

23830

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

**SİKLOFOSFAMİD'İN SWISS BLACK C 57'NİN  
BÖBREK DOKUSU ÜZERİNE ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**(Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Biyolojisi Programı)**

**M.Sc. Şehnaz BOLKENT**

**Danışman: Prof. Dr. Saime ÖZARSLAN**

**Haziran - 1992**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

## **TEŞEKKÜR**

Zooloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olmamdan bu yana yetişmemde emeği geçen ve doktora çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen, ayrıca çalışmalarım boyunca bütün olanaklardan yararlanmamı sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Saime ÖZARSLAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Eğitimim ve doktora çalışmalarım sırasında değişik süreçlerde değerli bilgi birikimlerinden ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Osman MURATHANOĞLU'na ve Sayın Prof. Dr. Ayşe OĞUZ'a, tez çalışmalarım boyunca her türlü kolaylığı sağlayan ve gerekli malzemelerin sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen Biyoloji Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Dinçer GÜLEN'e, bu çalışmanın gerçekleşmesi için maddi desteklerini gördüğüm başta Rektör Yardımcısı Sayın Prof. Dr. Sevim BÜYÜKDEVİRİM olmak üzere İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonuna, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm olanaklardan yararlanmama izin veren ve her türlü kolaylığı sağlayan Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Avni KURU'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Cihan DEMİRCİ'ye, Araş. Gör. Kadriye AKGÜN'e, Araş. Gör. Kadir TURAN'a ve Araş. Gör. Ali KARAGÖZ'e, ayrıca, fotoğraf ve çizimlerin gerçekleştirilmesini sağlayan Ahmet VATANSEVER'e ve Celal DAR'a teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                    | SAYFA     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                               | <b>1</b>  |
| <b>2. MATERİYAL VE METOT.....</b>                                                  | <b>8</b>  |
| 2.1. Histolojik metotlar .....                                                     | 9         |
| 2.2. Sitolojik metotlar .....                                                      | 9         |
| 2.3. Histokimyasal metot .....                                                     | 9         |
| 2.4. Sitokimyasal metot.....                                                       | 10        |
| 2.5. Biyokimyasal metot .....                                                      | 11        |
| <b>3. GÖZLEMLER .....</b>                                                          | <b>14</b> |
| 3.1. Histolojik gözlemler .....                                                    | 14        |
| 3.1.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler .....                                      | 14        |
| 3.1.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br>deney hayvanlarına ait gözlemler.....  | 16        |
| 3.1.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br>deney hayvanlarına ait gözlemler.....  | 16        |
| 3.2. Sitolojik gözlemler.....                                                      | 18        |
| 3.2.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler .....                                      | 18        |
| 3.2.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br>deney hayvanlarına ait gözlemler ..... | 23        |
| 3.2.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br>deney hayvanlarına ait gözlemler.....  | 32        |

|                                                                                                      | <b>SAYFA</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>3.3. Histokimyasal gözlemler .....</b>                                                            | <b>39</b>    |
| <b>3.3.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler .....</b>                                                 | <b>39</b>    |
| <b>3.3.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br/>          deney hayvanlarına ait gözlemler .....</b> | <b>41</b>    |
| <b>3.3.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br/>          deney hayvanlarına ait gözlemler .....</b> | <b>41</b>    |
| <b>3.4. Sitokimyasal gözlemler .....</b>                                                             | <b>41</b>    |
| <b>3.4.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler .....</b>                                                 | <b>41</b>    |
| <b>3.4.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br/>          deney hayvanlarına ait gözlemler .....</b> | <b>48</b>    |
| <b>3.4.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan<br/>          deney hayvanlarına ait gözlemler .....</b> | <b>50</b>    |
| <b>3.5. Biyokimyasal gözlemler .....</b>                                                             | <b>51</b>    |
| <b>4. TARTIŞMA .....</b>                                                                             | <b>53</b>    |
| <b>5. ÖZET .....</b>                                                                                 | <b>66</b>    |
| <b>6. SUMMARY .....</b>                                                                              | <b>68</b>    |
| <b>7.KAYNAKLAR .....</b>                                                                             | <b>70</b>    |



## 1. G İ R İ Ş

Bir nitrojen mustard türevi olan siklofosfamid (2H-1,3,2-oxazaphosphorine, 2-bis (2-chloroethyl) amino tetrahydro-, 2-oxide) ilk defa Arnold ve Bourseaux tarafından 1958'de sentez edilmiştir ve hâlen, kanser tedavisinde bir antineoplastik ajan olarak, organ transplantasyonundan önce ve bazı neoplastik olmayan hastalıklarda ise immünosüpressif bir ajan olarak kullanılmaktadır.

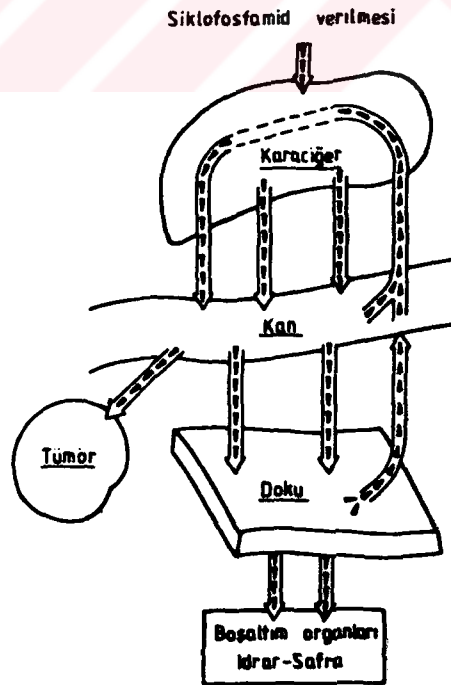
Antikanserojen , kanserojen, immünosüpressif ve sitotoksik özelliklere sahip bu ilacın etkisini gösterebilmesi için metabolik aktivasyonu şarttır (Foley ve ark., 1961; Brock ve Hohorst, 1967; Brock ve ark., 1971; Patel, 1990). Bazı araştırmacılar siklofosfamid aktivasyonunun sadece karaciğerde meydana geldiğini, diğer organlarda siklofosfamidin aktive olmadığını ileri sürerken (Foley ve ark., 1961; Sladek, 1971), bazı araştırmacılar da siklofosfamid aktivasyonunun sadece karaciğerde değil, çok az miktarda böbrekte (Brock ve Hohorst, 1967 ; Gurtoo ve ark., 1985) ve akciğerde (Brock ve Hohorst, 1967; Patel, 1990) meydana geldiğini bildirmektedirler.

Mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidazlar (MFO) olarak adlandırılan bir mikrozomal enzim sistemi, bir çok ilacı olduğu gibi, siklofosfamidi de aktive eder (Sladek, 1971). Bu MFO sistemin, siklofosfamidin biyokimyasal aktivasyonundan ve detoksifikasyonundan sorumlu olduğu ve bu ilacın, metabolize olmadan önce inaktif olduğu veya sitotoksik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (Gershwin ve ark., 1974; Gurtoo ve ark., 1985). Metabolik aktivasyon sonucu, siklofosfamidin iki reaktif sitotoksik metabolit olan akrolein ve fosforamid mustarda metabolize olduğu tespit edilmiştir (Berrigan ve ark., 1982; Gurtoo ve ark., 1985). Akroleinin, MFO sisteminin önemli bir unsuru olan sitokrom P-450 yi denatüre ederek, MFO sistemini baskıladığı ve bu baskılanmadan sorumlu olan akroleinin de idrar kesesinde (Berrigan ve ark., 1982; Gurtoo ve ark., 1985) ve akciğerde (Patel, 1990) toksisiteye neden olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, deneysel böbrek yetmezliğinin ilaç metabolizmasına ait MFO sistemini bozduğu ve

bu sistemdeki hasarın da mikrozomal sitokrom P-450 yi azalttığı belirtilmiştir (Gibson, 1985).

Freeman ve Crapo (1982), ilaca maruz kalan organizmaların çeşitli çözülebilir hücre elemanlarında, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sonucu, serbest radikallerin oluştuğunu ve bu radikallerin yapısal, metabolik ve genetik materyali değiştirerek tüm biyolojik olayları etkilediğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılara göre, hücre elemanlarını serbest radikal hasarından korumak için gelişen mekanizmalar, bazı durumlarda, toksisite gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Patel (1990) ise, MFO sistem vasıtasıyla oluşan serbest oksijen radikallerinin ve reaktif siklofosfamid metabolitlerinin, zar lipidleri ve proteinlerinde peroksidatif bir hasar oluşturduğunu ileri sürmüştür.

Siklofosfamidin karaciğer vasıtasıyla kana geçtiği, kan dolaşımı ile de sistemlerin tamamına dağıldığı ve kısmen dokuda kalan siklofosfamidin boşaltım organlarından geçerek atıldığı veya tekrar karaciğerde aktive olduğu bilinmektedir (Şekil:1). Aktive olan metabolitler, vücuda ait dokuların tümüne ya da tümöre, yine kan dolaşımı yolu ile ulaşmaktadır (Brock ve ark., 1971).



Şekil 1. Siklofosfamid metabolizması

Steinberg (1984), önemli hücre makromoleküllerini ve genellikle hızlı bölünen öldürücü hücreleri alkile ve fosforile eden siklofosfamidin çoğalmayan hücrelere karşı da etkili olduğunu belirtmiştir. Araştırmacıya göre, siklofosfamid hem B hem de T lenfositleri ile oluşan immün cevabı baskıladığından, birçok kötücül olmayan iltihabi hastalıklarda, son bir çare olarak, bu ilaca başvurulmakta ve böylece ilacın immün olarak oluşmuş yıkımı da gecikmektedir. Ayrıca, siklofosfamidin lökosit sayısında bir azalmaya sebep olduğu da bilinmektedir (Mills ve ark., 1979; Jalil ve ark., 1987).

Antidiüretik hormon gibi bir etkiye sahip olan siklofosfamidin (Steele ve ark., 1973) verilmesinden sonra 24 saat içinde, intravenöz olarak fazla miktarda sıvı verilmesinin, hastaları idrar kesesi iltihabı riskinden koruduğuna ve bu durumda, idrar toplayıcı sistemde hasar ve lösemi ihtimalinin ortadan kalktığına inanılmaktadır (Steinberg, 1984).

Siklofosfamidin in vivo metabolizması, in vitro çalışmalarla desteklenerek, erkek ve dişi sıçanlarda araştırılmış ve erkek sıçan karaciğerinden elde edilen mikrozomların, dişi sıçanlardan elde edilen mikrozomlara göre siklofosfamidin metabolize olmasını 6 ile 7 kat daha hızlı katalize ettikleri Sladek (1971) tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacıya göre, siklofosfamidin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra erkek sıçanların kanında dişilere göre çok daha fazla aktivite gösteren hepatik mikrozomal enzim sistemi, ancak enjeksiyondan 60 dakika sonra, her iki cinsiyette de aynı aktiviteye ulaşmaktadır.

Tardiff ve Dubois (1969), nitrojen mustardların genç sıçanların karaciğerlerinde mikrozomal enzimlerin gelişmesinde X-ışınlamasına benzer inhibitör etki gösterdiklerini, ayrıca ergin hayvanların karaciğerlerinde de mikrozomal enzimlerin aktivitelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre, bu bulgular, hepatik mikrozomal enzimler ile zehirsiz hale getirilen ilaçların toksik etkisindeki artışın alkile edici ajanlar ile tedavi esnasında meydana geldiğini göstermektedir.

Organizmaların bazı dokularının siklofosfamide duyarlı olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu ilacın, karaciğer (Lavin ve Koss, 1971a; Bolkent, 1987), idrar kesesi (Philips ve ark., 1961; Slavin ve ark., 1975), akciğer (Gould ve Miller, 1975; Morse ve ark., 1985; Bolkent ve Özarslan, 1988; Patel, 1990; Bolkent 1992 ) ve kalp kası (Mills ve ark., 1979; Goldberg ve ark., 1986) üzerine toksik etkileri incelenmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalar, siklofosfamidin, lösemi

(Steinberg, 1984) ve idrar kesesi kanseri (Philips ve ark., 1961; Slavin ve ark., 1975) oluşturma riskini de ortaya koymuştur. Normal dokular üzerine değişik tarzlarda etki eden siklofosfamid, idrar kesesi kanserine sebep olabildiği Schmahl ve Habs (1979) tarafından tespit edilmiştir.

Renal hastalıklarda terapötik bir ilaç olarak da kullanılan siklofosfamid enjekte edilmesinden üç saat sonra, primer metabolitlerin idrardaki konsantrasyonu yaklaşık % 30 dur (Brock ve Hohorst, 1967). Birçok sitotoksik siklofosfamid metabolitinin atılması için esas yolu idrar taşıyıcı tübüller oluşturmaktadır (Lavin ve Koss, 1971b).

Lopes (1967), 52 yaşında ovaryum kanserli bir hastaya intravenöz olarak önce 200 mg sonra da peritoneal boşluğa 400 mg siklofosfamid verilmesini takiben 38 inci günde idrarda kan ve protein, tübül epitelinde belirgin nekroz bulguları tespit edildiğini belirtmiştir. Araştırmacı, bu sitotoksik ilacın verilmesinden önce ne kliniksel ne de laboratuvar olarak toksik bulguya rastlanmadığını açıklamıştır.

Lavin ve Koss (1971b), dişi Fischer 344 sıçanlara, intraperitoneal olarak, 200 mg/kg tek doz siklofosfamid verdikten sonra, 10 dakika ile 48 saat arasındaki değişik zamanlarda kestikleri hayvanların böbreklerini, ışık ve elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, siklofosfamidin tek dozunun, idrar taşıyıcı tübüllerde, 10 dakikadan başlayıp 48 saat sonraki zaman dilimine doğru gittikçe artan şekilde, özellikle proksimal tübülün epitel hücrelerinde belirgin değişikliklere sebep olduğunu, distal tübüllerdeki değişikliklerin proksimal tübüllerdeki kadar belirgin olmadığını ve glomeruluslarda hiç hasar gözlenmediğini belirtmişlerdir.

Hsu ve Tsai (1982), belirli bir süre, intraperitoneal olarak, 50 veya 110 mg/kg, tek doz siklofosfamid enjekte edilmiş ergin farelerden yeni doğmuş 3, 7, 10, 14 ve 20 günlük farelerin glomeruluslarında, mesangiolizin çeşitli kademelerini ve bunu takiben yaygın mesangial ve segmental skleroz gözlediklerini belirtmektedirler.

Siklofosfamidin ovaryum kanserli hastada oluşturduğu böbrek toksisitesi ve yeni doğmuş farelerin glomerulusları üzerine etkisi dışında, sadece Lavin ve Koss (1971b) normal ergin sıçanlara 200 mg/kg tek doz siklofosfamid uygulaması sonucu renal tübüllerde oluşan değişikliklerden bahsetmektedirler. Literatür taraması sonucu, yüksek doz ve uzun süre siklofosfamid verilmesinin böbrek üzerindeki etkilerinin tam açıklığa kavuşmadığı gözlenmiştir.

Glukoz-6-fosfataz (D-Glukoz-6-fosfat fosfo hidrolaz, EC 3.1.3.9) hem hidrolitik ve hem de sentetik aktiviteden dolayı multi-fonksiyonel bir enzimdir. Bu enzim, esas olarak, karaciğerde ve böbrekde bulunur, mikrozomlarda yerleşmiştir (Baginski ve ark., 1974). Kan akımına glukoz sağlayan hücrelerde , glukoz-6-fosfatın glukoz hidrolizi glukoz-6-fosfataz ile başlar (Lojda ve Schiebler, 1979).

Glukoz-6-fosfatazın ilk yapısal lokalizasyonu Tice ve Barnett (1962) tarafından sıçan karaciğerinde incelenmiştir. Ericsson (1966) ise, bu enzimi glutaraldehit ile fikse edilmiş sıçan karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda gösteren çalışmalarla mükemmel sonuçlar elde etmiştir.

Proksimal tübül (P), ultrastrüktürel olarak, üç segmente ayrılır. Kıvrıntılı proksimal tübülün başlangıcını ve orta kısmını P<sub>1</sub> segmenti, kıvrıntılı proksimal tübülün sonunu ve düz proksimal tübülün başlangıcını P<sub>2</sub> segmenti, düz tübülün kalan kısmını da P<sub>3</sub> segmenti oluşturur (Maunsbach, 1966; Kriz ve Bankir, 1988). P<sub>1</sub> ve P<sub>2</sub> segmentlerinde belirgin bir aktivite gözlemlendiği, P<sub>3</sub> segmentine ait ilk hücrelerde ya çok zayıf bir sitoplazmik reaksiyon gözlemlendiği veya hiç reaksiyon gözlenmediği ve ışık mikroskobu ile proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde incelenen glukoz-6-fosfataz aktivitesinin muhtemelen endoplazmik retikuluma ait olabileceği belirtilmiştir (Jacobsen ve ark., 1967; Jacobsen ve Jorgensen, 1973).

Proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde bu enzimin ultrastrüktürel lokalizasyonu ilk defa Kanamura (1971) tarafından gösterilmiştir. Glukoz-6-fosfataz aktivitesinin, hem düz yüzlü ve hem de granüllü endoplazmik retikulum membranlarının dış ve genellikle iç yüzeyinde, bu membranlar tarafından kuşatılmış alanların içinde, nukleus zarları arasındaki perinuklear aralıkta kuvvetli, fırça kenarda ise zayıf bir reaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Kanamura, 1971). Proksimal tübülün ilk iki segmentinde, glukoz-6-fosfatazın meydana gelişi ile glukoneogenezin nefronun bu kısmında gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Jacobsen ve Jorgensen, 1973).

Jacobsen ve arkadaşları (1967), ışık mikroskobu ile, birinci segment hücrelerinin (P<sub>1</sub>) sitoplazmasında ince ağ şeklinde, çok küçük granüller; ikinci segment hücrelerinin (P<sub>2</sub>) sitoplazmalarında ise kaba ağ şeklinde, büyük granüller gözlemişlerdir. P<sub>1</sub> ve P<sub>2</sub> segmentleri arasındaki bu reaksiyon farkının, endoplazmik retikulumun şeklindeki farktan ileri geldiği Kanamura (1971) tarafından açıklanmıştır.

Araştırmacı , proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinin çoğunda endoplazmik retikulumun genellikle tübül veya vesikül şeklinde, bazı hücrelerde ise sisterna şeklinde olduğunu; tübül ve vesiküllere ait reaksiyon ürününün ince ağ şeklinde, sisternalara ait reaksiyon ürününün ise kaba ağ şeklinde olduğunu ortaya koymuştur.

Distal kıvrıntılı tübül hücrelerinde de, glukoz-6-fosfataz aktivitesinin yerleşimi proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerindeki benzer, fakat reaksiyon çok azdır (Böti ve ark., 1982).

Kanamura (1971), glukoz-6-fosfatazın, endoplazmik retikulum membranlarının genellikle iç yüzeyine yerleştiğini ve glukoneogenezin son basamağının, bu endoplazmik retikulum membranlarında gerçekleştiğini göstermiştir. Araştırmacıya göre, bu enzim, glukozun renal tübüller tarafından glomerular filtrattan reabsorbe edilmesinden ve taşınmasından sorumludur. Araştırma sonuçlarına göre, proksimal tübüllerde glukozun reabsorbe olduğu yer ile glukoz-6-fosfatazın bulunduğu yerin aynı olduğu tespit edilmiştir (Böti ve ark., 1982).

Glukoneogenik dokular olan karaciğer ve böbrek korteksinde, glukoneogenez enzimleri bulunur (Veeraragavan ve ark., 1981). Hem karaciğer ve hem de böbrekte aynı özelliklere sahip olduğu tespit edilen bu enzimlerin aynı gen tarafından kontrol edildiği belirtilmiştir. (Freedland, 1962; Fisher ve Stetten, 1965; Nordlie ve Arion, 1965). Glukoz-6-fosfatın glukozla hidrolizi sonucu serbest kalan glukoz, hücreden kan damarı içeren ekstrasellüler alanlara yayılır. Böylelikle, kan glukozu artar. Karaciğer ve bir dereceye kadar da böbrekler kan şekerine katkıda bulunmuş olurlar. Renal glukoneogenez, kan glukozu düştüğü zaman artar. Kan şekeri arttığı zaman, hepatik glukogenolizden dolayı böbreklerde glukoneogenez aracılığı ile glukoz sentezine gerek yoktur (Veeraragavan ve ark., 1981). Araştırmacılara göre, böbrekteki glukoz-6-fosfataz, metabolik fonksiyonda, hepatik enzimden farklı bir rol oynayabilir.

Kanserojen, antikanserojen, antimitotik, immünosüpressif, teratojenik, mutajenik ve sitotoksik bir madde olan siklofosfamid, bütün bu özelliklerinden dolayı çok farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu etkilerin her biri, amaca bağlı olarak, farklı doz ve farklı sürelerde ortaya çıkmaktadır. Çeşitli hastalıklarda siklofosfamidin yararlı olduğu tespit edilmesine rağmen, bu ilacın kullanılmasından vazgeçilmesinin ana sebebi toksisite riskidir.

Siklofosfamidin ergin hayvanların renal korpüskülleri üzerindeki etkisi henüz incelenmemiştir. Proksimal ve özellikle distal

tübüller üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, siklofosfamidin böbrek korteksindeki proksimal ve distal kıvrıntılı tübüller ile renal korpüsküller üzerindeki etkisinin, histolojik ve sitolojik yönden, ayrıntılı bir şekilde araştırılmasının gerekli olduğu anlaşılmıştır.

Literatürden bilindiğine göre, siklofosfamidin böbrek tübül epitelinde, glukoz-6-fosfataz aktivitesi üzerine etkisi henüz incelenmemiştir. Histokimyasal, sitokimyasal ve biyokimyasal bulguların birbirini tamamlayabileceği ve böylelikle olay hakkında çok daha güvenilir sonuçlar elde edileceği düşünülmüştür. Bu nedenle böbrekte sadece yapısal değişiklikler değil, karbonhidrat metabolizmasında yani glukoneogeneze anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfataz aktivitesi de histokimyasal, sitokimyasal ve biyokimyasal olarak incelenmiştir. Bu çalışma, bütün bu veriler dikkate alınarak, yüksek dozda ve uzun süreli siklofosfamid uygulamasının ışık ve elektron mikroskobu düzeyinde oluşturabileceği değişiklikleri hem morfolojik ve hem de enzimatik yönden değerlendirmeyi amaçlamıştır.



## 2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada 90 adet erkek, Swiss Black C 57 fare kullanıldı. Deneyler öncesi ve deneyler süresince hayvanlar, pelet yem ve musluk suyu ile beslendiler. Kullanılan ilacın dozuna bağlı olarak, deney hayvanları iki grup altında toplandılar. Bu grupların her biri 30 deney, 15 kontrol olmak üzere toplam 45 hayvan içermektedir.

Grup I i oluşturan 3 aylık , 20-28 gram ağırlığında deney hayvanlarının derileri altına, steril saf suda eritilerek hazırlanan % 1 lik siklofosfamid monohidrat (ISOPAC®, Sigma) eriyiği, 125 mg/kg olacak şekilde, her gün saat 12.00-13.00 arası, 9 gün süreyle enjekte edildi. Yukarıda belirtilen özelliklere sahip kontrol hayvanların derileri altına da, deney hayvanlarına enjekte edilene eş miktarda ve sürede %0,9 luk steril fizyolojik su enjekte edildi.

Grup II yi oluşturan 1.5 aylık, 18-24 gram ağırlığında deney hayvanlarının derileri altına ise, her gün saat 10.00-11.00 ve 17.00-18.00 arası olmak üzere günde iki kez, 125 mg/kg olarak, günde toplam 250 mg/kg siklofosfamid monohidrat, 8 gün süreyle enjekte edildi. Bu gruba ait özellikleri içeren kontrol hayvanların derileri altına da, yine deney hayvanlarına enjekte edilene eş miktarda ve sürede % 0.9 luk steril fizyolojik su enjekte edildi.

Her grubun 10 deney, 5 kontrol hayvanı, histolojik ve sitolojik metotlar, 10 deney, 5 kontrol hayvanı, histokimyasal ve sitokimyasal metotlar, diğer 10 deney ve 5 kontrol hayvanı ise, spektrofotometrik metot için kullanıldılar.

Grup I i oluşturan deney hayvanları kontrolleri ile birlikte son enjeksiyondan 1 saat sonra, grup II yi oluşturan deney hayvanları ise, yine kontrolleri ile birlikte son enjeksiyondan 1 gün sonra kesildiler.



Kloroform ile bayıltılan hayvanların çok çabuk biçimde çıkarılan böbreklerine aşağıda açıklanan metotlar uygulandı.

### 2.1. Histolojik metotlar

Böbrekden alınan doku parçaları Bouin fiksatif ile fikse edilip yükselen alkol serilerinden geçirilerek parafine gömüldüler. 5  $\mu$  kalınlıkta alınan kesitlere, Hematoksilin-Eosin (Humanson, 1972), Periodik-Asit-Schiff (PAS) (Humanson, 1972) ve Gurr'un modifikasyonu ile Masson'un üçlü boyası (Humanson, 1972) uygulandı. Masson'un üçlü boyasında kesitler, asit fuksinin % 1 lik eriyiğinde 5 dakika yerine, % 0,1 lik eriyiğinde 5 saniye tutuldular. Her üç boyama metodunda da diğer kademeler aynen uygulandı. Kesitler Carl Zeiss Ultraphot II ışık mikroskopunda incelendiler. Fotoğraf çekiminde mavi filtre kullanıldı.

### 2.2. Sitolojik metotlar

Böbrek korteksine ait 1 mm<sup>3</sup> lük doku parçaları Sörensen'in fosfat tamponu (pH 7.2) ile hazırlanan % 2 lik glutaraldehit (Merck) ile 2 saat fikse edildikten sonra, aynı fosfat tamponu (pH 7.2) ile 1 saat yıkandılar. Doku parçaları tamponlanmış (pH 7.2) % 1 lik osmiyum tetraoksit (Merck) ile +4 °C de, 1 saat süreyle tekrar fikse edildiler ve daha sonra aynı fosfat tamponu ile yıkandılar. Bu aşamaya kadar uygulanan tüm işlemler, buzdolabında buz dolu bir kabin içinde yürütüldüler. Yükselen alkol serilerinden ve propilen oksitten geçirilerek suyu alınan doku parçaları, 1:1 (2 saat) ve 3:1 (1 gece) epon-propilen oksit aşamalarından geçirilip, Luft'un (1961) metoduna göre, epon 812 ye gömüldüler. C. Reichert Om U3 ultramikrotomu ile alınan 1  $\mu$  kalınlıkta kesitler % 1 lik toluidin mavisi (Bancroft ve Stevens, 1982) ile boyandılar. Daha sonra alınan 400-500 Å luk ince kesitler, 300 delikli gridler üzerine alınıp, uranil asetat (Bancroft ve Stevens, 1982) ve kurşun sitrat (Reynolds, 1963) ile boyandılar ve Carl Zeiss EM 9 S-2 elektron mikroskopunda incelendiler.

### 2.3. Histokimyasal metot

Glukoz-6-fosfataz fiksasyondan çok çabuk etkilendiğinden taze kryostat kesitlerin çok daha uygun olduğu belirtilmiştir (Lojda ve Schiebler, 1979). Böbrek korteksinden alınan 2-3 mm<sup>3</sup> lük parçalar, -15 ile -20 °C de, TISSUE-TEK Mikrotom-Kryostatda, Tissue-Tek gömme

ortamında hemen donduruldular. 10  $\mu$  kalınlıkta kesitler oda ısısında kurutuldular. Kesitler kurşun metoduna göre (Bancroft ve Stevens, 1982), aşağıda konsantrasyonları ve oranları belirtilen Wachstein ve Meisel inkubasyon ortamında (pH 6.7), oda ısısında, 15 dakika tutuldular.

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| % 0.125 Glukoz-6-fosfat . . . . .   | 4 ml   |
| Tris-malat tampon (pH 6.7). . . . . | 4 ml   |
| % 2 Kurşun nitrat . . . . .         | 0.6 ml |
| Saf su . . . . .                    | 1.4 ml |

İnkubasyonu takiben saf suda iyice yıkanan kesitler, % 1 Na<sub>2</sub>S ile muamele edilip tekrar saf su ile yıkandıktan sonra, % 10 nötral formalinde fikse edildiler. Bu kesitler saf suda yıkanıp, fosfat tamponu (pH 7) ile hazırlanmış gliserin jelle (Bancroft ve Stevens, 1982) kapatıldılar.

Glukoz-6-fosfataz aktivitesini inhibe etmek için inkubasyon ortamına 1 mM CuSO<sub>4</sub>, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF katıldı (Kanai ve ark., 1986). Bu inhibitör maddeleri içeren inkubasyon ortamı ile glukoz-6-fosfat içermeyen inkubasyon ortamı kontrol olarak kullanıldılar.

Histokimyasal metotta kullanılan nötral formalin Merck, diğer kimyasal maddeler Sigma ürünüdürler.

#### 2.4. Sitokimyasal metot

Böbrek korteksinden alınan 1 mm<sup>3</sup> lük taze doku parçaları 0.1 M sodyum kakodilat (pH 7.2) ile hazırlanan % 2 glutaraldehit ile + 4 °C de, 45 dakika fikse edildiler ve fiksasyonu takiben 0.23 M sukroz içeren 0.1 M sodyum kakodilat (pH 7.2) ile + 4 °C de, 1 saat içinde üç kez değiştirilerek yıkandılar (Kanai ve ark., 1986). Doku parçalarının bir kısmı, 30  $\mu$  kalınlıkta kesilebilmeleri için, Tissue-Tek gömme ortamı içinde bloklandılar.

1mm<sup>3</sup> lük doku parçaları ve 30  $\mu$  kesitler Wachstein ve Meisel inkubasyon ortamında (Bancroft ve Stevens, 1982), oda ısısında, 30 dakika süre ile inkübe edildiler. Saf suda yıkandıktan sonra tamponlanmış (pH 7.2) % 1 OsO<sub>4</sub> de, + 4 °C de, 1 saat, ikinci defa fikse edildikten sonra, yükselen alkol serilerinde ve propilen oksitte suyu alınan doku parçaları ve kesitler, bilinen yol izlenerek, epon 812 ye gömüldüler.

İnkubasyon ortamına ilave edilen inhibitör maddeler 1mM CuSO<sub>4</sub>, 10 mM ZnCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF dır (Kanai ve ark., 1986). Bu inhibitör maddeleri içeren ve substrat içermeyen inkubasyon ortamları yine kontrol amacı ile kullanıldılar. Doku parçaları ve kesitlerin bir kısmı inhibitör maddeleri içeren inkubasyon ortamından önce aşağıda belirtilen ve aynı inhibitör maddeleri içeren bir ön inkubasyon ortamına (pH 7.2) alındılar (Kanai ve ark., 1986).

0.1 M Sodyum kakodilat (pH 7.2)

0.23 M Sukroz

+

1 mM CuSO<sub>4</sub>

10 mM ZnCl<sub>2</sub>

10 mM NaF

Wachstein ve Meisel inkubasyon ortamı (pH 6.7) histokimyasal metotta belirtilen konsantrasyonlarda ve oranlarda hazırlandı.

Sitokimyasal metotlarda kullanılan kimyasal maddelerin tümü Sigma ürünüdürler.

## 2.5. Bilyokimyasal metot

Mikrozomal süspansiyondaki glukoz-6-fosfataz aktivitesi Baginski ve arkadaşları (1974) nın önerdiği metoda göre ölçüldü. Hayvandan çıkarılan böbrek tartıldı ve süratle 4 parçaya ayrıldı. Bu parçalar, kandan arıtmak için 0.25 M sukroz ile iyice yıkandıktan sonra, buz dolu bir kabın içindeki petrider ufak parçalara ayrıldı. Parçalanan doku, soğutulmuş 3 ml 0.25 M sukroz solusyonu ile, buz dolu cam kap içindeki cam-teflon 'homogenizer'de (Thomas) 5 dakika homojenize edildi. 1,5 ml lik Eppendorf tüplere yerleştirilen homojenizat soğutulmuş (0-4 °C) Eppendorf santrifüjü 415 de 11.000 g de, 30 dakika santrifüj edildi ve tortu atıldı. Üst sıvı 105.000 g de, 1 saat süre ile Sorval marka ultra-santrifüj OTD 75B de santrifüj edildi ve üstteki sıvı atıldı. Çökelti üzerine soğutulmuş 2 ml sukroz/EDTA solusyonu eklenip, kısa bir süre bekletildi ve tekrar buz dolu bir beher içindeki cam-teflon homogenizerde, 5 dakika homojenize edildi. Homojenizat, Eppendorf tüblere bölünerek, -22 °C lik derin dondurucuda saklandı ve kullanılacağı zaman buzda eritildi.

Hem deney hem de kontrol hayvanların her biri ve ölçümlerin her bir serisi için üç örnek, bir standart, bir blank (kör) ve bir kontrol hazırlandı.

Spektrofotometrik analizlere ait bütün eriyikler için deiyonize distile su kullanıldı ve solusyonlar aşağıda belirtilen oranlarda hazırlandılar.

|                |                                     |
|----------------|-------------------------------------|
| 0.25 M         | Sukroz                              |
| 0.25 M/ 1 mM   | Sukroz/EDTA-Na <sub>4</sub>         |
| 0.1 M          | Glukoz-6-fosfat                     |
| 0.1 M          | Kakodilat tampon (pH 6.5)           |
| 1.5 mM         | Standart fosfat solusyonu           |
| (W/v) %2 / %10 | Askorbik asit / trikloroasetik asit |
| (W/v) % 1      | Amonyum molibdat                    |
| (W/v) %2 / %2  | Arsenit/sitrat                      |

0.1 ml sukroz/EDTA, 0.1 ml glukoz-6-fosfat ve 0.1 ml kakodilat tampon iyice karıştırıldı. Bu karışımın üzerine 0.1 ml örnek (mikrozomal süspansiyon) ilave edildi ve tekrar karıştırıldı. Standarta örnek yerine 0.1 ml fosfat solusyonu, blanke örnek yerine 0.1 ml sukroz/EDTA solusyonu ilave edilip karıştırıldı. Bütün tübler 37 °C lik su banyosunda, 10 dakika inkubasyona maruz bırakıldı. Inkubasyonu takiben bütün tüblere reaksiyonu durdurmak amacı ile 2 ml askorbik asittrikloroasetik asit ilave edildi. Reaksiyonu durdurduktan sonra kontrole 0.1 ml örnek ilave edildi ve karıştırıldı. Bütün tübler masa tipi santrifüjde, 3000 g de, 3 dakika santrifüj edildi. 1 ml lik üst sıvı temiz tüblere alındı. Bu tüblerin üzerine 0.5 ml molibdat solusyonu ilave edilip karıştırıldıktan sonra, 1 ml arsenit/sitrat solusyonu katıldı ve tekrar karıştırıldı. 15 dakika beklendikten sonra, spektrofotometrik ölçümler Shimadzu UV-160 da yapıldı.

Inkubasyon hacmi : 0.4 ml

Son hacim : 2.5 ml

Işık yolu : 1 cm

Aktivite, glukoz-6-fosfattan ayrılan inorganik fosfat ölçümü ile tayin edildi. Açığa çıkan inorganik fosfat amonyum molibdat ile belirlendi. Askorbik asit ise indirgeyici ajan olarak kullanıldı. 840 nm de mavi fosfomolibdaz kompleksi olarak tayin edilen, belli bir zaman biriminde ayrılan fosfat miktarı glukoz-6-fosfataz aktivitesini verdi.

Biyokimyasal metotta kullanılan tüm kimyasal maddeler Sigma ürünüdürler.

Glukoz-6-fosfatazın volüm aktivitesi, 0.1 ml örnek ile 10 dakikalık bir inkubasyon zamanında hesaplandı.

$$\text{Volüm aktivite} = \frac{E_{\text{örnek}} - E_{\text{kontrol}}}{E_{\text{standart}}} \times \frac{1500}{t} \text{ U/l (37 °C)}$$



### 3. G Ö Z L E M L E R

#### 3.1. Histolojik gözlemler

##### 3.1.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler

Her iki gruba ait kontrol hayvanların proksimal tübül, distal tübül ve renal korpüskül yapılarında gözlenen özelliklerden aşağıda bahsedilmektedir.

**Proksimal tübüller:** Tek tabakalı, mikrovillüslü, yüksek kübik epitelden oluşan tübüllerin lümenleri dardır (Şekil:2,3). Hücrelerin apikalinde, lümene bakan yüzeyde yer alan fırça kenar binlerce uzun mikrovillusun birbirleriyle sıkıca ve düzenli bir şekilde sıralanmasından oluşmaktadır. Tübül hücrelerinin fırça kenarında ve bazal membranında PAS (+) reaksiyon izlenmektedir (Şekil: 5,6). Tübül hücrelerinin sitoplazmaları eosinofilik reaksiyon gösterir ve tanecikli görünümündedir (Şekil:4). Bu hücrelerin merkezinde küre şeklinde bir nukleus yer almaktadır (Şekil:3). Birkaç tübül lümeninde, sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar dikkati çekmektedir (Şekil:7).

**Distal tübüller:** Distal tübül epitelini oluşturan hücrelerin boyu proksimal tübül hücrelerinininkinden daha kısa, sitoplazmaları daha az eosinofiliktir (Şekil:4). Bu tübüllerin lümenleri oldukça geniştir (Şekil:2,3). Tübül hücreleri apikal bölgeye yakın küre şeklinde bir nukleus içermektedir (Şekil :3). Hücrelerin sitoplazmaları tanecikli görünümündedir (Şekil :4).

**Renal korpüsküller:** Bowman kapsülünün parietal yaprağının ve glomerulus kapiller endotel hücrelerinin bazal membranlarında PAS (+) reaksiyon izlenmiştir (Şekil:5,6). Tek tabakalı yassı epitelden oluşan parietal yaprak ve oldukça büyük, çok özel epitel hücrelerinin oluşturduğu viseral yaprak arasında kalan kapsül aralığı genelde yok denecek kadar dar bir alana sahiptir. Glomerulus kitlesini oluşturan kapiller endotel hücrelerine ait nukleuslar lümene doğru çıkıntı yapmakta ve bu kapillerlerde eritrositler gözlenmektedir (Şekil:7).

**Şekil 2-7: Kontrol hayvanlara ait şekiller.**

**Şekil 2 :** Böbrek korteksinin genel görünümü. Yüksek kübik epitel-  
den oluşan proksimal tübüllerin dar lümenleri (→), kübik  
epitelden oluşan distal tübüllerin geniş lümenleri (⇒) ve  
renal korpusküller (Rk). Hematoksilin-Eosin. X 126

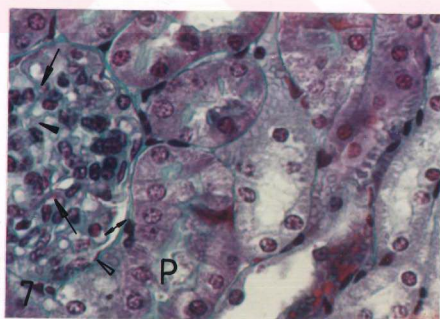
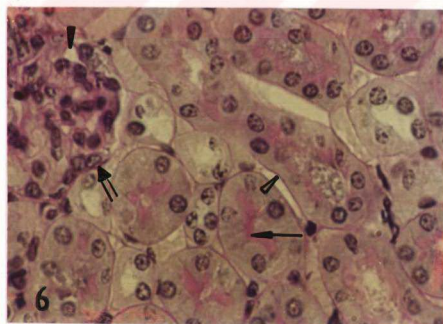
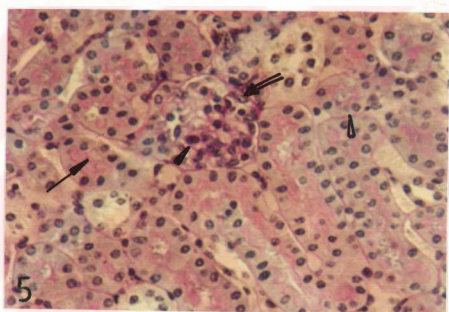
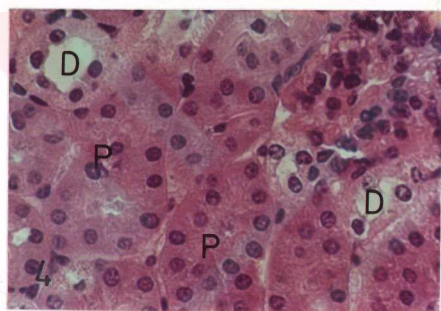
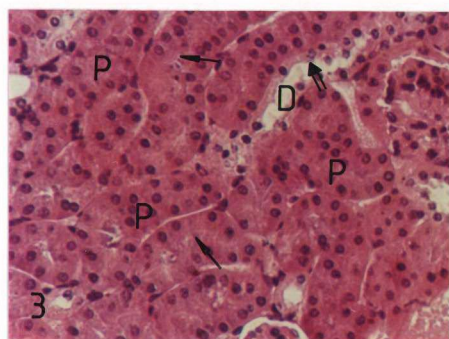
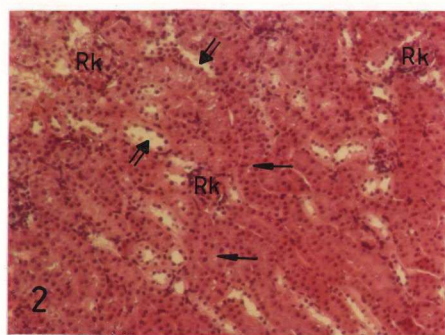
**Şekil 3 :** Merkezinde küre şeklinde nukleus içeren hücrelerden  
oluşmuş proksimal tübüllerin (P) dar lümenleri (→),  
apikale yakın yine küre şeklinde nukleus içeren  
hücrelerden oluşmuş distal tübüllerin (D) geniş lümenleri  
(⇒). Hematoksilin-Eosin. X 326

**Şekil 4:** Eosinofilik reaksiyon gösteren ve tanecikli sitoplazma  
içeren hücrelerden oluşmuş proksimal tübüller (P) ve  
daha az eosinofilik reaksiyon gösteren ve tanecikli  
sitoplazma içeren hücrelerden oluşmuş distal tübüller  
(D). Hematoksilin-Eosin. X 500

**Şekil 5-6 :** Proksimal tübül hücrelerinin fırça kenarında (→) ve bazal  
membranında (Δ). Bowman kapsülünün parietal  
yaprağının (⇒) ve glomerulus kapiller endotel  
hücrelerinin (▲) bazal membranlarında PAS (+) reak-  
siyon. PAS. X 320, X 500

**Şekil 7 :** Lümenlerinde sitoplazma artıkları ve atılmış nukleus  
içeren proksimal tübül (P), kapiller endotel hücreleri (→),  
kapsül aralığı (⇔), parietal yaprak (Δ) ve visceral yaprak  
(▲) hücreleri. Masson'un üçlü boyası. X 500







### 3.1.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına alt gözlemler

**Proksimal tübüller:** Tübül hücrelerinin fırça kenarı genelde düzgün bir yapıya sahip olmakla beraber, bazı tübüllerde yer yer parçalanma ve bozulmalar gözlenmektedir (Şekil :10). Hücrelerin fırça kenarında ve bazal membranlarında gözlenen PAS (+) reaksiyon kontrollardakiyle benzerlik göstermektedir (Şekil: 11,12). Bazı tübüllerin genişlemiş lümenlerinde sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar (Şekil :10), tübül hücrelerinin bazılarında da piknotik nukleuslar gözlenmektedir (Şekil:13). Bazı proksimal tübül hücreleri yapısal bakımdan belirgin değişiklikler gösterirken bazıları da kontrollardakine yakın bir durum göstermektedir (Şekil:8).

**Distal tübüller:** Bazı distal tübül hücrelerinde, piknotik nukleuslar ve apikal membranda parçalanmalar gözlenmektedir (Şekil:10). Tübüllerin lümenlerinin genellikle sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar içerdikleri dikkati çekmektedir (Şekil:9).

**Renal korpüsküller:** Bowman kapsülünün parietal yaprağının ve glomerulusun kapiller endotel hücrelerinin bazal membranlarındaki PAS (+) reaksiyon genellikle kontrollardaki ile benzerlik göstermektedir (Şekil: 11,12). Birkaç Bowman kapsülünün parietal yaprağındaki parçalanmanın dışında (Şekil:13), gerek Bowman kapsülünde gerekse glomerulusda hiçbir yapısal değişiklik gözlenmemektedir.

### 3.1.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına alt gözlemler

**Proksimal tübüller:** Proksimal tübül hücrelerinde fırça kenarın devamlılığının bazı bölgelerde yer yer apikal membranın kopup ayrılması sonucu izlenemediği (Şekil:15) ve lümenin daha geniş bir görünüm aldığı dikkati çekmektedir (Şekil:14). Fırça kenarda bazı bölgelerde PAS (+) reaksiyonun azaldığı gözlenmektedir (Şekil: 17,18). Pek çok tübülün genişlemiş lümeni sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar içermektedir (Şekil:16). Hücreler genellikle apikal bölgelerinde irili ufaklı çok sayıda vakuol içerirler (Şekil:19). Bazı tübül hücrelerinde ise piknotik nukleuslar gözlenmektedir (Şekil:17).

**Şekil 8-13:** 125 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait şekiller

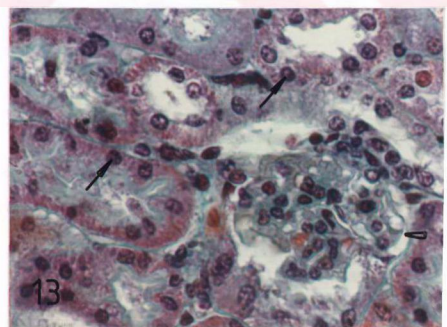
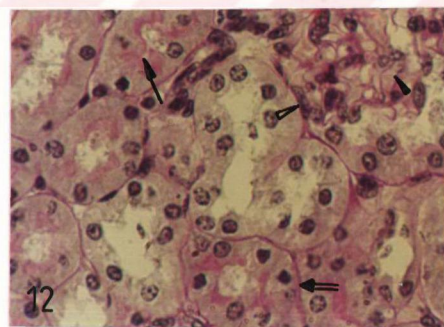
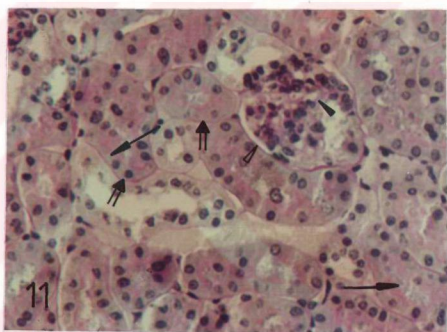
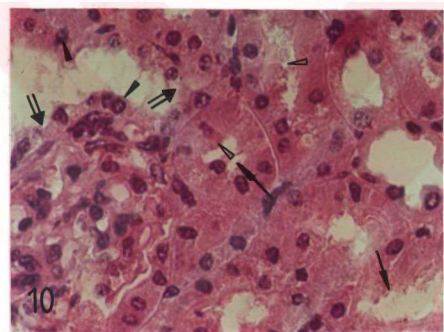
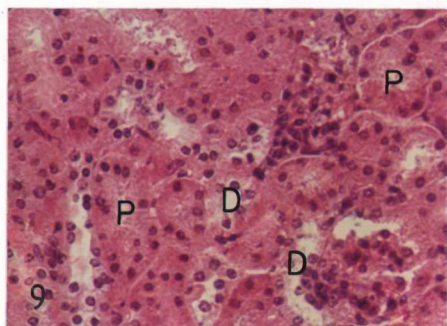
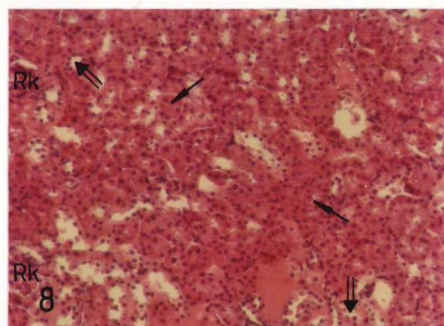
**Şekil 8** : Böbrek korteksinin genel görünümü. Proksimal tübüller (→), distal tübüller (⇒) ve renal korpüsküller (Rk). Hematoksilin-Eosin. X 126

**Şekil 9** : Lümenlerinde sitoplazma artıkları ve atılmış nükleuslar içeren proksimal (P) ve distal (D) tübüller. Hematoksilin-Eosin. X 320

**Şekil 10** : Bazı proksimal tübül hücrelerinde yer yer parçalanmış, bozulmuş fırça kenar (→), proksimal tübüllerin genişlemiş lümenlerinde sitoplazma artıkları ve atılmış nükleuslar (Δ). Bazı distal tübül hücrelerinde piknotik nükleuslar (▲) ve apikal membranda parçalanma (⇒). Hematoksilin-Eosin. X 500

**Şekil 11,12:** Proksimal tübül hücrelerinin fırça kenarında (→) ve bazal membranında (⇒), Bowman kapsülünün parietal yaprağının (Δ) ve glomerulusun kapiller endotel hücrelerinin bazal membranlarında (▲) PAS (+) madde. PAS. X 320, X 500

**Şekil 13** : Proksimal tübül hücrelerinde piknotik nükleuslar (→) ve Bowman kapsülünün parietal yaprağında parçalanma (Δ). Masson'un üçlü boyası. X 500





**Distal tübüller:** Distal tübüllerin lümenlerinde genellikle sitoplazma artıkları ve atılmış nükleuslar gözlenmektedir (Şekil:16). Tübül hücreleri çoğunlukla apikal bölgelerinde çok sayıda iri vakuoller içermekte, dolayısıyla sitoplazma çok az bir bölgede gözlenmektedir (Şekil:19). Birçok hücrede apikal membranda parçalanma ve nükleus-da piknotik bir görünüm dikkati çekmektedir (Şekil:16).

**Renal korpüsküller:** Bowman kapsülünün parietal yaprağının ve glomerulusun kapiller endotel hücrelerinin bazal membranlarındaki PAS (+) reaksiyon genellikle kontrollardaki ile benzerlik göstermektedir (Şekil:17,18). Parietal ve viseral yaprak arasını oluşturan kapsül aralığı dikkati çekecek derecede genişlemiştir (Şekil:14,19). Bazı glomerulus kitlelerine ait hücrelerin sayıca azaldığı, bazılarının ise oldukça hasar gördüğü ve sanki kaybolmakta olduğu gözlenmiştir (Şekil:15). Bowman kapsülünün parietal yaprağı ise izlenemeyecek kadar bozulmuştur (Şekil:15,17).

### 3.2. Sitolojik gözlemler

#### 3.2.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler

Her iki gruba ait kontrol hayvanların proksimal tübül, distal tübül ve renal korpüskül yapılarında gözlenen özelliklerden aşağıda bahsedilmektedir.

**Proksimal tübüller:** Mikrovilluslar arasında yer alan, sitoplazma içine doğru ilerleyen, uç kısımda genişleyen ve "apikal kanalcık" adını alan tüp şeklinde invaginasyonlar ve yine bu kanalcıkların uçlarında "endositotik vesiküller" gözlenmektedir (Şekil:22). Bunları sınırlayan membran, plazma membranı ile devamlı ve belirgin bir yüzey örtüsü oluşturmaktadır (Şekil: 21). Kanalcıkların uçlarında oluşan vesikül görünümündeki bu yapıların genelde yoğun madde birikimi ile örtülü yüzeyler içerdikleri, birkaç apikal kanalcığın hücre yüzeyine açıldığı (Şekil:22) ve plazma membranının dış yüzeyinin de bu yoğun materyali içerdikleri dikkati çekmektedir (Şekil:21,22).

Hücrelerin merkezinde küre şeklinde bir nükleus yer almaktadır (Şekil: 20, 23). Bazal membran katlanmaları arasına yerleşmiş oval, küresel ve uzun çomak şeklinde mitokondriyumlar gözlenmektedir (Şekil 20,23). Sayıca az olan koyu hücreler yoğun sitoplazma ve bol mitokondriyum içermektedirler (Şekil : 21).

**Şekil 14-19:250 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait şekiller**

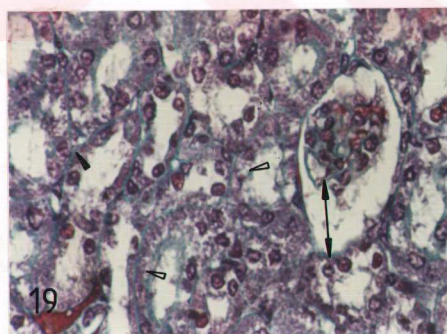
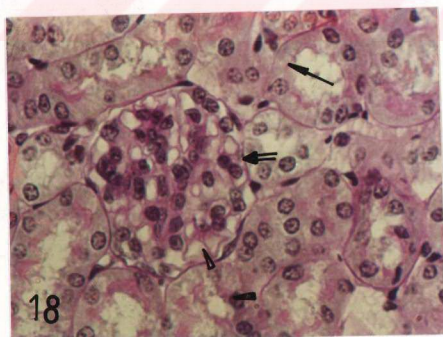
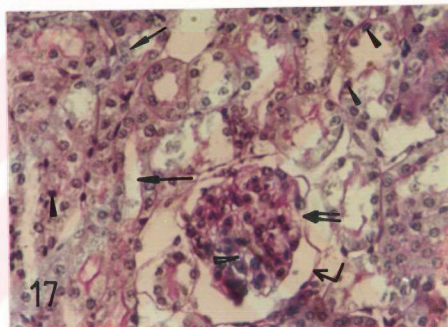
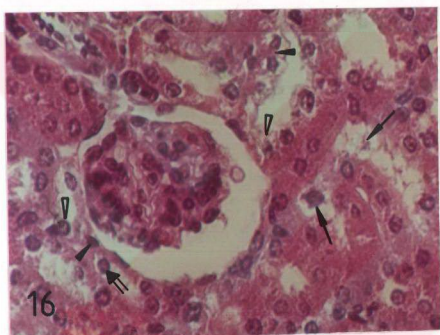
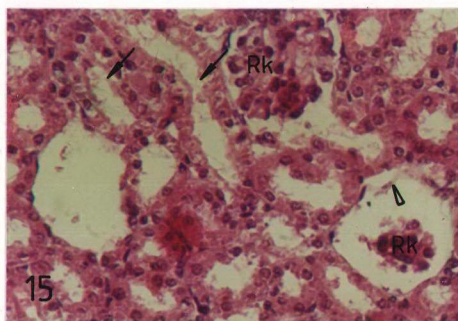
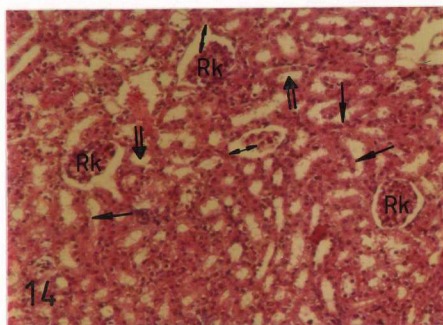
**Şekil 14** : Böbrek korteksinin genel görünümü. Genişlemiş lümen içeren proksimal tübüller (→), distal tübüller (⇒), genişlemiş kapsül aralığı (⇔) ve renal korpüsküller (Rk). Hematoksilin-Eosin. X 126

**Şekil 15** : Bazı proksimal tübül hücrelerinde apikal membranda parçalanma (→), hücreleri sayıca azalmış veya oldukça hasar görmüş renal korpüsküller (Rk) ve Bowman kapsülünün parietal yaprağında bozulma (Δ). Hematoksilin-Eosin. X 320

**Şekil 16** : Genişlemiş proksimal tübül lümeninde (→) ve distal tübül lümeninde (⇒) sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar, distal tübül hücrelerinde apikal membranda parçalanma (Δ) ve piknotik nukleuslar (▲). Hematoksilin-Eosin. X 500

**Şekil 17,18:** Yer yer apikal membranın kopup ayrılması sonucu devamlılığı gözlenemeyen fırça kenarda azalmış PAS (+) reaksiyon (→), Bowman kapsülünün parietal yaprağında (⇒) ve glomerulusun kapiller endotel hücrelerinde (Δ) PAS (+) reaksiyon. Piknotik nukleuslar (▲) içeren proksimal tübül hücreleri ve bozulmuş parietal yaprak (↓). PAS. X 320 , X 500

**Şekil 19** : Genellikle apikal bölgelerinde iri vakuoller içeren proksimal (Δ) ve distal (▲) tübül hücreleri ve genişlemiş kapsül aralığı (⇔). Masson'un üçlü boyası. X 500





Tübül hücreleri iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum, lizozom, Golgi aygıtı ve rozet şeklinde kümelenme yapan polizomlar içermektedirler (Şekil:22).

**Distal tübüller:** Distal tübül hücrelerinin bazal katlanmaları arasında oval, küresel ve uzun çomak şeklinde mitokondriyumlar yerleşmiştir (Şekil 24,27). Bu hücreler küresel veya oval bir nukleus (Şekil 24), lümeneye bakan apikal membranlarında proksimal tübül hücrelerinininkine göre az sayıda mikrovillus içerirler ve yine granüllü endoplazmik retikulum, rozet şeklinde kümelenmiş polizomlar (Şekil:25) ve Golgi aygıtı (Şekil:26) da rahatça gözlenmektedir.

**Renal korpüsküller:** Kapiller endoteli çok sayıda por içermektedir (Şekil:28). Kapiller lümeninde yoğun olarak boyanan eritrositler yer almaktadır (Şekil: 27). Bowman kapsülünü oluşturan parietal yaprak ile viseral yaprak arasında "kapsül aralığı" yer alır (Şekil:27). Viseral yaprağı oluşturan podositlerin hücre gövdesinden çıkan çok sayıda uzantı "primer uzantı", primer uzantılardan çıkan çok daha küçük "sekonder uzantılar" ise "pedisel" olarak adlandırılır. Podositler, primer ve sekonder uzantılar aracılığı ile birbirleriyle ve glomerulusa ait kapillerlerle ile çok yakın ilişki kurarlar. Podosit uzantılarının ve glomerulus kapillerlerinin ortak bir bazal laminaları vardır ve bu bazal lamina, lamina lüsida tabakası ile bu tabakalar arasında yer alan lamina densadan oluşur (Şekil:28).

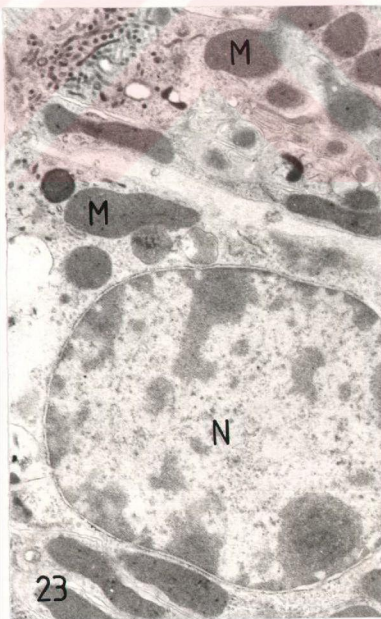
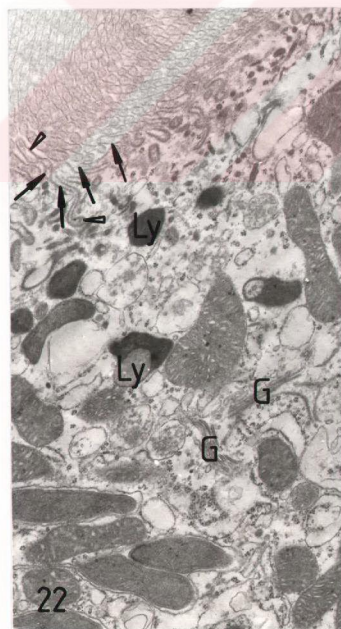
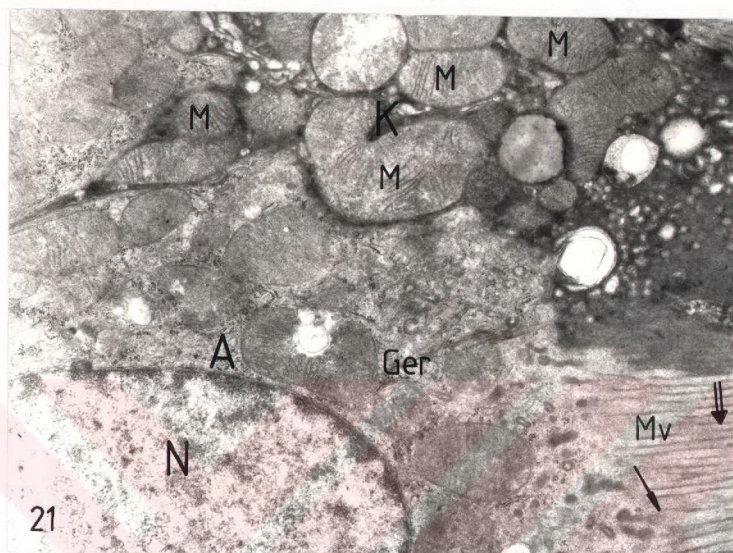




Şekil 21 : Endositotik vesikülleri sınırlayan membranın plazma membranı ile devamlılığı ( $\rightarrow$ ), plazma membranının dış yüzeyinde yoğun madde ( $\Rightarrow$ ), nukleus (N), granüllü endoplazmik retikulum (Ger), mikrovilluslar (Mv), bir açık hücre (A) ve yoğun sitoplazma içeren bir koyu (K) hücrede çok sayıda mitokondrium (M). X 14800

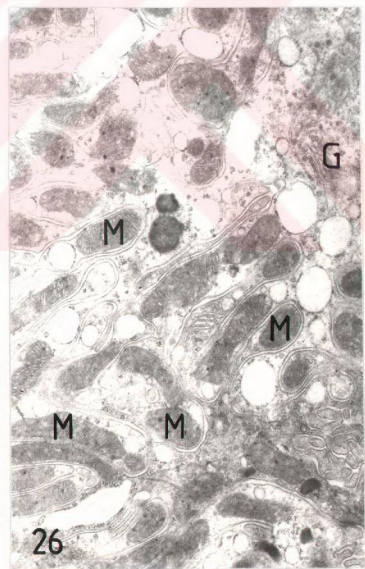
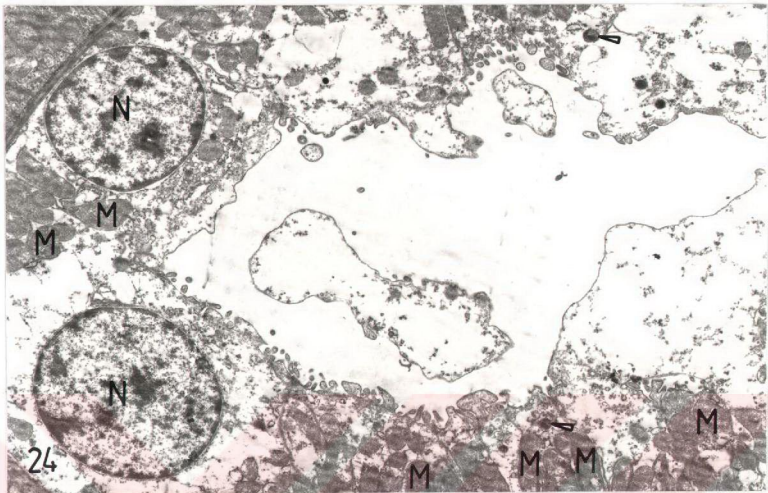
Şekil 22 : Apikal kanalcıklar ( $\rightarrow$ ) ve endositotik vesiküller ( $\Delta$ ), tüp şeklinde uzantılarda ve plazma membranının dış yüzeyinde izlenen yoğun madde ( $\blacktriangle$ ), hücre yüzeyine açılan apikal kanalcıklar ( $\Rightarrow$ ), granüllü endoplazmik retikulum (Ger), rozet şeklinde kümelenmiş polizomlar ( $-$ ), Golgi aygıtı (G) ve lizozomlar (Ly). X 14800

Şekil 23 : Bazal membran katlanmaları arasına yerleşmiş mitokondriyumlar (M) ve küresel bir nukleus (N). X 14800



**Şekil 24-26 : Kontrol hayvanlara ait distal tübül hücreleri**

- Şekil 24** : Küresel nukleus (N), bazal katlanmalar arasına yerleşmiş mitokondriyumlar (M) ve lizozomlar ( $\rightarrow$ ). X 6400
- Şekil 25** : Enine ve boyuna kesitlerde granüllü endoplazmik retikulum (Ger), polizomlar ( $\Delta$ ) ve apikal membranda mikrovilluslar (Mv). X 14800
- Şekil 26** : Golgi aygıtı (G) ve bazal katlanmalar arasına yerleşmiş mitokondriyumlar (M). X 14800

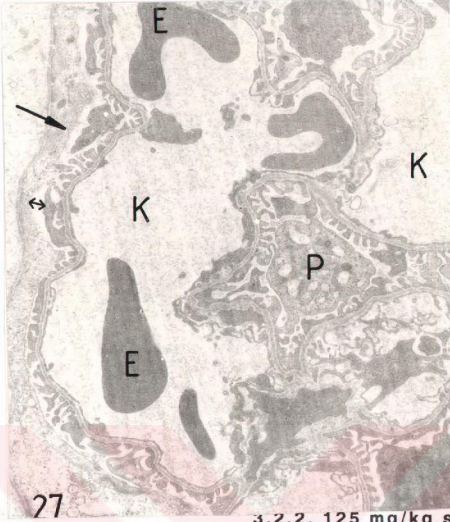


Şekil 27,28: Kontrol hayvanlara ait Bowman kapsülü ve glomerulus.

Şekil 27 : Kapsül aralığı ( $\Leftrightarrow$ ), kapiller (K) içinde yoğun olarak boyanmış eritrositler (E), parietal yaprak epiteli ( $\rightarrow$ ) ve podositler (p). X 6400

Şekil 28 : Kapiller endotelinde porlar ( $>$ ), podosite ait primer uzantılar ( $\Delta$ ) ve sekonder uzantılar ya da pediseller ( $\blacktriangle$ ), podositlerin primer ve sekonder uzantılar aracılığı ile birbirleriyle ve kapillerler ile ilişkisi ( $\rightarrow$ ), podosit uzantılarının ve glomerulus kapillerinin ortak bazal laminaları ( $\Rightarrow$ ), lamina densa ( $\rightarrow$ ) ve lamina lusida ( $\downarrow$ ). X 14800





3.2.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler

**Proksimal tübüller:** Pekçok tübülde belirgin hüresel değişiklikler olmasına rağmen (Şekil:29,37,39), bazı tübül hücrelerinde fazla hasar gözlenmemiştir (Şekil:38). Bazı hücrelerde apikal membranın parçalanması sonucu fırça kenar yer yer kesintiye uğramıştır (Şekil:29).

Hücrelerin nukleus membranında invaginasyonlar barizdir ve bazı nukleuslar piknotik bir yapıya sahiptir (Şekil:34). Nukleus membranının bazen yer yer, bazen de tümünde iç ve dış membranlar net olarak gözlenmemektedir (Şekil:36).

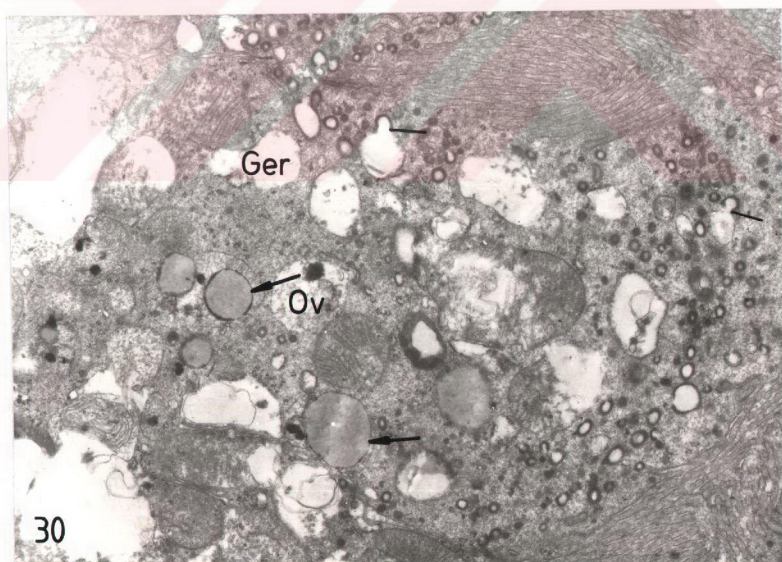
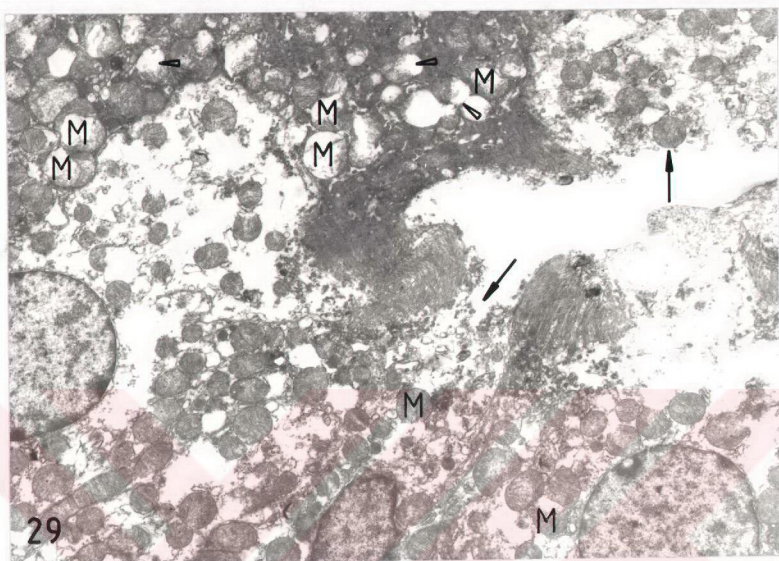
Sayıcı artan mitokondriyumların çoğunda dejenerasyon gözlenmiştir (Şekil:29,31,33,36). Bu mitokondriumlarda, özellikle iç ve dış membran arasında şişme (Şekil:36) veya iç bölgede krista içermeyen transparan bir bölge mevcuttur (Şekil:31). Bu mitokondriyumlar solgun matriks ve genellikle periferde kısa kristalar içerirler. Mitokondriyumdan sitoplazma yönüne doğru genişlemiş yapıların çevresinde, mitokondriyum membranları bazen yer yer izlenebilmekte, bazen de yalnızca sitoplazmik materyal ile birlikte devam etmektedirler (Şekil 36).

Hücre içinde, yoğun bir halka ile çevrili lipid damlalarının mitokondriyumlar ile yakın ilişkide oldukları gözlenmiştir. Bu lipid damlalarının mitokondriyum içinde olduğunu söylemek çok güçtür.

Şekil 29-36: 125 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait proksimal tübül hücreleri.

Şekil 29 : Yer yer kesintiye uğramış fırça kenar (→), sayıca artmış mitokondriyumlarda (M) dejenerasyon, iç ve dış membran arasında şişme (Δ). X 6400

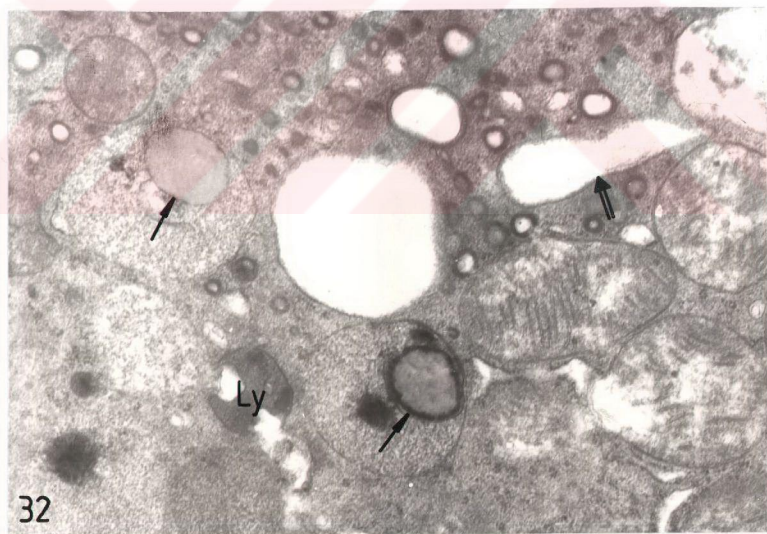
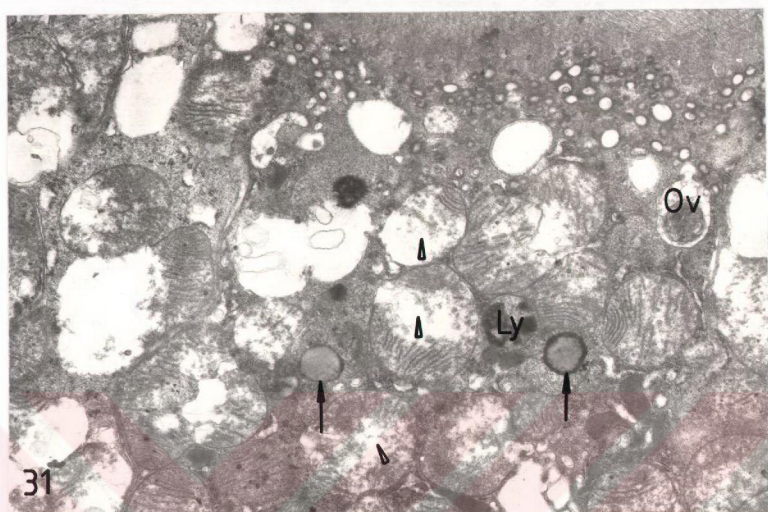
Şekil 30 : Mitokondriyum-lipid ilişkisi (→), apikal kanalcıklarla büyük vakuollerin sıkı ilişkisi (—), otofajik vakuol (Ov) oluşumu, şişmiş granüllü endoplazmik retikulum (Ger). X 14800



Şekil 31 : Mitokondriyum-lipid ilişkisi ( $\rightarrow$ ), mitokondriyumların iç bölgesinde krista içermeyen transparan bölgeler ( $\Delta$ ), lizozom (Ly) ve otofajik vakuol (Ov) oluşumu. X 14800

Şekil 32 : Mitokondriyum-lipid ilişkisi ( $\rightarrow$ ) ve apikal kanalcıklar ile büyük vakuollerin sıkı ilişkisi ( $\Rightarrow$ ) ve bir lizozom (Ly). X 31300

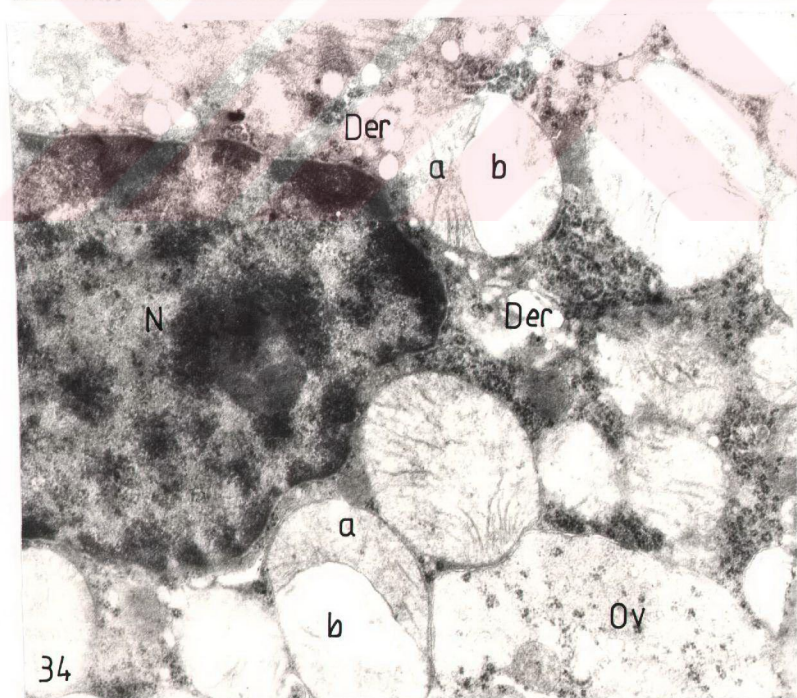
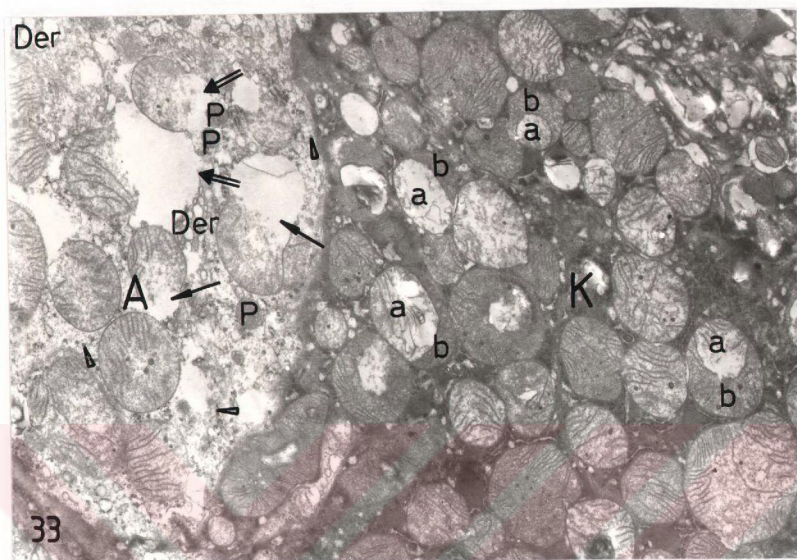






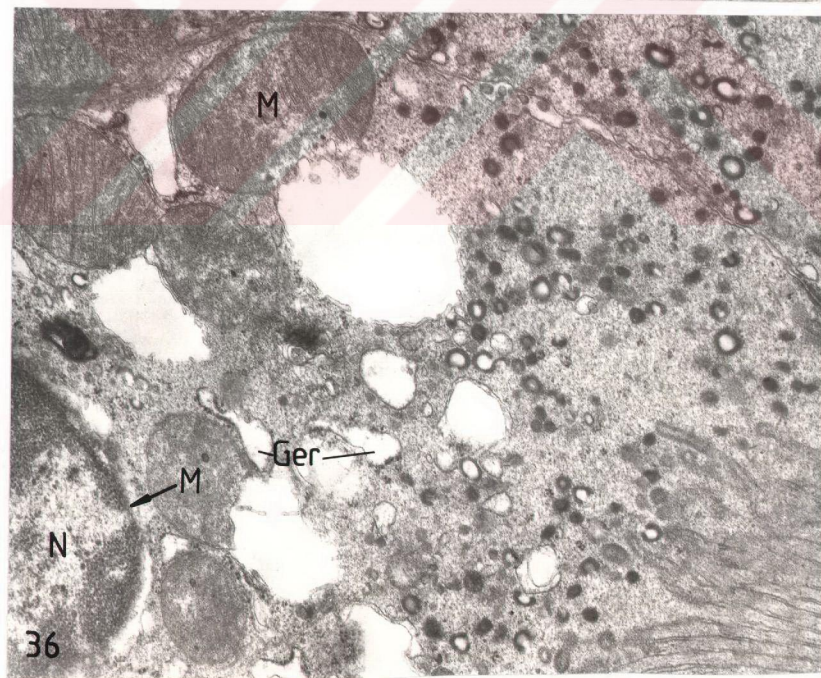
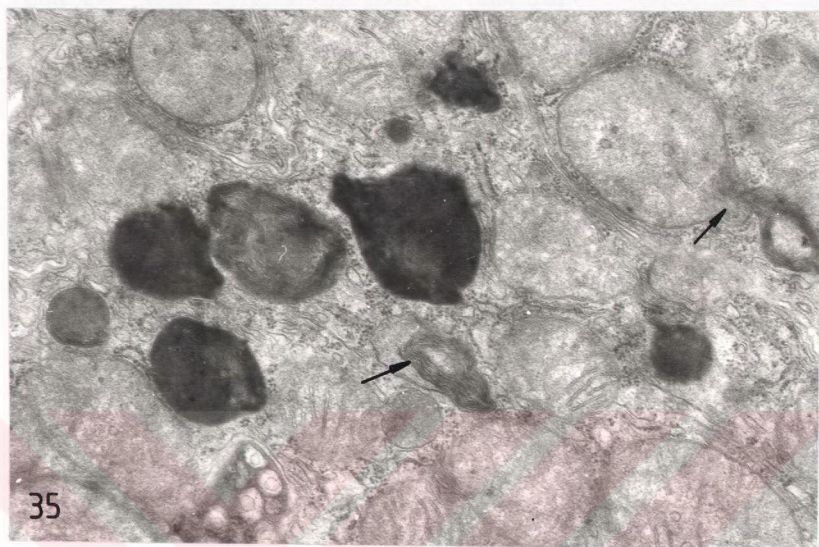
Şekil 33 : Bir kısmı şişmiş matriks (a) ve diğer kısmı yoğun matriks (b) içeren mitokondriyumlar, açık hücre (A) ve koyu matriksli, bol mitokondriyum içeren yoğun sitoplazmaya sahip koyu hücre (K), mitokondriyum iç ve dış membranı arasında şişme ( $\rightarrow$ ), mitokondriyum membranının parçalanması sonucu gözlenen mitokondriyum-sitoplazma ilişkisi ( $\Rightarrow$ ), rozet şeklinde kümelenmiş polizomlar ( $\Delta$ ), düz yüzlü endoplazmik retikulumda artış (Der) ve peroksisomlar (P). X 14800

Şekil 34 : Açık (a) ve koyu (b) renk matriks içeren mitokondriyumlar, piknotik bir nukleus (N) ve düz yüzlü endoplazmik retikulumda artış (Der), otofajik vakuol oluşumu (Ov). X 14800



Şekil 35 : Mitokondriyum içinde halka dizilişli-elektron yoğun membranimsı yapılar (→). X 31300

Şekil 36 : İç ve dış membranın net olarak izlenemediği bir nukleus (N), iç ve dış membran arası şişmiş ve sitoplazma yönüne genişlemiş yapılar içeren ve membranı yer yer izlenebilen mitokondriyumlar (M), şişmiş granüllü endoplazmik retikulum sisternaları (Ger). X 31300





Lipid ile ilişkili olan bu mitokondriyumların membranları yer yer, kristalleri ise genellikle izlenememiştir (Şekil:30,32).

Siklofosfamid uygulanan hayvanların proksimal tübül hücrelerinin mitokondriyumları içinde halka dizilişli-elektron yoğun membranımsı yapılar gözlenmiştir (Şekil:35)..

Daha elektron yoğun sitoplazmik matriks; daha yoğun, daha küçük ve invaginasyon gösteren nukleus içeren koyu hücreler sayıca artmıştır (Şekil:33). Bu hücrelerde, bazı mitokondriyumların bir kısmı şişmiş matriks içerirken, diğer kısmı yoğun bir matrikse sahiptir (Şekil:33,34).

Granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında bazı bölgelerde şişme ve vesikül şekline dönüşüm gözlenmektedir (Şekil 30,36). Rozet şeklinde kümelenmiş polizomlar dikkati çekmiştir (Şekil:33). Düz yüzlü endoplazmik retikulum miktarının (Şekil 33), lizozom (Şekil:31,32) ve peroksizomların (Şekil:33) sayısının arttığı ve ayrıca da otofajik vakuol oluşumu gözlenmiştir (Şekil:30,34). Apikal kanalcıkların genişlemiş olan uç kısımlarının sayıca artan büyük vakuoller ile birleştikleri gözlenmektedir (Şekil:30,32).

**Distal tübüller:** Tübül hücrelerinin apikal bölgelerine yakın bir konumda yer alan bazı nukleusların membranlarının tamamen veya yer yer net olarak izlenemediği gözlenmektedir (Şekil:37,39).

Bu tübül hücrelerinde de mitokondrium dejenerasyonu izlenmiştir (Şekil:37,38,40). Mitokondriyumların dış kompartımanında, dışa doğru çıkıntı yapan vesiküllerin önemsenecek derecede büyüyerek mitokondriyuma değişik bir görünüm kazandırdıkları tespit edilmiştir (Şekil:40). Açık ve elektron yoğun sitoplazmalı koyu hücreler gözlenmektedir (Şekil:37).

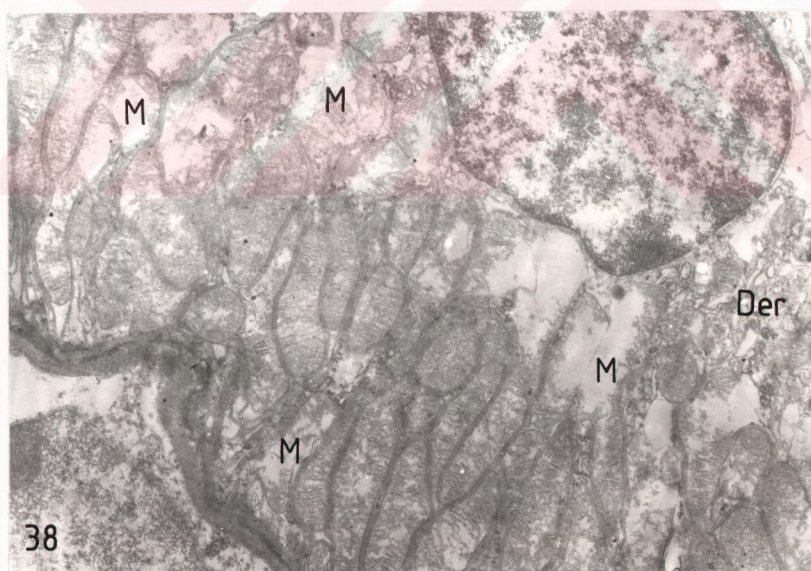
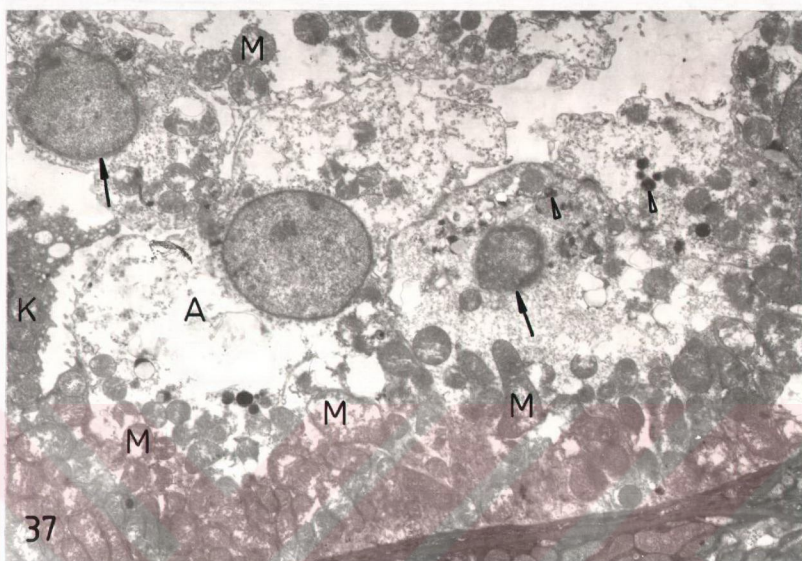
Granüllü endoplazmik retikulum sisternalarının bazı bölgelerde şiştiği (Şekil:40) ve düz yüzlü endoplazmik retikulum vesiküllerinin arttığı izlenmektedir (Şekil:38). Lizozomların (Şekil:37) ve rozet şeklinde kümeler oluşturan polizomların (Şekil:39) arttığı da gözlenmektedir.



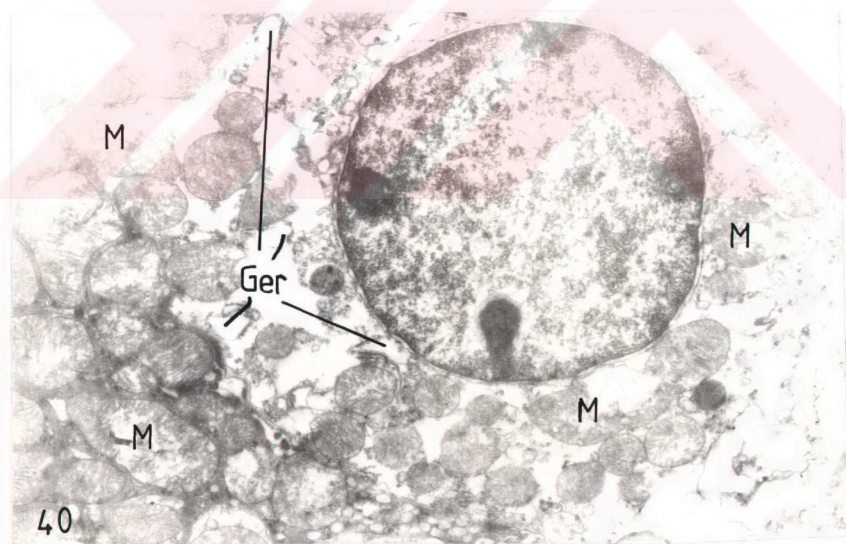
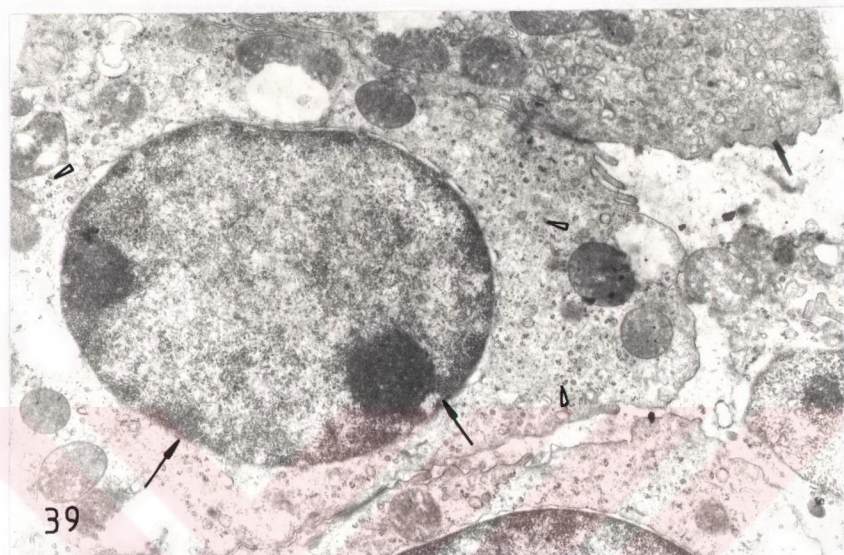
Şekil 37-40 :125 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait distal tübül hücreleri.

Şekil 37 : Net olarak izlenemeyen nukleus membranı (→), mitokondriyum (M) dejenerasyonu, sayıca artmış lizozomlar (Δ), açık (A) ve koyu (K) hücreler. X 6400

Şekil 38 : Mitokondriyum (M) dejenerasyonu ve düz yüzlü endoplazmik retikulumda (Der) artış. X 14800



- Şekil 39 : Net olarak izlenemeyen iç ve dış nükleus membranı (→), rozet şeklinde kümelenmiş polizomlar (Δ). X 14800
- Şekil 40 : Mitokondriyum (M) dejenerasyonu, dışa doğru çıkıntı yapan vesiküller içeren mitokondriyumlar (M), şişmiş granüllü endoplazmik retikulum (Ger). X 14800

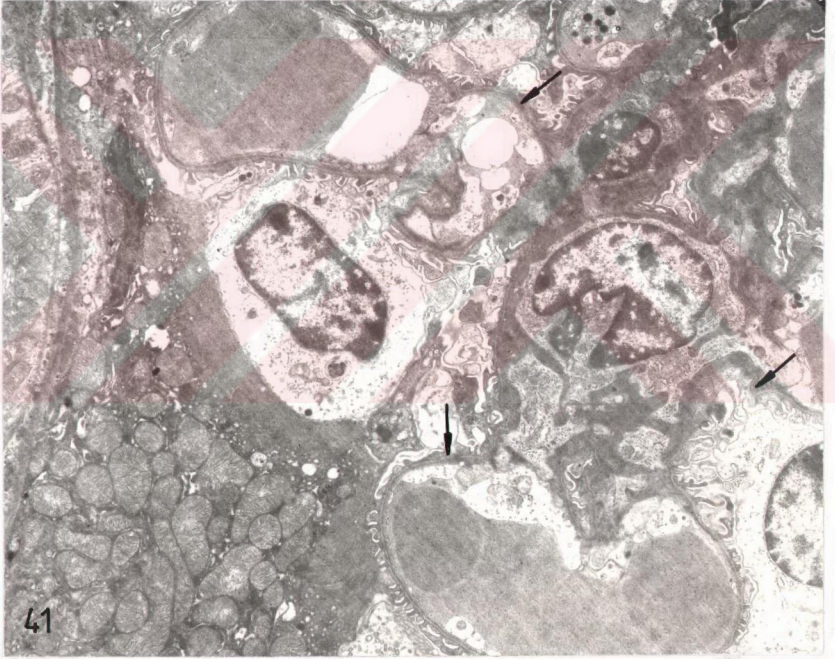


Şekil 41,42 :125 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait Bowman kapsülü ve glomerulus.

Şekil 41 : Glomerulus kapillerleri ile podosit pedisellerinin ortak paylaştığı bazal laminada yer yer bozulmalar (→). X 6400

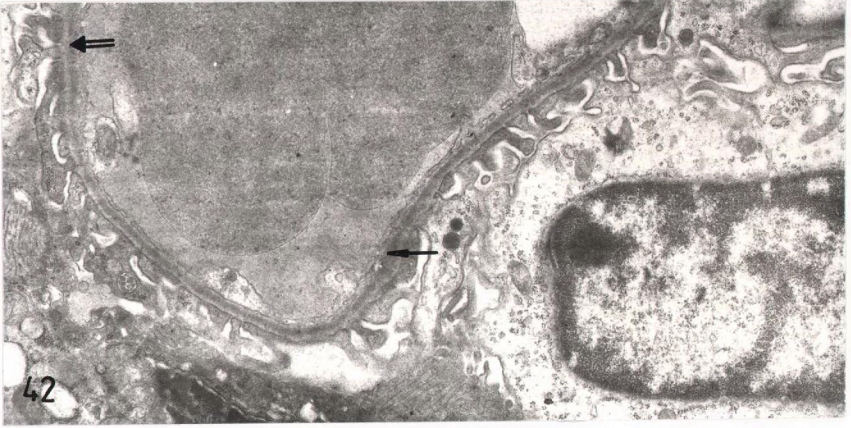


**Renal korpüsküller:** Glomerulus kapillerleri ile podosit pedisellerinin ortaklaşa paylaştıkları bazal laminada bozulma ve yer yer yapısal şişkinlikler veya kalınlaşmalar izlenmiştir (Şekil 41,42). Trilaminar yapıya ait lamina densenin genişlemesinden dolayı lamina lüsida tabakalarının daraldığı ve pekçok bölgede net olarak gözlenemediği tespit edilmiştir (Şekil 42).



Şekil 42 : Yer yer yapısal şişkinlikler veya kalınlaşmalar gösteren bazal lamina (→), net olarak izlenemeyen trilaminar yapı (⇒). X 14800





**3.2.3. 250 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler.**

**Proksimal tübüller:** Tübül hücrelerinin nukleus membranlarında invaginasyonlara rastlanmıştır (Şekil: 43, 46). Bazı durumlarda, bu nukleusların piknotik bir görünüm kazandıkları gözlenmiştir (Şekil:46). Bu grubda da, iç ve dış nukleus membranlarının yapısının tümüyle veya yer yer net olarak izlenemedikleri dikkati çekmektedir (Şekil:48).

Mitokondriyumlarda dejenerasyon oldukça artmıştır. Hem mitokondriyumların orta bölgelerinde ve hem de sitoplazmaya doğru çıkıntı yapan bölgelerinde krista içermeyen, genişlemiş transparan bölgeler mevcuttur (Şekil:43,44). Mitokondriyum matriksindeki granüller kontroller ile karşılaştırıldığında dikkati çekecek kadar artmıştır (Şekil:48). Halka dizilişli-elektron yoğun membranimsı yapılar içeren mitokondrilere bu grubda da rastlanmıştır (Şekil:46).

1. grubda gözlenen mitokondriyum-lipid ilişkisine bu grubda daha az rastlanmaktadır (Şekil:48). Daha elektron yoğun sitoplazmik matriks, daha küçük ve yoğun nukleus, çok sayıda mitokondriyum içeren koyu hücrelere bu grubda daha sıklıkla rastlanmıştır (Şekil:46).

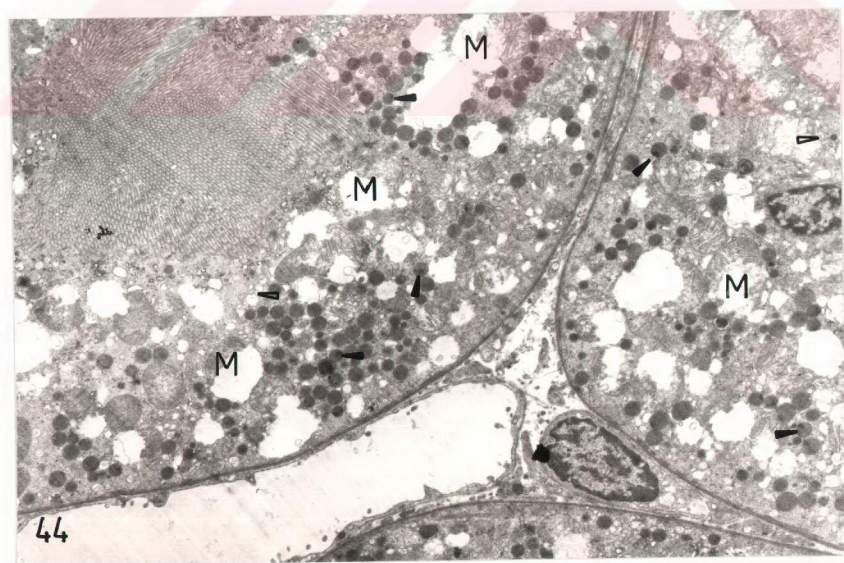
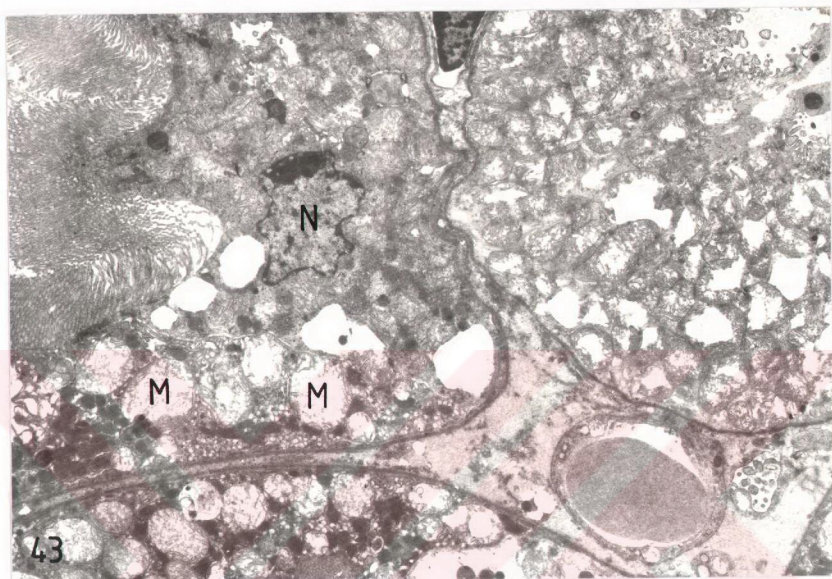
Bazı hücrelerde vakuolizasyonda, peroksizomlarda (Şekil:44,49) ve otofajik vakuolde (Şekil:45) artış gözlenmiştir. Granüllü endoplazmik retikulum sisternalarında şişme (Şekil:47) ve düz yüzü endoplazmik retikulum vesiküllerinde gruplaşmalar, serbest ribozomlarda ve sitoplazmik membranimsı yapılarda bir artış dikkati çekmiştir (Şekil:46).

Şekil 43-49 :250 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait proksimal tübül hücreleri.

Şekil 43 : Nukleus membranında invaginasyon gözlenen piknotik bir nukleus (N), krista içermeyen transparan bölgeler içeren mitokondriyumlar (M), X 6400

Şekil 44 : Genişlemiş transparan bölge içeren mitokondriyumlar (M), artmış vakuolizasyon ( $\Delta$ ), peroksizomlar ( $\blacktriangle$ ), X 6400

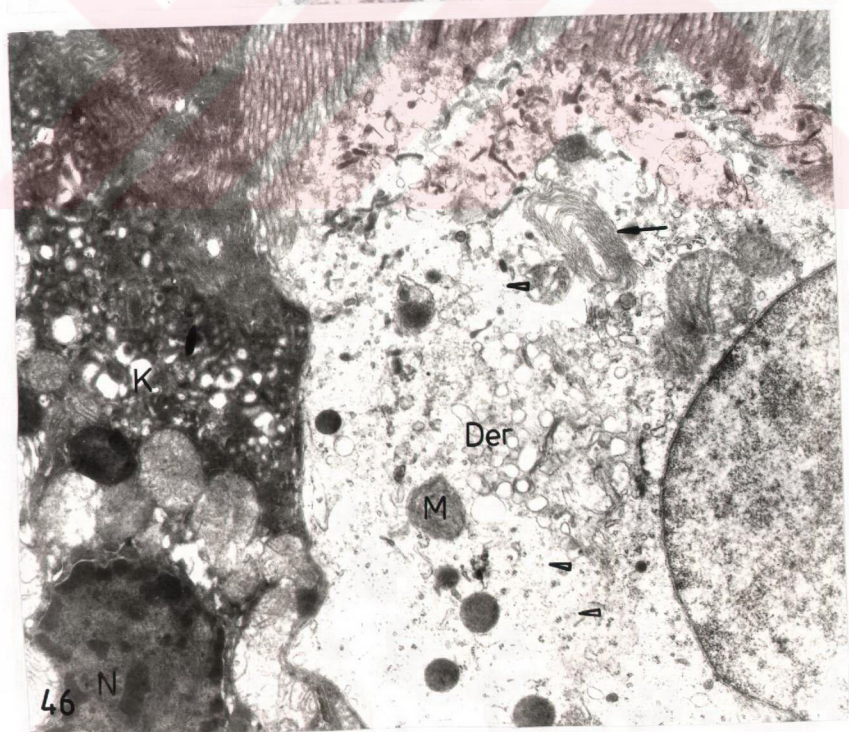
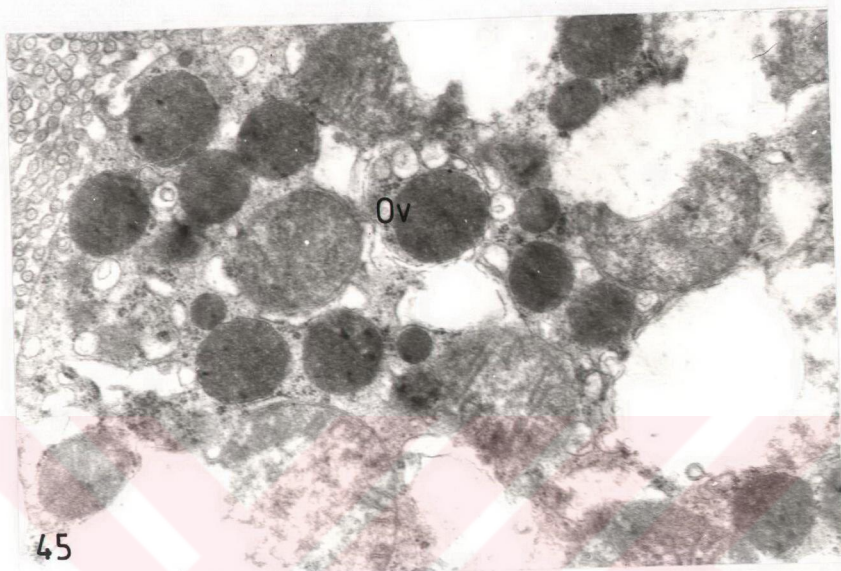






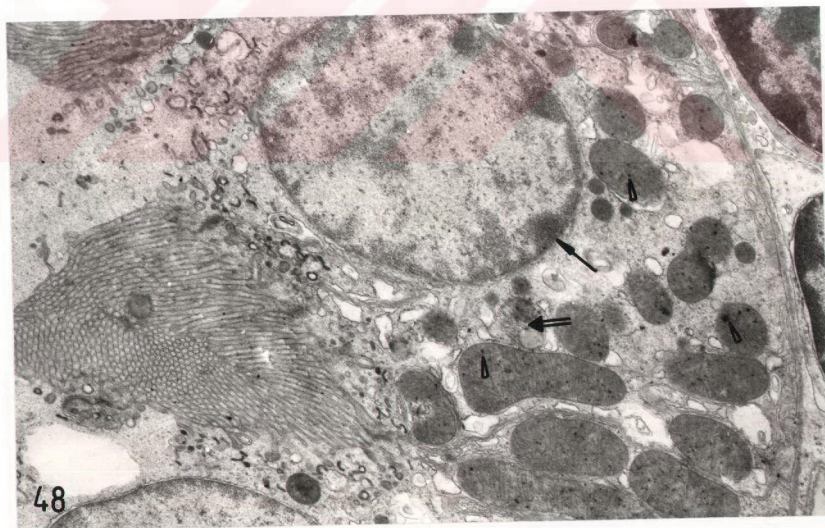
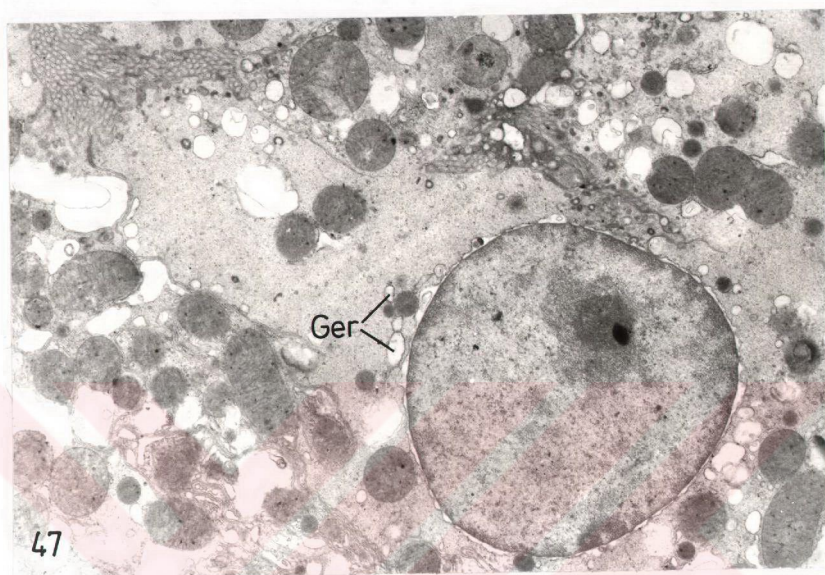
Şekil 45 : Otofajik vakuol (Ov) oluşumu. X 31300

Şekil 46 : Nukleus membranında invaginasyon gözlenen piknotik bir nukleus (N), koyu hücre (K), artmış düz yüzlü endoplazmik retikulum gruplaşmaları (Der) ve sitoplazmik membranimsı yapılar (→), halka dizilişli-elektron yoğun membranimsı yapılar içeren mitokondriyumlar (M) ve serbest ribozomlar ( $\Delta$ ). X 14800



Şekil 47 : Şişmiş granüllü endoplazmik retikulum sisternaları (Ger).  
X 14800

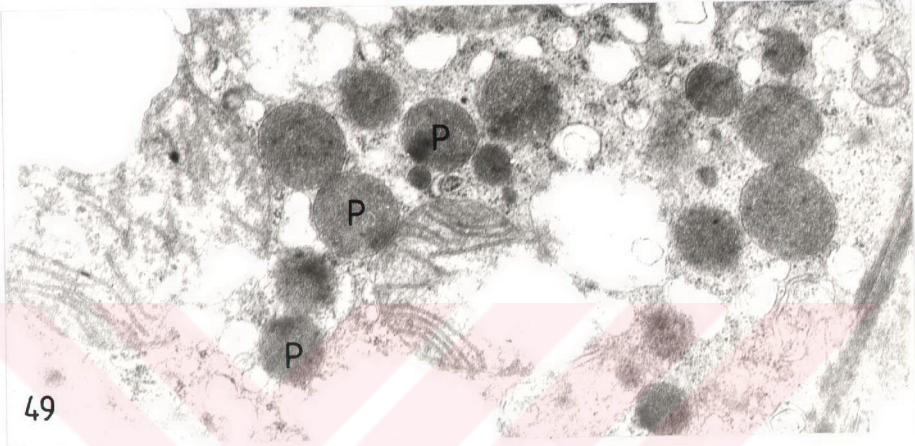
Şekil 48 : Net olarak izlenemeyen nukleus membranı ( $\rightarrow$ ), artmış  
mitokondri granülleri ( $\Delta$ ), mitokondrium-lipid ilişkisi  
( $\Rightarrow$ ). X 14800



Şekil 49 : Sayıca artmış peroksizomlar (P). X 31300







**Distal tübüller:** Bu tübül hücrelerinin apikal membranlarında yer yer bozulup parçalanmış kısımlar dikkati çekmiştir (Şekil:51). Bazı hücrelerin nukleus membranları net olarak gözlenememiştir (Şekil:52). Mitokondriyum dejenerasyonu ve düzyüzlü endoplazmik retikulum oluşumu artmıştır (Şekil:50, 52). Az miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve rozet şeklinde kümelenen polizomlar içeren hücreler gözlenmiştir (Şekil:52).

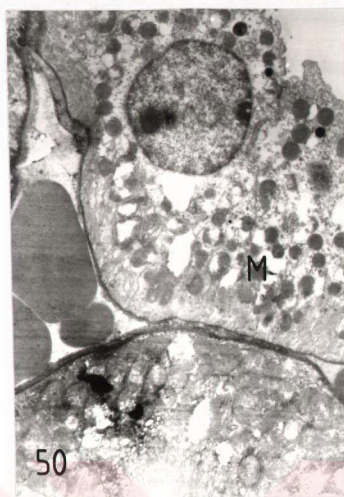
**Renal korpüsküller:** Kapsül aralığının kontrolları ile karşılaştırıldığında oldukça genişlemiş olduğu tespit edilmiştir (Şekil:54). Glomerulus kapilleri ile podosit pedisellerinin ortak olarak kullandıkları bazal laminanın bozulduğu ve yer yer kalınlaştığı izlenmiştir (Şekil:53,55). Lamina densenin genişlemesinden dolayı lamina lusida tabakaları daralmış ve bu nedenle de trilaminar yapı net olarak izlenememektedir (Şekil:55).

Şekil 50-52: 250 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait distal tübül hücreleri.

Şekil 50 : Artmış mitokondriyum (M) dejenerasyonu X 6400

Şekil 51 : Parçalanmış apikal membran (→). X 6400

Şekil 52 : Net olarak izlenemeyen nukleus membranı (→), mitokondriyum (M) dejenerasyonu, artmış düz yüzlü endoplazmik retikulum (Der), az miktarda granüllü endoplazmik retikulum (Ger) ve rozet şeklinde kümelenen polizomlar (Δ). X 14800

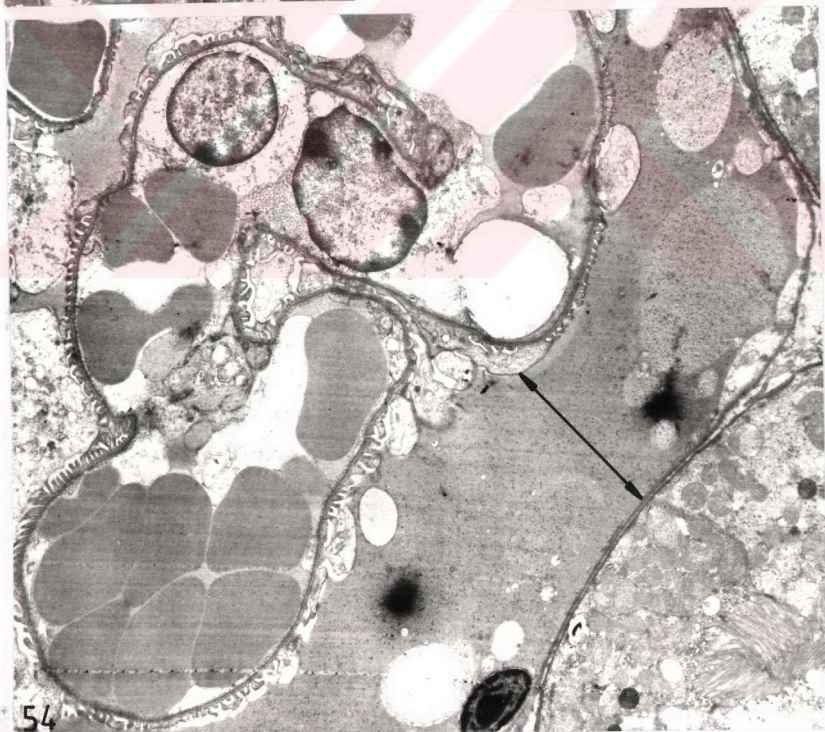
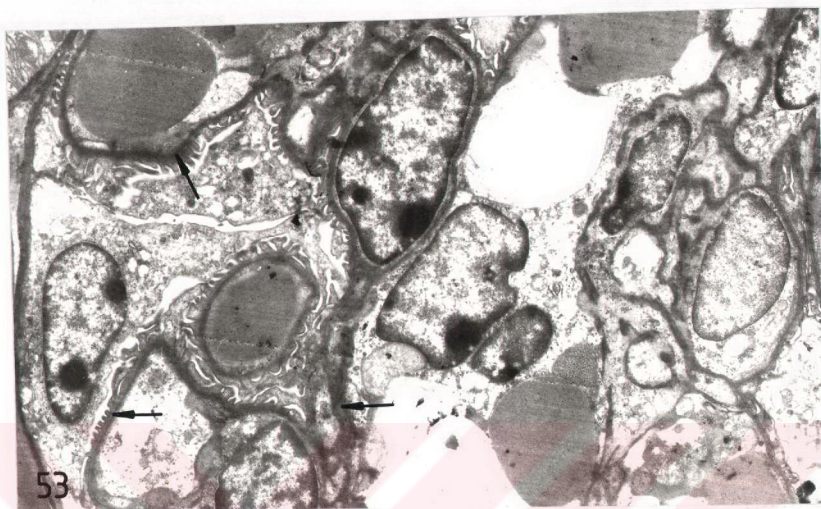


Şekil 53-55 :250 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait Bowman kapsülü ve glomerulus.

Şekil 53 : Bazal laminada bozulma ve yer yer kalınlaşma (→). X 6400

Şekil 54 : Genişlemiş kapsül aralığı (↔). X 6400







Şekil 55 : Net olarak izlenemeyen trilaminar yapı (→). X 14800





### 3.3. Histokimyasal gözlemler

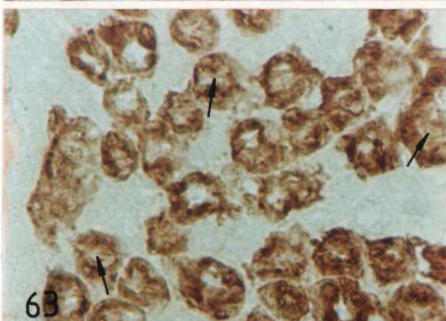
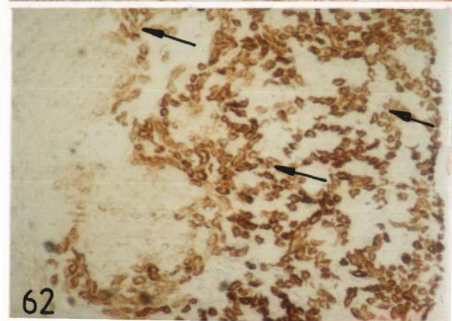
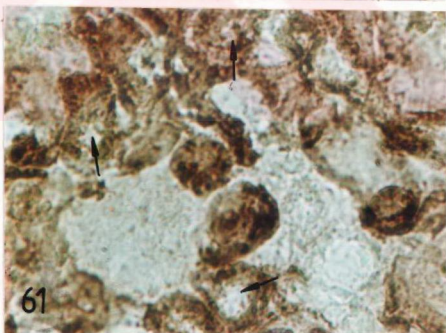
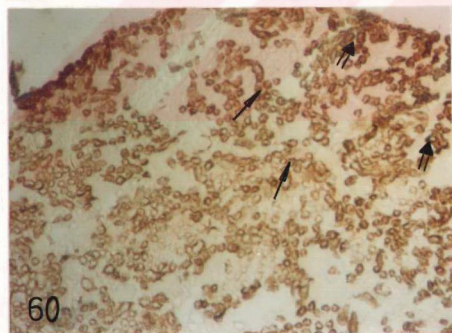
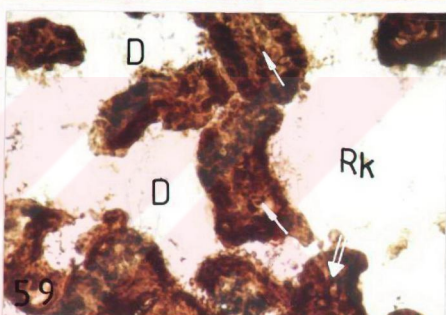
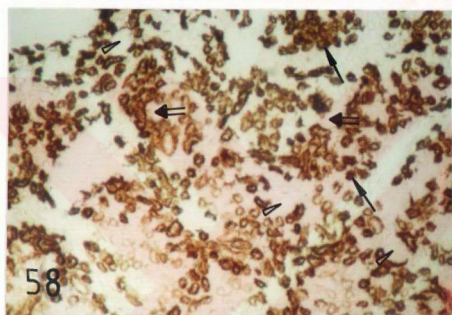
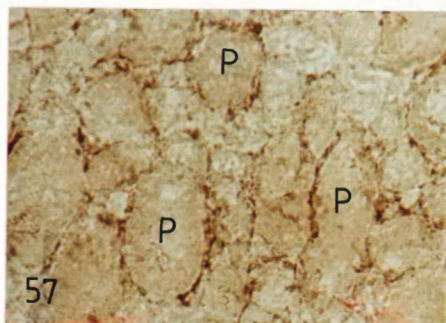
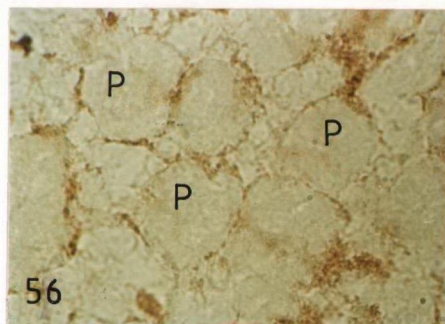
#### 3.3.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler

Glukoz-6-fosfataz aktivitesi, proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde kuvvetli olarak gözlenmesine rağmen, distal kıvrıntılı tübül hücrelerinde çok zayıftır. Renal korpüsküle ait hücrelerde ise aktivite yok denecek kadar azdır (Şekil:58).

Proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinin sitoplazmalarında glukoz-6-fosfataz aktivitesi nokta veya iğ şeklinde sitoplazmanın hemen hemen tamamında kuvvetli, fırça kenarda ise hafif bir reaksiyon göstermiştir (Şekil:59).

1 mM  $\text{CuSO}_4$  , 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  ve 10 mM NaF içeren inkubasyon ortamı (Şekil:57) ile substrat içermeyen (Şekil:56) inkubasyon ortamları kontrol olarak kullanılmıştır. Bu preparatlarda, enzim aktivitesi inhibe edildiği için ya hiç gözlenmemiştir ya da çok az birkaç granüle rastlanmıştır. Bu nedenle de, substrat içeren inkubasyon ortamındaki reaksiyon ürününün glukoz-6-fosfataza ait olduğu doğrulanmaktadır (Şekil:56,57).

- Şekil 56 : Kontrol olarak kullanılan ve substrat içermeyen ortamda inkübe edilmiş proksimal tübüller (P). X 320
- Şekil 57 : Kontrol olarak kullanılan ve inhibitör maddeler içeren ortamda inkübe edilmiş proksimal tübüller (P). X 320
- Şekil 58 : Kontrol hayvanlara ait proksimal tübüllerde glukoz-6-fosfataz aktivitesi ( $\rightarrow$ ), distal tübüllerde ( $\Rightarrow$ ) ve renal korpüsküle ait hücrelerde ( $\Delta$ ) belirsiz aktivite. X 50
- Şekil 59 : Kontrol hayvanların proksimal tübüllerinde glukoz-6-fosfataz aktivitesi. Nokta ve iç şeklinde aktif granüller ( $\rightarrow$ ) ve fırça kenarda hafif reaksiyon ( $\Rightarrow$ ), distal tübüllerde (D) ve renal korpüskülde (Rk) belirsiz aktivite. X 320
- Şekil 60 : 125 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait proksimal tübüllerde glukoz-6-fosfataz aktivitesinde azalma ( $\rightarrow$ ), ve aktivitenin korunduğu birkaç tübül ( $\Rightarrow$ ). X 50
- Şekil 61 : 125 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait proksimal tübüllerde azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi ( $\rightarrow$ ). X 320
- Şekil 62,63 : 250 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait proksimal tübüllerde azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi ( $\rightarrow$ ). X 50, X 320





### **3.3.2. 125 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler**

Proksimal kıvrıntılı tübüllerde glukoz-6-fosfataz aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Birkaç tübülde ise aktivitenin korunmakta olduğu tespit edilmiştir (Şekil:60). Aktif granüller sayıca azaldığı için daha az sitoplazmik reaksiyon gözlenmiştir. Distal kıvrıntılı tübüllerde ve renal korpüskülerde aktivite belirgin olmadığı için bir değerlendirme yapılamamıştır (Şekil:60,61).

### **3.3.3. 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler**

Bu grubda da, proksimal kıvrıntılı tübüllerde glukoz-6-fosfataz aktivitesi oldukça azalmıştır. Distal kıvrıntılı tübüllerde ve renal korpüskülerde ise değerlendirilebilecek bir aktivite gözlenememiştir (Şekil:62,63). Proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde aktif granüller oldukça azalmış ve sitoplazmik reaksiyonun çok zayıf olduğu izlenmiştir (Şekil:63).

## **3.4. Sitokimyasal gözlemler**

### **3.4.1. Kontrol hayvanlara ait gözlemler**

1 mM  $\text{CuSO}_4$  ve 10 mM  $\text{ZnCl}_2$  ve 10 mM NaF içeren ve substratsız inkubasyon ortamlarında, böbrek korteksine ait yapılarda son ürün birikimi ya hiç ya da çok daha az gözlenmiştir. Bu nedenle, enzim aktivitesi hem kontrol amacı ile kullanıldığından ve hem de kontrol ve deney hayvanlara ait yapılarda hiçbir fark gözlenmediğinden sadece birer resim konulmuştur (Şekil:64,65,66).

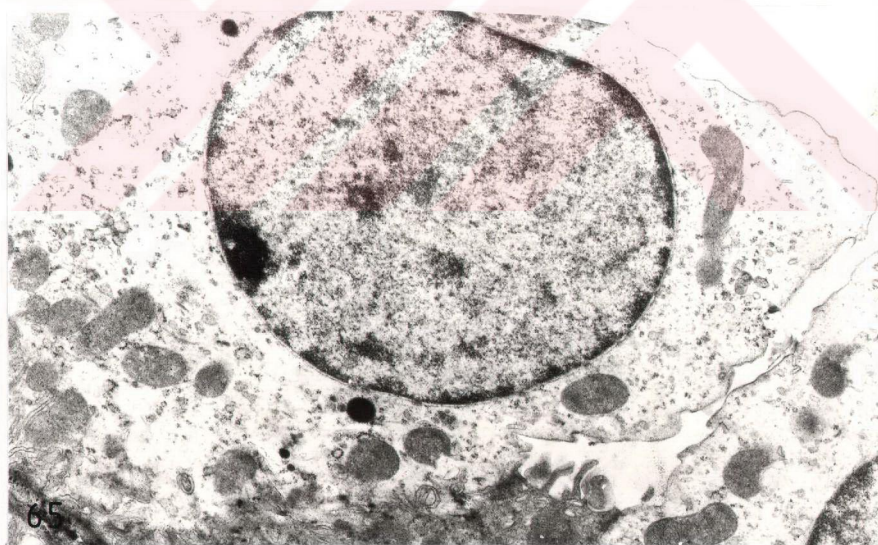
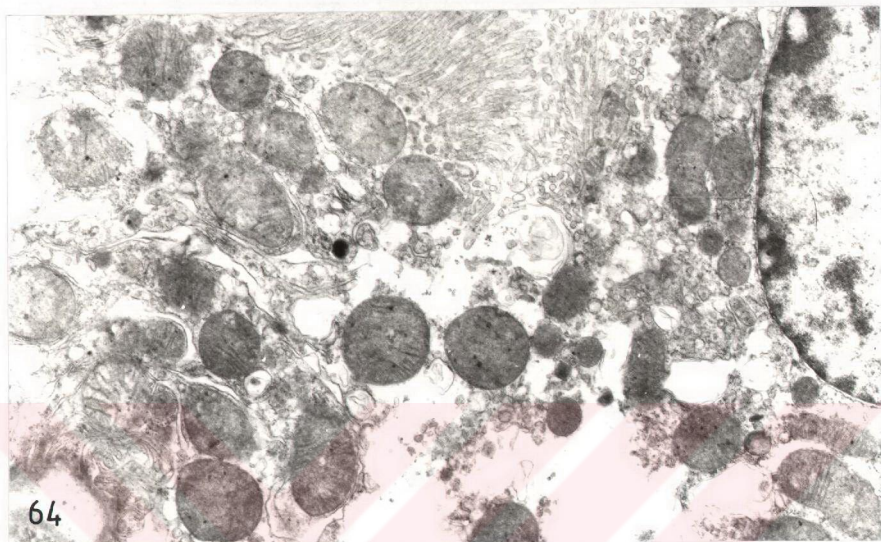
Glukoz-6-fosfataz aktivitesi için reaksiyon ürünü, en belirgin şekilde, proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde gözlenmektedir (Şekil:67). Distal kıvrıntılı tübül hücrelerinde reaksiyon çok zayıftır (Şekil:72). Renal korpüsküle ait hücrelerde ise reaksiyon hemen hemen hiç yoktur (Şekil:74).

Glukoz-6-fosfataz reaksiyonu en kuvvetli şekilde endoplazmik retikulumda ve nukleus zarında gözlenmiştir (Şekil:69). Ayrıca, bazal laminada, bazal katlanmalarda ve fırça kenarda da reaksiyon tespit edilmiştir (Şekil:70,71). Hücre içi diğer sitoplazmik organellerde ve nukleusun içinde ise hiç reaksiyon gözlenmemiştir.



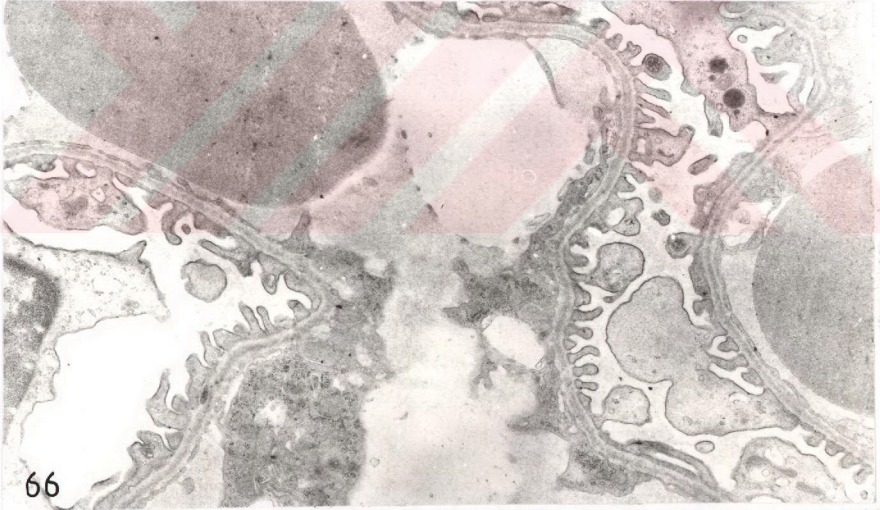
Şekil 64 : Kontrol olarak kullanılan ve inhibitör maddeleri içeren ortamda inkübe edilmiş proksimal tübül hücresi. X 14800

Şekil 65 : Kontrol olarak kullanılan ve inhibitör maddeleri içeren ortamda inkübe edilmiş distal tübül hücresi. X 14800



Şekil 66 : Kontrol olarak kullanılan ve inhibitör maddeleri içeren ortamda inkübe edilmiş podosit ve glomerulus. X 14800

Glukoz-6-fosfataz aktivitesi, hem granüllü ve hem de düz yüzlü endoplazmik retikulumda mevcuttur. Reaksiyon ürünü endoplazmik retikulum membranlarının üzerinde, genişlemiş membranlarda iç yüzeye bitişik ve genellikle de membranların içindeki alanlarda hapsedilmiş olarak gözlenmiştir (Şekil:68). Bazı hücrelerde ise, reaksiyon ürünü endoplazmik retikulum sisternalarında yoğun birikimlere neden olmuştur (Şekil:67). Aktif granüller genellikle nokta nokta ya da yoğun birikimler halindedir (Şekil:68,69). Genellikle, proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinin çoğunda, endoplazmik retikulumun tübül ve vesikül şeklinde olmasına rağmen, bazen bunların sisternal bir görünüm aldıkları da izlenmektedir (Şekil:68,69). Bazı durumlarda, granüllü endoplazmik retikulumun dış yüzündeki birikimler ve ribozomlar yaklaşık aynı büyüklükte olduklarından birbirlerinden güçlükle ayırt edilebilmektedirler (Şekil:69). Son ürün birikimlerinin ribozomlara yakın bir konumda yerleştiği gözlenmiştir.

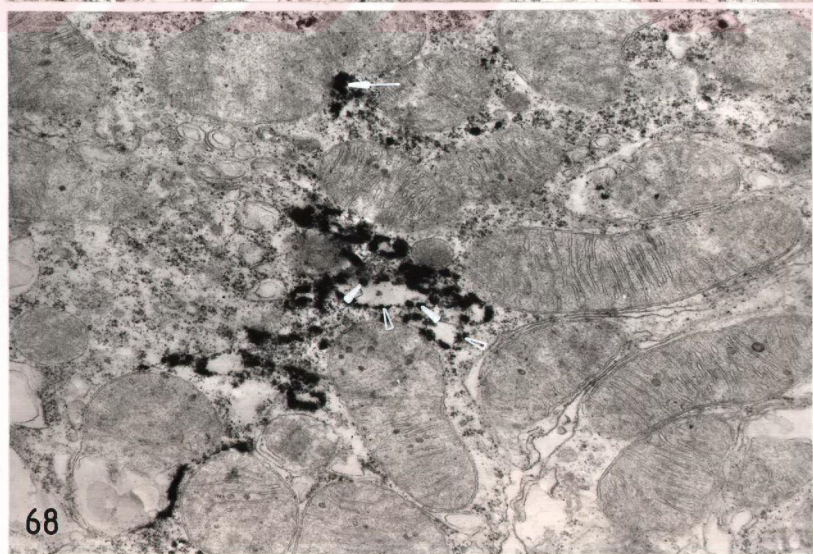
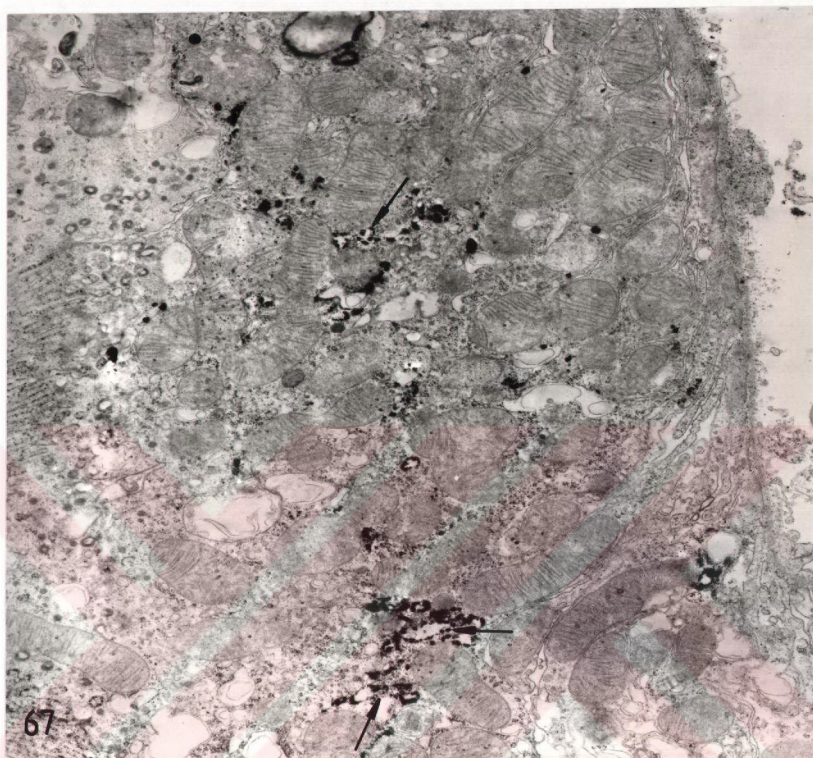


Şekil 67-71 :Kontrol hayvanların proksimal tübül hücrelerinde glukoz-6-fosfataz aktivitesi

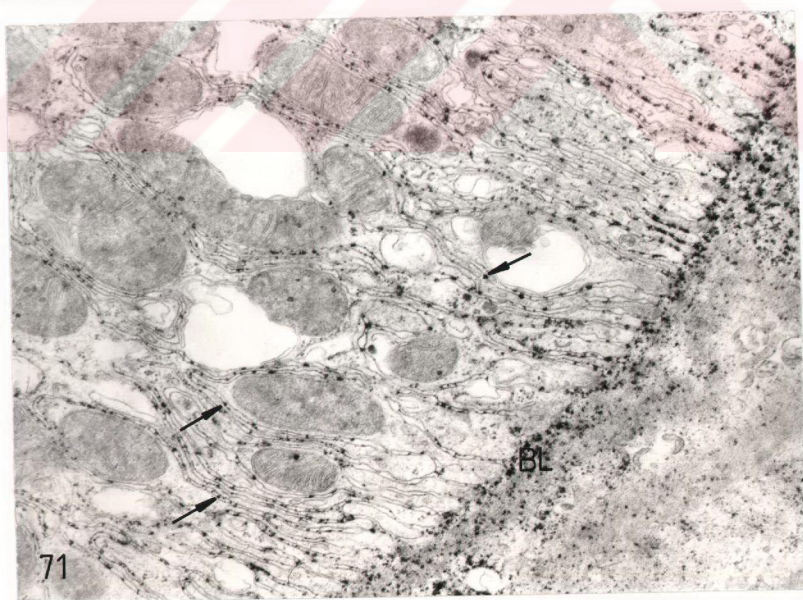
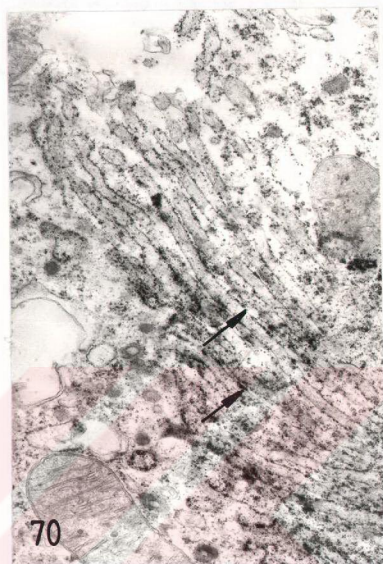
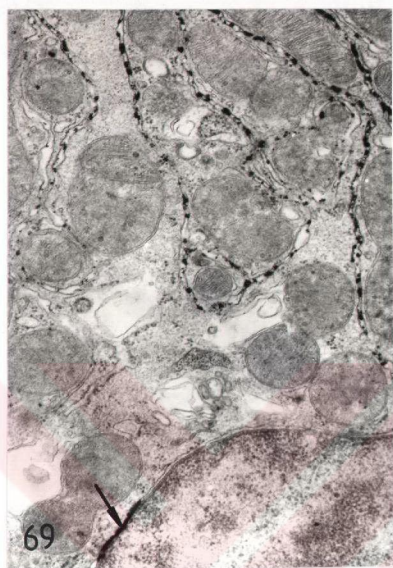
Şekil 67 :Proksimal kıvrıntılı tübül hücresinde endoplazmik retikulumdaki yoğun glukoz-6-fosfataz birikimi (→). X 14800

Şekil 68 :Endoplazmik retikulum membranları üzerinde ( $\Delta$ ), iç yüzüne bitişik ( $\blacktriangle$ ) ve içinde (→) glukoz-6-fosfataz aktivitesi. X 31300





- Şekil 69 : Nukleus membranının bir bölümünde glukoz-6-fosfataz aktivitesi (→). X 31300
- Şekil 70 : Fırça kenarda reaksiyon ürünü (→). X 31300
- Şekil 71 : Bazal laminada (BL) ve bazal katlanmalarda son ürün birikimi (→). X 31300



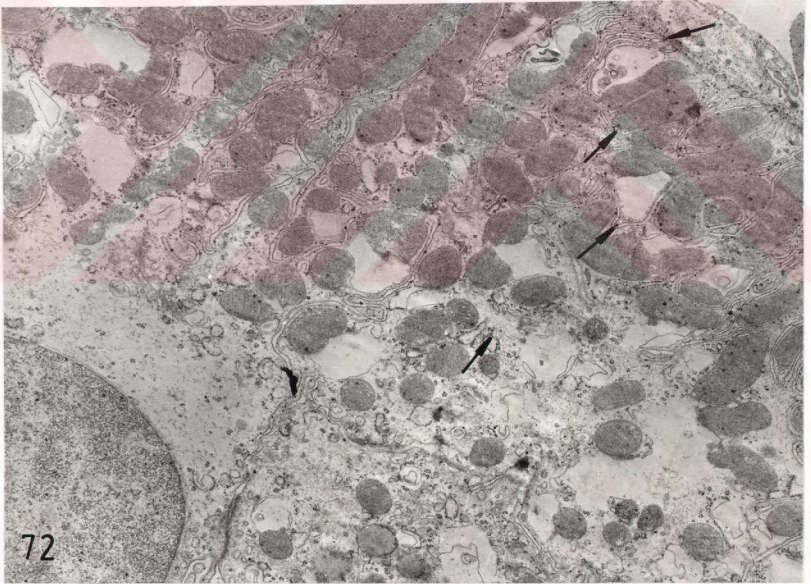
Şekil 72, 73: Kontrol hayvanların distal tübül hücrelerinde glukoz  
- 6 - fosfataz aktivitesi

Şekil 72 : Distal kıvrıntılı tübül hücresinde zayıf glukoz-6-  
fosfataz aktivitesi (→). X 14800



Bazal laminada ve bazal membran katlanmalarının dış yüzünde ve apikal membranın oluşturduğu fırça kenarda daha az olmakla beraber belirgin bir reaksiyon mevcuttur (Şekil:70,71). Nukleus membranında ise, reaksiyon ürünü perinuklear aralıkta yerleşmiştir. Son ürün genellikle nukleus membranının bir bölümünde veya membranın tümünde aralıklı izlenmiştir (Şekil:69).

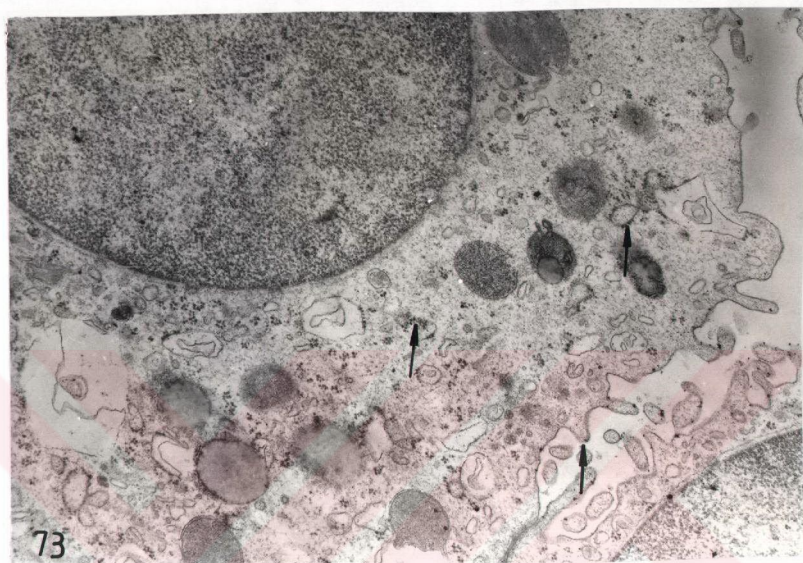
Distal kıvrıntılı tübül hücrelerindeki glukoz-6-fosfataz aktivitesi proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerindeki benzer yerleşim göstermektedir, fakat aktivite çok daha zayıftır (Şekil:72,73). Podositlerde ve glomerulusa ait hücrelerde ise bu azalma çok daha ileri bir düzeydedir (Şekil:74).





Şekil 73 : Kontrol hayvanın distal kıvrıntılı tübül hücresinde zayıf glukoz-6-fosfataz aktivitesi (→). X 31300

Şekil 74 : Kontrol hayvanın podositinde ve glomerulusa ait hücresinde zayıf glukoz-6-fosfataz aktivitesi. X 31300



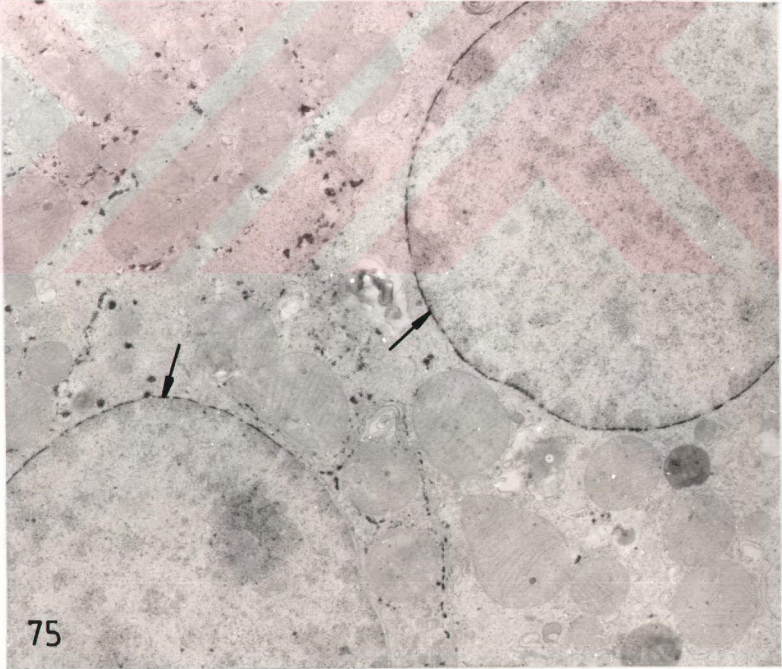
Şekil 75-77 :125mg/kg siklofosfamid uygulanan hayvanlara ait proksimal tübül hücrelerinde glukoz-6-fosfataz aktivitesi.

Şekil 75 : Nukleus membranının tamamında veya bir kısmında reaksiyon ürünü ( $\rightarrow$ ). X 14800

### 3.4.2. 125 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler

Glukoz-6-fosfataz aktivitesi genellikle proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerindeki granüllü endoplazmik retikulumda belirgin olarak azalmıştır (Şekil:76,77). Reaksiyon ürünü nükleus membranının tamamında veya yalnızca bir bölgesinde izlenmiştir (Şekil:75,76). Mikrovilluslardaki, bazal lamina ve bazal membran katlanmalarındaki reaksiyon dikkati çekecek kadar azalmıştır (Şekil:76). Granüllü endoplazmik retikulumun dış yüzündeki birikimler ve ribozomlar bazen güçlükle ayırt edilebilmiştir (Şekil:77).

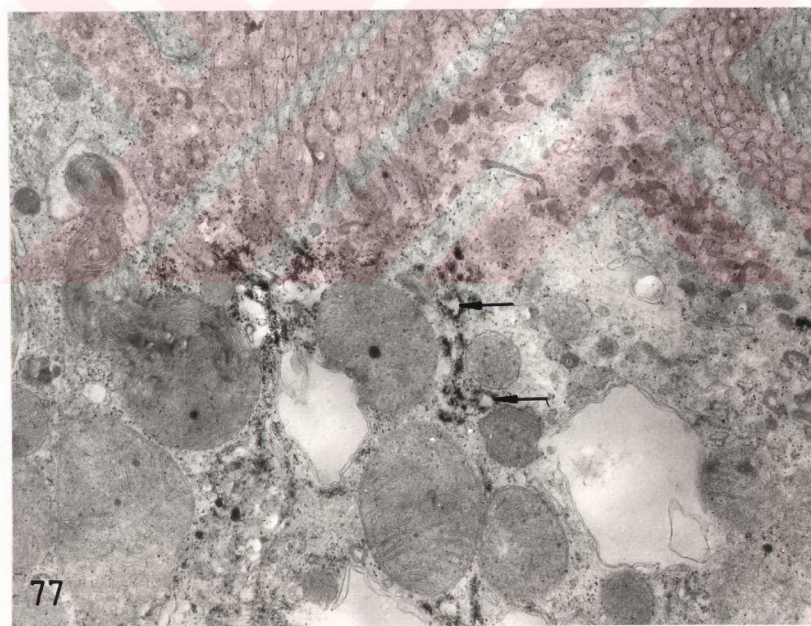
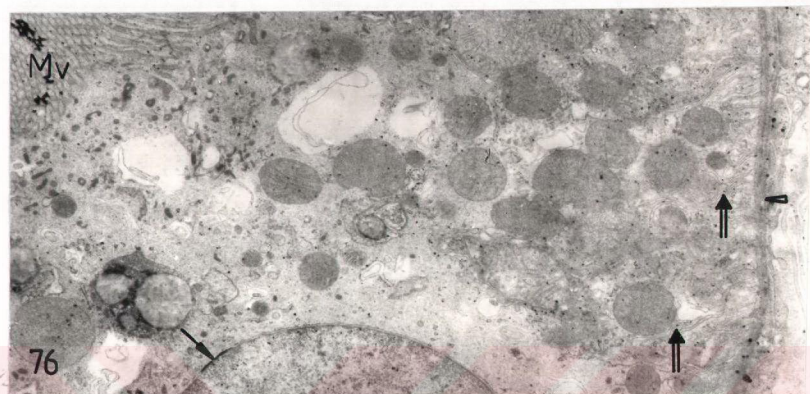
Distal kıvrıntılı tübül hücrelerinde, podositlerde ve glomerulosa ait hücrelerde reaksiyon ürünü çok zayıf olduğu için kontrol ve deney hayvanlarına ait yapılar incelendiğinde bir karşılaştırma yapmak mümkün olamamıştır.





**Şekil 76** : Proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi. Nukleus membranının bir bölgesinde reaksiyon ürünü ( $\rightarrow$ ), mikrovilluslarda (Mv), bazal laminada ( $\Delta$ ) ve bazal katlanmalarda ( $\Rightarrow$ ) azalmış reaksiyon. X 14800

**Şekil 77** : Granüllü endoplazmik retikulumda azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi ( $\rightarrow$ ). X 31300



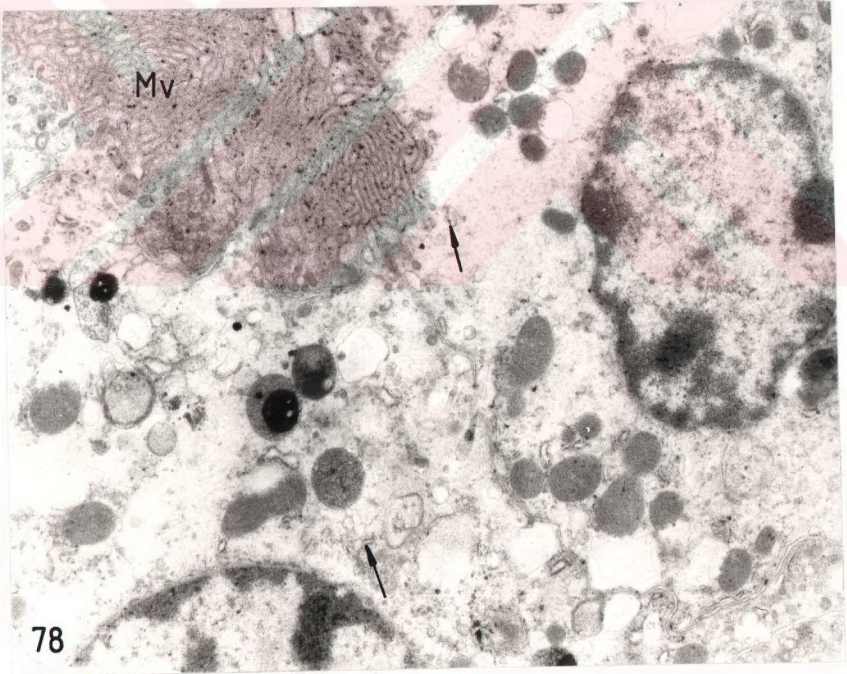
Şekil 78, 79 : 250 mg/kg siklofosfamid uygulanan hayvanlara ait proksimal tübül hücrelerinde glukoz - 6 - fosfataz aktivitesi

Şekil 78 : Proksimal tübül hücresinde glukoz-6-fosfataz aktivitesi. Özellikle endoplazmik retikulum membranlarında (→) ve mikrovillustarda (Mv) azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi. X 14800

### 3.4.3. 250 mg/kg siklofosamid uygulanan deney hayvanlarına ait gözlemler.

Bu grubda da, proksimal kıvrıntılı tübül hücrelerinde özellikle endoplazmik retikulum membranlarında glukoz-6-fosfataz aktivitesi belirgin olarak azalmıştır (Şekil:78,79). Pekçok hücrenin nukleus membranında reaksiyon gözlenememiştir (Şekil:78). Mikrovilluslarda, bazal laminada ve bazal membran katlanmalarının dış yüzünde az miktarda reaksiyon ürününün yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil: 78).

Daha önce belirtilen nedenlerden dolayı, distal kıvrıntılı tübül hücrelerinde, podositlerde ve glomerulusa ait hücrelerde bir değerlendirmeye gidilememiştir.





**Şekil 79:** Proksimal tübül hücresinde endoplazmik retikulum membranlarında (→) ve mikrovillustarda (Mv) azalmış glukoz-6-fosfataz aktivitesi. X 14800

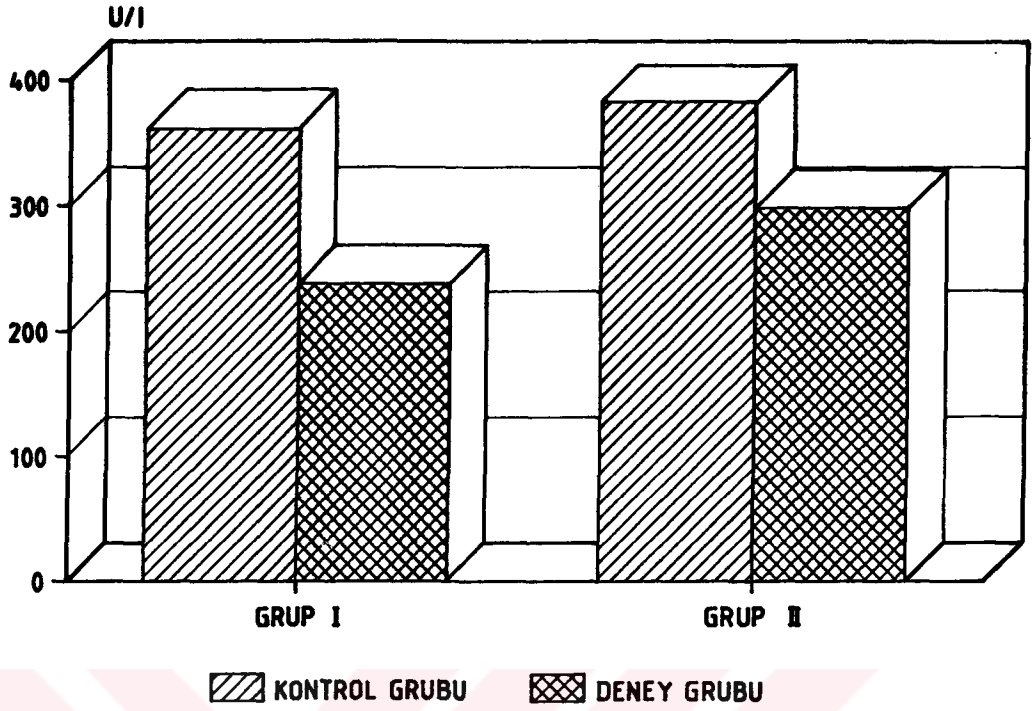




### 3.5. Blyoklmyasal gözlemler.

Mikrozomal süspansiyondaki glukoz-6-fosfataz aktivitesinin kontroller ile karşılaştırıldığında, belirgin olarak baskılandığı tespit edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen değerlere göre volüm aktivite (U/l) hesaplanmıştır.

Her iki grubda da, siklofosfamidin glukoz-6-fosfataz aktivitesinde belirgin bir azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Şekil:80). Grup I de, glukoz-6-fosfataz aktivitesinin kontrol hayvanlarda  $360.54 \pm 18.29$  iken, siklofosfamid uygulananlarda  $237.62 \pm 51.93$  e düştüğü tespit edilmiştir. Grup II de ise, kontrol hayvanlara ait mikrozomal süspansiyonda enzim aktivitesi  $380.96 \pm 36.97$  iken, siklofosfamid uygulananlarda  $297.91 \pm 46.13$  e düştüğü saptanmıştır (Tablo). Her iki gruba ait veriler student t-testi ile değerlendirildiğinde istatistikî yönden anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).



Şekil 80: Siklofosfamid uygulamasından sonra mikrozomal süspansiyondaki glukoz-6-fosfataz aktiviteleri.

| UYGULANAN DOZ (mg/kg) | KONTROL (U/l)  | DENEY (U/l)    | P       |
|-----------------------|----------------|----------------|---------|
| 125                   | 360.54 ± 18.29 | 237.62 ± 51.93 | < 0.001 |
| 250                   | 380.96 ± 36.97 | 297.91 ± 46.13 | < 0.001 |

± standart hata

Tablo: Siklofosfamidin glukoz-6-fosfataz aktivitesi üzerine etkileri.

#### 4. TARTIŞMA

Siklofosfamidin biyolojik olarak aktif bileşiklere yıkımının, genellikle, karaciğerde (Foley ve ark., 1961; Brock ve Hohorst, 1967; Gurtoo ve ark., 1985), çok az miktarda da böbrekte (Brock ve Hohorst, 1967; Gurtoo ve ark., 1985) meydana geldiği bildirilmiştir. İdrar taşıyıcı tübüller, siklofosfamidin ve onun bir çok sitotoksik metabolitlerinin atılması için esas yolu oluşturmaktadır.

Proksimal tübül hücrelerinde gözlenen değişikliklerin siklofosfamid metabolitlerinin sitotoksik etkisi sonucu meydana geldiği tahmin edilmektedir (Lavin ve Koss, 1971b). Lavin ve Koss (1971a), aynı deneysel şartlar altında, renal ve hepatik değişikliklerin aynı zamanda ya da renal değişikliklerin daha önce meydana geldiğini gözlemişlerdir. Bu araştırmacılara göre, renal tübüllerdeki yapısal bozukluklar hepatik değişikliklerin sonucu değildir. Bu çalışmada renal tübüllerde gözlediğimiz değişikliklerin, aynı deneysel şartlar altında ve aynı zamanda, hepatositlerde gözlediğimiz (Bolkent, 1987) yapısal değişikliklerden farklı olması ya da benzerlik göstermesi, Lavin ve Koss'un (1971b) da ileri sürdüğü gibi, renal değişikliklerin hepatik değişikliklerin sonucunda oluşmadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmada gözlediğimiz peroksizomlarda sayıca artma, mitokondriyum-lipid ilişkisi, halka dizilişli-elektron yoğun membranımsı yapılar içeren mitokondriyumlar gibi yapısal değişikliklerin hepatositlerde gözlenmemesi (Bolkent, 1987) karaciğerin, ilacın bu etkilerinden korunduğu anlamına gelmez. Karaciğer ve böbrekte hidrojen peroksit metabolizması ile ilgili olduğu tahmin edilen bazı enzimleri içeren peroksizomların, yapılan histokimyasal ve biyokimyasal incelemeler sonucu yapısal veya enzimatik bir fark göstermedikleri tespit edilmiştir ( Afzelius, 1965; de Duve ve Baudhuin, 1966; Shnitka, 1966; Beard ve Novikoff, 1969). Lavin ve Koss



(1971b), böbrek tübülleriindeki peroksizomların sayıca artış göstermesinden dolayı, karaciğer ve böbrek peroksizomlarının siklofosfamide ve onun metabolitlerine aynı şekilde tepki göstermediklerini ileri sürmektedirler. Araştırmacılar, izledikleri bu durumun farklı bir enzimin varlığına bağlı olup olmadığını veya karaciğer peroksizomlarının ilacın etkisinden korunup korunmadığını belirtmek için başka çalışmalara gerek duyulduğunu vurgulamaktadırlar. Lavin ve Koss'un (1971b) da belirttiği gibi, hepatik dokudan farklı renal dokuda gözlediğimiz peroksizomlarda sayıca artış gibi yapısal değişiklikler, muhtemelen karaciğer hasarının sekonder bir sonucu değil de, siklofosfamid metabolitlerinin direkt sitotoksik etkisi sonucu oluşabilir.

Steinberg (1984), günlük siklofosfamid tedavisinin lenfoma ve lösemiye yol açabilen kromozom anomalileri ve idrar kesesi ile ilgili enfeksiyonların gözlenebilme olasılığının hastayı hergün riske attığını ve bu ilacın 3 ile 4 haftada bir kez bir yıl süre ile verilmesinin bu riski kısıtladığını belirtmektedir. Lane (1959), tek doz, intraperitoneal olarak farelere, 600-750 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonunu takiben aynı gün % 100 oranında, 480 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan 1-2 gün sonra % 100 oranında, 375 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan 3-8 gün sonra % 80 oranında, 300 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan 3-21 gün sonra % 80 oranında ölüme rastlandığını, 240 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan sonra ise hiç ölüm olayına rastlanmadığını belirtmiştir. Evans ve arkadaşları (1984) ise, farelere 500-600 mg/kg siklofosfamid enjekte edilmesinden 48 saat sonra hayvanların hepsinin öldüğünü, bu doz 8 ya da 12 saatlik aralıklarla beşe bölünerek 100'er mg/kg verildiğinde akut ölüm oranının oldukça indirgendiğini, 24 saatlik aralıklara bölündüğünde ise ölümlerin ortadan kalktığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada, deney olarak kullandığımız hayvanlarda ölüm oranı % 25-30 olmuştur. Hem günde bir kez 125 mg/kg ve hem de sabah 125 mg/kg , akşam 125 mg/kg olmak üzere günde toplam 250 mg/kg siklofosfamid verilen grubda, ölüm oranının hemen hemen birbirine yakın olduğu bulunmuştur. Bu sonuç, her iki gruba ait deney hayvanlarının ilaca dayanma gücünün birbirlerine yakın olduğunu göstermektedir.

Lavin ve Koss (1971b), çalışmalarında sıçanlara tek doz, 200 mg/kg siklofosfamid enjeksiyonundan sonra 10 dakika ile 48 saat arasında bu ilacın etkilerini araştırdıklarında önemli yapısal değişiklikler gördüklerini belirtmişlerdir. Bu çalışmada ise, kısa sürede gözlenen değişikliklere dayanarak, özellikle kanser araştırmalarında, sitostatik

olarak, genellikle, tedavi amacı ile yüksek dozda ve bölünerek kullanımı dikkate alınarak doz-süre ayarlaması yapılmıştır. Ayrıca, deney hayvanlarının mümkün olduğu kadar yüksek doza dayanıklılığı da dikkate alınmıştır.

Bu araştırmada, en önemli morfolojik değişiklikler proksimal ve distal tübül hücrelerinin plazma membranlarında, nukleuslarında, mitokondriyumlarında ve endoplazmik retikulumlarında gözlenmiştir. Hem proksimal ve hem de distal tübüllere ait bazı hücrelerin apikal membranlarında parçalanmalar, bu tübüllerin lümeninde de atılmış sitoplazma artıkları ve nukleuslar dikkati çekmektedir. Membranın yapısal bütünlüğünü bozan değişikliklerin, distal ve özellikle proksimal tübül hücrelerinde reabsorpsiyon ve taşıma işlemlerinde fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi, aminoasitler, glukoz, su,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , bazı vitaminler ve anorganik iyonlar süzüntüden kıvrıntılı proksimal tübül hücrelerine reabsorbe olurken; metabolik artıklar, boya maddeleri ve ilaçlar da süzüntüye geri verilmektedir. Su,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ve  $\text{HCO}_3^-$  süzüntüden kıvrıntılı distal tübül hücrelerine reabsorbe olurken  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$  ve  $\text{NH}_4^+$  da süzüntüye katılmaktadırlar (Leeson, 1988; Telford, 1990). Aktif olarak reabsorbe olan bu maddelerin miktarı, taşıma sisteminin hızına, bu hız da taşıyıcı ya da özel enzim miktarına bağlıdır (Guyton, 1986). Dolayısı ile reseptör etkileşimindeki, taşıma ve enzim miktarındaki her değişikliğin reabsorbe edilecek madde miktarını da etkileyebileceği düşünülmektedir.

Patel (1990), siklofosfamidin ve reaktif metabolitlerinin membran elemanları ile reaksiyona girerek, özellikle lipid tabakasının fiziksel özelliğini değiştirdiğini ya da membran lipidleri ve proteinlerinde peroksidatif bozulmaya neden olduğunu ve bu bozulmanın da yüzey membran fonksiyonlarını etkileyerek sitotoksositeye neden olan bir seri olayları başlattığını belirtmektedir. Araştırmacıya göre, biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü düzenleyen çift lipid tabakasının akışkanlığındaki değişiklikler sonucu, membrana bağlı enzimlerin aktivitesi, reseptörlerin etkisi, permeabilite, taşıma, farklılaşma ve membran sinyal iletimi gibi membrana bağlı bir çok fonksiyon da zarar görmektedir. Örneğin mitokondriumlarda muhtemelen serbest radikal üretimi ile hücre hasarı söz konusu olabilmektedir (Brenner ve Rector, 1986b). Patel'in (1990) belirttiği, siklofosfamid ile oluşmuş pulmoner toksisitenin bir belirtisi olan bu membran fonksiyon bozukluklarının, siklofosfamid uyguladığımız hayvanların böbrek tübül hücrelerine ait membranlar için de söz

**konusu olduğu ve özellikle reabsorbsiyon ve taşıma işlemlerinde fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği düşünölmektedir.**

**PAS reaksiyonu, bilindiği gibi doku karbonhidratlarının varlığını gösteren bir indikatördür (Bancroft ve Stevens, 1982). PAS (+) maddelerin yapılarındaki ve miktarlarındaki değışiklikler rengin şiddetini değıştirebilir (Dahlquist ve ark., 1965). Reaksiyon ile gelişen rengin şiddeti dokudaki glukoz gibi reaktif yapıların miktarına bağlı olacaktır. Hücre yüzey örtüsünü oluşturan materyaldeki yapıtaşlarının miktarının azalması veya kimyasal yapısının bozulması zayıf PAS (+) reaksiyonunun nedeni olabilir.**

**Işık mikroskobu ile bazı nukleuslarda piknotik bir görünüm ayırt edilirken, elektron mikroskobu ile incelendiğinde bazı hücrelerde yoğun kromatin ve bazen yer yer, bazen de tümöyle net olarak izlenemeyen iç ve dış nukleus membranları gözlenmiştir. Nukleus membranındaki bu değışikliğin nukleus-sitoplazma ilişkisinin bozulmasına yol açacağı ve hücrenin nekroza gitmesiyle ilgili olabileceği düşünölmektedir.**

**Siklofosfamid uygulanan hayvanların proksimal túböl hücrelerinin mitokondriyumlarında gözlediğimiz halka dizilişli-elektron yoğun membranımsı yapıların varlığı daha önce belirtilmemiştir. Reynolds (1960), karbon tetraklorür verilmesinden sonra, mitokondriyumlarda benzer bir değışim gözlediğini, fakat mitokondriyum morfolojisinde izlenen böyle bir değışimin önemi hakkında bir bilgiye sahip olunmadığını belirtmiştir. Ghadially (1988a) ise, çeşitli toksik ilaçların verilmesinden sonra, zaman zaman elektron yoğun, membranımsı halka şeklinde dizilişler içeren mitokondriyumlara rastlandığını, bu halka şeklinde dizilen membranımsı yapıların miyelin şekillere dönüşümünün arttığını ve bu durumun dejenerasyon olayının bir işareti olduğunu belirtmektedir. Bu yoğun, osmiyofilik, yaprak şekilli veya halka dizilişli membranların gelişmesi ve böyle organellerin miyelin şekiller içeren lizozomal cisimlere dönüşümünün mitokondriyum kaybına yol açtığı da Ghadially (1988a) tarafından ileri sürölmektedir. Miyelin benzeri şekiller, çeşitli uyaranlar altında gözlenebilen mitokondriyum fosfolipid membran dejenerasyonu olarak kabul edilirler. Miyelin şekillere benzeyen bu konsantrik düzenlemeler aç bırakılmış, hem aç bırakılmış hem de insülin verilmiş ve hiçbir şey uygulanmadan beslenmiş sıçanların karaciğer hücrelerinin mitokondriyumlarında gözlenmiştir (Beux ve ark., 1969). Bu çalışmada da mitokondriyumlarda gözlediğimiz halka dizilişli-elektron yoğun membranımsı yapıların, Ghadially'nin (1988a) da belirttiği gibi, bir**

dejenerasyon belirtisi olduğu ve bunların lizozomal cisimlere dönüşümü sonucu mitokondriyum kaybının meydana gelebileceği düşünölebilir.

Bu çalışmada, mitokondri iç ve dış membranları arasındaki bölgede genişleme, matriksinde transparan bir bölge içeren mitokondriyumlarda ise genellikle periferde oldukça kısa kristallerin yer aldığıının izlenmesi, hücresel ATP'nin esas kaynağı olan bu organellerde metabolik aktivitenin azaldığını düşündürmektedir. Siklofosfamidin, mitokondriyum morfolojisinde bu tür patolojik değişikliklere sebep olduğu ve bu değişikliklerin de hücre solunumu için gerekli olan fonksiyonları ve enerji üretimini engellediği tahmin edilmektedir. Bilindiği gibi, krista sayısı ile mitokondriyumun oksidatif etkinliği arasında bir uygunluk vardır. Ghadially (1988a), toksik etkilere maruz kalan hücrelerde hücre içi sıvı birikiminin hücresel osmotik kontrol mekanizmalarının yetersizliği ile ilgili olduğunu, bu hasarın ve mitokondriyum şişmesinin ATP üretimini baskıladığını ve hücre membranındaki ATP'ye bağlı aktif sodyum iletiminde de yetersizliğe neden olduğunu açıklamıştır. Bilindiği gibi, proksimal tübölün esas fonksiyonlarından biri, tüböl lümeninden sodyum iyonlarının aktif emilimidir. Sodyum iyonlarının seçici reabsorbsiyonu enerji gerektiren bir işlemdir ve bu olay hücre yüzeyinde meydana gelir (Striker ve ark., 1968). Hücre enerjisinin asıl kaynağı mitokondriyumlar olduğu için, gözlenen yapısal bozukluklar enerji üretiminde ve dolayısıyla sodyum iyonlarının reabsorbsiyonunda bir azalmaya sebep olabilir.

Hanaki ve arkadaşları (1990), intraperitoneal olarak, 4 gün süreyle günde 100 mg/kg siklofosfamid verilen sıçanların kalp kasını kontrolleri ile karşılaştırdıklarında, mitokondriyum solunum zincirindeki NADH-sitokrom c redüktaz ve sitokrom c oksidazın belirgin olarak azaldığını ve dolayısı ile mitokondriyum solunum fonksiyonunun azaldığını gözlemişlerdir. Bu araştırmacılara göre, siklofosfamid ile oluşan kardiotoksisite mitokondriyum fonksiyon kaybı ile yakından ilişkilidir. Bizim çalışmamızda gözlenen yapısal değişikliklerin de mitokondriyumlarda fonksiyon bozukluklarına neden olabileceği ve bu durumun enerji üretimini engelleyebileceği düşünölmektedir.

Hücre içinde elektron yoğun bir halka ile çevrili lipid damlalarının mitokondriyumlar ile sıkı ilişkide olduklarını ve bazı elektron mikrograflarında, bu lipid damlalarının mitokondriyum içinde yer aldığını açıklamanın güç olduğunu belirtmiştik. Ghadially (1988a), lipid damlacığının mitokondriyum membranının derin çöküntüsü içinde

yer alabileceğini ve böyle bir lipid damlacığının kesit düzlemine göre mitokondriyum içindeymiş gibi görülebileceğini belirtmektedir. Palade ve Schidlowsky'a (1958) göre, mitokondriyumlar trigliserit metabolizmasında kullanılan bir çok enzimi içerdikleri için, bu enzimlerin lipidik substratlar ile yakın ilişki kurduklarını açıklamışlardır. Siklofosfamid etkisiyle, ilk defa, böbrekte proksimal tübül hücrelerinde izlediğimiz lipid-mitokondriyum ilişkisi, mitokondriyumlardaki yağ asidi oksidasyonu ile sağlanan hücresel enerjinin kaynak olarak lipidleri kullanılabileceği ihtimali, Palade ve Schidlowsky'nin (1958) açıklamaları ile paralellik göstermektedir.

Siklofosfamid enjekte edilen hayvanların, proksimal tübül koyu hücrelerinde, krista ile tamamı iki ayrı kompartmana ayrıldığı izlenimini veren bazı mitokondriyumların bir kısmının şişmiş bir matriks, diğer kısmın normal durumda fakat oldukça yoğun bir matriks içerdiği gözlenmiştir. Deney hayvanlarımızda rastlanan bu değişiklik, patolojik şartlar altında ortaya çıkan Trump ve Ginn'in (1968) de belirttiği gibi, mitokondriyumun bir krista ile iki kompartmana ayrılması durumuna büyük bir benzerlik göstermektedir.

Çok fazla miktarda su ve iyon geçişi olan dokuların mitokondriyumlarında kalsiyum, magnezyum, fosfor, inorganik materyal, lipid v.b. içeren ve osmiyofilik olan granüllerin arttığı Ghadially (1988a) tarafından açıklanmıştır. Araştırmacının patolojik ve deneysel şartlar altında gözlendiğini belirttiği bu granüllere, bizim çalışmamızda, nekroza giden hücrelerin mitokondriyumlarında rastlanması, canlıda siklofosfamidin nekroza uygun bir ortam oluşturduğunu bir kere daha vurgulamaktadır.

Apikal vesiküller apikal vakuollerini oluşturmak için birbirleri ile veya daha önceden var olan apikal vakuoller ile kaynaşır ve bu apikal vakuoller daha sonra hücre merkezine doğru hareket edip sindirilecek materyalin sindirimi için gerekli olan asit hidrolazları içeren lizozomlar ile kaynaşır (Brenner ve Rector, 1986a). Bu apikal vesiküllerin vakuollerle birleşmesi bu çalışmada da gözlenmiştir. Tübül hücrelerinde, ışık mikroskobu ile genellikle apikal bölgelerde çeşitli büyüklükte oldukları gözlenebilen vakuollerin, elektron mikroskobu ile incelendiğinde endoplazmik retikulum vesikülleri ile iç ve dış mitokondri membranları arasındaki genişlemelerden ibaret oldukları tespit edildi. Bu çalışmada, granüllü endoplazmik retikulumda izlediğimiz genişlemeler ve düz yüzlü endoplazmik retikulumun yer yer kümeler oluşturması Lavin ve Koss (1971b) tarafından da belirtilmiştir Hücre içine fazla miktarda su ve eriyik halinde maddelerin girmesi, granüllü ve düz yüzlü



granüllü ve düz yüzlü endoplazmik retikulum gibi membran içeren kanal ve vesiküllerin genişlemelerine yol açar.

Granüllü endoplazmik retikulumun önemli bir fonksiyonu plazma proteinlerinin sentezidir. Ribozomlar seyrekleşip, granüllü endoplazmik retikulumdan sitoplazmik matrikse geçip, sitoplazmada serbest olarak bulunduklarında protein sentezi bloke olur ve böylece, yeni membranların ve plazma proteinlerinin sentezi gerçekleşemez. Siklofosfamid uygulamasından sonra böbrek tübül hücrelerinde endoplazmik retikulumda bu yönde gözlediğimiz değişiklikler, bu hücrelerdeki protein sentezinin inhibisyona uğradığını düşündürmektedir.

Smuckler ve Benditt (1963), toksik bir madde olan karbon tetraklorür uygulanmış sıçanların karaciğer hücre fraksiyonu çalışmalarında polizom kümelenmelerinde azalma ve onlarla ilgili amino asit bağlanma kapasitesinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, siklofosfomid uygulamasını takiben izlenen benzer polizom azalmasının ve serbest ribozomların büyük bir artış göstermesinin aynı nedenlere bağlı olarak meydana gelebileceğini düşündürmektedir.

Ghadially (1988a), ilaçla stimüle edilen enzim üretiminin morfolojik bir ifadesi olarak kabul edilen düz yüzlü endoplazmik retikulum hipertrofisinde, ilk safhada mikrozomal protein fraksiyonunda artıştan ve ilaç metabolize edici enzimlerin oluşumundan, ikinci safhada kısa veya oldukça uzun sürebilen ilaç toleransından, üçüncü safhada ilaç metabolize edici enzimlerin azalmasından ve düz yüzlü endoplazmik retikulumun hücre sitoplazmasında sıkıca gruplaşmalarından bahsetmektedir. Bu araştırmacı, granüllü ve düz yüzlü endoplazmik retikulumlardaki bu morfolojik değişikliklerin ilaca, doza, miktara, verilme sıklığına, yaşa ve cinsiyete göre değişebildiğini de belirtmektedir. İlaçların zehirsiz duruma getirilmesi ile ilgili olan düz yüzlü endoplazmik retikulumun en karakteristik enzimlerinden biri glukoz-6-fosfatın glukoz-6-fosforilasyonunu katalizleyen glukoz-6-fosfatazdır (Karp, 1984). Bizim çalışmamızda, toksik hasara bir cevap olarak gözlediğimiz düz yüzlü endoplazmik retikulum kümelenmeleri Ghadially'nin (1988a) belirttiği üçüncü safhaya uymaktadır. Bu son safhada metabolize edici enzimlerin azalması da glukoz-6-fosfatazın azalacağına bir işaret olabilir. Ayrıca, bu enzimin aktivitesinin azaldığı da bu çalışmada tespit edilmiştir.

Kontrollar ile karşılaştırıldığında, deney grubunda arttığı tespit edilen koyu hücreler, daha elektron yoğun sitoplazmik matriks ile daha

yoğun, daha küçük ve invaginasyon gösteren nukleus içermektedirler. Açık hücrelerin küçülerek ve yoğunlukları artarak koyu hücreleri veya koyu hücrelerin şişerek ve yoğunlukları azalarak açık hücreleri meydana getirebilecekleri ileri sürülmüş, fakat koyu hücrelerdeki organellerin görünümü dikkate alındığında bu hücrelerin açık hücrelere dönüşebileceğine pek ihtimal verilmemiştir (Steiner ve Baglio, 1963; Herdson ve ark., 1964a). Koyu ve açık hücre olayının, toksik ajanlar ile meydana gelen patolojik bir değişiklik olabileceği ya da örneğin hepatositlerin hidrasyon ve fonksiyonel durumlarındaki farklardan ileri gelebileceği şeklinde yorumlanmıştır (Herdson ve ark., 1964b; Witzleben, 1966). Bizim çalışmamızda da rastlanan koyu hücrelerin, genellikle metabolik olarak inaktif veya ölmekte olan veya ölmüş hücreler olabileceği düşünülmektedir.

Suzuki ve Mostofi (1966), intraperitoneal gliserin enjeksiyonunu takiben, kıvrıntılı proksimal tübülü döşeyen koyu epitel hücrelerin sayıca arttığını, bu hücrelerin yoğun, küçük ve ince uzun olduğunu sitoplazmik organellerin ve nukleusların sıkıca paketlenildiğini, mitokondriyumların genellikle küçük, yoğun, büzülmüş olduğunu, nukleusun küçük ve girintili çıkıntılı olduğunu, sitoplazmik polizomların sayıca azaldığını, serbest ribozomlara rastlandığını ve bu bulguların zarar görmüş hücrelerin karakteristik değişiklikleri olduklarını belirtmişlerdir. Herdson ve arkadaşları (1964c) thiohydantoin ile sıçan karaciğerinde gözlenen koyu hücrelerde organellerin yığılma gösterdiğini açık hücrelerde ise dağınık olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da deney hayvanlarında gözlenen sayıca artmış koyu hücrelerin özellikleri, bu araştırmacıların belirttiği özellikler ile büyük bir benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada, siklofosfamidin renal korpüsküller üzerine etkisi incelendiğinde, kapiller ile podositlerin ortaklaşa paylaştıkları bazal laminada lamina densesinin daha elektron yoğun bir görünüm aldığı ve bu nedenle de, lamina lusidanın bazı bölgelerde ayırt edilemediği gözlenmiştir. Renal glomerulus gibi, su ve eriyebilen madde değişiminin süratle meydana geldiği yapılarda, kapillerlerin bazal laminalarının seçici bir filtrasyon membranı olarak rol oynadıkları bilinmektedir. Bu durumda, bu tür bir morfolojik değişikliğin süzülme fonksiyonunu engelleyici ya da azaltıcı bir rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu araştırmada, hem hidrolitik ve hem de sentetik aktiviteden dolayı multifonksiyonel bir enzim olan glukoz-6-fosfatazın, deney grubuna ait hayvanların proksimal tübül hücrelerinde belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Böbrek korteksi homojenatlarında plazma membranı parçaları (membran kalınlığı  $\sim 100 \text{ \AA}$ ) zerinde belirgin kurşun fosfat birikimi mevcut olmadığı, endoplazmik retikuluma ait mikrozomal vesiküllerin (membran kalınlığı  $\sim 60-70 \text{ \AA}$ ) i yüzeyinde ise kurşun fosfat birikiminin çok belirgin olduğu belirtilmiştir (Jakobsson ve Ericsson, 1969). Hem her iki tip endoplazmik retikulum ve hem de nukleus membranında glukoz-6-fosfatazın varlığı gösterilmiştir (Kanamura, 1971). Bu çalışmada, glukoz-6-fosfatazın nukleus ve endoplazmik retikulum membranlarında çok yoğun, fırça kenarda ve bazal membran katlanmalarında az yoğun reaksiyon vermesi, yukarıda adı geçen araştırıcıların böbrek kıvrıntılı proksimal tübül hücrelerinde glukoz-6-fosfatazın yerleşimine ait açıklamaları ile büyük bir benzerlik göstermektedir.

Rhodin (1958), mikrovillusların reabsorbe edilen glukozun fosforilasyonu ile ilgili özel enzimatik aktiviteye sahip bir enzim sistemini içerdiklerini belirtmişdir. Nordlie ve Soodsma (1966), glukoz-6-fosfatazın diyabetik hayvanların proksimal tübül hücrelerinde, glukoz reabsorbsiyonu ve taşıma fonksiyonu ile ilgili olabileceğini ve böylece, böbrek glukoz-6-fosfatazının metabolik fonksiyonda hepatik enzimden farklı bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bu araştırıcılara göre, hücrenin luminal membranına yakın glukozun fosforilasyonu ve aynı hücrenin bazal kısmına yakın şeker fosfatın hidrolizi, glukoz-6-fosfataz ile kataliz edilir; sentez reaksiyonu glukoz konsantrasyonu yüksek ve pH asidik iken gerçekleşir; glukoz-6-fosfatın hidrolizi ise kanın pH sına yakın yani daha yüksek bir pH ile başarılır; fosforil verici kaynak, hücrenin bazal bölgesinde yer alan mitokondriyumlardaki ATP ile dengede tutulur. Hem karaciğer ve hem de böbrekteki fosfotransferaz ve fosfohidrolaz aktivitelerinin diyabette belirgin olarak artması ve insülin verilerek azalması glukoz-6-fosfatazın ortak bir genetik kontrol altında olduğunu kanıtlar (Fisher ve Stetten, 1965; Nordlie ve Arion, 1965). Kanamura (1971) ise, normal hayvanların da proksimal tübül hücrelerinde bu enzimin, glukoz reabsorbsiyonu sırasında glukoz-6-fosfatın hidrolizinden sorumlu olduğunu belirtmektedir. Bu araştırıcı, glomerular süzüntüden glukozun reabsorbsiyonu ile ilgili olan bu enzimin yeri ile glukozun reabsorbsiyon yerinin aynı olduğunu da belirtmiştir. Bti ve arkadaşları (1982), glukoz-6-fosfatazın, normal şartlar altında, böbrekte ya glukozun reabsorbsiyonu ve taşınmasında ya da glukoz-6-fosfatın hidrolizinde yer alabileceğini belirtmektedirler.

Veeraragavan ve arkadaşları (1981), hem karaciğerde ve hem de böbrekte glukoneogenezde yer alan glukoz-6-fosfatazin, proksimal tübüllerden kana glukoz salınmasına yardım ettiğini ve kan glukoz konsantrasyonundaki artışın glukoz-6-fosfataz aktivitesi ile kontrol edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılara göre, glukoz-6-fosfatın hidrolizi sonucu serbest kalan glukoz, hücreden ekstrasellüler alanlarda yer alan kapillere geçer ve kan glukozuna devamlı bir kaynak oluşturur. Böylece karaciğerin yanısıra bir dereceye kadar da böbrekler kan şekere katkıda bulunmuş olurlar (Kanamura, 1971; Veeraragavan ve ark., 1981). Kan glukozu düştüğü zaman renal glukoneogenezin arttığı, kan glukozu arttığı zaman da, muhtemelen hepatik glukogenolizden dolayı, böbreklerde glukoneogenez aracılığı ile glukoz sentezine gerek duyulmadığı belirtilmiştir (Veeraragavan ve ark., 1981). Ross ve arkadaşları (1986), glukoneogenezin kan glukozuna katkısının normal şartlar altında % 5-25, açlık ve diyabette hemen hemen % 50 civarında olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacılar, enerji gerektiren işlemler olan sodyum reabsorpsiyonu ile glukoneogenezin proksimal tübüllerdeki enerji için rekabet ettiklerini de belirtmişlerdir. Oysa, Kıda ve arkadaşları (1978), böbrek glukoneogenezinin kan glukozunun korunmasındaki fizyolojik önemini incelemişler ve diyabet, açlık ve asidosis gibi anormal metabolik durumlarda sıçanlarda glukoneogenezin belirgin olarak arttığını tespit etmişlerdir.

Nefronda glukoneogenezin, proksimal tübülde gerçekleştiği ve kıvrıntılı kısımdan düz kısma doğru gidildikçe azaldığı tespit edilmiştir (Schmidt ve Guder, 1976). Patolojik şartlar altında rejenerasyon için gerekli enerjinin sağlanmasında bu enzimin, glukoz tüketiminde bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Böti ve ark., 1982). Bizim çalışmamızda ise, proksimal tübül hücrelerinin mitokondriyumları sayı bakımından azalmış olmasa da fonksiyon bakımından yetersiz olacaklarından, böbrek tübül hücrelerinin optimum fonksiyonları için metabolik enerji sağlanmasında glukoz üretimi gerekli olabilir. Bilindiği gibi, enerji gerektiren taşıma işlemleri için gereken enerjinin çoğu solunum ile sağlanır. ATP azaldığı zaman enerji gerektiren bir işlem olan glukoneogenez de azalır (Ross ve ark., 1986). Fakat, glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki azalma sonucu optimum şartlar için söz konusu olan glukoz üretimi ve kana glukoz verimi tam anlamıyla gerçekleştiremeyeceğinden kan glukoz konsantrasyonu belli bir seviyede tutulamayabilir.

Glukoz-6-fosfatazin endoplazmik retikulum membranlarının iç yüzünde yer aldığı, glukoneogenezin son basamağının endoplazmik

retikulumda başarıldığı ve glukoz-6-fosfatın hidrolizi ile oluşan glukozun endoplazmik retikulum membranları ile çevrelenmiş alana serbest bırakıldığı tespit edilmiştir (Kanamura, 1971). Normal şartlar altında, böbreğin, kan glukoz konsantrasyonunun korunmasında önemli bir rol oynamadığı da belirtilmiştir (Schmidt ve Guder, 1976). Sıçan böbreğinde laktat, pirüvat, trikarboksilik asit siklusuna ait yapıların ve amino asitlerin glukozla dönüşümü için optimum şartlar araştırılmış ve aç kalmanın glukoneogenik kapasiteyi artırdığı tespit edilmiştir (Krebs ve ark., 1963).

Böti ve arkadaşları (1982), glukoz-6-fosfataz aktivitesinin civa klorit verilmesinden iki gün sonra hasar görmüş tübüllerde azaldığını ve 4 gün sonra da, rejenere olan ve nekrotik olmayan tübüllerde arttığını gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar, civa klorit ile oluşmuş nekrozdan sonra, sıçan böbreğinin proksimal tübülünün ilk kısmında glukoneogenez olayının çok daha yüksek olduğunu ve sadece patolojik şartlar altında enzimin rejenerasyon için gerekli enerjide önemli bir fonksiyona sahip olduğunu ve glukoz tüketiminde de bir rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine aynı araştırmacılar, glukoz alımı ve üretiminin böbreğin farklı kısımlarında birlikte meydana gelebildiğini ve dengenin idrar atılımına bağlı olabileceğini belirtmişlerdir. McCann (1962), glukozun proksimal tübüllerde oluştuğunu ve burdan salındığını, renal glukoz metabolizması ile diüresis arasında önemli bir ilişki olduğunu, glukoz alımı ve üretiminin aynı zamanda meydana geldiğini ve böbrek glukoz metabolizmasında dengenin idrar atılımı ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, glukoz alımı ve üretiminin şartlara bağlı olarak değişebileceği de açıklanmıştır (Nordlie ve Soodsma, 1966). Glukoz metabolizmasının, sodyumun böbrek tarafından geri emiliminde özel bir rol oynadığı ve glukozun maksimal  $\text{Na}^+$  reabsorpsiyonu için gerekli olduğu tespit edilmiştir (Trimble ve Bowman, 1973).

de Duve ve Baudhuin (1966), hücre ekonomisinde peroksizomların muhtemel rolünden bahsetmiş ve yardımcı solunum mekanizmasının varlığını kabul etmiştir. Bu ileri sürülen mekanizmada, katalaz katalitik kapasiteden ziyade peroksidatif bir rol oynamaktadır. Peroksizomların glukoneogenez gibi çeşitli hücre fonksiyonları ile ilgili olduğu belirtilmiştir (Brenner ve Rector, 1986a). Kristic (1984) ise, peroksizomların glukoneogenezde enerji materyali olarak lipidlerden  $\alpha$ -keto asit üretimi ile ilgili olduğunu belirtmiştir. Düz yüzlü endoplazmik retikulumun çoğaldığı bölgelerde peroksizomların yerleştiği ve bunların çok yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir (Claude, 1969). Bizim



çalışmamızda düz yüzlü endoplazmik retikuluma paralel olarak peroksisomlarda gözlediğimiz artış glukoneogenez ile ilgili olabilir.

Bu çalışmada, karbonhidrat metabolizmasında anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfatazın azalması biyokimyasal metotla da gösterilmiştir. Bilindiği gibi, enzim seviyesinin düşmesi enzim sentezinin hızının yavaşlamasına veya enzim yıkım hızının artmasına bağlıdır.

Her iki grubda da, glukoz-6-fosfataz aktivitesi anlamlı bir şekilde azalmasına rağmen, grup II'de bu aktivite kaybının grup I'e göre biraz az olduğu tespit edilmiştir. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. Birincisi, aktivitedeki değişikliğin son enjeksiyondan sonraki süreye bağlı olabileceğidir. Çünkü, grup I son enjeksiyondan bir saat sonra, grup II ise son enjeksiyondan 1 gün sonra kesilmiştir. Son enjeksiyondan sonra hayvanların kesimine kadar olan devrenin kısa veya uzun olması bu farka neden olabilir. Grup I ve II de, glukoneogenik aktivite protein sentezinin ve dolayısıyla glukoz-6-fosfatazın inhibe olması nedeni ile azalabilir ve kana glukoz verimi tam olarak gerçekleşemez. Grup II de son enjeksiyondan 1 gün sonra, hepatik glukogenoliz veya glukoneogenez veya kısmen de böbrek glukoneogenezini işe karışabilir. Her iki olasılıkta grup II deki enzim aktivitesindeki kaybın daha az olmasına açıklık getirmektedir.

Sonuç olarak, siklofosfamidin böbrek tübül epitelinde glukoz-6-fosfataz aktivitesini azalttığı tespit edilmiştir. İlacın böbrekte bu enzim üzerine etkisi daha önceden incelenmemiş olup yapılan histokimyasal, sitokimyasal ve biyokimyasal çalışmalardan elde edilen bulguların birbirini desteklediği gözlenmiştir. Hücrelerin metabolik fonksiyonlarında oldukça önemli değişikliklere yol açan yapısal değişiklikler ve glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki azalma, bu tür ilaçların çok daha dikkatle kullanımı gerektirmektedir.

İlacın yararlı etkilerinin oldukça uzun sürmesi ve toksisitenin çok az olması şüphesiz arzu edilen bir durumdur. Ancak, bu, siklofosfamidin bazı hastalıklarda kısa bir süre kullanımı ile başarılmaktadır. Oysa, uzun süreli kullanımda enfeksiyon olasılığına karşı ilaç dozunun ayarlanması söz konusudur.

Siklofosfamid gibi antikanser ilaçları değerlendirirken, sadece terapötik etkilerini değil, aynı zamanda muhtemel toksik ve karsinogenik etkilerini de dikkate almak gerekir. Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulmuş böbrek toksisitesi ile ilgili ayrıntılı bir çalışma

olmadığından, bu çalışma ile siklofosfamid uygulanmasında dikkate alınması gereken hususlar saptanmıştır.

Bu çalışma ile siklofosfamidin enzim aktivitesini nasıl etkilediği ve metabolik fonksiyonda ne gibi değişikliklere yol açacağı tespit edilmiştir. Siklofosfamid, toksisite ve glukoz-6-fosfatazın birbirleri ile ilişkilerinin tespiti bu tür ilaçların çok daha dikkatle kullanımını gerektirir.



## 5. Ö Z E T

Siklofosfamid, hem neoplastik ve hem de neoplastik olmayan pekçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Terapötik olarak kullanılan bu ilacın proksimal tübüllerde, distal tübüllerde ve renal korpüsküllerde belirgin yapısal **değişiklere** sebep olduğu gözlenmiştir. Bu ilacın özellikle proksimal tübül hücrelerinde toksik etki gösterdiği ve nekroza sebep olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek doz ve uzun süreli siklofosfamid uygulamasının etkileri hem yapısal ve hem de enzimatik yönden incelenmiştir. Işık mikroskopu seviyesinde, proksimal ve distal tübül hücrelerinin apikal membranının parçalanması sonucu, tübül lümeninde sitoplazma artıkları ve atılmış nukleuslar gözlenmiştir. Bazı tübül hücrelerinde piknotik nukleuslar mevcuttur. Grup II'de, proksimal tübül hücrelerinin yer yer tahrip olmuş fırça kenarlarında PAS (+) reaksiyon azalmıştır. Tübül hücrelerinin özellikle apikal bölgelerinde **değişik büyüklüklerde** vakuoller yer almaktadır. Kapsül aralığının dikkat çekecek derecede genişlediği, glomerular kitlenin bütünlüğünün bozulduğu ve küçüldüğü, parietal yaprağın bozulduğu dikkati çekmiştir.

Elektron mikroskopu düzeyinde ise, nukleus membranında bozulma, mitokondriumlarda şişme, mitokondrium-lipid ilişkisi ve mitokondrium içinde halka dizilişli-elektron yoğun membranımsı yapılar, sayıca artmış koyu hücreler, bir kısmı şişmiş diğer kısmı yoğun matriks içeren mitokondriyumlar, şişmiş granüllü endoplazmik retikulum sisternaları, artmış ve gruplaşmış düz yüzlü endoplazmik retikulum vesikülleri, sayıca artmış peroksizomlar gözlenmiştir. Glomerulus kapillerleri ile podosit pedisellerinin ortaklaşa paylaştıkları bazal laminada bozulma ve yer yer yapısal şişkinlikler veya kalınlaşmalar izlenmiştir.

Siklofosfamidin, özellikle proksimal tübül hücrelerindeki glukoz-6-fosfataz aktivitesi üzerine etkisi de hem histokimyasal ve hem de sitokimyasal yönden incelenmiş ve bu aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, glukoneogenezde anahtar bir enzim olan glukoz-6-fosfatazın aktivitesi böbrek dokusuna ait mikrozomal süspansiyonda da ölçülmüş ve glukoz-6-fosfatazdaki aktivitenin azalması istatistikî yönden anlamlı bulunmuştur.

Glukoz reabsorbsiyonu ve taşımada ya da glukoz-6-fosfatın hidrolizinde yer alabileceği düşünölen bu enzimin aktivitesindeki azalma glukoneogenez aktivitesini azaltabilir. Bu azalmadan dolayı, kana glukoz verilmesi gerçekteşemeyeceğinden kan glukoz konsantrasyonu belli bir seviyede tutulamaz.

Bu çalışmada histokimyasal, sitokimyasal ve biyokimyasal bulgular birbirini desteklemektedir. Hücrelerin metabolik fonksiyonlarında oldukça önemli yapısal değışikliklere yol açabilen bu yapısal değışiklikler ve glukoz-6-fosfataz aktivitesindeki azalma, siklofosamid gibi sitotoksik ve kanserojen ilaçların kullanımında dikkate alınmalıdır.



## 6. SUMMARY

Cyclophosphamide is a drug widely used in the treatment of many diseases both neoplastic and non-neoplastic. It has been noted that this drug used for therapeutic purposes produces marked structural alterations in the proximal tubule, in the distal tubule and in the renal corpuscles. It has been established that this agent exerts a toxic effect especially on the cells of proximal tubule and leading to necrosis.

In the present study, the effects to cyclophosphamide administered in large doses for a long period were investigated both from the enzymatic and structural viewpoints. At the light microscope level, cytoplasmic debris and extruded nuclei were observed in the lumen of the tubule as a result of disintegration of the apical membrane of the cells of the proximal and distal tubules. Certain cells of the tubule contain picnotic nucleus. In group II, PAS (+) reaction is decreased at some sites of the partly destroyed brush border of the proximal tubule cells. Vacuoles of various sizes are found especially in the apical region of the tubule cells. It was observed that the capsular space was markedly widened, the glomerular mass had lost its integrity and become smaller and the parietal layer was damaged.

While at the electron microscopic level, it was observed that the nuclear membrane was destroyed and that mitochondria became swollen. Also, a relationship between the mitochondria and lipids was observed, as well as the presence of electron dense membranous structures with a circular arrangement, increased numbers of dark cells, mitochondria some of which are swollen, others with a dense matrix, dilated cisternae of rough endoplasmic reticulum, increased grouped vesicles of smooth endoplasmic reticulum and increased numbers of peroxisomes. Destruction and thickening or structural swellings at places in the basal lamina shared by glomerular capillaries and pedicels of the podocytes.

The effect of cyclophosphamide on the activity of glucose-6-phosphatase was investigated both histochemically and cytochemically in the proximal tubule cells and a decrease in this activity was noted. Furthermore, the activity of glucose-6-phosphatase which is a



key enzyme in gluconeogenesis, was measured in the microsomal fraction of the renal tissue and the decreased in the glucose-6-phosphatase activities was found to be statistically significant. A decrease in the activity of this enzyme which is thought to play a part in glucose reabsorption and transport or in hydrolysis of glucose-6-phosphate may cause a decrease in the gluconeogenesis activity. As a result of this decrease, glucose cannot be released into the circulation and blood-glucose concentration cannot be maintained at a defined level.

In the present study, histochemical, cytochemical and biochemical findings support each other. These structural changes which may cause relatively important alterations in the metabolic function of the cells as well as a decrease in the glucose-6-phosphatase activity should be taken into consideration in the use of cyclophosphamide and carcinogenic and cytotoxic drugs of this type.



## 7. K A Y N A K L A R

**AFZELIUS, B.A. (1965).** The occurrence and structure of microbodies. J. Cell Biol., 26, 835 - 843.

**ARNOLD, H. und BOURSEAUX, F. (1958).** Synthese und abbau cyto-statisch wirksamer cyclischer N - phosphamidester des Bis (  $\beta$  - chloräthyl ) - amins. Angew. Chem., 70, 539 - 544.

**BAGINSKI, E.S., FOÁ, P.P. and ZAK, B. (1974).** Glucose -6-phosphatase, 876-880. Ed. H. U. Bergmeyer.. Methods of Enzymatic Analysis, 2,. Verlag Chemie GmbH, Florida.

**BANCROFT, J.D. and STEVENS, A. (1982).** Theory and Practice of histological Techniques. , Churchill Livingstone ,Edinburgh.

**BEARD, M.E. and NOVIKOFF, A.B. (1969).** Distribution of peroxisomes (microbodies) in the nephron of the rat. J. Cell Biol., 42 (1), 501 - 518.

**BERRIGAN, M. J., MARINELLO, A. J., PAVELIC, Z., WILLIAMS, C.J., STRUCK, R.F. and GURTOO, H.L. (1982).** Cancer Res., 42, 3688 - 3695.

**BEUX, Y.L., HETENYI, G. JR. and PHILLIPS, M.J. (1969).** Mitochondrial myelin - like figures: A non - specific reactive process of mitochondrial phospholipid membranes to several stimuli. Z. Zellforsch., 99, 491 - 506.

**BOLKENT, Ş. (1987).** The effect of cyclophosphamide on the hepatic tissues of Swiss Black C 57 mice. İstanbul Üniv. Fen. Fak. Mec. Seri B, 52, 1 - 11.

**BOLKENT, Ş. ve ÖZARSLAN, S. (1988).** Siklofosfamid'in Swiss Black C 57'nin akciğer dokusu üzerine etkisi. IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21 - 23 Eylül, Sivas, 2, 289 - 297.

**BOLKENT, Ş. (1992).** Effect of cyclophosphamide on ciliated cells and macrophages in the pulmonary tissue. J. Turk. Phys. Sc., 1, 84 - 88.

**BÖTİ, ZS., KOBOR, J. and ORMOS, J. (1982).** Activity of glucose - 6 -phosphatase in regenerating tubular epithelium in rat kidney after necrosis induced with mercuric chloride: A light and electron microscopical study . Br. J. Exp. Path., 63, 615 - 624.

**BRENNER, B.M. and RECTOR, F.C. (1986a).** The kidney. I, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**BRENNER, B.M. and RECTOR, F.C. (1986b).** The kidney II, W.B, Saunders Company, Philadelphia.

**BROCK, N. and HOHORST, H. J. (1967).** Metabolism of cyclophosphamide. Cancer, 20(5), 900 - 904.

**BROCK, N., GROSS, R., HOHORST, H.J., KLEIN, H.O. and SCHNEIDER, B. (1971).** Activation of cyclophosphamide in man and animals. Cancer, 27 (6), 1512 - 1529.

**CLAUDE, A. (1969).** Microsomes, endoplasmic reticulum and interactions of cytoplasmic membranes, Microsomes and drug oxidations 3 - 37. Ed. : J. R. Gillette, A. H. Conney, G. J. Cosmides, R.W. Estabrook, J. R. Fouts and G. J. Mannering. Analytical profiles of drug substances, Academic Press, New York.

**DAHLQUIST, A., OLSSON, I. and NORDEN, Å. (1965).** The Periodate-Schiff Reaction: Specificity, kinetics, and reaction products with pure substrates, J. Histochem. Cytochem., 13 (6), 423 - 430.

**de DUVE, C. and BAUDHUIN. (1966).** Peroxisomes (Microbodies and related particles). Physiol. Rev., 46, 323 - 357.

**ERICSSON, J. L. E. (1966).** On the fine structural demonstration of glucose 6 - phosphatase. J. Histochem. Cytochem., 14(4), 361 - 365.

**EVANS, B.D., SMITH, I. E., CLUTTERBUCK, R.D. and MILLAR, J. L. (1984)** Prevention of acute deaths in mice after very high dose cyclophosphamide by divided dose schedule. *Br. J. Cancer*, 49, 43 - 47.

**FREEDLAND, R.A. (1962).** Properties of liver and kidney glucose - 6 - phosphatase of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 427 - 429.

**FREEMAN, B.A. and CRAPO, J.D. (1982).** Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47(5), 412 - 426.

**FISHER, C. J. and STETTEN, M.R. (1965).** Parallel hormonal and dietary induced changes in microsomal inorganic pyrophosphatase, pyrophosphate phosphotransferase, and glucose 6 - phosphatase activities. *Feder. Proc.*, 24, 474. Abst. No: 1910.

**FOLEY, G.E., FRIEDMAN, O.M. and DROLET, B.P. (1961).** Studies on the mechanism of action of cytoxan evidence of activation in vivo and in vitro. *Cancer Res.*, 21, 57 - 63.

**GERSHWIN, M. E., GOETZL, E.J. and STEINBERG, A. D. (1974).** Cyclophosphamide: Use in practice. *Ann. Intern. Med.*, 80, 531 - 540.

**GHADIALLY, F.N. (1988a).** Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 1, Butterworths, London.

**GHADIALLY, F.N. (1988b).** Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 2, Butterworths, London.

**GIBSON, T.P. (1985).** The kidney and drug metabolism. *Int. J. Alrt. Org.* 8(5), 237 - 238

**GOLDBERG, M.A., ANTIN, J.H., GUINAN, E.C and RAPPEPORT, J.M. (1986).** Cyclophosphamide cardiotoxicity: An analysis of dosing as a risk factor. *Blood*. 68 (5), 1114 - 1118.

**GOULD, V.E. and MILLER J. (1975).** Sclerosing alveolitis induced by cyclophosphamide. *Am. J. Path.* 81 (3), 513 - 529.

**GURTOO, H.L., BANSAL, S.K., PAVELIC, Z. and STRUCK, R.F. (1985).** Effects of the induction of hepatic microsomal metabolism on the toxicity of cyclophosphamide. *Br. J. Cancer*, 51, 67 - 75.

**GUYTON, A.C. (1986).** Textbook of medical physiology, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**HANAKI, Y., SUGIYAMA, S., AKIYAMA, N. and OZAWA, T. (1990).** Role of the autonomic nervous system in cyclophosphamide induced heart mitochondrial dysfunction in rats. *Biochem. Intern.*, 21 (2), 289 - 295.

**HERDSON, P.B., GARVIN, P.J. and JENNINGS, R.B. (1964a).** Fine structural changes produced in rat liver by partial starvation. *Am.J. Path.*, 45(2), 157 - 181.

**HERDSON, P.B., GARVIN, P.J. and JENNINGS, R.B. (1964b).** Fine structural changes in rat liver induced by phenobarbital. *Lab. Invest.*, 13(9), 1032 - 1037.

**HERDSON, P.B., GARVIN, P.J. and JENNINGS, R.B. (1964c).** Reversible biological and fine structural changes produced in rat liver by a thiohydantoin compound. *Lab. Invest.*, 13(9), 1014 - 1031.

**HSU, HC. and TSAI, HM. (1982).** Cyclophosphamide - induced glomerular injury in newborn mice. *Lab. Invest.*, 47(3), 281 - 285.

**HUMANSON, G - L. (1972).** Animal tissue techniques. H.W. Freeman and company, San Francisco.

**JACOBSEN, N.O., JORGENSEN, F. and THOMSEN, Å .C. (1967).** On the localization of some phosphatases in three different segments of the proximal tubules in the rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 15 (8), 456 - 469.

**JACOBSEN, N.O. and JORGENSEN, F. (1973).** Further enzyme histochemical observations on the segmentation of the proximal tubules in the kidney of the male rat. *Histochemie*, 34, 11 - 32.

**JAKOBSSON, S. and ERICSSON, J. (1969).** Glucose - 6 - phosphatase in kidney cortex membranes. *Exptl. Cell Res.*, 58, 455 - 456.



**JALIL, M. A. and PANDEY, S.K. (1987).** Haematological response to cyclophosphamide administration in dogs. *J. Indian Vet.*, 64, 751 - 755.

**KANAI, K., KANAMURA, S. and WATANABE, J. (1986).** High and testosterone - dependent glucose 6 - phosphatase activity in epithelium of mouse seminal vesicle. *J. Histochem. Cytochem.*, 34(9), 1207 - 1212.

**KANAMURA, S. (1971).** Ultrastructural localization of glucose - 6 - phosphatase activity in proximal convoluted tubule cells of rat kidney. *Histochemie*, 28, 288 - 295.

**KARP, G. (1984).** *Cell Biology*, Mc. Graw - Hill Book Company, New York.

**KIDA, K., NAKAJO, S., KAMIYA, F., TOYAMA, Y., NISHIO, T. and NAKAGAWA, H. (1978).** Renal net glucose release in vivo and its contribution to blood glucose in rats. *J. Clin. Invest.*, 62, 721 - 726.

**KREBS, H. A., BENNETT, D.A. H., GASCOYNE, T. and YOSHIDA, T. (1963).** Renal Gluconeogenesis. The effect of diet on the gluconeogenic capacity of rat kidney cortex slices. *J. Biochem.*, 86, 22 - 27.

**KRIZ, W. and BANKIR, L. (1988).** A standart nomenclature for structures of the kidney. *Cell and Tiss. Res.*, 253 (1), N1 - N8.

**KRSTIC, R.V. (1984).** *Illustrated encyclopedia of human histology*. Springer - Verlag, Berlin.

**LANE, M. (1959).** Some effects of cyclophosphamide (cytoxan) on normal mice and mice with L1210 leukemia. *J. Nat. Cancer Inst.*, 23 (6), 1347 - 1357.

**LAVIN, P. and KOSS, L.G. (1971a).** Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs of the rat. III. Electron microscopic study of the liver. *Am J. Path.* 62(2), 159 - 168.

**LAVIN, P. and KOSS, L.G. (1971b).** Effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs in the rat. IV. Electron microscopic study of the renal tubules. *Am. J. Path.*, 62(2), 169 - 176.

**LEESON, T.S., LEESON C.R. and PAPARO, A.A. (1988)** . Text /Atlas of Histology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

**LOJDA, Z., GOSSRAU, R. and SCHIEBLER, T.H. (1979).** Enzyme Histochemistry A Laboratory Manual. Springer - Verlag, Berlin.

**LOPES, V. M. (1967).** Cyclophosphamide nephrotoxicity in man. *Lancet*, May 13, 1060.

**LUFT, J.H. (1961).** Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 9, 409 - 414.

**MAUNSBACH, A.B. (1966).** Observations on the segmentation of the proximal tubule in the rat kidney. *J. Ultrastruct. Res.*, 16, 239 - 258.

**McCANN, W.P. (1962).** Renal glucose production and uptake in separate sites, and its significance. *Am. J. Physiol.*, 203, 572 - 576.

**MILLS, B.A. and ROBERTS, R.W. (1979).** Cyclophosphamide - induced cardiomyopathy. *Cancer*, 43(6), 2223 - 2226.

**MORSE, C.C., SIGLER, C., LOCK, S., HAKKINEN, P.J., HASCHER, W.M. and WITSCHI, H.P. (1985).** Pulmonary toxicity of cyclophosphamide = A 1 - Year study. *Exp. Mol. Path.*, 42, 251 - 260.

**NORDLIE, R.C. and ARION, W.J. (1965).** Liver microsomal glucose 6 - phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate glucose phosphotransferase. *J. Biol. Chem.*, 240 (5), 2155 - 2164.

**NORDLIE, R.C. and SOODSMA, J.F. (1966).** Phosphotransferase activities of kidney glucose 6 - phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 241(8), 1719 - 1724.

**PALADE, G.E. and SCHIDLOWSKY, G. (1958).** Functional association of mitochondria and lipid inclusions. *Anat. Rec.*, 130, 352 - 353.

- PATEL, J.M. (1990).** Metabolism and pulmonary toxicity of cyclophosphamide. *Pharmac. Ther.*, 47, 137 - 146.
- PHILIPS, F.S., STERNBERG, S.S., CRONIN, A.P. and VIDAL, P.M., (1961).** Cyclophosphamide and urinary bladder toxicity - *Cancer Res.*, 21, 1577 - 1589.
- REYNOLDS, E.S. (1960).** Cellular localization of calcium deposition in livers of rats poisoned with carbon tetrachloride. *J. Histochem. Cytochem.*, 8, 331 - 332.
- REYNOLDS, E.S. (1963).** The use of lead citrate of high pH as an electron - opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, 17, 208 - 212.
- RHODIN, J. (1958).** Electron microscopy of the kidney. *Am. J. Med.*, 24, 661 - 675.
- ROSS, B.D., ESPINAL, J. and SILVA P. (1986).** Glucose metabolism in renal tubular function. *Kidney Int.*, 29, 54 - 67.
- SCHMÄHL, D. and HABS, M. (1979).** Carcinogenic action of low-dose cyclophosphamide given orally to Sprague-Dawley rats in a lifetime experiment. *Int. J. Cancer*, 23, 706-712.
- SCHMIDT, U. and GUDER, W.G. (1976).** Sites of enzyme activity along the nephron. *Kidney Int.*, 9, 233-242.
- SHNITKA, T. K. (1966).** Comparative ultrastructure of hepatic microbodies in some mammals and birds in relation to species differences in uricase activity. *J. Ultrastruct. Res.*, 16, 598-625.
- SLADEK, N. E. (1971).** Metabolism of cyclophosphamide by rat hepatic microsomes. *Cancer Res.*, 31, 901-908.
- SLAVIN, R. E., MILLAN, J. C. and MULLINS, G. M. (1975).** Pathology of high dose intermittent cyclophosphamide therapy. *Human Path.*, 6(6), 693-709.

**SMUCKLER, E. A. and BENDITT, E. P. (1963).** Carbon tetrachloride poisoning in rats: Alteration in ribosomes of the liver. *Science*, 140, 308-310.

**STEELE, T. H., SERPICK, A. A. and BLOCK, J. B. (1973).** Antidiuretic response to cyclophosphamide in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 185(2), 245-253.

**STEINBERG, A. D. (1984).** Cyclophosphamide. Should it be used daily, monthly, or never? *N. Engl. J. Med.*, 310(7), 458-459.

**STEINER, J. W. and BAGLIO, C. M. (1963).** Electron microscopy of the cytoplasm of parenchymal liver cells in  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced cirrhosis. *Lab. Invest.*, 12(8), 765-790.

**STRIKER, G. E., SMUCKLER, E. A., KOHNEN, P. W. and NAGLE, R. B. (1968).** Structural and functional changes in rat kidney during CCl<sub>4</sub> intoxication. *Am. J. Path.*, 53, 769-789.

**SUZUKI, T. and MOSTOFI, F. K. (1966).** Electron microscopic studies of acute tubular necrosis. Early changes in proximal convoluted tubules of the rat kidney following subcutaneous injection of glycerin. *Lab. Invest.*, 15(7), 1225-1247.

**TARDIFF, R. G. and DUBOIS, K. P. (1969).** Inhibition of hepatic microsomal enzymes by alkylating agents. *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 177(2), 445-456.

**TELFORD, I. R. and BRIDGMAN, C. F. (1990).** Introduction to functional histology. Harper & Row, Publishers, New York.

**TICE, L. W. and BARNETT, R. J. (1962).** The fine structural localization of glucose-6-phosphatase in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.*, 10, 754-765.

**TRIMBLE, M. E. and BOWMAN, R. H. (1973).** Renal Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport: effects of glucose, palmitate, and  $\alpha$ -bromopalmitate. *Am. J. Physiol.*, 225(5), 1057-1062.

**TRUMP, B. F. and GINN, F. L. (1968).** Studies of cellular injury in isolated flounder tubules. II. Cellular swelling in high potassium media. *Lab. Invest.*, 18(4), 341-351.

**VEERARAGAVAN, K., RATHINASAMY, P. and RAMAKRISHNAN, S. (1981).** Effect of 5-thio-D-glucose on blood glucose and glucose-6-phosphatase activity in mice. *Experientia*, 38, 910-912.

**WITZLEBEN, C. L. (1966).** An electron microscopic study of ferrous sulfate induced liver damage. *Am. J. Path.*, 49(6), 1053-1067.





## ÖZGEÇMİŞ

1960 yılında İstanbul'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi İstanbul'da tamamladım. 1978 yılında başladığım İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimini 1982 yılında bitirdim. 1984 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünün Biyoloji Anabilim Dalına bağlı "Hücre Biyolojisi Yüksek Lisans Programı"nı "Siklofosfamid'in Swiss Black C 57'nin Karaciğer Dokusu Üzerine Etkileri" konulu tezle 1986 yılında tamamladım. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünün açtığı "Hücre Biyolojisi Doktora Programı"na kaydoldum. 1983 yılı Ağustos ayından itibaren Zooloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.