesane dokusunda da apoptozu artırabilir. Ayhancı ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada; CP grubu mesane dokularında apoptozu ifade eden Bax ve kaspaz 3 artışını immünohistokimyasal olarak gösterdiler (133). Bir başka çalışmada 200 mg/kg tek doz CP uygulanan sıçanların hem böbrek hem de mesane dokularında apoptoz artışı olduğu bildirilmiştir (7). Biz de literatürle uyumlu olarak CP grubuna ait her iki dokuda da apoptoz artışı olduğunu tespit ettik. Bu artışın; CP' nin indüklediği oksidatif stresin yanında CP'nin DNA üzerine yaptığı hasara sekonder oluşmuş olabileceğini düşündük.

CP, mesane epitelinde apoptoza ilave olarak nekroza da yol açabilir ve epitel tabakalarında ayrılma ve dökülmeler oluşturabilir (132). CP kullanımının mesanede oluşturduğu toksik etkiler, yani CP'nin klinikte de kullanımını kısıtlayan yan etkilerden biri olan hemorajik sistit, birçok deneysel çalışmada histolojik olarak da gösterilmiştir (7, 8). Akbaş ve ark. (2022), 30 gün boyunca i.p. 75 mg/kg CP uygulayarak hemorajik sistit oluşturdukları grupta; histopatolojik olarak mesane epitelinin yer yer kesintiye uğradığını, lamina propriada polimorfonükleer lökosit (PMNL) birikimi, ödem ve vazodilatasyonun olduğunu tespit ettiler (122). Ho ve ark. (2021)'nin yaptığı çalışmada ise sıçanlara 3 doz 75 mg/kg CP uygulaması sonrası değerlendirilen PAS ile boyanmış mesane kesitlerinde; mukozada ödem, glikoprotein tabakasında incelme, mesane epitelinde dökülme gözlemlendi (134). Bizim çalışmamızın CP grubunda da literatüre benzer şekilde mesane mukozasında ödem, hemoraji, ülserasyon, inflamatuvar hücre artışı ve epitelde dökülme, dejenerasyon mevcut olup ve en yüksek hasar skoru bu gruba aitti. Bu durum; CP'nin hücrelerde

ROS artışıyla lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına, hücre nekrozuna ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmasına bağlı olabilir (121). Çalışmamızda CP grubunun yüksek TNF- α seviyelerinin bu düşüncüyü doğrulayabildiğini düşünmekteyiz.

CP'nin yaptığı nefrotoksisite de histopatolojik olarak gösterilebilir. Hem CP hem de metaboliti olan akrolein, doku antioksidan savunma sistemini bozarak tübüler epitel hücrelerinde nekroz ve buna bağlı nefrotoksisite oluşturabilir (108, 123). Literatürdeki farklı iki çalışma; 200 mg/kg CP uygulanmasının sıçan böbrek dokularında, glomerüllerde dejenerasyon ve büzülme, intertisyel hemoraji, tübüllerde dejenerasyon, vakuolizasyon ve tübül epitelinde dökülmeye yol açtığını bildirmiştir (6,107). Alabi ve ark. (2021) da CP grubu sıçanların böbrek kesitlerinde ciddi glomerüler hasar, proksimal ve distal tübüllerde dejenerasyon ve ilave olarak intertisyumda inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğunu tespit ettiler (116). Bir başka çalışmada ise CP'nin; PAS boyalı kesitlerde glomerüllerde atrofi, Bowman boşluğunda genişleme, tübüllerde cast formasyonu, tübül epitelinde dökülme ve bazal membranında kalınlaşmaya neden olduğu gösterildi (135). Mahipal ve ark. (2017) da CP uygulanan gruptaki böbrek kesitlerinde; proksimal ve distal tübüllerde dejenerasyon ve glomerüllerde diğer çalışmalardan farklı olarak hiperplazi gözlemlendiler (136). Biz de CP uygulanan grubun HE boyalı böbrek preparatlarında literatür geneline benzer şekilde; glomerüllerde atrofi, Bowman boşluğunda genişleme, tübül epitelinde dökülme ve vakuolizasyon, tübül çaplarında genişleme, intertisyel ödem ve hemoraji saptadık. Literatürdeki bulgulara ek olarak glomerüler kapillerlerde konjesyon da mevcuttu. PAS boyalı preparatlarda ise literatüre benzer şekilde saptanan Bowman kapsülü paryetal yaprağında kalınlaşma ve ayrılmaya ek olarak, tübül bazal membranlarında düzensizlikler ve proksimal tübülde fırçamsı

kenar kayıpları tespit ettik. Bu da bize; çalışmamızda CP'nin böbrek hasarına neden olduğunu göstermektedir.

Klinikte böbrek hasarını değerlendirmede sıklıkla böbrek fonksiyon testlerinden serum BUN ve kreatinin kullanılır. BUN, protein yıkımıyla oluşan bir yapı olup kandaki nitrojen miktarını ölçmek için kullanılırken; kreatinin, iskelet kasında bulunan kreatinin yıkım ürünüdür (137). CP'nin indüklediği nefrotoksisite serum BUN ve kreatinin artışına yol açabilir. Çağlayan ve ark. (2018) ile Mansour ve ark. (2017) da tek doz 200 mg/kg CP uyguladıkları sıçanlarda CP'nin; BUN ve kreatinin artışına neden olduğunu gördüler (6,107). Farklı CP dozlarının kullanıldığı birçok çalışmada da CP uygulanan grupta BUN ve kreatinin artışı mevcuttu (116, 118, 136). Bizim çalışmamızda da CP grubunun serum BUN ve kreatinin seviyelerinin literatüre benzer şekilde yüksek olması CP'nin böbrekte sebep olduğu glomerüler hasar ve konjesyona, bu hasar ve konjesyonun yol açmış olabileceği glomerüler filtrasyon hızındaki düşmeye bağlanabilir.

Böbrek ve mesanede bizim çalışmamızda da gösterdiğimiz gibi CP tarafından oluşturulan hasarı gidermek için literatürde çok farklı antioksidanlar denenmiştir (7,8). Bizim çalışmamızda bu amaçla kullandığımız CGA da antioksidan, antiapoptotik, antienflamatuar ve antikanser özelliklere sahip olduğu bilinen, biyolojik olarak aktif olan, diyetle alınabilen ve bazı bitkilerde bulunan bir polifenoldür. CGA'nın tüm bu faydalarının yanında; hepatik trigliserit depolanmasını bloklayarak, amilazın lipolitik aktivitesini artırarak veya yağ dokusunda lipolitik etkiyi artırarak kilo kaybına da neden olabildiği bildirilmektedir (96). Bizim çalışmamızda da; CGA verilen grubu kontrolle kıyasladığımızda 8. Gün vücut ağırlıklarında tespit edilen azalma, CGA'nın kilo kaybettirici etkisine bağlı olabilir.

Çalışmamız CP+CGA grubunun böbrek ve mesane ağırlıklarında ise CP grubuna göre belirgin azalma mevcuttu. Bu azalmanın ise CP grubunda artmış olan inflamasyon ve ödemin CGA tarafından azaltılmasına bağlı olabileceğini düşündük. Ancak CGA verilen grubun mesane ağırlıklarının kontrole göre de belirgin olarak azalmış olmasını açıklayamadık.

CGA'nın böbrek ve mesane üzerine antioksidan ve antienflamatuar etkileri farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Ye ve ark. (2016), streptozosinle deneysel diyabetik nefropati oluşturulan sıçanlarda, 6 hafta boyunca farklı dozlarda (5, 10, 20 mg/kg ip.) CGA verilen grupların böbrek SOD, CAT ve GPX (glutatyon peroksidaz) seviyelerinde artış gözlemlemişler (138). Bir başka çalışmada da böbrekte D-Galaktoz kaynaklı kronik inflamasyona karşı 8 hafta boyunca oral 200 mg/kg CGA verilen grupta lipid peroksidasyon belirteci MDA ve inflamasyon belirteçlerinden TNF- α ve IL-6 düzeyleri azalırken, antioksidan aktivite belirteci SOD, CAT, GSH düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür (139). AL-Megrin ve ark. (2020)'nin yaptığı çalışmada ise sodyum arsenit (NaAsO₂) kaynaklı nefrotoksiteye karşı 4 hafta boyunca farklı iki dozda (100 mg/kg ve 200 mg/kg) uygulanan CGA'nın; böbrek MDA seviyelerinde ve inflamasyon belirteçlerinden TNF- α , IL-1 β düzeylerinde düşüş ve antioksidan GSH, CAT ve SOD aktivitelerinde artış yaptığı gösterilmiştir (140). Biz de CGA uyguladığımız grubun böbrek dokularında literatüre benzer şekilde hasar grubuna göre oksidatif stres göstergelerinin (MDA, TOS ve OSI) düştüğünü, antioksidanların (SOD, CAT, TAS, GSH) ise arttığını ancak bu artışın sadece GSH için anlamlı olduğunu gördük. Çalışmamızın CGA verilen grubun böbrek dokularının TNF- α ve MPO seviyelerinde de CP grubuna göre literatürle uyumlu düşüş vardı ancak bu düşüş TNF- α için anlamlı fark yaratmadı. Luo ve ark. da (2020), tek doz CP uyguladığımız çalışmamızdan farklı olarak, üç günde bir 75

mg/kg olacak şekilde dört kez i.p. CP ile sistit oluşturdıkları sıçanlara 10 gün boyunca i.p. yolla 100 mg/kg CGA uygulamış ve inflamasyon belirteçlerinden IL-6, IL-1 β ve TNF- α seviyelerinin CGA tedavisi sonrası düştüğünü görmüşlerdir (93). Biz de çalışmamızda 200 mg/kg tek doz CP ile oluşturduğumuz sistit modelinde; Luo ve ark. (2020)' dan farklı olarak 7 gün boyunca oral yolla 100 mg/kg CGA uyguladık. CGA grubumuz mesane dokularında literatürdeki ve çalışmamızdaki böbrek dokularına benzer şekilde CP grubuna göre MDA, OSİ ve TOS seviyelerinde belirgin azalma vardı ancak TOS'taki bu azalma anlamlı fark oluşturmadı. CGA'nın, böbrek dokusunda olduğu gibi, mesanede de antioksidan parametrelerden SOD, CAT, GSH, TAS değerlerini artırdığını ancak bu artışın sadece SOD düzeyinde anlamlı olduğunu tespit ettik. İlave olarak CGA grubuna ait mesanelerde; Luo ve ark. (2020)'nın çalışmasına ve çalışmamızdaki böbrek dokularına benzer şekilde inflamasyon belirteçlerinden TNF- α ve MPO düzeylerinin CP grubuna kıyasla belirgin olarak azaldığı görüldü. Bu nedenle CGA'nın antioksidan ve antienflamatuar etkisi ile hem böbrek hem de mesane dokusunda CP'nin indüklediği oksidatif stresi ve inflamatuvar süreçleri hafifletmiş olabileceğini düşündük.

Çalışmamızda CGA, hem mesane hem de böbrek dokularında TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücre sayısında CP grubuna göre azalmaya neden oldu. Luo ve ark. (2020); tarafından yapılan çalışmanın CGA tedavi grubuna ait mesane dokularında tespit edilen kaspaz 3 ve bax ekspresyonunda azalma, bcl-2'de artış ve TUNEL pozitif hücre sayısındaki azalma, bizim çalışmamızla uyumlu olarak CGA'nın antiapoptotik etkisini gösterdi. Owumi ve ark. (2021) ise; karaciğer ve böbrek dokularında tamoksifen (TAM) tarafından indüklenerek artan apoptozun; çalışmamız böbrek dokusuna benzer şekilde CGA tarafından azaltıldığını gösterdiler (141).

Literatürdeki çalışmalarda; farklı toksik etkilerin dokularda yaptığı hasarın CGA tarafından iyileştirildiği histolojik olarak da gösterilmiştir (7, 95). TAM ile böbrek hasarının indüklendiği bir çalışmada 14 gün boyunca iki farklı dozda (25 mg/kg ve 50 mg/kg) verilen CGA'nın böbrek dokusunda glomerulonekroz, tübüler deskuamasyon ve inflamatuvar hücre sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (141). Zhang ve ark. (2019) ise, farelerde kurşun (Pb) maruziyeti ile oluşan nefrotoksisiteye karşı CGA' yı değişen dozlarda (10, 20, 40 mg/kg) i.p. olarak 14 gün boyunca her gün uygulamışlar ve CGA uygulanan grupta Pb toksisitesi ile ortaya çıkan tübül epitelinde dejenerasyon ve genişlemenin; uygulanan CGA dozu ile orantılı olarak düzeldiğini tespit ettiler (142). Bir başka çalışmada; sisplatin kaynaklı böbrek hasarına karşı oral gavaj yoluyla uygulanan farklı dozlardaki (3, 10, 30 mg/kg) CGA'nın; böbrek tübüllerinde deskuamasyon ve dilatasyonu, doza paralel olarak düzelttiği gösterildi (95). AL-Megrin ve ark. (2020) da 4 hafta gastrostomi vasıtasıyla 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında uyguladıkları CGA'nın; hasar grubunda tespit ettikleri Bowman boşluğunda artma, tübül hücrelerindeki vakuoler değişiklik ve dökülmede azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (140). Bizim çalışmamızda da oral gavaj yolu ile uygulanan CGA; CP grubundaki böbrek dokularında oluşan histopatolojik bozukluklarda, literatüre benzer şekilde azalmaya neden oldu. Bunun nedeni CGA'nın dokuda oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak doku hasarını önlemesi olabilir. Böbrek dokusunda toksinlerin yol açtığı hasarı azaltan CGA'nın; serum BUN ve kreatinin düzeylerinde de azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (138-140). Ancak çalışmamızda CGA; böbrek dokusunda oksidatif stres, inflamasyon ve doku hasarını azaltmasına karşın literatürdeki çalışmalardan farklı olarak, serum BUN ve kreatinin seviyelerinde azalmaya neden

olmadı. Bu durum; diğer çalışmalardaki uygulama doz veya süresinin bizim çalışmamızdakinden fazla olmasıyla ilişkili olabilir.

Luo ve ark. (2020) da yaptıkları çalışmada mesane dokusunda, CP kaynaklı mukoza ve lamina propria oluşun ödem, kanama ve inflamasyonun, 10 gün boyunca 100 mg/kg i.p. CGA uygulaması ile azaldığını gördüler (93). Biz de profilaktik olarak 7 gün oral yolla uyguladığımız CGA'nın literatürle ve çalışmamızın mesane dokularındaki oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçlerdeki azalma ile paralelik gösterecek şekilde mukozal hasarı azalttığını gözlemledik.

Sonuç olarak; sıçanlarda oral yolla profilaktik olarak uygulanan CGA; mesane ve böbrek dokularında CP'nin indüklediği oksidatif stresi ve inflamasyonu azaltarak doku hasarını önleyebilir. Oral kullanım kolaylığına da sahip olan CGA; CP kullanımının farklı organlarda yol açtığı toksik etkileri önlemek için de iyi bir profilaksi tercihi olabilir ancak hem bu konuda hem de etkin doz ve sürenin belirlenmesi için ek deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

CGA'nın, sıçan böbrek ve mesane dokularındaki CP ile indüklenen hasarı önleme ve/veya iyileştirmesindeki rolünü araştırdığımız çalışmada:

CP'nin;

1. Böbrek ve mesane dokusunun histolojik yapısında bozulmaya neden olduğu,
2. Serum BUN ve kreatinin düzeyinde artışa yol açtığı,
3. Böbrek ve mesane dokusunda apoptozu artırdığı,
4. Böbrek dokusunda SOD, GSH, TAS düzeylerini azalttığı, MDA, TNF- α , MPO, TOS ve OSİ seviyelerini artırdığı,
5. Mesane dokusunda SOD düzeyini azalttığı, MDA, TNF- α , MPO, OSİ seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir.

CGA'nın;

1. Vücut ağırlığını azalttığı,
2. Böbrek ve mesane dokularının ağırlıklarını azalttığı,
3. Böbrek ve mesane dokusunda apoptozu azalttığı,
4. CP'nin böbrek ve mesane dokusunda oluşturduğu histolojik hasarı iyileştirdiği,
5. Böbrek dokusunda CP'nin azalttığı GSH'ı artırdığı, CP'nin artırdığı MDA, MPO, TOS ve OSİ seviyelerini azalttığı
6. Mesane dokusunda CP'nin artırdığı MDA, TNF- α , MPO, OSİ değerlerini azalttığı, CP'nin azalttığı SOD seviyesini artırdığı tespit edildi.

Elde ettiğimiz bu veriler ışığında bu konuda yapılacak sonraki çalışmalarda;

-CGA'nın profilaktik ve/veya iyileştirici etkisinin altında yatan mekanizmaların değerlendirilebilmesi için farklı moleküler teknikler de kullanılabilir.

-CGA'nın etkinliğini daha iyi değerlendirebilmek için proflaksi için uygulanan doz ve süre çeşitlendirilebilir.

-CP'nin dokuda yarattığı hasara karşı CGA'nın etkisini ultrastrüktürel olarak daha iyi değerlendirebilmek amacıyla elektron ve konfokal mikroskopik yöntemlerden de faydalanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Jeelani, R., Khan, S. N., Shaeib, F., Kohan-Ghadr, H. R., Aldhaheeri, S. R., Najafi, T., Thakur, M., Morris, R., & Abu-Soud, H. M. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radical Biology & Medicine*. 2017; 110: 11–18.
2. Pinto, N., Ludeman, S. M., & Dolan, M. E. Drug focus: Pharmacogenetic studies related to cyclophosphamide-based therapy. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(12): 1897–1903.
3. Kumar, S., Gupta, R. K., & Samal, N. Cyclophosphamide cardiotoxicity. *The National Medical Journal of India*. 1992; 5(1): 17–19.
4. Sakthivel, K. M., & Guruvayoorappan, C. *Acacia ferruginea* inhibits cyclophosphamide-induced immunosuppression and urotoxicity by modulating cytokines in mice. *Journal of Immunotoxicology*. 2015; 12(2): 154–163.
5. Kim, S. H., Lee, I. C., Baek, H. S., Shin, I. S., Moon, C., Bae, C. S., Kim, S. H., Kim, J. C., & Kim, H. C. Mechanism for the protective effect of diallyl disulfide against cyclophosphamide acute urotoxicity in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2014; 64: 110–118.
6. Caglayan, C., Temel, Y., Kandemir, F. M., Yildirim, S., & Kucukler, S. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2018; 25(21): 20968–20984.
7. Kerimoğlu G, Arıcı T, Bıyık AF, et al. Protective potential of pterostilbene against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity and cystitis in rats [published online ahead of print, 2023 Aug 11]. *Int Urol Nephrol*. 2023;10.1007/s11255-023-03735-6.
8. Engin S, Barut EN, Barut B et al. Uroprotective effect of pantoprazole against cyclophosphamide-induced cystitis in mice. *Support Care Cancer*. 2019; 27(11): 4273–4281.
9. Suzuki, A., Yamamoto, N., Jokura, H., Yamamoto, M., Fujii, A., Tokimitsu, I., & Saito, I. Chlorogenic acid attenuates hypertension and improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 2006; 24(6): 1065-1073.
10. Clifford, M. N., Jaganath, I. B., Ludwig, I. A., & Crozier, A. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*. 2017; 34(12): 1391–1421.

11. Gao, W., Wang, C., Yu, L., Sheng, T., Wu, Z., Wang, X., Zhang, D., Lin, Y., & Gong, Y. Chlorogenic Acid Attenuates Dextran Sodium Sulfate-Induced Ulcerative Colitis in Mice through MAPK/ERK/JNK Pathway. *BioMed Research International*. 2019; 6769789.
12. Ali, N., Rashid, S., Nafees, S., Hasan, S. K., Shahid, A., Majed, F., & Sultana, S. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chemico-Biological Interactions*. 2017; 272: 80-91.
13. Rouiller, C. General Anatomy and Histology of The Kidney. In *The kidney* Academic Press. 1969; 61-156.
14. Drake RL, Vogl AW and Mitchell AWM. *Gray's Basic Anatomy*. 2. edition. Elsevier: Philadelphia; 2018. P. 133-207.
15. Altunören, O., Aydın, G., & Güngör, Ö. Böbrek anatomisi. Böbrek Fiziopatolojisi [Elektronik Kitap]. 2017; 1-3. Arıncı K, Elhan A. İnsan Vücudunun Yapısı. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi; 1987. 94-99.
16. Mahadevan, V. Kidney and ureter anatomy. *Surgery (Oxford)*. 2019; 37 (7): 359-364.
17. Moinuddin, Z. and Dhanda, R. Kidney and ureter anatomy. *Anesthesia and Intensive Care Medicine*. 2015; 16 (6): 247-252.
18. Wallace, M. A. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN Journal*. 1998; 68(5): 799-820.
19. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji (Konu anlatımı ve atlas)*, 6. baskı (Çev. Edit: Baykal B), Ankara: Palme Yayıncılık; 2014.
20. Ovale WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji (Netter Basic Histology, Çev. Ed. Müftüoğlu S., Kaymaz F., Atilla P.)*, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.
21. 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. 303-321.
22. Deveci, Ş. Üriner Sistemin Genel Yapısının Değerlendirilmesi ve Histolojik Açından İncelenmesi. 2020.
23. Janqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji (Basic Histology, 11th Edition, 2005. Çev. Ed. Aytekin Y, Solakoğlu S.)*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009
24. 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

25. Yıldız, A. Glomerulopati Hastaya Yaklaşım. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 2022; 688.
26. Schlondorff, D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. The FASEB Journal. 1987; 1(4): 272-281.
27. Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Clinically oriented embryology. 10th Ed., Saunders. Elsevier, Philadelphia; 2016.
28. Abraham L. Kierszenbaum M.D., Ph.D. and Laura L. Tres M.D., Ph.D. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 14, 479-510
29. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji, Çev. Başaklar C., Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
30. De Rouffignac C. Editorial: Physiological role of the loop of Henle in urinary concentration. Kidney International. 1972; 2(6): 297-303.
31. Dudek R.W., BRS Embriyoloji 1. Baskı Çev. İrez T., Erkan M., İstanbul: Medikal Yayıncılık; 2016
32. Carlson B. M., İnsan Embriyolojisi ve Gelişim Biyolojisi, 1. Baskı, Çev. Kaymaz F. F., Atilla P., Zırh E. B, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2022.
33. Gary C. Schoenwolf PhD, Steven B. Bleyl MD, PhD, Philip R. Brauer PhD, Philippa H. Francis-West PhD Larsen's Human Embryology Sixth Edition Copyright © 2021 by Elsevier, Inc. All rights reserved.
34. Costantini F. Genetic controls and cellular behaviors in branching morphogenesis of the renal collecting system. Wiley interdisciplinary reviews. Developmental Biology. 2012; 1(5): 693-713.
35. Arıncı K, Elhan A. İnsan Vücudunun Yapısı. Ankara: Türk Tarih Kurumu Basımevi, 1987; 94-99.
36. Spence, A. P. Basic human anatomy. Benjamin-Cummings Publishing Company. 1990.
37. Gartner, L. P. Textbook of histology e-book. Fifth edition. Edited by Elsevier, Philadelphia: Health Sciences; 2020; 459-486.e2
38. Krstic, R. V. Human microscopic anatomy: an atlas for students of medicine and biology. Springer Science & Business Media. 1991
39. Rehman, S., & Ahmed, D. Embryology, Kidney, Bladder, and Ureter: In StatPearls. StatPearls Publishing. 2021.
40. Liaw, A., Cunha, G. R., Shen, J., Cao, M., Liu, G., Sinclair, A., & Baskin, L. Development of the human bladder and ureterovesical junction. Differentiation. 2018; 103: 66-73.

41. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., & Krause, K. H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Medical Weekly*. 2012; 142: w13659.
42. Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*. 2004; 327(7): 649-662.
43. Yang S, Lian G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply [published correction appears in *Mol Cell Biochem*. 2020 Feb 17]. *Mol Cell Biochem*. 2020; 467(1-2): 1-12.
44. Kirkinezos, I. G., & Moraes, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. 2001; 449-457.
45. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Investig*. 2015;6(3):331–6.
46. Serdal, Ö., Polat, M., & Alanoğlu, E. G. Tam Kan Bağışçılarının Kanlarındaki Malondialdehit (MDA) ve Redükte Glutatyon (GSH) Seviyeleri. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2011; 18(4): 128-131.
47. Malle, E., Buch, T., & Grone, H. J. Myeloperoxidase in kidney disease. *Kidney International*. 2003;64(6); 1956-1967.
48. Burner, U., Jantschko, W., & Obinger, C. Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds I and II. *FEBS Letters*. 1999; 443(3); 290-296.
49. Davies, M. J., & Hawkins, C. L. The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020; 32(13): 957–981.
50. Li W, Liu Q, Shi J, Xu X, Xu J. The role of TNF- α in the fate regulation and functional reprogramming of mesenchymal stem cells in an inflammatory microenvironment. *Front Immunol*. 2023; 14: 1074863.
51. Inoue M, Ando D, Kamada H, et al. A trimeric structural fusion of an antagonistic tumor necrosis factor- α mutant enhances molecular stability and enables facile modification. *J Biol Chem*. 2017; 292(16): 6438-6451.
52. Ozkok, A., & Edelstein, C. L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *BioMed Research International*. 2014.
53. Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., Hasan, S. K., & Sultana, S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NF κ B/MAPK pathway. *Chemico-biological Interactions*. 2015; 231: 98-107.
54. Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. Oxidative stress mitigation by antioxidants-An overview on their chemistry and

- influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2021; 209: 112891.
55. Badr, G. M. Pre-treatment of ozone therapy in rat model provides good prophylaxis against nephrotoxicity induced by cyclophosphamide. *Bulletin of Egyptian Society for Physiological Sciences*. 2016; 36(1): 1-12.
 56. Hosseinzadeh, H., Sadeghnia, H. R., Ziaee, T., & Danaee, A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences: a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe Canadienne Des Sciences Pharmaceutiques*. 2005; 8(3): 387–393.
 57. Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, Wolin MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016;25(3):119-146.
 58. Osama M. Abo-Salem. Uroprotective Effect of Pentoxifylline in Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2013; 27: 337-387.
 59. Shinde A, Ganu J, Naik P. Effect of free radicals & Antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci*. 2012; 1(2): 63- 66.
 60. Saxena, P., Selvaraj, K., Khare, S. K., & Chaudhary, N. Superoxide dismutase as multipotent therapeutic antioxidant enzyme. Role in human diseases. *Biotechnology Letters*. 2022; 1-22.
 61. He, Y. Q.; Zhang, W. T.; Shi, C. H.; Wang, F. M.; Tian, X. J.; Ma, L. L. Phloroglucinol protects the urinary bladder via inhibition of oxidative stress and inflammation in a rat model of cyclophosphamide-induced interstitial cystitis. *Chin. Med. J*. 2015; 128: 956–962.
 62. Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*. 1999; 32(8): 595–603
 63. Goyal, M. M., & Basak, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein & Cell*. 2010; 1(10): 888-897.
 64. Çimen, Ç., Çiğdem, Ö. TER, DEMİR, H. ve SAVRAN, A. Sıçan eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2005; 16 (1): 15-20.
 65. Fleisher T. A. Apoptosis. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 1997; 78(3): 245–250.
 66. D'Arcy M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. 2019; 43(6): 582–592.

67. Bosman, F. T., Visser, B. C., & van Oeveren, J. Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. Pathology, research and practice. 1996; 192(7): 676–683.
68. Şimşek F., Vatansever H. Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon? Yeni Tıp Dergisi. 2014; 31(1): 6-11.
69. Kim, J. H., Lee, S. Y., Oh, S. Y., Han, S. I., Park, H. G., Yoo, M. A., & Kang, H. S. Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-XS and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. Oncology reports. 2004; 12(6): 1233–1238.
70. Gökhan A., Kılıç K. D., Gülle K., Uyanıkgil Y. , Çavuşoğlu T. Apoptotik Yolaklar ve Hedefe Yönelik Tedaviler. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2020; 27(4): 565-573.
71. Gershwin, M. E., Goetzl, E. J., & Steinberg, A. D. Cyclophosphamide: use in practice. Annals of internal medicine. 1974; 80(4): 531–540.
72. Frank L. Shand The immunopharmacology of cyclophosphamide. 1979; 1(3): 165–171.
73. Colvin OM. Overview of cyclophosphamide development and clinical applications. Curr Ecz. Des. 1999; 5 (8): 555–560.
74. Moore M. J. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clinical pharmacokinetics. 1991; 20(3): 194–208.
75. Boddy, A. V., & Yule, S. M. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. Clinical pharmacokinetics. 2000; 38(4): 291–304.
76. De Jorge, M. E., Huitema, A. D., Rodenhuis, S., & Beijnen, J. H. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clinical pharmacokinetics. 2005; 44(11): 1135–1164.
77. Grochow, L. B., & Colvin, M. Clinical pharmacokinetics of cyclophosphamide. Clinical pharmacokinetics. 1979; 4: 380-394.
78. Ayza, M. A., Zewdie, K. A., Yigzaw, E. F., Ayele, S. G., Tesfaye, B. A., Tafere, G. G., Abrha, M. G.. "Potential Protective Effects of Antioxidants against Cyclophosphamide-Induced Nephrotoxicity", International Journal of Nephrology, vol. 2022; 12
79. Ahmed, A. R., & Hombal, S. M. Cyclophosphamide (Cytosan): a review on relevant pharmacology and clinical uses. Journal of the American Academy of Dermatology. 1984 ;11(6): 1115-1126.
80. Fraiser, L. H., Kanekal, S., & Kehrer, J. P. Cyclophosphamide toxicity: characterising and avoiding the problem. Drugs. 1991; 42: 781-795.

81. Mills, K. A., Chess-Williams, R., & McDermott, C. Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Archives of Toxicology*. 2019; 93: 3291-3303
82. Bhat N, Kalthur SG, Padmashali S, Monappa V. Toxic Effects of Different Doses of Cyclophosphamide on Liver and Kidney Tissue in Swiss Albino Mice: A Histopathological Study. *Ethiop J Health Sci*. 2018; 28 (6): 711-716.
83. Santos MLC, de Brito BB, da Silva FAF, Botelho ACDS, de Melo FF. Nephrotoxicity in cancer treatment: An overview. *World J Clin Oncol*. 2020;11(4):190-204.
84. Van Hung P. Phenolic Compounds of Cereals and Their Antioxidant Capacity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016; 56(1): 25–35.
85. Lu H, Tian Z, Cui Y, Liu Z, Ma X. Chlorogenic acid: A comprehensive review of the dietary sources, processing effects, bioavailability, beneficial properties, mechanisms of action, and future directions. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2020; 19(6): 3130-3158.
86. Naveed, M., Hejazi, V., Abbas, M., Kamboh, A. A., Khan, G. J., Shumzaid, M., XiaoHui, Z. Chlorogenic acid (CGA): A Pharmacological Review and Call for Further Research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018; 97: 67-74.
87. Olthof, M. R., Hollman, P. C., & Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of Nutrition*. 2001; 131(1): 66-71.
88. Rashidi, R., Rezaee, R., Shakeri, A., Hayes, A. W., & Karimi, G. A review of the protective effects of chlorogenic acid against different chemicals. *Journal of Food Biochemistry*. 2022; 46(9): e14254
89. Farah, A., & Duarte, G. Bioavailability and metabolism of chlorogenic acids from coffee. In *Coffee in health and disease prevention*. Academic Press. 2015; 789-801.
90. Ji, L., Jiang, P., Lu, B., Sheng, Y., Wang, X., & Wang, Z. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013; 24(11): 1911-1919.
91. Yun, N., Kang, J. W., & Lee, S. M. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012; 23(10): 1249-1255.
92. Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research Official Journal of The European Histamine Research Society*. 2014; 63(1): 81–90.

93. Luo, J., Yang, C., Luo, X., Yang, Y., Li, J., Song, B., Li, L. Chlorogenic acid attenuates cyclophosphamide-induced rat interstitial cystitis. *Life Sciences*. 2020; 254: 117590.
94. Liu, Y. J., Zhou, C. Y., Qiu, C. H., Lu, X. M., & Wang, Y. T. Chlorogenic acid induced apoptosis and inhibition of proliferation in human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Molecular Medicine Reports*. 2013; 8(4): 1106-1110.
95. Domitrović R, Cvijanović O, Šušnić V, Katalinić N. Renoprotective mechanisms of chlorogenic acid in cisplatin-induced kidney injury. *Toxicology*. 2014; 324: 98-107.
96. Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition*. 2017; 56: 2215-2244.
97. Lee, B., & Lee, D. G. Depletion of reactive oxygen species induced by chlorogenic acid triggers apoptosis-like death in *Escherichia coli*. *Free Radical Research*. 2018; 52(5): 605-615.
98. Narla, S. T., Bushnell, D. S., Schaefer, C. M., Nouraie, M., & Bates, C. M. (2020). Keratinocyte growth factor reduces injury and leads to early recovery from cyclophosphamide bladder injury. *The American Journal of Pathology*. 190(1): 108-124.
99. Mitrea, D. R., Malkey, R., Florian, T. L., Filip, A., Clichici, S., Bidian, C., Moldovan, R., Hoteiuc, O. A., Toader, A. M., & Baldea, I. (2020). Daily oral administration of chlorogenic acid prevents the experimental carrageenan-induced oxidative stress. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*. 71(1).
100. Zirak, M. R., Karimi, G., Rahimian, R., Jafarian, A. H., Hayes, A. W., & Mehri, S. Tropisetron ameliorates cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *European Journal of Pharmacology*. (2020); 883: 173310.
101. Baran, M., Önder, G. Ö., Göktepe, Ö., Balcıoğlu, E., Yıldız, O. G., & Arzu, Y. A. Y. İyonize Radyasyonun Karaciğer ve Böbrek Dokusu Üzerine Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2021; 18(1): 11-18.
102. Vashishtha, S. C., Nazarali, A. J., & Dimmock, J. R. Application of fluorescence microscopy to measure apoptosis in Jurkat T cells after treatment with a new investigational anticancer agent (NC 1213). *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1998; 18: 437-445.
103. Demir S, Kazaz IO, Kerimoglu G, Demir EA, Colak F, Yilmaz S, Mentese A. Astaxanthin protects testicular tissue against torsion/detorsion-induced injury via suppressing endoplasmic reticulum stress in rats. *J Invest Surg*. 2022; 35(5): 1044-1049.

104. Fleming, R. A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1997; 17(5P2): 146S-154S.
105. Bignold, L.P. Alkylating agents and DNA polymerases. *Anticancer Res*. 2006; 26(2B): 1327- 1336.
106. Osawa T, Davies D, Hartley JA. Mechanism of cell death resulting from DNA interstrand cross-linking in mammalian cells. *Cell Death Dis*. 2011; 2: e187.
107. Mansour, D. F., Salama, A. A., Hegazy, R. R., Omara, E. A., & Nada, S. A. Whey protein isolate protects against cyclophosphamide-induced acute liver and kidney damage in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017; 7(6): 111-120.
108. Stankiewicz A, Skrzydlewska E. Protection Against Cyclophosphamide-Induced Renal Oxidative Stress by Amifostine: The Role of Antioxidative Mechanisms. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2003; 13: 301–308.
109. Rehman M U, Tahir M, Ali F, Qamar W, Lateef A, Khan R, Quaiyoom A, Oday O H, Sultana S. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss Albino Mice: The Protective Effect of Ellagic acid. *Mol Cell Biochem*. 2012; 365: 119-127.
110. Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., & Wolin, M. S. Oxidant mechanisms in renal injury and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2016; 25(3): 119-146.
111. Abraham P, Isaac B, Ramamoorthy H, Natarajan K. Oral glutamine attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in the bladder but does not prevent hemorrhagic cystitis in rats. *Journal of Medical Toxicology: Official Journal of the American College of Medical Toxicology*. 2011; 7: 118
112. Topal T, Oztas Y, Korkmaz A, et al. Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. *J Pineal Res*. 2005; 38(4): 272-277.
113. Engin S, Barut EN, Yaşar YK, et al. Trimetazidine attenuates cyclophosphamide-induced cystitis by inhibiting TLR4-mediated NFκB signaling in mice. *Life Sci*. 2022; 301:120590.
114. Wang L, Pan X, Jiang L, et al. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. *Front Nutr*. 2022; 9:943911. Published 2022 Jun 29.

115. Augé C, Gamé X, Vergnolle N, Lluet P, Chabot S. Characterization and Validation of a Chronic Model of Cyclophosphamide-Induced Interstitial Cystitis/Bladder Pain Syndrome in Rats. *Front Pharmacol*. 2020; 11: 1305.
116. Alabi, Q. K., Akomolafe, R. O., Omole, J. G., Aturamu, A., Ige, M. S., Kayode, O. O., & Kajewole-Alabi, D. Polyphenol-rich extract of *Ocimum gratissimum* leaves prevented toxic effects of cyclophosphamide on the kidney function of Wistar rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2021; 21:1-14.
117. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*. 2004; 3(4): 294-300.
118. Alshahrani S, Ali Thubab HM, Ali Zaeri AM, et al. The Protective Effects of Sesamin against Cyclophosphamide-Induced Nephrotoxicity through Modulation of Oxidative Stress, Inflammatory-Cytokines and Apoptosis in Rats. *Int J Mol Sci*. 2022; 23(19): 11615. Published 2022 Oct 1.
119. Sadir S, Deveci S, Korkmaz A, Oter S. Alpha-tocopherol, beta-carotene and melatonin administration protects cyclophosphamide-induced oxidative damage to bladder tissue in rats. *Cell Biochem Funct*. 2007; 25(5): 521-526.
120. Güneş, S., Şahintürk, V., Uslu, S., Ayhancı, A., Kaçar, S. ve Uyar, R. Selenyumun siklofosfamid kaynaklı oksidatif stres ve böbrek hasarı üzerindeki koruyucu etkileri. *Biyolojik iz element araştırması*. 2018; 185: 116-123.
121. Saima, Anjum, I., Najm, S., Barkat, K., Nafidi, H. A., Bin Jordan, Y. A., & Bourhia, M. Caftaric Acid Ameliorates Oxidative Stress, Inflammation, and Bladder Overactivity in Rats Having Interstitial Cystitis. An In Silico Study. *ACS Omega*; 2023.
122. Akbaş N, Suleyman B, Mammadov R, Yazıcı GN, Bulut S, Süleyman H. Effect of taxifolin on cyclophosphamide-induced oxidative and inflammatory bladder injury in rats. *Exp Anim*. 2022; 71(4): 460-467.
123. Kalantar, M., Goudarzi, M., Khodayar, M. J., Babaei, J., Foruozandeh, H., Bakhtiari, N., & Alidadi, H. Protective effects of the hydroalcoholic extract of *Capparis spinosa* L. against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in mice. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2016; 11:(4).
124. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(7): 1126-1167.
125. Luster MI, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J. Tumor necrosis factor alpha and toxicology. *Crit Rev Toxicol*. 1999 Sep; 29(5): 491-511.

126. Wölkart G, Kaber G, Kojda G, Brunner F. Role of endogenous hydrogen peroxide in cardiovascular ischaemia/reperfusion function: Studies in mouse hearts with catalase-overexpression in the vascular endothelium. *Pharmacol Res* 2006; 54:50-6.
127. Ndrepepa G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2019; 493: 36-51.
128. Goudarzi, M., Khodayar, M. J., Hosseini Tabatabaei, S. M. T., Ghaznavi, H., Fatemi, I., & Mehrzadi, S. Pretreatment with melatonin protects against cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 2017; 31(6): 625-635.
129. Sharma S, Sharma P, Kulurkar P, Singh D, Kumar D, Patial V. Iridoid glycosides fraction from *Picrorhiza kurroa* attenuates cyclophosphamide-induced renal toxicity and peripheral neuropathy via PPAR- γ mediated inhibition of inflammation and apoptosis. *Phytomedicine*. 2017; 36: 108-117.
130. Liu, Q., Lin, X., Li, H., Yuan, J., Peng, Y., Dong, L., & Dai, S. Paeoniflorin ameliorates renal function in cyclophosphamide-induced mice via AMPK suppressed inflammation and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016; 84: 1899-1905.
131. Temel, Y., Kucukler, S., Yildirim, S. et al. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020; 393: 325–337.
132. Jezernik, K., Romih, R., Mannherz, H. G., & Koprivec, D. Immunohistochemical detection of apoptosis, proliferation and inducible nitric oxide synthase in rat urothelium damaged by cyclophosphamide treatment. *Cell biology international*. 2003; 27(10): 863-869.
133. Ayhanci A, Tanriverdi DT, Sahinturk V et al. Protective effects of boron on cyclophosphamide-induced bladder damage and oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res*. 2020; 197(1): 184–191.
134. Ho, D. R., Chen, C. S., Lin, W. Y., Chang, P. J., & Huang, Y. C. Effect of hyaluronic acid on urine nerve growth factor in cyclophosphamide-induced cystitis. *International journal of urology*. 2011; 18(7): 525-531.
135. Wanas, H., El-Shabrawy, M., Mishriki, A., Attia, H., Emam, M., & Aboulhoda, B. E. Nebivolol protects against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2021; 48(5): 811-819.

136. Mahipal P, Pawar RS. Nephroprotective effect of *Murraya koenigii* on cyclophosphamide induced nephrotoxicity in rats. *Asian Pac J Trop Med*. 2017; 10(8): 808-812.
137. Dabla PK. Renal function in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*. 2010; 1(2): 48-56.
138. Ye, H. Y., Li, Z. Y., Zheng, Y., Chen, Y., Zhou, Z. H., & Jin, J. The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *Archives of Pharmacal Research*. 2016; 39: 989-997.
139. Feng, Y., Yu, Y. H., Wang, S. T., Ren, J., Camer, D., Hua, Y. Z., Liu, Y. Chlorogenic acid protects D-galactose-induced liver and kidney injury via antioxidation and anti-inflammation effects in mice. *Pharmaceutical Biology*. 2016; 54(6): 1027-1034.
140. AL-Megrin, W. A., Metwally, D. M., Habotta, O. A., Amin, H. K., Abdel Moneim, A. E., & El-khadragy, M. Nephroprotective effects of chlorogenic acid against sodium arsenite-induced oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020; 100(14): 5162–5170.
141. E Owumi S, K Olusola J, O Arunsi U, K Oyelere A. Chlorogenic acid abates oxido-inflammatory and apoptotic responses in the liver and kidney of Tamoxifen-treated rats. *Toxicol Res (Camb)*. 2021; 10(2): 345-353. Published 2021 Feb 13.
142. Zhang, T., Chen, S., Chen, L., Zhang, L., Meng, F., Sha, S., ... & Tai, J. Chlorogenic acid ameliorates lead-induced renal damage in mice. *Biological trace element research*. 2019; 189: 109-117.