



**RATLARDA GENTAMİSİNLE OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTEDE CROSİNİN İNFLAMASYON,
OKSİDATİF STRES, APOPTOZ, NF- κ B, TLR-4 ve
Nrf-2/HO-1 YOLAKLARI ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Tuba DOĞAN

Veterinerlik Biyokimyası Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM**

Doktora Tezi-2023



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**RATLARDA GENTAMİSİNLE OLUŞTURULAN
NEFROTOKSİSİTEDE CROSİNİN İNFLAMASYON,
OKSİDATİF STRES, APOPTOZ,
NF- κ B, TLR-4 ve Nrf-2/HO-1 YOLAKLARI
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Tuba DOĞAN

**Veterinerlik Biyokimyası Ana Bilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Crosin'in Tanımı ve Tarihçesi	4
2.2. Crosin'in Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3. Böbrek.....	7
2.4. Böbrek Fonksiyon Testleri.....	10
2.4.1. Üre	10
2.4.2. Kreatinin	11
2.4.3. Ürik Asit	11
2.5. Nefrotoksisite.....	12
2.5.1. Akut Böbrek Hasarı	12
2.5.2. Kronik Böbrek Hasarı	13
2.6. Gentamisin ile Nefrotoksisite Oluşturulması.....	13
2.7. Sitokinler.....	16
2.7.1. İnterlökin-1 β	18
2.7.2. İnterlökin-6 (IL-6).....	19
2.7.3. Tümör Nekroz Faktör (TNF- α)	19

2.8. Oksidatif Stres.....	20
2.9. Serbest Radikaller	20
2.9.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri	21
2.9.2. Serbest Radikal Çeşitleri.....	21
2.9.3. Serbest Radikallerin İç ve Dış Kaynakları.....	23
2.10. Lipid peroksidasyonu, Malondialdehid (MDA)	24
2.11. Antioksidanlar.....	25
2.11.1. Enzimatik Antioksidanlar (Primer antioksidanlar)	25
2.11.2. Non-enzimatik Antioksidan Sistem (Sekonder antioksidanlar).....	26
2.12. Apoptoz.....	28
2.12.1. Bcl-2.....	31
2.12.2. Bax	32
2.12.3. Kaspaz-3	32
2.13. NF- κ B	33
2.14. TLR-4.....	34
2.15. Heme Oksijenaz-1 (HO-1).....	35
2.16. Nrf-2.....	37
3. MATERYAL VE METOT.....	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	39
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	39
3.1.3. Hayvan Materyali	40
3.2. Metot.....	40
3.2.1. Deneyisel Uygulamalar.....	40
3.2.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması	41

3.2.3. Biyokimyasal Analizler	42
3.2.3.1. Tam Kandan Böbrek Fonksiyon Parametrelerinin Tayini	42
3.2.3.2 Sitokin Düzeylerinin Ölçülmesi.....	43
3.2.3.3. Plazmada MDA Tayini:	47
3.2.3.4. Plazmada GSH Tayini:	48
3.2.3.5. Plazma AOPP tayini:	49
3.2.3.6. Plazma ve Böbrek Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	50
3.2.3.7. Plazma ve Böbrek Dokusunda Katalaz Aktivitesinin Ölçümü:	51
3.2.3.8. Plazma ve Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesinin Ölçümü:	51
3.2.3.9. Dokuda MDA tayini:	53
3.2.3.10. Dokuda GSH tayini.....	53
3.2.3.11. Plazma ve Böbrek Dokusunda Nitrit tayini:	54
3.2.3.12. Plazma ve Böbrek Dokusunda Nitrat Tayini	55
3.2.3.13. Real Time PCR Analizi	56
3.2.3.14. Western Blot Analizi	60
3.2.4. Nekropsis İşlemi ve Histopatolojik İncelemeler	69
3.2.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama	69
3.2.4.2. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama	70
3.5. İstatistiksel Analizler	71
4. BULGULAR.....	72
4.1. Canlı Ağırlıkları ve Böbrek Ağırlıkları	72
4.2. Biyokimyasal Analizler	72
4.2.1. Böbrek Fonksiyon Testleri.....	72
4.2.2. Plazma Sitokin Düzeyleri	73
4.2.3. Plazma ve Böbrek Dokusu Oksidatif Stres Parametreleri ve TLR-4.....	74

4.2.4. Real-Time PCR Bulguları.....	77
4.2.5. Western Blot Analizi Bulguları	83
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	90
4.3.1. Makroskopik Bulgular	90
4.3.2. Mikroskopik Bulgular.....	94
5. TARTIŞMA.....	102
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	116
KAYNAKLAR	118
EKLER	135
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	153
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	154
EK-3. TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU	138

TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunulan bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve yolumu aydınlatan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora eğitimim boyunca bana katkıda bulunan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mesut Bünyami HALICI'ya, Biyokimya ABD'inde görev yapan Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR'a, Doç. Dr. Sefa KÜÇÜKLER'e, Dr. Öğr. Üyesi Esra AKTAŞ ŞENOCAK'a, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa İLERİTÜRK'e, Araş. Gör. Dr. Cihan GÜR'e, histopatolojik analizlerdeki katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN'e, Esra KİRMAN'a ve Araş. Gör. Metin Kılıçlıoğlu'na bu çalışmayı TDK-2022-11200 proje koduyla destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, her zaman yanımda olan ve doktora sürecim boyunca maddi manevi desteğini benden esirgemeyen canım aileme ve amcama teşekkürlerimi sunuyorum.

Tuba DOĞAN

ÖZET

Ratlarda Gentamisinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Crosinin İnflamasyon, Oksidatif Stres, Apoptoz, NF-κB, TLR-4, Nrf-2/HO-1 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Bu çalışmada ratlarda gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı crosinin inflamasyon, oksidatif stres, apoptoz, NF-κB, TLR-4 ve Nrf-2/HO-1 sinyal yolakları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla her grupta 6 rat olacak şekilde 36 rat Kontrol, Crosin (Cr) 25mg/kg, Cr 50 mg/kg, Gentamisin (Gm), Gm+ Cr 25 mg/kg ve Gm + Cr 50 mg/kg grupları olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Cr gruplarına 25 ve 50 mg/kg crosin, Gm gruplarına 80 mg/kg gentamisin 8 gün boyunca i.p. uygulandı. Deney sonunda anestezi altında ratlardan kan ve böbrek dokuları alınarak böbrekler tartıldı. Tam kanda ürik asit, kreatinin ve üre düzeylerine bakıldı. Plazmada TNF-α, IL-1β, IL-6 ve AOPP; plazma ve böbrek dokusunda MDA, GSH, Nitrit, Nitrat ve TLR-4 düzeyleri, SOD, CAT ve GPx aktiviteleri; böbrek dokusu Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, COX-2, HO-1, NF-κB, Nrf-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeylerine RT-PCR ve western blotlama ile bakıldı. Elde edilen sonuçlara göre Gm uygulaması sonrasında gelişen dejenerasyon, akut tubüler nekroz, inflamasyon ve hemorajinin artışından dolayı böbreklerde ödem gelişimi sonucu böbrek ağırlıklarında artış saptandı; ve böbrek fonksiyon testlerinde, TNF-α, IL-1β, IL-6, MDA, Nitrit, Nitrat, AOPP ve TLR-4 düzeylerinde artışa sebep olarak SOD, CAT ve GPx aktivitelerini, Bax, Kaspaz-3, COX-2, NF-κB ve TLR-4 ekspresyon düzeylerini artırdığı; Bcl-2, HO-1 ve Nrf-2 ekspresyon düzeylerini azalttığı saptandı.

Sonuç olarak, crosinin özellikle 50 mg/kg dozunun Gm ile birlikte uygulandığında oksidatif stresi, apoptozu, inflamasyonu inhibe ederek gentamisinin olumsuz etkilerini azalttığı tespit edildi. Gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede Crosin 50 mg/kg dozunun böbrek Nrf-2 ve HO-1 protein düzeylerini artırdığı bulgusu literatüre öncü çalışma olarak sunuldu.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, crosin, inflamasyon, nefrotoksisite, oksidatif stres.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Crosin on Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, NF- κ B, TLR-4 and NRF-2/HO-1 Pathways in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats

In this study, it was aimed to investigate the effects of crosin on inflammation, oxidative stress, apoptosis, NF- κ B, TLR-4 and Nrf-2/HO-1 signaling pathways against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. A total of 36 rats, 6 rats in each group, were divided into 6 groups, were used for the Control, Crosin (Cr) 25 mg/kg, Cr 50 mg/kg, Gentamicin (Gm), Gm+Cr 25mg/kg, and Gm+Cr 50mg/kg groups. The Cr groups received crosin at 25 and 50 mg/kg, and the Gm groups received gentamicin at 80 mg/kg i.p. for 8 days. At the end of the experiment, blood and kidney tissues were taken under anesthesia. The collected kidneys were weighed. Uric acid, creatinine and urea levels were measured in whole blood. TNF- α , IL-1 β , IL-6 and AOPP levels in plasma; MDA, GSH, Nitrite, Nitrate and TLR-4 levels, SOD, CAT and GPx activities were measured in plasma and kidney tissue. Bax, Bcl-2, Caspase-3, COX-2, HO-1, NF- κ B, Nrf-2 and TLR-4 expression levels were determined by RT-PCR and western blotting in kidney tissue.

According to the findings, an increase in kidney weights and kidney function tests as a result of edema in the kidneys due to degeneration, acute tubular necrosis, inflammation and increased in hemorrhage after Gm administration; increased in levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6; decreased in SOD, CAT and GPx activities by causing an increased in MDA, Nitrite, Nitrate, AOPP and TLR-4 levels; and increased in the expression levels of Bax, Caspase-3, COX-2, NF- κ B and TLR-4; It was determined that Bcl-2, HO-1 and Nrf-2 expression levels decreased in.

In conclusion; It was found that the application of crosin 50 mg/kg dose against Gm induced kidney damage inhibited oxidative stress, apoptosis, inflammation and reduced the negative effects of gentamicin. The finding that crosin 50 mg/kg treatment dose increased in kidney Nrf-2 and HO-1 protein expression levels when administered with gentamicin was presented as a pioneering study in the literature.

Key Words: Apoptosis, crosin, inflammation, nephrotoxicity, oxidative stress

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AKI	: Akut böbrek yetmezliği
AOPP	: Proteinlerin ileri oksidasyon ürünleri
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	: Adenin trifosfat
BSA	: Bovin albümin serum
BUN	: Kan üre azotu
CAT	: Katalaz
Cu	: Bakır
COX-2	: Siklojenaz 2
CRP	: C-reaktif protein
Cr	: Crosin
DTNB	: 5,'-ditio-bis (-2-nitrobenzoik asit)
Fe	: Demir
Gm	: Gentamisin
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
GRF	: Glomerüler filtrasyon hızı
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HO-1	: Hemeoksijenez-1
IGF	: İnsülin büyüme faktörü
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-6	: İnterlökin 6
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LOOH	: Lipid hidroperoksitleri
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
Mn	: Mangenez
Mo	: Molibden
NAD	: Nikorinamid adenin dinükleotid fosfat

NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
NF-κB	: Nükleer Faktör kappa B
NO	: Nitrik oksit
Nrf-2	: Nükleer faktör eritroid 2
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
$\text{O}^{2\bullet-}$	: Süperoksit radikali
$\text{OH}^\bullet$	: Hidroksil radikali
PAS	: Periyodik asit schiff boya
PVDF	: polivinilden florür
$\text{ROO}^\bullet$	: Lipid peroksit radikalleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBS-T	: Tris tamponlu buffer
TBA	: Tiyoarbütirik asit
TCA	: Triklorasetik asit
TGF-β1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü
TLR-4	: Toll benzeri reseptör 4
μL	: mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Safran bitkisi.....	4
Şekil 2.2.	Crosinin yapısı.....	6
Şekil 2.3.	Böbrek yapısı.....	8
Şekil 2.4.	Crosinin yolaklar üzerindeki etkileri.....	38
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan crosin ve gentamisin.....	40
Şekil 3.2.	Crosin ve gentamisinin i.p. uygulanması.....	41
Şekil 3.3.	Böbreklerin makroskopik görüntüsü.....	42
Şekil 3.4.	LYSUN böbrek fonksiyon testleri ölçüm cihazı.....	43
Şekil 3.5.	Sandwich ELİSA metodunun prensibi.....	43
Şekil 3.6.	Qiazol ile RNA izolasyonu.....	57
Şekil 3.7.	BSA ve numunelerin protein ölçümü.....	61
Şekil 3.8.	BSA protein standart eğrisi.....	62
Şekil 3.9.	Standa yerleştirilen plaka ve jellerin görüntüsü.....	64
Şekil 3.10.	Proteinlerin SDS-PAGE jelde yürütülmesi.....	66
Şekil 3.11.	Membran, jel ve stacks kağıtlarının dizilimi.....	67
Şekil 3.12.	Western blotlamanın özeti.....	69
Şekil 4.1.	Tüm gruplardaki kesim anında ölçülen böbrek ağırlıkları.....	72
Şekil 4.2.	Bax ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	79
Şekil 4.3.	Bcl-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	79
Şekil 4.4.	Kaspaz-3 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	80
Şekil 4.5.	COX-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	80
Şekil 4.6.	NF-κB ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	81
Şekil 4.7.	HO-1 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	81

Şekil 4.8.	Nrf-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	82
Şekil 4.9.	TLR-4 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı.....	82
Şekil 4.10.	Bax protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	86
Şekil 4.11.	Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	86
Şekil 4.12.	Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	87
Şekil 4.13.	COX-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	87
Şekil 4.14.	NF- κ B protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	88
Şekil 4.15.	HO-1 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	88
Şekil 4.16.	Nrf-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	89
Şekil 4.17.	TLR-4 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları.....	89
Şekil 4.18.	Kontrol grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	90
Şekil 4.19.	Cr 25 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	91
Şekil 4.20.	Cr 50 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	91
Şekil 4.21.	Gentamisin grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	92
Şekil 4.22.	Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	92
Şekil 4.23.	Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü.....	94
Şekil 4.24.	Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	94

Şekil 4.25.	Kontrol grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	95
Şekil 4.26.	Cr 25 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	95
Şekil 4.27.	Cr 25 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	96
Şekil 4.28.	Cr 50 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	96
Şekil 4.29.	Cr 50 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	97
Şekil 4.30.	Gm grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	97
Şekil 4.31.	Gentamisin grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	98
Şekil 4.32.	Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	99
Şekil 4.33.	Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	99
Şekil 4.34.	Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.....	100
Şekil 4.35.	Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.....	100

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Crosinin türevleri.....	6
Tablo 3.1. Plazmada GSH tayini.....	49
Tablo 3.2. Dokuda MDA tayini.....	53
Tablo 3.3. Nitrat analizinin yapılışı.....	54
Tablo 3.4. Nitrit analizinin yapılışı.....	55
Tablo 3.5. Dizayn edilen primer sekansları.....	56
Tablo 3.6. Her bir grup için 1000 ng total RNA içeren miktarlar.....	58
Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyon solusyonu bileşenleri.....	58
Tablo 3.8. cDNA sentezinin reaksiyon protokolü.....	59
Tablo 3.9. Her bir örneğe ait Real-Time PCR karışımı.....	60
Tablo 3.10. Real-Time PCR reaksiyon şartları.....	60
Tablo 3.11. Her bir gruba ait 30 µg protein içeren total hacim.....	62
Tablo 3.12. Resolving jelin bileşimi.....	64
Tablo 3.13. Stacking jelin bileşimi.....	65
Tablo 3.14. 1X Running Buffer bileşimi.....	65
Tablo 4.1. Tam kanda ürik asit, kreatinin ve üre düzeyleri.....	73
Tablo 4.2. Tüm grupların plazma sitokin düzeyleri.....	74
Tablo 4.3. Tüm grupların plazmasında ölçülen bazı biyokimyasal parametreler..	75
Tablo 4.4. Tüm grupların böbrek dokusunda ölçülen bazı genlerin ekspresyon düzeyleri.....	76
Tablo 4.5. Tüm grupların böbrek dokusunda ölçülen bazı genlerin ekspresyon düzeyleri.....	78

Tablo 4.6.	Böbrek dokusu Western blot ile ölçülen bazı proteinlerin ekspresyon düzeyleri.....	85
Tablo 4.7.	Böbrek dokusu kesitlerindeki histopatolojik bulguların skorlaması....	94



1. GİRİŞ

Aminoglikozidler, gram-negatif mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlarda kullanılan güçlü ve geniş spektrumlu antibiyotik sınıfıdır. Düşük maliyetli olması nedeniyle gentamisin en sık kullanılan aminoglikozid grubu antibiyotiktir (Balakumar ve ark., 2010). Gentamisine bağlı nefrotoksisitede böbreklerdeki şiddetli proksimal renal tübüler nekroz, yüksek serum kreatinin ve üre seviyeleri görülmektedir (Medic ve ark., 2019). Böbreklerin fonksiyonlarından birinin bile bozulması, ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu nedenle, böbreklerin sağlıklı olması ve düzgün çalışması hayati önem taşır. Gentamisine bağlı akut böbrek hasarı son yıllarda giderek daha fazla görülmektedir. Bu nedenle gentamisinin intravenöz, intramusküler, topikal ve oftalmik gibi çeşitli uygulama yollarıyla uygulanması durumunda kullanılacak gentamisinin dozunda sürekli düzenleme yapılmalıdır ve serum toksisite oranı kontrol edilmelidir (Hayward et al., 2018; Ozbek et al., 2009).

Gentamisin (Gm) renal proksimal tübüler hücrelerde birikerek glomerüler filtrasyon hızında azalmaya, inflamasyona, hücresel nekroza ve fibroze neden olmaktadır. Gm kaynaklı böbrek toksisitesinin patogenezinde oksidatif stresin artışı ve birçok yolak aracılığıyla sürekli olarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınması, inflamasyon ve apoptozisin rol aldığı belirtilmektedir (Azouz et al., 2022; Hassanein et al., 2021). Düşük düzeyde ROS, *in vivo* olarak endojen koruyucu antioksidanları uyarıcı bir sinyal molekülü olarak işlev görür (Bledsoe et al., 2006). Öte yandan, yüksek konsantrasyonlardaki ROS, lipid peroksidasyonunu uyartabilir ve ardından renal mitokondri ve hücre zarlarında oksidatif hasara neden olabilir (Tong et al., 2018). Gm maruziyeti sonrasında oksidatif stresin artışı ayrıca nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve inflamatuvar faktörlerin ekspresyonunun yükselmesine yol açar, bu da inflamatuvar hasarı teşvik eder (Medic et al., 2019). Hücreler oksidatif baskı altında

kaldığında, hücre ölüm sinyallerinde yer alan genler aktif edilir, apoptozis/nekroz indüklenir böylece geri dönüşümsüz olarak hasar görmüş hücreler uzaklaştırılır (Nadeem et al., 2023). Bu nedenle, apoptozun artışı renal hasarın patogenezinde önemli rol oynar. Antioksidan savunma mekanizmasının baş düzenleyicisi nükleer faktör-eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf-2), hemeoksijenaz-1 (HO-1) gibi antioksidan genlerin üretimini sürdürür ve oksidatif stres kaynaklı hasarı durdurur (Arab et al., 2022). Nrf-2/HO-1 yolağının gentamisin kaynaklı nefrotoksisiteye karşı hücreleri serbest radikallerin hasarından, apoptozdan koruduğu ve hücre sağkalımını teşvik ettiği bildirilmiştir (Sue et al., 2009). Nükleer faktör kappa B'nin (NF-κB) nefrotoksisitede yukarı regülasyonu görülmektedir (He et al., 2015; Subramanian et al., 2015).

Karotenoidler, fotomedisin, fotobiyoloji ve foto-kimya alanlarında önemli rolleri nedeniyle yıllardır araştırma konusu olmuştur (Krinsky, 1998). Crosin safranın (*Crocus sativus* L.) kurutulmuş taç yapraklarından ve zambak (*Gardenia jasminoides* E.) meyvesinden elde edilen sistematik adı 8.8-diapo-8.8-karotenoik asit olan, trans-krosetin (di-(β-D-gentiobyosil)) esteri olan suda çözünebilen bir karotenoiddir (Liu et al., 2016; Nair et al., 1995; Pham et al., 2000). Crosinin (Cr), antiapoptotik, antioksidan (Nikbakht-Jam et al., 2016; Yaribeygi, Mohammadi, & Sahebkar, 2018), antidepresan (Jam et al., 2017), antiaterosklerotik (Nam et al., 2010), antitrombosit agresyonu (Xi et al., 2007), renoprotektif (Yaribeygi, Mohammadi, Rezaee, et al., 2018), antinosiseptif ve antitümör (Hoshyar & Mollaei, 2017) özelliklerini doğrulayan antiinflamatuvar etkiler de dahil olmak üzere birçok etkisi olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Korani et al., 2019). Yapılan literatür taramasında Cr'nin cisplatin (Naghizadeh et al., 2010), doksorubisin (Hussain et al., 2021), STZ (Zhang. et al., 2021), metotroksat (Jalili et al., 2020) ve gentamisin (Yarijani et al., 2016) tarafından oluşturulan renal toksisite üzerinde antioksidan, antinosiseptif, antiinflamatuvar ve antiapoptotik yollarla çeşitli terapötik

etkileri olduğu kanıtlanmıştır . Fakat crosinin gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede NF- κ B, TLR-4 ve Nrf-2/HO-1 yolaklarının ekspresyon düzeyinde ve western blotlama ile ilişkilendirildiğı literatüre rastlanmamıştır.

Bu amaçla sunulan tez çalışmasında ratlarda gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı crosinin inflamasyon, oksidatif stres ve apoptoz etkilerinin belirlenmesi ve bu etkiler altında yatan NF- κ B, TLR-4 ve Nrf-2/HO-1 yolaklarının Western blot ve Real Time PCR ile ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Crosin'in Tanımı ve Tarihçesi

Iridaceae familyasının monokotiledon türlerinden biri Safran (*Crocus sativus* L.), Hindistan, İspanya, Yunanistan, Çin, İtalya, Azerbaycan, Türkiye ve İran gibi çeşitli ülkelerde yetiştirilmektedir (Javadi et al., 2013). Alternatif tıpta oldukça aktif olarak kullanılan bitkinin çiçekleri mor renkte ve üç tepeciklidir (Lotfi et al., 2015). Safran tadını pikocrosinden, kokusunu safranaldan ve rengini crosinden almakta olup, bu maddeler safranın 3 parçalı tepeciğinde yer almaktadır (Karabagias et al., 2017) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Safran bitkisi

Safranın kökeni çok eski zamanlara dayanır. İlk olarak Antik Mısır'da, tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Daha sonra Antik Yunanistan'da, Roma İmparatorluğu'nda ve Orta Çağ'da, safranın yemeklere tat ve aroma vermek için kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca Orta Çağ'da, safran ipek boyamada kullanılmıştır. Güney Asya ve Akdeniz gibi bölgelerde yetiştirilir ve tedavi amacının yanı sıra dünyanın en pahalı baharatlarından biri olarak da bilinir (Schmidt et al., 2007). Hem beşeri hekimlikte hem de modern tıpta sıkça karşımıza çıkan safranın antik Mısır döneminde böbrek hastaları için kullanıldığı Ebers Papirüsleri'nde bildirilmiştir (Ferrence & Bendersky, 2004). Yine Lokman Hekim'in 11

reçetesinde Hipokrat'ın ise 200'den fazla ilacın etkeninde kullanıldığı bilinmektedir (Mousavi & Bathaie, 2011; Paşayeva & Tekiner, 2014).

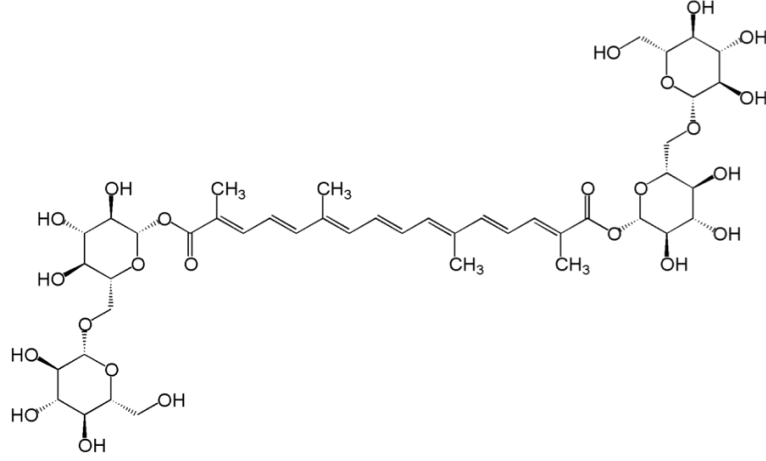
Bölgelere göre kullanım alanı farklılaşmakla birlikte birçok hastalığın (kanser, baş ağrısı, boğaz ağrısı, bronşit, antispazmodik, diyabet vs.) tedavisinde kullanılmaktadır (Hajyzadeh et al., 2020).

Aynı zamanda antioksidan olan bitkinin üst solunum yolları hastalıklarından kadın hastalıklarına kadar birçok rahatsızlığı hafifletici etkisi bulunmaktadır (Cerde-Bernad et al., 2022). Safranın içeriğinde bulunan crosin ile hücrelere oksijen alımını artırdığı yapılan bir çalışmada ortaya konulmuştur (Giaccio, 2004).

Tip 2 diyabete karşı olumlu gelişim göstererek insülin direncine karşı hassas bir etki gösterdiği gözlemlenirken (Razak et al., 2017), genotoksinlerin neden olduğu oksidatif stresi engelleyerek öğrenme ve hafıza becerilerini geliştirmektedir (Premkumar et al., 2003). Kalpteki elektriksel iletim hızını yavaşlatarak aritmiyi önlediğinde belirtilmiştir. İmmünolojik bir etkiye sahip olan safran bağışıklık sistemini güçlendirerek insan sağlığına katkıda bulunur. Safran içeriğinde bulunan en etkili biyoaktif bileşenlerden biri de crosindir (Razak et al., 2017).

2.2. Crosin'in Kimyasal Özellikleri

Safran bitkisinin ana bileşenidir ve doğal bir karotenoid bileşik olup, gentiobioz adlı disakkarit ile krosetin adlı dikarboksilik asitten meydana gelen bir digentiobioz esteridir. İçeriğinde yedi çift bağ ve dört metil grubu bulunmaktadır (Alonso et al., 2001)(Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Crosetin yapısı

Parlak kırmızı renkli olup suda çözünerek kırmızı-turuncu bir çözelti oluşturmaktadır (Bolhasani et al., 2005). Krosetin ile konjuge şekerin konfigürasyonuna bağlı olarak birçok farklı crosin konfigürasyonu vardır ancak crosinler esas olarak trans-formda bulunur (Alonso et al., 2001). Cis/trans formunun farkı, esas olarak 13.karbon konfigürasyonunun farklılığından kaynaklanmaktadır (Korani et al., 2019) (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Crosetin türevleri

Bileşik	Kimyasal Formül	Şeker Parçaları	İzomer Oluşumu
Crosetin	$C_{20}H_{24}O_4$	$R1 = R2 = OH$	cis-trans
Crosin 1	$C_{26}H_{34}O_9$	$R1 = b\text{-D-glukosil}$ $R2 = H$	trans
Crosin 2	$C_{32}H_{32}O_{14}$	$R1 = b\text{-D-gentiobiosyl}$ $R2 = H$	cis-trans
Crosin 2	$C_{32}H_{32}O_{14}$	$R1 = R2 = b\text{-D-glucosyl}$	cis-trans
Crosin 3	$C_{38}H_{54}O_{19}$	$R1 = b\text{-D-gentiobiosyl}$ $R2 = b\text{-Dglucosyl}$	cis-trans
Crosin 4	$C_{44}H_{64}O_{24}$	$R1 = R2 = b\text{-D-gentiobiosyl}$	cis-trans
Crosin 5	$C_{50}H_{74}O_{29}$	$R1 = 3 b\text{-D-glucosyl.}$ $R2 = b\text{-Dgentiobiosy}$	cis-trans

Doğal bir karotenoid olduğu bilinen crosin erime noktasında (186 °C) kristaller oluşturur (Bolhasani et al., 2005). Yapılan çalışmalar safranda karbonhidratlar, proteinler, antosiyaninler, flavonoidler, karotenoidler, tanenler, vitaminler özellikle de riboflavin ve tiamin, aminoasitler, mineral maddeler, zamklar gibi diğer kimyasal bileşenleri de içerir. Safranın bu zengin kimyasal yapısından dolayı hem fiyatı yüksektir hem de çok tercih edilen bir baharat olmasını sağlar (Giaccio, 2004; Korani et al., 2019).

Safranın nefrotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, safranın böbrek sağlığı üzerinde yararlı etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Bastani et al., 2022). Örneğin, bir araştırmada, safranın farelerde nefrotoksisiteye neden olan ağır metal zehirlenmesi sonrası böbrek hasarını önlediği bulunmuştur. Ayrıca, safranın antioksidan özellikleri sayesinde, böbreklerde oksidatif stresi azaltarak böbrek fonksiyonlarını koruduğu da belirlenmiştir (Erdemli et al., 2018).

Bir başka çalışmada, safranın diyabetik farelerde böbrek hasarını azalttığı ve böbrek fonksiyonlarını koruduğu görülmüştür. Safranın böbrek hasarını önlemeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir, çünkü safranın anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri ile birlikte böbreklerdeki iltihaplanmayı ve oksidatif stresi azaltarak böbrek fonksiyonlarını koruma potansiyeli vardır (Abou-Hany et al., 2018a). Ancak safranın böbrek sağlığı üzerindeki etkileri hala araştırma aşamasındadır ve bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Yaribeygi, Mohammadi, & Sahebkar, 2018).

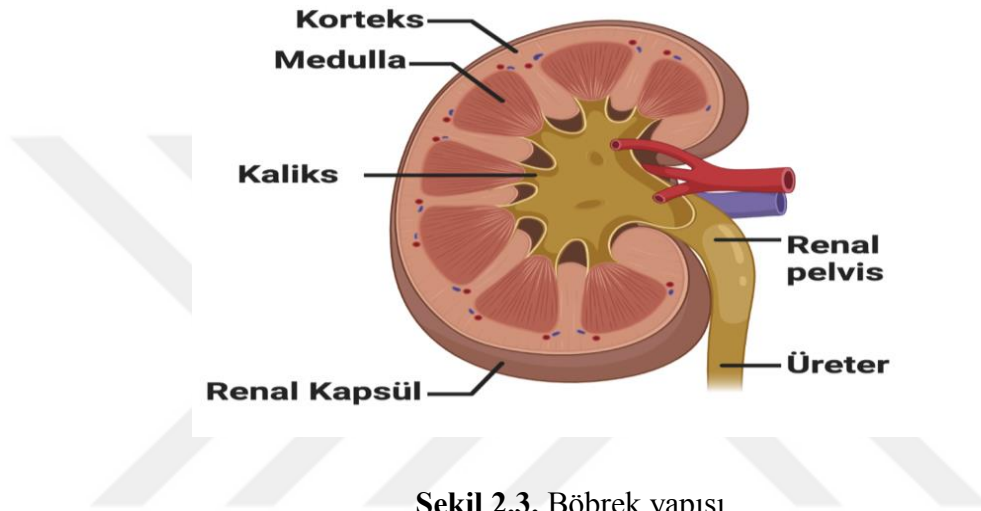
Bu nedenle bu çalışmada, gentamisinle ile uyarılan nefrotoksisiteye karşı crosinin koruyucu etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.3. Böbrek

Böbrekler, insan vücudunda, sırtın alt bölgesinde, bel kemiği seviyesinde, sağ ve sol olmak üzere çift halinde bulunur. Böbreklerin anatomik yapısı, kabaca bir fasulye

şeklinde olup yaklaşık 10-12 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde ve 2-3 cm kalınlığındadır (Lindstrom et al., 2018)(Şekil 2.3.).

Ratların böbrekleri boyut olarak insan böbreklerinden daha küçüktür. Genellikle uzunluğu 2-3 cm, genişliği 1-1.5 cm, kalınlığı ise 0.5-1 cm arasındadır. Normal bir yetişkin ratın böbrek ağırlığı genellikle 1-1.5 gram arasındadır (Voetseder et al., 2005).



Böbrekler, korteks, medulla ve pelvis adı verilen üç ana bölümden oluşur. Korteks, böbreklerin dış katmanıdır ve böbreklerin yaklaşık % 90'ını oluşturur. Korteks, nefron adı verilen temel filtreleme birimlerini içerir ve böbreğin temel işlevi olan kanın süzülmesi, atık maddelerin uzaklaştırılması, elektrolit dengesinin sağlanması ve pH'nın düzenlenmesi gibi işlemler burada gerçekleşir (Lindstrom et al., 2018).

Medulla, böbreklerin orta bölümüdür ve korteks altında yer alır. Medulla, nefronlarda süzülen sıvının toplandığı yerdir ve idrarın oluşumu burada başlar. Medulla, içinde birçok piramit şeklindeki bölümden oluşur. Bu piramitler, bir papilla adı verilen küçük bir kanal sistemi tarafından toplanarak pelvise dökülür. Pelvis, böbreklerin iç bölümüdür ve böbreklerin idrarını topladığı yerdir. Pelvis, böbreklerin merkezinde yer

alır ve böbrekleri üretere bağlayan bir kanal sistemidir. İdrar, böbreklerden pelvise doğru akan küçük tüpler olan üreterler aracılığıyla mesaneye taşınır. Böbreklerin anatomik yapısı, işlevleri için oldukça önemlidir. Bu yapının herhangi bir bölümünde meydana gelen bir hasar veya bozukluk, böbreklerin görevlerini yerine getirmesini engelleyebilir ve ciddi sağlık sorunlarına neden olabilir. Böbreklerin görevleri arasında şunlar bulunur (Kandel et al., 1995):

Atık maddelerin uzaklaştırılması: Böbrekler, kan dolaşımından atık maddeleri ve fazla suyu filtreleyerek idrar yoluyla vücuttan uzaklaştırır. Böbrekler ayrıca kanın asit-baz dengesini de düzenler.

Kan basıncının düzenlenmesi: Böbrekler, kan basıncını kontrol ederek vücudun tuz-su dengesini sağlarlar. Böbreklerde bulunan renin adı verilen bir enzim, kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Elektrolit dengesinin sağlanması: Böbrekler, kanda bulunan elektrolitlerin (sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum vb.) dengesini sağlayarak vücudun sağlıklı bir şekilde çalışmasını sağlar.

Eritropoietin üretimi: Böbrekler, kanda bulunan oksijen seviyesini algılayarak, kemik iliğinde kırmızı kan hücrelerinin üretimini sağlayan eritropoietin hormonu üretirler.

D vitamini sentezi: Böbrekler, D vitamini sentezleyerek, kemik sağlığı için önemli olan kalsiyum ve fosforun emilimini düzenlerler.

Hemostatik bir organ olan böbrekler vücudun önemli bir regülatörüdür. Böbreklerin yaşamı sürdürmedeki rolü, çeşitli işlevlerin bir bileşimidir. Su ve birçok elektrolit, negatif vücut dengesi zamanlarında böbrekler tarafından korunur ve pozitif denge zamanlarında atılır. Asit baz dengesi, su ve elektrolit dengesi ve zararlı bileşenlerin atılması başlıca görevlerindendir. Bir böbrek dokusu fonksiyonel bölmeler olan yaklaşık

bir milyon nefrondan oluşur. Nefronlar bulunduğu yere ve henle kulpunun uzunluklarına göre kortikal veya jukstamedüller olarak isimlendirilir. Fonksiyonel üniteler olan nefronlar yapısında bowman kapsülü tarafından çevrelenen glomerüler bir kapillar ağa, bir proksimal tübüle, bir distal tübüle, bir henle kulpuna ve toplayıcı duktusa sahiptir.

Böbreklerde yüksek perfüzyona karşı çok düşük olan intrarenal direnç vardır. Böbrek arteriyöz oksijen farkı bu direnç farkından dolayı % 1.7'dir fakat diğer organlarda yaklaşık olarak % 4-5 dolaylarındadır. Böbreklerin oksijen tüketimi vücudun toplam oksijen tüketiminin % 7'si kadardır. Bunun büyük bir kısmını ise tübüllerdeki sodyum transportuyla ilgilidir ve buna göre değişim gösterir (Guder & Ross, 1984).

2.4. Böbrek Fonksiyon Testleri

Böbrek fonksiyon testleri, böbreklerin ne kadar iyi çalıştığını değerlendirmek için kullanılan laboratuvar testleridir. Bu testler, böbrek hastalıklarının erken tanısına ve tedaviye başlamak için gereken önlemlerin alınmasına yardımcı olur (Gowda et al., 2010).

2.4.1. Üre

Üre (karbamid olarak da adlandırılır) birçok organizmanın maddesidir ve insan idrarının ana organik parçasıdır (Comba et al., 2016). Fizyolojik öneme sahip bu bileşik proteinlerin metabolize edilmesi sonucu meydana gelen amonyağın karaciğerde karbondioksitle üreye dönüşmesi sonucu oluşur. Daha sonra kana geçen üre idrar yoluyla dışarı atılır. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla bakılan üre klirensi 1 dakikada üreden temizlenen plazma miktarıdır. Böbrek hasarı ve yaşlılık gibi birçok etken böbreklerin üreyi vücuttan uzaklaştırma kabiliyetini azaltmaktadır (Rosner & Bolton, 2006).

2.4.2. Kreatinin

Vücutta doğal olarak üretilen ve çok az miktarda besinlerde bulunan, kreatinden üretilen ve 113 Da'lık moleküler ağırlığa sahip bir amino asittir. Kreatinin, karaciğerde üretilen, kas metabolizması sonucu ortaya çıkan ve vücutta enerji için kullanılan atık ürünüdür. Böbrekler tarafından süzülüp idrar ile atılarak kan dolaşımından temizlenmektedir. Kreatinin seviyeleri, böbreklerin nasıl çalıştığı hakkında bilgi verdiği için böbrek fonksiyon testleri arasında sıklıkla kullanılan bir parametredir. Böbrek hasarı ve böbrek yetmezliğinde kandaki kreatinin seviyeleri yükselmektedir (Kayukov et al., 2020).

Böbreklerdeki kreatininin bir dakikada temizlenen plazma hacmine kreatinin klirensi denir. Bu testte kullanılarak, böbreklerin kreatininini ne kadar iyi süzdüğü ve idrar ile ne kadar atıldığı hesaplanarak böbreklerin çalışma durumu ortaya konulur. Kreatinin klirensi GFR'nin bir göstergesidir. Nefrotoksisite, akut tübüler nekroz gibi böbrek hastalıklarında kreatinin klirensi azalır (Zuo et al., 2008).

2.4.3. Ürik Asit

Ürik asit, pürin nükleotidlerinin katabolizmasındaki son üründür. Memelilerde adenin, guanin, ksantin veya hipoksantin yapısındaki azotun çoğu idrarda ürik asit veya allantoin olarak meydana gelmektedir. İnsanlarda ürikaz enzimi olmadığı için ürik asit parçalanıp allantoina çevrilemez. Ürik asitinin % 80'i böbrekler aracılığı ile atılır. Plazma ürik asitin tamamı glomerüllerden filtre olarak % 98'i proksimal tübüllerden geri emilir. Tübüler reabsorpsiyonu-sekresyon mekanizmasının çeşitli sebeplerden dolayı bozulması ürik asit filtrasyonunun azalmasına yol açarak hiperurisemiye neden olur. Kandaki ürik asit düzeyini vücut ağırlığı, genetik yapı, beslenme, yaşam tarzı ve sosyal durum gibi etkenler etkileyebilir. Ürik asit renal yolla atıldığı için böbrek hastalıklarında ürik asit seviyeleri yükselebilmektedir (Khan & Ola, 2012).

2.5. Nefrotoksisite

Böbrekler çeşitli fonksiyon ve işlevlerini çeşitli nedenlerden dolayı kısmen veya tamamen kaybedebilir (Bae et al., 2020). Fonksiyonunda herhangi bir hasar oluşan böbreklerin vücuttaki atık maddeleri atamaması ve diğer fonksiyonlarında bozulması sonucu organizmada çeşitli patolojik durumlar oluşmaktadır. Böbrek hasarını belirlemek için glomerüler filtrasyon hızının (GFR) ölçümü ilk başvuru ve güvenilir olan bir ölçüttür. GFR referans aralığı 1 dakikada 80 mL'den az ise böbrek hasarı söz konusudur. Böbrekteki bu hasar iyileştirilmesi mümkün ve geçici bir durum ise akut böbrek yetmezliği, kalıcı bir durum ise kronik böbrek yetmezliği olarak tanımlanır (Griffin et al., 2019).

2.5.1. Akut Böbrek Hasarı

Böbrek fonksiyonlarının hızlı bir şekilde hasara uğraması olarak tanımlanmaktadır. Akut böbrek hasarında atık ürünler ve idrar atılımı ya çok azalmıştır ya da tamamen kesilmiştir. Akut böbrek hasarı çoğunlukla kansızlık ve toksisiteden kaynaklanmaktadır. Akut böbrek yetmezliği kronik böbrek yetmezliği ile kıyaslandığında daha hızlı gelişir (Abernethy & Lieberthal, 2002).

Akut böbrek yetmezliği etiyojisi ve konumuna göre prerenal, intrarenal ve postrenal olarak 3 kısma ayrılabilir (Girndt, 2017). Prerenal böbrek hasarı intravasküler volümde azalma, sistemik vazodilatasyon, böbrek vazokonstriksiyon, artmış abdominal basınç ve outputta azalma başlıca hasar sebepleridir. Böbrekler yüksek perfüzyon yeteneğine sahip oldukları için azalan kan akımına oldukça hassastırlar. Bu durumda parankim hasarı olmadıysa perfüzyon sağlaması durumunda böbrek fonksiyonları genellikle geri dönüşümlüdür (Naderi et al., 2021).

Intrarenal akut böbrek hasarı uzun süreli iskemi ya da nefrotoksik nedenlerle oluşabilir. Hasar gören kısımlar ise tübüller, glomerüller, intrarenal ve interstisyel kan

damarları olabilir. Böbreğe etki eden toksik maddeler endojen ve eksojen olabilir (Bonavia et al., 2021). Postrenal akut böbrek hasarı ise genellikle idrar yollarında oluşan obstrüksiyonlara bağlı olarak oluşmaktadır ve obstrüktif etiyoloji ortadan kaldırıldıktan sonra böbrek fonksiyonları düzelir (Kellum et al., 2021).

2.5.2. Kronik Böbrek Hasarı

Böbrekler organizmadaki su elektrolit dengesi gibi birçok fonksiyonu ile metabolik dengeyi sağlar ve devam ettirir. Böbrek yapısının zamanla dönüşümsüz şekilde hasar görmesi sonucu kronik böbrek hasarı oluşur. Glomerüler filtrasyon oranında bir azalma meydana gelir (Webster et al., 2017). Kronik böbrek hasarının genel tanımını yapmak gerekirse glomerüler filtrasyon hızının 90 gün ya da daha fazla bir sürede 60 mL/dk/1.73 m²'nin altında devam etmesi olarak tanımlanmaktadır (Bia et al., 2010). Kronik böbrek hasarlarına; kronik pyelonefrit, kronik glomerulonefrit, akut böbrek yetmezliği, hipertansiyon, diabetes mellitus, orak hücreli anemi, amilodozis, multipl myeloma, polikistik böbrek hastalığı gibi birçok neden sıralanabilir. Kronik böbrek hasarında nefronlar geri dönüşümsüz olarak zarar görür (Romagnani et al., 2017).

2.6. Gentamisin ile Nefrotoksisite Oluşturulması

Gentamisin, aminoglikozid grubuna ait olan bir antibiyotiktir ve *Micromonospora purpurea* kültüründen elde edilir. Aminoglikozitler, merkez kısımda olan hekzos çekirdeğine glikozit bağıyla bağlanan iki veya daha fazla amino şeker grubundan oluşmaktadırlar. Polaritesi ve suda çözünürlüğü fazla olan katyonik bir moleküldür (Mahi-Birjand et al., 2020).

Gm aminoglikozit grubu içerisinde amikasin antibiyotiğinden sonra etki gücü ve kullanım sahası olarak ikinci sırada yer alır (Hu et al., 2022). Duyarlı bakterilerin 30S ribozomal alt birimine geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve bakterinin protein sentezini inhibe eder. Bu şekilde haberci RNA'ya müdahale eder. Sonuç olarak bakteri DNA'sı

yanlış okunarak anormal ve fonksiyonel olmayan proteinler meydana gelir. Duyarlı bakteriler işlevsel proteinlerin olmaması nedeniyle ölür. Gm bakteri hücrelerine aktif yolla taşınır. Aminoglikozidlerin duyarlı bakteri üzerinde etki gösterebilmesi için hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunması gerekmektedir. Aminoglikozidlerin anaerobik bakterileri etkileyememesinin sebebi aktif bir taşıma mekanizmasına sahip olmamasından kaynaklanmaktadır (Klementa et al., 2022).

Gm'nin intravenöz, intramusküler, topikal ve oftalmik gibi çeşitli uygulama şekilleri mevcuttur. Zehirlenme ihtimalinin yüksek olması nedeniyle böbrek yetmezliğı durumunda kullanılacak gentamisin dozununda sürekli düzenleme yapılmalıdır ve serum toksisite oranı kontrol edilmelidir (Kedir et al., 2022). Gm ile 7 günden fazla tedavi edilen hastaların %30'unda bazı böbrek yetmezliğı belirtileri görölmektedir (Ali et al., 2011; Ustuner et al., 2017). Nefrotoksisite tayini için serum kreatinin seviyesi değerlendirilmektedir ve ölçüt alınmaktadır. Kreatin düzeyi 0.4-0.5 mg/dL civarında olması nefrotoksisite olarak kabul edilmiştir (Evans et al., 1986; Lode, 1998).

Gm uygulamasından 24 saat sonra uygulanan dozun % 70'i böbrek tübüllerinden geri emilir. Vücuttan atılımı ise neredeyse tamamı glomerüler filtrasyon yoluyla olmaktadır. Gm böbrek tübülleri tarafından yeniden emilmesi ve birikmesi nefrotoksisitenin oluşmasına neden olmaktadır. İlacın çok az bir kısmı safra yoluyla atılır. Bu nedenle vücuttan atılımının büyük kısmı böbrek fonksiyonuna bağıdır (Apaydın Yildirim et al., 2017; Walker et al., 1999).

Deneyisel olarak ratlarda oluşturulan böbrek hasarı modellerinde birçok toksik etkili maddeler kullanılır. Dışarıdan alınan ve nefrotoksisiteye sebep olan aminoglikozid grubu antibiyotikler bu modeli oluşturmak için iyi bir ajandır (Heidarian et al., 2017; Jacob et al., 2020a).

Gm sahip olduğu katyonik amino grupları proksimal túbül hücrelerinin zar yapısında bulunan anyonik fosfolipitlere bağlanır ve ilaç-reseptör kompleksi oluşur. Daha sonra ise túbül hücrelerine pinositoz yoluyla alınarak lizozom organeline taşınır. Lizozomlardaki asidik ortam sayesinde gentamisin fosfolipitlere bağlanma kapasitesi artar. Yapılan çalışmalarda aminoglikozidlerin fosfolipidlerin yapısını bozduğu, inositol trifosfat salınımını inhibe ettiği ve fosfolipazların etkisini azalttığı bildirilmiştir. Yaptığı bu olumsuz etkilerden dolayı da lizozom membranında yıkıma sebep olmaktadır. Buna ek olarak sadece lizozomları değil mitokondri dahil diğer hücresel elemanları da etkiler. Bozulan lizozom membranı lizozom içeriğinin sitozole boşalmasına neden olur. Yine hücre içi enerji sisteminin bozulması apoptozu tetikler. Fosfolipitlerdeki değişiklikler, asit ve baz taşınması, sodyum-potasyum ATPaz ve adenil siklaz aktivitesinin azalması, azalmış kalsiyum taşınması gibi membran fonksiyonlarında birtakım değişiklikler ile sonuçlanır. Mitokondri fonksiyonlarının bozulması hücre içi reaktif oksijen türlerinin artmasına sebep olur. Apoptozla sonuçlanması gereken süreç ise hem oksidatif stres hem de enerji azlığı nedeniyle nekroza doğru ilerler. Gm verdiği bu hasarlar sonucu glomerüler filtrasyon hızı azalır ve nefrotoksisite oluşur (Hu et al., 2022; Quiros et al., 2011; Suzuki et al., 1995).

Mitokondri membranına bağlanarak mitokondrilerde oksidatif fosforilasyonu inhibe eder. Hücre içi ATP sentezi, mitokondriyal membrandaki değişiklikler, kalsiyum taşınmasındaki bozulmalar, endoplazmik retikulum stresi ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile bağlantılıdır. Gm'nin reaktif oksijen türlerinin üretimi ve hidrojen peroksit oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (Azouz et al., 2022; Jado et al., 2020).

Böbrek túbüllerinde gentamisin birikimine bağlı olarak túbüler nekroz oluşur. Yapılan bazı araştırmalarda ise gentamisinin glomerüler endotelial hücre sayısını ve porların boyutunu azalttığını, vasküler düz kas hücrelerinin daralmasına ve böbrek kan

akışının azalmasına yol açtığını tespit etmiştir. Devam eden bu değişiklikler sonucu akut böbrek hasarı oluşmaktadır (Balaha et al., 2023; Mahmoud et al., 2021).

Meydana gelen hücresel tepkiler böbrek hasarının vasküler, tübüler ve glomerüler düzeyde daha da artmasına sebep olarak inflamatuvar yanıtın gelişmesini sağlar. Aslında kontrollü bir inflamatuvar yanıt vücut için yararlı bir süreçtir. İnflamuar yanıt sonucunda doku ve organlarda hücresel immün aktivitesi ve bazı mediatörlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Nötrofiller kanda en fazla bulunan lökositlerdir ve ilk savunma hattını oluştururlar. Tümör nekroz faktör (TNF- α), interlökin 6 (IL-6), memeli nötrofil hücrelerindeki azurofilik granüllerin ana bileşenleridir; insan monositlerinde mikrobiyal öldürme ve inflamatuvar doku hasarında yer alırlar. Bu nedenle, TNF- α ve IL-6, çeşitli inflamatuvar faktörlerin neden olduğu doku hasarının göstergeleri olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Apaydin Yildirim et al., 2020; Que et al., 2019). Gentamisin dahil diğer tüm aminoglikozid grubu antibiyotikler nefrotoksisite dışında ototoksisite oluşturmaktadırlar (Govindappa et al., 2019).

Günümüzde nefrotoksisiteyi engellemek veya azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler; en az toksik olan aminoglikozitin seçilmesi, tedavi süresinin kısıtlı tutulması, dozun ayarlanması, hipokalemi ve hipomagnezeminin düzeltilmesidir. Bu stratejilerin yanında bazı ajanlar kullanılarak gentamisinin ve diğer aminoglikozidlerin neden olduğu nefrotoksisiteyi önlemek amaçlanmıştır. Gentamisin kaynaklı nefrotoksisite ile ilgili çok fazla çalışma mevcut olmasına rağmen gentamisinin sebep olduğu nefrotoksisiteye karşı kullanılabilecek ajan arayışı hala devam etmektedir (Apaydin Yildirim et al., 2017; Korani et al., 2019).

2.7. Sitokinler

Sitokinler Yunanca cyto (hücre) ve kinos (hareket) kelimelerinin biraraya gelmesi ile oluşan, 5-25 kDa aralığında olan, hücrelere sinyal taşıyarak birbirleriyle iletişim

kurmalarını sağlayan peptid yapılı k protein molekülleridir. Hücre zarına bağlanarak membrandaki çift katlı lipid tabakayı geemediklerinden dolayı etkilerini hücre yüzeyi reseptörlerine bağlayarak gösterirler (Stenken & Poschenrieder, 2015). Sitokinler doğal immun yanıtın çok önemli bir parçasıdır. İmmun sistem hücrelerinin aktifleşmesi, değişime uğraması, hücre çoğalması, hücre g ve adezyonundan sorumludurlar. Pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar özelliklere sahiptirler (Dinarello, 2007).

Sitokinler interferonları, interlökinleri, kemokinleri, lenfokinleri ve tümör nekroz faktörlerini kapsarlar. Herhangi bir sitokin birden fazla hücre tarafından salgılanabilir (Stenken & Poschenrieder, 2015). Mast hücreleri, B ve T lenfositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücrelerde üretilirler. Enfeksiyon, kanser, travma, sepsis, iskemi ve inflamasyona karşı organizmanın hücresel ve humoral bağışıklık yanıtında görev alırlar. Endojen ve eksojen toksinler sitokinlerin en güçlü uyaranları arasındadırlar (Vilcek & Feldmann, 2004; Zhang & An, 2007).

Sitokinler, bağışıklık sisteminde birçok işleve sahip olan hücreler tarafından üretilen ve hücreler arasında iletişim sağlayan bir tür protein veya peptid hormonudur. Sitokinler, etkiledikleri hücrelerin türüne ve işlevine göre sınıflandırılabilirler (Opal & DePalo, 2000; Pfeffer, 2003; Saini et al., 2020).

İnterlökinler: Hücreler arasındaki iletişimi sağlayan ve immun yanıtın düzenlenmesinde görev alan bir grup sitokindir. Örneğin, IL-2 T hücreleri tarafından salgılanarak T hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenler.

Tümör nekrozis faktörleri (TNF-): Hücre lmn ve inflamasyonu düzenleyen bir grup sitokindir. TNF-, özellikle makrofajlar tarafından salgılanarak inflamasyon ve apoptozis (programlı hücre ölümü) gibi birçok işleve katılır.

İnterferonlar (IFN): Viral enfeksiyonlar gibi durumlarda immün yanıtı uyararak, virüslerin çoğalmasını önleyen bir grup sitokindir. İnterferonlar, özellikle enfekte hücreler tarafından üretilirler ve diğer hücrelerdeki antiviral savunmayı artırır.

Kemokinler: Hücreler arasındaki hareketi düzenleyen bir grup sitokindirler. Kemokinler, hücrelerin yaralanma bölgesine yönlendirilmesinde ve inflamasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

İmmunoglobulinler: B lenfositlerden salgılanan bir grup sitokindirler. İmmunoglobulinler, antikorları oluşturan moleküllerdir ve enfeksiyonlara karşı koruyucu etki sağlarlar.

2.7.1. İnterlökin-1 β

İnterlökin-1 β (IL-1 β) düzeyi her hücrede farklıdır ve makrofajlar IL-1 β sitokini için ana kaynaktır. IL-1 β salgılanmasını prostoglandinler, IFN- γ , IL-10, IgG ve kortikosteroidler engeller. IL-1'in 3 formu vardır. Bunlar: IL-1 α , IL-1 β ve IL-1Ra olarak adlandırılır. Alfa ve beta formları benzerdir. IL-1 β ise bir pro-inflamatuar olarak görev yapar. Vücudun patojenlere karşı hızlı cevap vermesini sağlar. IL-1 β inflamasyona öncülük ederek bağışıklık sisteminin aktive olmasında önemli bir rol üstlenir (Fields et al., 2019).

IL-1'in başlıca görevleri şunlardır:

- Lökosit göçünü artırır.
- Kolajenaz sentezlenmesini sağlar.
- Nötrofillerin, B ve T lenfositlerin aktivasyonunu başlatır.
- Diğer birçok sitokinin salgılanmasını tetikler.
- PGE salgılanmasını uyarır.
- Endotelial hücre proliferasyonunu sağlar.

Hipertermi, duyarlı ağrı hassasiyeti, hipotansiyon ve vazodilatasyon IL-1 seviyesinin yüksek olduğuna işaretler (Dinarello, 2018; Fields et al., 2019).

2.7.2. İnterlökin-6 (IL-6)

Endotel ve monositler tarafından salgılanan IL-6 lökosit artışını sağlayarak doğal bağışıklığı başlatır. Sepsis, septik şok ve organ yetmezliği durumlarında IL-6 düzeyinde doğru orantılı olarak artar (Hibi et al., 1996). Artan IL-6 düzeyi C-reaktif protein (CRP) ve diğer akut faz reaktanlarında salgılanmasını artırır. Yine trombopoez, B hücre proliferasyonunu başlatır ve T hücreleri üzerinde IL-1 ve TNF- α ile sinerjik etki gösterir. (Vansnick, 1990).

2.7.3. Tümör Nekroz Faktör (TNF- α)

Vücutta gram negatif bakterilere karşı salgılanan, 17 kD ağırlığında bir sitokindir. Vücutta aşağıdaki etkileri gösterir (Graves & Cochran, 2003);

- Lipid metabolizması, pıhtılaşma ve endotel fonksiyonu üzerinde geniş kapsamlı biyolojik etkileri vardır.
- İnflamasyon ve ateşi indükler, akut faz reaksiyonu, kilo kaybı ve antitümöral etkileri bulunur.
- Nötrofillere de etki ederek endotel hücrelerinin bağlanma fonksiyonunu artırır.
- Nötrofillerin bağışıklık sisteminde de görev alması için aktive eden elemanlardan biridir.
- TNF- α , IL-1, IL-6, kemokinler ve TNF- α 'nın kendisini üretmek üzere mononükleer fagositleri ve diğer hücre tiplerini uyarır. IL-6 ile sinerjik etki gösterir.
- Virüslere karşı interferon gibi koruyucu etki gösterir. Bu etkileri vücudun immun yanıtında çok önemlidir (Hashiramoto et al., 2010).
- Özellikle IL-1 ile birlikte projen etki yaparak hasta bireylerde ateşi yükseltir.

2.8. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, hücrelerde serbest radikallerin birikmesi ve bunların normalden daha fazla üretilmesi sonucu oluşan bir durumdur. Serbest radikaller, hücrelerdeki diğer moleküllere saldırarak oksidasyon reaksiyonlarına neden olurlar ve bu reaksiyonlar hücre hasarına, disfonksiyona ve hatta ölüme yol açabilirler. Normalde, hücrelerde serbest radikallerin üretimi ile antioksidan sistemler arasında bir denge vardır ve bu sistemler serbest radikalleri nötralize ederek hücrelerin normal fonksiyonlarını sürdürmelerine yardımcı olurlar. Ancak bu denge bozulduğunda, serbest radikallerin birikmesi sonucu hücrelerde oksidatif stres oluşur (Pisoschi & Pop, 2015).

Oksidatif stresin birçok nedeni vardır. Bunlar arasında çevresel toksinler, sigara içmek, alkol almak, UV ışınlarına ve radyasyona aşırı maruz kalma, aşırı egzersiz yapmak, yetersiz beslenme, stres ve yaşlanma sayılabilir. Oksidatif stresin birçok hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Bunlar arasında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, diyabet, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar ve diğer birçok kronik hastalık yer almaktadır. Oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmak için antioksidanlar (C vitamini, E vitamini, selenyum, çinko, beta-karoten, lutein vb.) tüketmek, sağlıklı bir yaşam tarzı benimsemek ve toksinlere maruz kalmaktan kaçınmak oldukça önemlidir (Poljsak et al., 2013).

2.9. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu atom veya moleküller kendilerini nötralize etmek için diğer yapılardan elektron alma eğilimine neden olur. Serbest radikaller yarı ömrü çok kısa ve son derece reaktiftirler. Zincirleme reaksiyonlar ile yeni radikaller üreten, organizmada biyomoleküllerin yapısını bozarak onları hasara uğratabilen maddelerdir. Singlet oksijen (1O_2), hidroperoksi radikalleri ($HOO^\cdot$), lipid peroksit radikalleri ($ROO^\cdot$), nitrik oksit ($NO^\cdot$)

), lipid peroksidleri (LOO^-) ve peroksinitrit (ONOO^-) diğer önemli serbest radikallerdir. Oksijen radikallerinin dışında azot içeren serbest radikallerde geniş ve önemli bir ailedir (Unsal et al., 2020).

Bunun yanında geçiş elementleri de denilen Fe, Cu, Mn, Mo, gibi bazı metal iyonları da eşlenmemiş elektron bulundurur. Buna rağmen serbest radikal olarak değerlendirilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda rol oynarlar (Finaud et al., 2006).

2.9.1. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Lipitler: Çoklu doymamış yağ asitleri serbest radikallere karşı oldukça dayanıksızdırlar.

Proteinler: Sülfhidril gruplarının oksidasyonu ve bazı amino asitlerin değişmesine neden olurlar. Serbest radikaller proteinlerin biyolojik aktivitelerini parçalanma, çapraz bağlanma ve agresyon yoluyla zarar vererek bozabilirler.

Karbonhidratlar: Normal koşullarda monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu H_2O_2 açığa çıkar. Glikasyon ile proteinler serbest radikallere karşı hassaslaşır.

Nükleik asitler: DNA molekülünde kırılmalar ve bazların parçalanmasına yol açarlar. Meydana gelen bu zararlar mutasyon ve sitotoksosite ile bağlantılıdır. Bunlara neden olan serbest radikaller kanserojenizde önemli rol oynarlar (Unsal et al., 2020).

2.9.2. Serbest Radikal Çeşitleri

Süperoksit Radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Yarı ömrü oldukça kısa olan bu radikal genellikle mitokondriyal elektron transport sisteminde NADH'ın (Nikotinamid adenin dinükleotid) NAD^+ 'a okside olması ile meydana gelir. Buna ek olarak birçok oksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonlarda da ortaya çıkar. Radikali tehlikeli kılan ise H_2O_2 molekülüne öncülük etmesi ve bazı iyonları indirgemesidir. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile O_2 ve H_2O_2 oluşturur (Chiaradia et al., 2021; Vona et al., 2021).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Diğer serbest radikaller gibi iyon yüklü değildir. Ancak hücre membranını çok kolay geçerek sitoplazmaya geçer ve metal iyonlarıyla birlikte OH^- radikalinin oluşmasına sebep olur. Yani metal iyonları ile birlikte çok güçlü bir radikale dönüşür. Hidrojen peroksit süperoksitin dismutasyonu sonucu da oluşur (Chiaradia et al., 2021).

Hidroksil Radikali (OH^-)

Organizma için en tehlikeli oksijen radikalidir. Çok güçlü okside edici özelliğe sahiptir. Radyasyona maruz kalma sırasında oluşabilir. Fenton ve Haber-weiss reaksiyonlarında ortaya çıkan bir radikaldir. Yarılanma ömrü kısa olan bu radikalın proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi pek çok molekülle tepkimeye girebilir. Diğer en önemli hasarı ise hücre membranındaki fosfolipitlerin doymamış yağ asitleri ile oksidan maddelerin varlığında tepkimeye girmesi ve sonuç olarak da lipid peroksidasyonu ile hücre membran yapısının bozulmasına sebep olur (Valaei et al., 2021).

Singlet Oksijen (1O_2)

H_2O_2 gibi ortaklanmamış elektronu yoktur. Serbest radikal oluşumuna sebep olduğundan oldukça etkili bir reaktif oksijen türüdür (Chiaradia et al., 2021).

Nitrik Oksit (NO^-)

Oldukça toksik ve renksiz bir gazdır. Hem patolojik hem de fizyolojik etkilere sahiptir. Nitrik oksit sentaz enzimi ile oksijen ve L-arjininden sentezlenir. Nitrik oksit bu enzim ile endotel ve birçok dokuda üretilir. Kan basıncı, böbrek fonksiyonlarının ve vasküler tonusun düzenlenmesi gibi birçok görevi vardır. Hücrelerde siklik GMP vasıtasıyla protein kinazları aktive ederler (Finaud et al., 2006).

Nitrik oksit, proteinlerden demiri kopararak yerine kendisi geçmeye çalışır. Fenton reaksiyonunun uyarılmasına sebep olur ve kanserogeneziste görev alır. SOD enzimi ile yarışmalı olarak O_2^- molekülünü bağlar ve bunun sonucunda peroksinitrit

oluşur. Peroksinitritin oluşması ile nitrik oksitin fizyolojik etkileri bozulur ve oksitadif etki gösterir. ONOO^- ve NO normalde nitrit ve nitrata yıkımlanır. Fizyolojik etkinin bozulması sonucu azot dioksit (NO_2), nitronyum iyonu (NO_2^+) ve hidroksil radikali gibi radikallere dönüşür ve özellikle proteinlere zarar verir (Capellini et al., 2010).

2.9.3. Serbest Radikallerin İç ve Dış Kaynakları

Serbest radikallerin oluşmasında iki ana neden vardır. Bunlardan biri vücutta meydana gelen normal hücresel olaylar, diğeri ise çevresel etkenlerdir (Seifried, 2007).

Serbest radikallerin oluştuğu iç kaynaklı süreçler;

- Solunum sistemindeki serbest elektronlar
- Oksidaz enzimleri ile H_2O_2 ve O_2 üretimi
- Membran lipidlerinin peroksidasyonunda zincirleme devam eden tepkimeler
- Peroksizomlarda meydana gelen O_2^- ve H_2O_2 üretimi
- Prostoglandinlerin salgılanması
- Arjininden nitrik oksit üretimi
- Fagositoz olayları
- Hemin safra pigmentlerine oksidasyonu
- Oto-oksidasyonun bir sonucu olarak

Serbest radikal oluşturan dış kaynaklar;

- İlaç metabolizmasının bir sonucu olarak
- İyonlaştırıcı radyasyonlar
- O_2 'nin fotolizi
- Organik moleküllerin foto-uyarılması
- Ağır metallerin alınımı ile serbest radikal ve OH^- üretimi

- Alkole bağılı olarak lipid peroksidasyonunun oluşması
- Diyetteki etkenler

2.10. Lipid peroksidasyonu, Malondialdehid (MDA)

Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerin etkileri ile alkol, aldehit ve etan gibi ürünler oluşturmasıyla meydana gelen reaksiyonların bütünüdür. Oldukça zararlıdır. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşir (Murray et al., 2021).

1. Başlama aşaması: Hidroksil radikalinin etkisi ile çoklu doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomunu çıkarmasıyla başlar. Bunun sonucunda H_2O ve $L^{\cdot}$ ortaya çıkar.
2. Yayılma aşaması: Oluşan yağ asidi radikali oksijeni alarak peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) meydana getirir. Daha sonra peroksil radikali başka bir çoklu doymamış yağ asidinden hidrojen alarak lipid hidroperoksiti oluşturur ve bu reaksiyon zincirleme devam eder.
3. Sonlandırma aşaması: Çoklu doymamış yağ asitlerinin tamamı oksitlenene kadar reaksiyon devam eder.

Lipid peroksidasyonu ürünlerinin büyük kısmı kararsız bileşiklerdir. Bunlardan biri olan MDA lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılır (Mohiti et al., 2021). MDA düşük molekül ağırlıklıdır. Uçucu formda olan MDA kısa zincirli zayıf bir asittir ($pK_a = 4.46$) (Tsikas, 2017). Hücre membranında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri ve araşidonik asitin yıkılması sonucu MDA oluşur. Malondialdehid oksidatif stres ile doğru orantılı gösterir. Yani MDA düzeyi ne kadar artmışsa hasar da o kadar artmıştır. MDA ve diğer lipid peroksidasyon ürünleri tiyobarbitürik asit ile tepkimeye girerek pembemsi renk oluşturur. Oluşan renk

değişikliğinin sebebi tiyobarbitürik asit reaktifleridir. MDA ölçümünün temel prensibi buna dayanmaktadır (Morales & Munne-Bosch, 2019).

2.11. Antioksidanlar

Organizmada serbest radikallere elektron transferi yaparak ya da onları yok ederek yapacakları hasarı önlemeye çalışan madde olarak tanımlanabilir. Serbest radikallerin oluşması ve antioksidanlar tarafından inhibe edilmesi fizyolojik bir süreçtir. Antioksidanlar birçok şekilde sınıflandırılabilirler. Antioksidanların bazıları dışarıdan diyetle alınırken, bazıları organizmada belirli bir düzeyde sentezlenirler. Sınıflandırmayı yaparken enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak 2 kısma ayırabiliriz (Begum et al., 2021; Davidovic et al., 2021; Durackova, 2010; Qi & Dong, 2021).

2.11.1. Enzimatik Antioksidanlar (Primer antioksidanlar)

Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit radikaline karşı en önemli savunma mekanizmasıdır. Çok yüksek reaktif özelliğe sahip süperoksitin daha az reaktif olan H_2O_2 'ye dönüşmesini sağlayan reaksiyonu katalize eder. Süperoksit radikali için ilk savunma hattı denebilir. İnsan organizmasında 3 çeşit SOD formu vardır. Bunlar sitozolik, mitokondriyal ve hücre dışı SOD olarak adlandırılırlar. Glikoprotein yapısında olan SOD'un oksijen tüketiminin fazla olduğu dokularda aktivitesinin yüksek olduğu bilinmektedir (Forman & Zhang, 2021; Fujii et al., 2021).

Katalaz (CAT)

Katalaz, hücrelerimizdeki oksidatif stresi nötralize etmek için önemli bir enzimdir. Bu enzim, hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürerek nötralize eder. Katalazın ana görevi, hücrelerimizi oksidatif stresin zararlı etkilerinden korumaktır. Karaciğer dokusundan kristal formda izole edilen bu enzim peroksizomlarda konumlanmıştır. Katalaz enzimi her alt ünitesinde NADPH ve hem grubu barındırır. Eritrositlerde

aktivitesi çok yüksektir. Mitokondride oluşarak sitozole geçen H_2O_2 'yi yıkımlanmasında görev alır. Bu sayede bazı fizyolojik fonksiyonlarda görev alan H_2O_2 'yi gerekli düzeyde tutar (Hayes et al., 2020).

Glutasyon peroksidaz (GPx)

Önemli bir antioksidan olan bu enzim hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlayan bir enzimdir. Yapısında 4 adet selenyum atomu içerir. Sitozolik bir enzim olan GPx az miktarda mitokondrilerde de bulunur. Hidrojen peroksitin suya yıkımlanması sırasında indirgenmiş glutasyonun (GSH) oksitlenmiş glutotyona (GSSG) dönüşümü sırasında gerçekleşir. İndirgenmiş glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar üretilir. Bu reaksiyonda NADPH varlığında mümkündür. Azalmış GPx aktivitesi antioksidan mekanizmasındaki etkinliğin bozulduğunu gösterir (Tian et al., 2021).

Glutasyon redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR) enzimi, FAD (flavin adenin dinükleotid) içeren ve hücrelerimizde oksidatif stresi önlemek için önemli bir enzimdir. Glutasyon (GSH) adı verilen bir antioksidan molekülünün yenilenmesinde anahtar bir rol oynar. Bu enzim, glutasyonun okside olmuş formunu (GSSG) glutasyonun indirgenmiş formuna (GSH) dönüştürür. Glutasyon redüktaz NADPH adı verilen bir molekülün varlığına bağımlıdır (Hayes et al., 2020).

2.11.2. Non-enzimatik Antioksidan Sistem (Sekonder antioksidanlar)

Sekonder antioksidanlar, birincil antioksidanların oksidasyonunu yavaşlatmak veya önlemek için kullanılan diğer antioksidanlardır. Birincil antioksidanlar, ROS etkisiz hale getirerek serbest radikal zincir reaksiyonunu durdurur. Ancak, birincil antioksidanlar kendileride zamanla okside olabilirler. Bu nedenle, ikincil antioksidanlar okside olmuş birincil antioksidanları yenileyerek onları tekrar etkin hale getirerek oksidatif hasarın

devam etmesini engeller. Sekonder antioksidanlara aşağıdaki sıralananlar birer örnektir (Nishimura et al., 2021).

- Tokoferoller (E vitamini):
- Askorbik asit (C vitamini):
- Karotenoidler:
- Selenyum:
- α -Lipoik asit:
- Kafein
- Flavonoidler

Metabolik antioksidanlar da aşağıda sıralanmıştır (Valaei et al., 2021):

- Ürik asit
- Seruloplazmin
- Transferrin
- Bilirubin
- Haptoglobin

Glutatyon (GSH): Glutatyon, üç amino asitten oluşan bir tripeptit molekülüdür: glutamik asit, sistein ve glisin. GSH, hücrelerde yaygın olarak bulunan güçlü bir antioksidandır ve serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarını önlemeye yardımcı olur. Ayrıca, hücrelerin normal işlevlerini sürdürmesine yardımcı olan birçok biyolojik işlevde yer alır. GSH, oksidatif stresin azaltılmasında önemli bir rol oynar. Hücreler, GSH'yi serbest radikallerle etkileşime sokarak onları nötralize eder. Bu süreçte, GSH okside olur ve glutatyon peroksidaz enzimi tarafından tekrar indirgenerek glutatyon yeniden elde edilir. Bu döngü, hücrelerin oksidatif hasardan korunmasına yardımcı olur (Mates et al., 2012; Mironczuk-Chodakowska et al., 2018).

2.12. Apoptoz

Apoptoz, embriyolojik gelişimden erişkin dokunun yaşamı boyunca gerçekleşen, hücrelerin kontrollü olarak kendilerini yok ettiği, fizyolojik ve patolojik olarak düzenlenen bir hücre sel süreçtir. Bu süreç, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengenin korunmasında kritik bir rol oynar. Apoptoz terimi, ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır (Elmore, 2007).

Organizmada sürekli olarak yeni hücreler oluşurken, aynı zamanda var olan hücrelerin de ölmesi de gerekmektedir. Bu durum, dokuların homeostazını sağlamak için önemlidir. Apoptoz, genetik olarak programlanmış mekanizmaları içerir ve dokuların devamlılığını sağlamak için apoptoz ve mitoz arasındaki dengeyi sürdürür (Favaloro et al., 2012). Örneğin, embriyolojik dönemde, kadınlarda menstrual döngüde ve bazı fizyolojik durumlarda, görevini tamamlamış, yaşlanmış, enfekte olmuş, DNA hasarlı veya radyasyona maruz kalmış hücrelerin fizyolojik apoptoz yoluyla yok edilmesi gerçekleşir (Favaloro et al., 2012). Ancak bazı durumlarda, dokularda apoptozun düzensiz bir şekilde artması veya azalması patolojik apoptoza yol açabilir. Patolojik apoptoz, kanser, nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson ve Alzheimer gibi), kardiyovasküler bozukluklar, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynayabilir. Özellikle kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ve azalmış apoptoz ile karakterize edilir. Bu nedenle, kanser tedavilerinde apoptotik yolların aktivasyonu, önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir (Carneiro & El-Deiry, 2020; Kumar & Pandey, 2013).

Sonuç olarak, apoptoz hücre sel düzeyde önemli bir süreç olup, embriyolojik gelişimden erişkin doku homeostazına kadar birçok fizyolojik ve patolojik durumda etkili olan moleküler mekanizmalar içermektedir. Apoptozun anlaşılması, hastalıkların patogenezi ve tedavisi açısından önemli bir araştırma alanı olmuştur.

Apoptotik hücreler, morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle belirlenebilen özel özellikler gösterir. Bu özellikler, çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden kolayca ayırt edilebilir. Apoptoz sırasında, hücrenin şekli yuvarlaklaşır, komşu hücrelerle bağlantıları kopar, büzülerek küçülür ve kromatin ve sitoplazma yoğunlaşması görülür. Ayrıca, apoptotik hücre yüzeyinde tomurcuklanmalar oluşur. Bu karakteristik morfolojik değişiklikler, apoptotik hücreleri diğer hücre ölüm tiplerinden ayıran belirgin özelliklerdir. Apoptozun son aşamasında, hücre membranıyla birlikte hücre yüzeyinden ayrılan parçalar apoptotik cisimcikleri oluşturur. Apoptotik cisimciklerin yüzeylerinde makrofajlar tarafından tanınmayı sağlayan sinyaller bulunur. Bu sayede, makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar. Bu süreç, dokuda inflamatuvar yanıtın oluşmasını önler ve çevre hücrelere zarar verme riskini azaltır. Bu özellik, apoptozu diğer hücre ölüm tiplerinden, özellikle nekrozdan ayıran önemli bir farklılıktır (Xu et al., 2017).

Bunun sonucunda, apoptoz sırasında hücrelerin morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler göstermesi, bu sürecin tanınmasını ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilmesini sağlar. Apoptotik hücrelerin karakteristik özellikleri, apoptozun sağladığı hücresel düzenin korunmasına katkıda bulunur ve dokuda inflamasyonun önlenmesine yardımcı olur. Apoptoz sürecinde, biyokimyasal değişikliklerin yanı sıra kaspazların aktivasyonu, DNA ve protein yıkımı, membran değişiklikleri ve hücrenin fagositik hücreler tarafından hızla temizlenmesi gibi olaylar gözlemlenir. Apoptozun biyokimyasal aktivasyonu, Bcl-2 ailesi üyeleri ile Apaf-1 (Apoptoz Aktive Edici Faktör) ve kaspazların etkileşimiyle gerçekleşir. Bu etkileşimler, apoptozda meydana gelen morfolojik değişikliklere yol açar. Apoptotik hücre ölümünün morfolojik değişiklikleri, tüm hücre tiplerinde önemli ölçüde benzerlik gösterir. Apoptozun başlamasından hücrenin tamamen yok edilmesine kadar geçen süre, genellikle birkaç saat kadar sürer. Bu süre, hücre tipine, uyarıcı etkene ve apoptotik yollara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Wong, 2011).

Apoptoz, hücrelerin programlı bir şekilde ölmesini sağlayan karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, biyokimyasal değişiklikler ve moleküler etkileşimlerin yanı sıra morfolojik değişiklikler de meydana gelir. Bu değişikliklerin zamanlaması ve süresi, apoptozun spesifik bağlamına ve hücre tipine bağlı olarak değişir. Böylece, apoptozda biyokimyasal değişiklikler, kaspaz aktivasyonu, DNA ve protein yıkımı, membran değişiklikleri ve hücrenin hızlı temizlenmesi gibi olaylar gözlenir. Morfolojik değişiklikler, farklı hücre tiplerinde benzerlik gösterir ve apoptozun başlamasından tamamlanmasına kadar geçen süre değişkenlik gösterebilir. Apoptoz, karmaşık bir süreç olup, hücre tipine ve apoptotik yola bağlı olarak farklılık gösterebilir (Wong, 2011).

Apoptoz, evrimsel süreçte korunan ve genetik olarak sıkı bir şekilde kontrol edilen biyolojik bir süreçtir. Apoptozun gerçekleşmesini sağlayan tüm bileşenler, DNA'da kodlanmış olup, apoptoz sinyali aldıklarında etkinleştirilirler. Apoptozun başlaması için bir uyarana ihtiyaç vardır. Hem hücre içi hem de hücre dışı birçok uyarıcı apoptoza yol açabilir. Bu uyarıcılar arasında TNF- α , insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), nöron büyüme faktörü (NGF), glukokortikoidler, radyasyon, sitotoksik ilaçlar, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, sitokinler, p53 aktivasyonu, hücre içi kalsiyum artışı ve DNA hasarı bulunur. Bu uyarıların varlığı apoptoza yol açarak mitokondri iç yol (intrinsik) veya ölüm reseptörlerini içeren dış yol (ekstrinsik) üzerinden kaspazların aktivasyonunu tetikler (Loreto et al., 2014). Kaspazlar, tüm apoptotik yolların ortak noktasıdır ve hem başlatıcı hem de uygulayıcı (efektör) olarak apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alır. İki yol arasında bağlantılar bulunur ve yapılan araştırmalar bir yolun moleküllerinin diğer yolun moleküllerini etkilediğini göstermiştir. Ayrıca, daha az yaygın olan T-hücre aracılı sitotoksisite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümü gibi bir yol daha vardır. Bu süreçte, apoptoza giden bir hücrenin kararını Bcl-2 ailesi proteinlerinin dengesi belirler (Pistritto et al., 2016).

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum gibi iyonlar, bazı genler, moleküller (seramid), proteinler (p53) ve hatta organeller (mitokondri) rol oynar. Apoptoz sırasında, hücre içine sürekli olarak kalsiyum girişi olur. Ancak, bu kalsiyum girişi apoptozun gerçekleşmesi için zorunlu değildir. Sonuç olarak, apoptoz evrimsel olarak korunan bir süreç olup, genetik olarak sıkı bir şekilde kontrol edilir. Apoptozun başlaması için uyarılar gereklidir ve bu süreçte kaspazların aktivasyonu önemli bir rol oynar. Apoptozun düzenlenmesinde çeşitli moleküler bileşenler ve faktörler etkili olur. Bu karmaşık süreç, hücrenin ölümünü yönetmek ve homeostazı sağlamak için önemlidir (D'Arcy, 2019; Poon et al., 2014).

2.12.1. Bcl-2

Bcl-2 protein; Bcl-2 protein ailesinin bir üyesi olarak görev yapan anti-apoptotik bir proteindir. Apoptozu tetikleyen (Bax, Bak, Bim) ve bastıran (Bcl-2, Bcl-x) birçok proteinin bulunduğu Bcl-2 ile ilişkili protein ailesi vardır. Hücrenin hayatta kalma yeteneği, bu gen ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin oranına bağlıdır. Bax proteini, Bcl-2 protein ailesinde kodlanan bir proteindir. Bcl-2 ailesi üyeleri, heterodimer veya homodimer kompleksleri oluşturabilir. Farklı hücresel aktivitelere anti-apoptotik veya pro-apoptotik düzenleyici olarak işlev görürler (Loreto et al., 2014; Rahman et al., 2021). Bcl-2, Bax ile bir heterodimer oluşturabilir ve apoptozun bir aktivatörü olarak işlev görebilir. Bax ile Bcl-2 arasındaki ilişki ve oran, bir hücrenin bir apoptotik uyarıya yanıt olarak hayatta kalmasını veya ölmesini belirler. Bcl-2/Bax oranındaki artış veya azalma, apoptozun inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bcl-2/Bax oranı artarsa, apoptozis inhibe edilirken, oranın azalması pro-apoptotik olayların gerçekleşmesine neden olur (Brunelle & Letai, 2009; Pistritto et al., 2016).

2.12.2. Bax

Apoptozun düzenlenmesi, Bcl-2/Bax gen ailesi tarafından sağlanmaktadır. Bu gen ailesinin 20 üyesi tespit edilmiştir; bazıları apoptozu inhibe eden (antiapoptotik) olarak işlev görürken, diğerleri apoptozu tetikleyen (proapoptotik) genler olarak tanımlanır. Bax (pro-apoptotik) proteinleri, apoptotik sinyali aldıktan sonra mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltarak etki gösterir. Bu zar değişiklikleri, mitokondri zarında bulunan sitokrom c ve AIF (Apoptoz İndükleyici Faktör) gibi faktörlerin sitoplazmaya geçişine yol açar (Lalier et al., 2007). AIF yoğunlaşmış kromatine ve parçalanmış çekirdeğe doğrudan yönlendirilirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun son aşamasında rol oynar. Sitokrom c, Apaf-1 adı verilen bir sitoplazmik protein ile etkileşime girerek prokaspaz-9'un aktivasyonunu sağlar. Oluşan bu kompleks "apoptozom" olarak adlandırılır. Prokaspaz-9'un aktifleşmesiyle bir dizi kaspaz aktivasyonu gerçekleşir ve apoptozun düzenlenmesi devam eder (Pena-Blanco & Garcia-Saez, 2018).

2.12.3. Kaspaz-3

Kaspazlar, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sürecinin önemli araçlarıdır. Kaspaz-3, birçok önemli hücre proteinin özel bölünmesini katalizleyen, sık aktive olan bir ölüm proteazıdır. Ancak bu (veya herhangi bir) kaspazın apoptozdaki spesifik gereksinimleri hala tam olarak bilinmemektedir. Kaspaz-3 aktivasyonu, mitokondriyal sitokrom-c salınımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağımlı veya bağımsız olarak tanımlanmıştır. Kaspaz-3, diğer apoptotik senaryolarda doku, hücre tipi veya ölüm uyarısı için özellikle önemli veya temel bir rol oynar. Apoptoz için kritik bir gereklilik olan apoptotik kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması, çalışılan tüm hücre tiplerinde kaspaz-3'e bağımlıdır. Bu nedenle, kaspaz-3 hücre lizisi ve apoptotik cisimlerin oluşumu için önemlidir, ancak hücrenin canlılığının kaybından önce veya öncesinde de işlev görebilir (Jiang et al., 2020; O'Brien & Kirby, 2008; Pu et al., 2017).

2.13. NF- κ B

NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B), hücre içindeki bir protein kompleksidir ve bağışıklık sistemi hücrelerinin enfeksiyonlara, yaralanmalara ve diğer çeşitli streslere yanıt vermesinde önemli bir rol oynar. NF- κ B, hücre çekirdeğindeki DNA'ya bağlanabilen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu faktörün etkinliği, hücredeki çeşitli uyarılara yanıt olarak kontrol edilir. Örneğin, NF- κ B, sitokinler, virüsler, bakteriler ve inflamatuvar moleküller gibi birçok sinyal tarafından aktive edilebilir (Habib et al., 2021).

NF- κ B, 5 alt birimden oluşan bir protein kompleksidir: p50, p52, RelA (p65), c-Rel ve RelB. Bu alt birimlerin farklı kombinasyonları, NF- κ B'nin aktivitesini ve hedef genlerin ifadesini belirler. NF- κ B'nin görevleri arasında iltihaplanma, bağışıklık yanıtı, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri düzenlemek yer alır. NF- κ B, bağışıklık sistemi hücrelerinin enfeksiyonlarla mücadele etmek ve inflamasyon gibi durumlarda bağışıklık yanıtını düzenlemek için gen ifadesini düzenleyen birçok hedef geni aktive eder (Yu et al., 2020).

Ancak, NF- κ B aşırı aktive olduğunda, oksidatif stres ve kronik inflamasyona neden olabilir, bu da birçok hastalığın patogenezinde rol oynayabilir. Bu nedenle, NF- κ B aktivasyonunu inhibe eden bazı ilaçlar ve diğer terapötik müdahaleler geliştirilmektedir. NF- κ B, bağışıklık sistemi hücrelerinde ve diğer dokularda bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. NF- κ B, hücre stresi, enfeksiyonlar ve inflamasyon gibi çeşitli uyarılar tarafından aktive edilir ve hücre ölümü, inflamasyon, bağışıklık yanıtı ve hücre büyüme ve farklılaşması gibi birçok biyolojik süreci düzenler (Hariharan et al., 2021).

Nefrotoksisite, böbrek dokusunda zararlı etkiler yaratan bir durumdur ve birçok nedeni olabilir. Nefrotoksisiteye neden olan maddeler arasında toksinler, ilaçlar ve enfeksiyonlar yer alır. Bazı çalışmalar, NF- κ B'nin nefrotoksisitenin birçok formunda rol

oynadığını göstermiştir. NF- κ B, nefrotoksisiteye neden olan çeşitli mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynar. Örneğin, NF- κ B'nin aktivasyonu, proinflamatuvar sitokinlerin (örneğin, TNF- α ve IL-1 β) salınımını artırarak inflamasyonu artırabilir. Buda, nefrotoksisiteye neden olan toksinlerin veya ilaçların böbrek dokusunda hasara neden olmasına yol açabilirler. Ayrıca, NF- κ B'nin aktivasyonu, oksidatif stresin artmasına ve apoptozun artmasına neden olabilir bu da nefrotoksisiteye katkıda bulunabilir (Albalawi et al., 2023; Ozbek et al., 2009).

NF- κ B'nin nefrotoksisiteye neden olan mekanizmaları arasında, inflamasyonun artması, oksidatif stresin artması ve apoptozun artması yer alır. NF- κ B'nin nefrotoksisitedeki rolü, NF- κ B'yi bloke eden maddelerin kullanımıyla azaltılabilir. Bu nedenle, NF- κ B blokajı, nefrotoksisitenin önlenmesinde potansiyel olarak faydalı bir stratejidir (Balaha et al., 2023).

2.14. TLR-4

TLR-4 (Toll-like receptor 4), hücre yüzeyinde bulunan bir reseptör proteindir ve bağışıklık sistemi hücrelerinin enfeksiyonlara ve hasara karşı tepkilerini düzenler. TLR-4, patojenlerin hücre yüzeyindeki bileşenlerini tanır ve bağlanır, böylece bağışıklık sistemi hücreleri enfeksiyonla mücadele etmek için uygun yanıtı verebilirler. TLR-4, aynı zamanda endotoksin olarak bilinen bakteriyel lipopolisakkaritleri (LPS) tanıyabilen bir reseptördür. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan bir moleküldür ve enfeksiyonların yanı sıra kronik inflamasyon gibi durumlarla da ilişkilendirilir (Boozari et al., 2019).

TLR-4, hücre yüzeyindeki bir transmembran proteindir. Dış yüzeydeki ekstraselüler bölgede, patojenlerin tanınmasında önemli olan lektin bağlayıcı alanları (LBD) bulunur. İç kısımda ise, sinyal transdüksiyonu için gerekli olan bir sitoplazmik bölge yer alır (Akira & Takeda, 2004).

TLR-4'ün görevleri arasında patojen tanınması, inflamasyon ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesi, doku hasarı ve enfeksiyonlara karşı savunma mekanizmalarının başlatılması yer alır. TLR-4 aktivasyonu, hücrelerdeki sitokinlerin ve diğer inflamatuvar moleküllerin salınımına neden olur ve böylece enfeksiyonlara ve diğer patolojik durumlara karşı bağışıklık sistemi hücrelerinin mobilizasyonunu ve koordinasyonunu sağlar. Ancak, TLR-4 aşırı aktive olduğunda, inflamasyon ve oksidatif stres gibi yan etkilere neden olabilir. Bu nedenle, TLR-4'ün aktivasyonunu inhibe eden bazı ilaçlar ve diğer terapötik müdahaleler geliştirilmektedir (Wang et al., 2019).

TLR-4'ün nefrotoksisitenin birçok formunda rol oynadığını göster çalışmada. LPS'nin TLR-4'ün doğal ligandı olduğu ve böbrek dokusunda TLR-4'ü aktive etmesi sonucu nefrotoksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir (Nair et al., 2014). Bazı ilaçların (aminoglikozid antibiyotikler), TLR-4'ü aktive ederek nefrotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Pakfetrat et al., 2022). Benzer şekilde, bazı kanser kemoterapi ilaçlarının da TLR-4'ü aktive ederek nefrotoksisiteye neden olduğuna dair çalışma mevcuttur (Gonzalez-Guerrero et al., 2017).

TLR-4'ün nefrotoksisiteye neden olan mekanizmaları arasında, inflamasyonun artması, oksidatif stresin artması ve apoptozun (programlanmış hücre ölümü) artması yer alır. TLR-4'ün nefrotoksisiteye neden olan etkileri, TLR-4'ün antagonisti olarak bilinen maddelerle bloke edilebilir. Bu nedenle, TLR-4 antagonizmi, nefrotoksisite tedavisinde potansiyel olarak faydalı bir stratejidir (Mohammed & Safwat, 2020).

2.15. HO-1

HO-1 (Heme Oksijenaz-1), hücrelerde bulunan bir enzimdir ve hücrelerin oksidatif stres, inflamasyon ve diğer stres faktörlerine karşı korunmasında önemli bir rol oynar. HO-1, hücrelerin hemoglobin, miyogloblin ve diğer heme içeren proteinlerin parçalanması yoluyla heme gruplarını serbest bırakmasını sağlayan bir enzimdir. Bu

serbest heme grupları, oksidatif stres ve inflamasyon gibi durumlarda hücrelere zarar verebilir. HO-1, serbest heme gruplarını oksijen ve karbon monoksit (CO) ile reaksiyona sokarak, heme grubunu çözünür bir bileşik olan biliverdin ve aynı zamanda sitokrom P450 enzim sistemi için bir substrat olan Fe^{2+} ye dönüştürür. Bu dönüşüm, heme gruplarından kaynaklanan toksik etkileri önler ve aynı zamanda hücrelerin antioksidan kapasitesini artırır (J. Zhang et al., 2021; Q. Zhang et al., 2021).

HO-1, oksidatif stres, inflamasyon, hipoksi, iskemi, yüksek kan basıncı, ağır metaller, UV ışınları, kanser ve diğer stres faktörleriyle karşı karşıya kalan hücrelerde yükselir. HO-1 ayrıca, hücrelerin apoptoz ve inflamasyonu kontrol etmek için sinyal yollarına müdahale eder (Fernandez-Mendivil et al., 2021).

HO-1'nin yapısı, diğer heme oksijenaz enzimleriyle benzerdir ve aynı katalitik etkiyi gösterir. HO-1, hücrelerin sitoplazmasında bulunur ve 288 amino asit uzunluğunda bir proteindir. HO-1 geni, insanlarda 22. kromozomda bulunur ve birden fazla promotörü vardır. HO-1, oksidatif stres ve diğer stres faktörlerine karşı hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, HO-1 aktivitesini artıran ilaçlar ve diğer terapötik müdahaleler, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili birçok hastalığın tedavisinde potansiyel olarak faydalı olabilir (Albarakati et al., 2020).

HO-1'in nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, birkaç mekanizma aracılığıyla gerçekleşir. HO-1'in antioksidan etkisi, oksidatif stresin azaltılmasına yardımcı olur ve böylece hücre hasarını önler. Ayrıca HO-1, inflamasyonu azaltarak ve anti-apoptotik etki göstererek nefrotoksisiteye karşı koruma sağlayabilir. HO-1'in nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkisi, hücrelerin toksik heme moleküllerinden arındırılmasına da bağlıdır. Toksik heme molekülleri, hücrelerde oksidatif stresi artırarak hücre hasarına neden olur. HO-1'in toksik heme moleküllerinin parçalanmasına yardımcı olması, oksidatif stresin azaltılmasına ve böylece hücre hasarının önlenmesine katkıda bulunur (Cai et al., 2022).

2.16. Nrf-2

Nrf-2 (Nükleer faktör eritroid türevli 2 benzeri 2), hücrelerde bulunan bir transkripsiyon faktörüdür ve antioksidan yanıt yoluyla oksidatif stresle mücadelede önemli bir rol oynar (Saha et al., 2020).

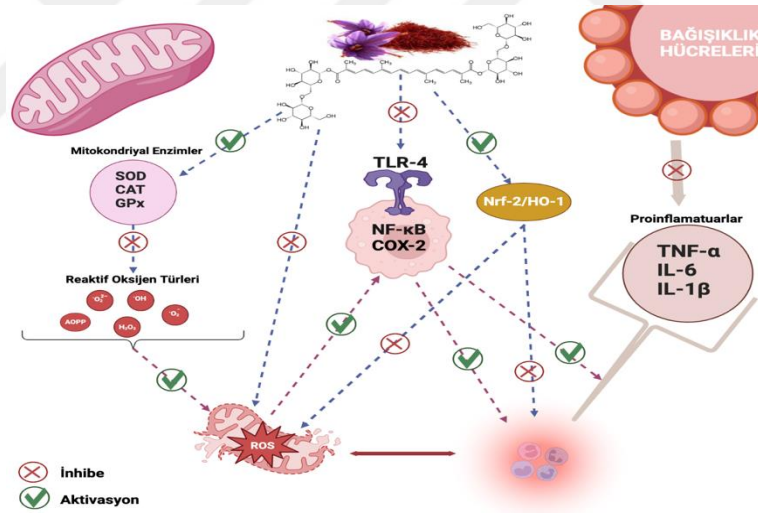
Nrf-2, hücrenin sitoplazmasında bulunur ve hücre içindeki reaktif ROS artması durumunda aktive olur. Aktif Nrf-2, nükleusa göç eder ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır. Bu hedef genler arasında antioksidan enzimler (örneğin glutatyon S-transferaz, süperoksit dismutaz, katalaz), hücre siklusu regülatörleri ve diğer stres yanıtı genleri yer alır (Hu et al., 2021).

Nrf-2, hücrenin antioksidan kapasitesini artırarak, hücreleri ROS'ların zararlı etkilerinden korumaya yardımcı olur. Nrf-2 ayrıca, inflamasyon, oksidatif stres, toksik maddeler ve diğer stres faktörleriyle ilişkili birçok hastalıkta da koruyucu bir rol oynar. Bu hastalıklar arasında kanser, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer oksidatif stresle ilişkili hastalıklar yer alır. Nrf-2, hücre içinde oksidatif stres düzeylerini algılayan bir sensördür ve ROS seviyeleri arttığında Nrf-2 artar. Aktif Nrf-2, hücrenin antioksidan kapasitesini artırarak, ROS'ların zararlı etkilerinden korur. Nrf-2'nin yapısı, bZIP (basic leucine zipper) bir transkripsiyon faktörüdür ve insanlarda Nrf-2 geni 2. kromozomda bulunur (Chowdhury et al., 2022).

Nrf-2, hücrelerin oksidatif stres ve diğer stres faktörlerine karşı korunmasında önemli bir rol oynar. Bu nedenle, Nrf-2'yi artıran ilaçlar ve diğer terapötik müdahaleler, oksidatif stres ve inflamasyonla ilişkili birçok hastalığın tedavisinde potansiyel olarak faydalı olabilir. Ancak, Nrf-2'nin aşırı aktivasyonu, kanser hücrelerinin hayatta kalma ve çoğalma yeteneğini artırabilir. Bu nedenle, Nrf-2 aktivitesinin dengelenmesi, tedavi stratejilerinde önemlidir. Nrf-2, çeşitli nefrotoksik ajanlara karşı koruyucu bir rol oynayabilir. Örneğin, bir çalışmada, toksik bir kimyasal olan klordekon ile tedavi edilen

farelerde Nrf-2 aktivasyonu, böbrek hasarını önlediği ve böbrek fonksiyonlarını koruduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde, diğer çalışmalar, böbrek hasarına neden olan diğer nefrotoksik maddelerin (örneğin, kadmiyum, sodyum florür, arsenik) neden olduğu oksidatif stresin önlemede Nrf-2'nin etkili olduğunu göstermektedir (Saha et al., 2020).

Nrf-2'nin rolü karmaşıktır ve aşırı aktivasyonu da bazı durumlarda (kansere türlerinin gelişiminde) zararlı olabilir. Ayrıca, Nrf-2 aktivasyonu, bazı enfeksiyonların (Listeria enfeksiyonu) ilerlemesine yardımcı olabilir (Huang et al., 2015). Bu nedenle, Nrf-2'nin böbrek toksisitesi ile ilgili rolü tam olarak anlaşılmamaktadır fakat Nrf-2'nin böbrek hasarını önlemede potansiyel role sahip olduğu düşünülmektedir (Gupta et al., 2021).



Şekil 2.4. Crosinin yollar üzerindeki etkileri

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

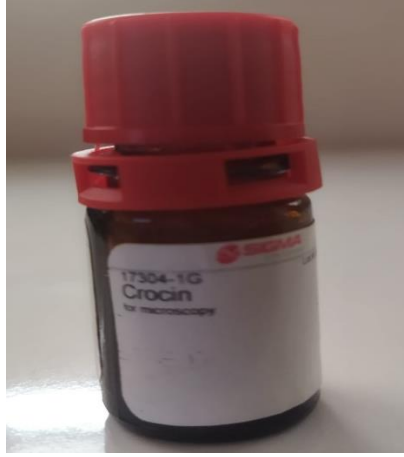
3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmada Mettler Toledo pH metre (B5106796777, China), Hettich Universal 32 R soğutmalı santrifüj (D-78532, Germany), Heidolph magnetik karıştırıcısı (MR 3001, Germany), Ika mini shaker (MS2 S9, Germany), Heidolph shaker (Rotamax 120, Germany), BİORAD jel yürütme cihazı (Type T, Singapore), QIAGEN Rotor-Gene Q (Rotor Gene Q, Germany), Biotek Epoch (254776, U.S.A.), Biotek Elisa Plate Yıkayıcı (ELx50, U.S.A.), Biotek Elisa Okuyucu (μ Quant MQX200 Elisa reader, U.S.A.), MMM Ecocell 55 Etüv (Ecocell 55, Germany), Thermo Blotlama cihazı (Model:22838, China), BİORAD Gel Doc XR görüntüleme cihazı (170815, U.S.A.), Qiagen TissueLyser II (40717, Germany), Qiagen TissueLyser LT (23.1001/06282, Germany), ESCO UV-Kabin (AC2-4E8, Singapore), Shimadzu hassas terazi (ATX224, JAPAN), GFL 2012 distile su cihazı (2001/2, Germany), GFL su banyosu (1083, Germany) kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Gentamisin: Böbrek toksisitesi oluşturmak için çalışmada kullanılan Gm ticarı olarak (Gentadur %10, Bavet İlaç San., İstanbul, Türkiye) satın alınarak 80 mg/kg/gün i.p. olarak 8 gün uygulandı (Şekil 3.1.). Uygulanan doz daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak belirlendi (Apaydin Yildirim et al., 2017).

Crosin: Cr'nin (Katalog No: 17304, Sigma-Aldrich, ABD), 25 mg ve 50 mg'lık dozları FTS ile çözdürülerek i.p. olarak 8 gün uygulandı (Şekil 3.1.). Uygulanan dozlar yapılan çalışmalar referans alınarak belirlendi (Razavi et al., 2014).



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan crosin ve gentamisin

3.1.3. Hayvan Materyali

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından sağlanan ratlar için 30.06.2022 tarihli ve E-7296309-050.01.04-2200200421 sayılı etik kurul belgesi alınmıştır. Çalışma için 250-300 g 36 adet 9-10 haftalık Sprague-Dawley erkek rat kullanılmıştır. Ratlar %55±5 nem, 22±2 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık/karanlık ortamda standart rat yemi ve musluk suyu ad libitum olarak verilerek 7 gün boyunca ortama adaptasyonları sağlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Deneysel Uygulamalar

Ratlar her grupta 6 rat olacak şekilde rastgele seçilip tartılarak, ortalama ağırlıkları eşitlenerek 6 gruba ayrıldı. Oluşturulan gruplar;

- 1. Grup (K):** Ratlara 8 gün boyunca her gün 0.5 mL % 0.9 serum fizyolojik (FTS) çözeltisi i.p. olarak uygulandı.
- 2. Grup (Cr 25 mg/kg):** Ratlara 8 gün boyunca 0.5 mL 25 mg/kg/vücut ağırlığı dozda crosin i.p. olarak uygulandı.

3. **Grup (Cr 50 mg/kg):** Ratlara 8 gün boyunca 0.5 mL 50 mg/kg/vücut ağırlığı dozda crosin i.p. olarak uygulandı.
4. **Grup (Gm 80 mg/kg):** Ratlara nefrotoksisite oluşturmak için 8 gün boyunca gentamisin 0.5 mL 80 mg/kg/vücut ağırlığı i.p. olarak uygulandı.
5. **Grup (Gm+Cr 25 mg/kg):** Ratlara 8 gün boyunca 80 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda gentamisin 0.5 mL i.p. olarak verildikten 30 dk sonra crosin 25 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda 0.5 mL i.p. olarak uygulandı (Şekil 3.2.).
6. **Grup (Gm+Cr 50 mg/kg):** Ratlara 8 gün boyunca 80 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda gentamisin 0.5 mL i.p. olarak verildikten 30 dk sonra crosin 50 mg/kg/vücut ağırlığı dozunda 0.5 mL i.p. olarak uygulandı.



Şekil 3.2. Crosinin ve gentamisinin i.p. uygulaması

3.2.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Deney sonunda (9. gün) tüm gruptaki ratlara 8 mg/kg ksilazin (Rompun %2, Bayer, Türkiye) ve 60 mg/kg ketamin (Ketasol, Interhas, Türkiye) anestezikleri kas içi uygulandı. Anestezi altındaki ratlara dekapitasyon işlemi uygulanarak kan ve böbrek dokuları alındı. Alınan kanlar lityum heparinli tüplere aktararak yavaş bir şekilde alt üst

edildi. Soğutmalı santrifüjde 4000 rpm’de 10 dk +4 °C’de santrifüj edilerek plazmalar ayrılarak biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

Alınan böbrek doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkandı ve beyaz bir zemin üzerinde böbrek görüntüleri alındı (Şekil 3.3.). Daha sonra böbreklerden biri biyokimyasal analizler yapılncaya kadar -20 °C’de deep freeze’de saklandı.



Şekil 3.3. Böbreklerin makroskobik görüntüsü

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal parametreler için böbrek dokuları sıvı azot ile Qiagen TissueLyser II cihazı kullanılarak toz haline getirildi. Toz haline getirilen böbrek dokuları gerekli miktarda tartılarak analizlere göre uygun tampon çözeltiler ile sulandırıldı. Analizlerde belirtilen g’de ve sürede santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. GPx ve SOD aktiviteleri için böbrek dokusunda protein düzeyleri ölçüldü (Lowry et al., 1951).

3.2.3.1. Tam Kandan Böbrek Fonksiyon Parametrelerinin Tayini

Ratlardan alınan kan örneklerinin bir kısmı EDTA’lı tüpe alınarak böbrek fonksiyon testeri için kullanıldı. LYSUN marka böbrek fonksiyon ölçüm cihazı (Hangzhou Medasia Trading, China) kullanıldı (Şekil 3.4.). Cihaza otomatik pipet ile 35

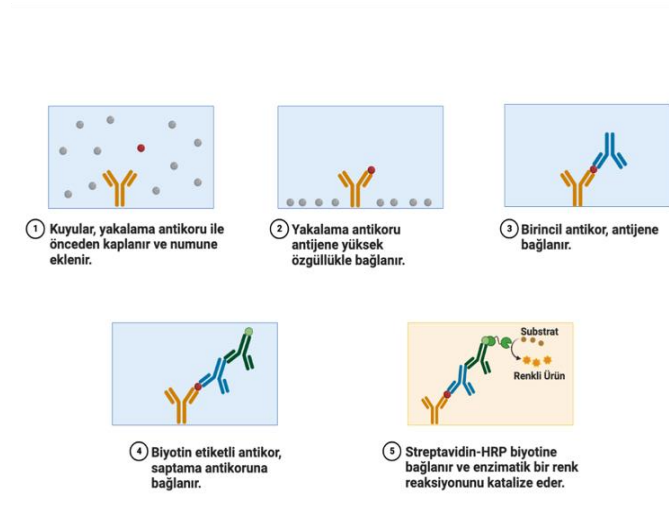
μ L kan damlatıldı. 3 ile 5 dakika arasında ürük ait , kreatinin ve üre düzeyleri ölçülerek kaydedildi.



Şekil 3.4. LYSUN böbrek fonksiyon testleri ölçüm cihazı

3.2.3.2 Sitokin Düzeylerinin ve TLR-4'ün Ölçülmesi

TLR-4, IL-6, IL-1 β ve TNF- α düzeylerine ticari olarak satın alınan sandwich ELISA kitinde (Cat. No: 201-11-0081, Shanghai SunRed Biological Technology Co., Ltd., Çin) belirtilen protokol uygulanarak ölçümler yapıldı (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. Sandwich ELISA metodu prensibi

- **TLR-4 Ölçümü**

TLR-4 analiz kitinden çıkan çözeltiler ve malzemeler:

- 0.5 mL Standart (24 ng/mL)
- 3 mL Standart dilisyon
- 1 mL Biotin TLR-4 ab
- 6 mL Kromojen A solüsyonu
- 6 mL Kromojen B solüsyonu
- 6 mL Stop solüsyonu
- 6 mL Str-HRP Reagent
- 20 mL Yıkama solüsyonu
- Microelisa strip plate (12 wellx8 strips)

TLR-4 tayini Rat TLR-4 ELISA ticari kitinde (Cat. No: 201-11-0081, Shanghai SunRed Biological Technology Co., Ltd., Çin) belirtilen protokole uygun olarak yapıldı. Biotek ELISA Reader cihazı ile 450 nm’de absorbanlar okundu.

TLR-4 analizi için çift antikorlu sandwich ELISA kiti kullanıldı. Numuneler antikor kaplı pleyte 40 µL miktarında yüklendi. Üzerine TLR-4 monoklonal antikor eklenildi. Daha sonra Streptavidin-HRP konjugat eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birleştirilmemiş enzimi uzaklaştırmak için yıkama tampon ile yıkama yapıldı. Daha sonra Kromojen A solüsyonu ve kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C’de 10 dakika inkübe edilerek pleyt kuyucuklarının rengi maviye dönüştü. Asit özellikteki stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve sarı renk oluştu. Yüklenen örneklerin konsantrasyonu ve renk kroması örneklerin TLR-4 ile pozitif korelasyonunu gösterdi.

- **IL-6 Ölçümü**

IL-6 analiz kitinden çıkan çözeltiler ve malzemeler:

- 0.5 mL Standart (24 ng/mL)
- 3 mL Standart dilisyon
- 1 mL Biotin IL-6 ab
- 6 mL Kromojen A solüsyonu
- 6 mL Kromojen B solüsyonu
- 6 mL Stop solüsyonu
- 6 mL Str-HRP Reagent
- 20 mL Yıkama solüsyonu
- Microelisa strip plate (12 wellx8 strips)

IL-6 tayini Rat IL-6 ELISA ticari kitinde (Cat. No: 201-11-0136, Shanghai SunRed Biological Technology Co., Ltd., Çin) belirtilen protokole uygun olarak yapıldı. Biotek ELISA Reader cihazı ile 450 nm’de absorbanlar okundu.

IL-6 analizi için çift antikorlu sandwich ELISA kiti kullanıldı. Numuneler antikor kaplı pleyte 40 µL miktarında yüklendi. Üzerine 10 µL IL-6 monoklonal antikor eklenildi. Daha sonra Streptavidin-HRP konjugat eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birleştirilmemiş enzimi uzaklaştırmak için yıkama tampon ile yıkama yapıldı. Daha sonra Kromojen A solüsyonu ve kromojen B solüsyonu eklendi ve 37°C’de, 10 dakika inkübe edilerek pleyt kuyucuklarının rengi maviye dönüştü. Asit özellikteki stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluştu. Yüklenen örneklerin konsantrasyonu ve renk kroması örneklerin IL-6 ile pozitif korelasyonunu gösterdi.

• IL-1β Ölçümü

IL-1β analiz kitinden çıkan çözeltiler ve malzemeler:

- 0.5 mL Standart (24 ng/mL)

- 3 mL Standart dilisyon
- 1 mL Biotin IL-1 β ab
- 6 mL Kromojen A solüsyonu
- 6 mL Kromojen B solüsyonu
- 6 mL Stop solüsyonu
- 6 mL Str-HRP Reagent
- 20 mL Yıkama solüsyonu
- Microelisa strip plate (12 wellx8 strips)

IL-1 β tayini Rat IL-1 β ELISA ticari kitinde (Cat. No: 201-11-0120, Shanghai SunRed Biological Technology Co., Ltd., Çin) belirtilen protokole uygun olarak yapıldı. Biotek ELISA Reader cihazı ile 450 nm’de absorbanslar okundu.

IL-1 β analizi için çift antikorlu sandwich ELISA kiti kullanıldı. Numuneler antikor kaplı pleyte 40 μ L miktarında yüklendi. Üzerine 10 μ L IL-1 β monoklonal antikor eklenildi. Daha sonra Streptavidin-HRP konjugat eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birleştirilmemiş enzimi uzaklaştırmak için yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. Daha sonra Kromojen A solüsyonu ve kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C’de, 10 dakika inkübe edilerek pleyt kuyucuklarının rengi maviye dönüştü. Asit özellikteki stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluştu. Yüklenen örneklerin konsantrasyonu ve renk kroması örneklerin IL-1 β ile pozitif korelasyonunu gösterdi.

• TNF- α Ölçümü

TNF- α analiz kitinden çıkan çözeltiler ve malzemeler:

- 0.5 mL Standart (24 ng/mL)
- 3 mL Standart dilisyon
- 1 mL Biotin TNF- α ab

- 6 mL Kromojen A solüsyonu
- 6 mL Kromojen B solüsyonu
- 6 mL Stop solüsyonu
- 6 mL Str-HRP Reagent
- 20 mL Yıkama solüsyonu
- Microelisa strip plate (12 wellx8 strips)

TNF- α tayini Rat TNF- α ELISA ticari kitinde (Cat. No: 201-11-0765, Shanghai SunRed Biological Technology Co., Ltd., Çin) belirtilen protokole uygun olarak yapıldı. Biotek ELISA Reader cihazı ile 450 nm’de absorbanslar okundu.

TNF- α analizi için çift antikorlu sandwich ELISA kiti kullanıldı. Numuneler antikor kaplı pleyte 40 μ L miktarında yüklendi. Üzerine 10 μ L TNF- α monoklonal antikoru eklendi. Daha sonra Streptavidin-HRP konjugatı eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda birleştirilmemiş enzimi uzaklaştırmak için yıkama tamponu ile yıkama yapıldı. Daha sonra Kromojen A solüsyonu ve kromojen B solüsyonu eklendi ve 37 °C’de, 10 dakika inkübe edilerek pleyt kuyucuklarının rengi maviye dönüştü. Asit özellikteki stop solüsyonu eklenerek sarı renk oluştu. Yüklenen örneklerin konsantrasyonu ve renk kroması örneklerin TNF- α ile pozitif korelasyonunu gösterdi.

3.2.3.3. Plazmada MDA Tayini:

Hazırlanan Solüsyonlar ve kimyasallar:

- n-bütanol
- % 20 Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi
- TBA çözeltisi (% 0.67)

Deneyin prensibi: Tiyoarbutirik asit ile düşük pH’da bir MDA molekülü ve iki TBA molekülünün tepkimeye girmesi ile oluşan kromojenden dolayı kırmızı-pembe renk

elde edilir ve 535 nm’de absorbans değerleri alınır. MDA’nın bir kısmı peroksidasyon sırasında oluşur. Geri kalan büyük kısım ise ısıtma ve ortamın asitleştirilmesi sonucu peroksidlerin yakılması ile oluşur (Yoshioka et al., 1979).

Deneyin Yapılışı: rnek tüplerine 0.5 mL plazma eklendi. zerine 2.5 mL %20’lik TCA konuldu. Kr olarak belirlenen tüpe ise 3 mL %20’lik TCA eklendi. Hem rnek tüplerine hem de kr tüpüne 1 mL TBA zeltisi eklendi. 30 dakika boyunca su banyosunda inkübe edildi. Inkübasyon sonunda hızlı soğuması için buzlu su içerisine alınıp soğutuldu. Bütün tüplere 4 mL n-bütanol eklendi ve karıştırıldı. 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar alınıp 535 nm’de absorbanslar okundu. Etil alkolde çözünmüş 1.1.3.3-tetraetoksipropan (2.5- 5-10 ve 20 μ mol/L) kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilerek standart eğriden plazmadaki MDA miktarı hesaplandı.

3.2.3.4. Plazmada GSH Tayini:

Hazırlanan Solüsyonlar ve Kimyasallar:

- % 10’luk TCA
- Tris-HCl tamponu (pH: 8.9) (lm Tamponu)
- DTNB (5,5-ditiyobis-2- nitrobenzoik asit) zeltisi

Stok GSH zeltisi: 1 mM stok GSH zeltisi hazırlandı. Bu stok zeltiden 5 μ M-100 μ M arasında seyreltmeler yapılarak standart çözeltiler hazırlandı.

Tietze metodu ile plazma glutatyon tayini yapıldı. Yönteme göre plazma ile eşit ilave edilen TCA zeltisi ile porteinsizleştirilmiş numunelerdeki glutatyonun hem primer amino grubu hem de sülfhidril grubu DTNB ile şiddetli kolorimetrik yapılar oluşturur. Oluşan bu yapılar 412 nm’de spektrofotometrik olarak okunur (Tablo 3.1.) (Tietze, 1969).

Tablo 3.1. Plazmada GSH tayini

Çözelti/Numune	Kör	Örnek	Standart
dH ₂ O	100 µL	-	-
Plazma	-	100 µL	-
GSH	-	-	100 µL
400 mM Tris-HCl	300 µL	300 µL	300 µL
DTNB	20 µL	20 µL	20 µL
	1580 µL	1580 µL	1580 µL
Methanol			

Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilerek absorbanlar 412 nm’de okundu.

Hesaplama: Standart grafiği kullanılarak okunan absorbas değerleri ile karşılaştırılarak plazma glutatyon miktarı µM olarak hesaplandı.

3.2.3.5. Plazma AOPP tayini:

Prensibi: AOPP ölçümü Witko-Tarsat ve ark. metoduna göre yapıldı. Bu yöntemle göre; AOPP oluşumu klorine oksidanların (kloraminler ve hipokloröz asit gibi) oluşumu ile indüklenmektedir. Bu sebeple konsantrasyonu da bunlara korele olarak değişir. AOPP konsantrasyonu ölçümünde bu ilişki nedeni ile Chloramine-T standart olarak kullanıldı (Renault et al., 2006).

Reaktifler:

Asetik Asit: % 96, v/v olacak şekilde hazırlandı.

Potasyum İyodür (KI): 1.16 mol/L olacak şekilde hesaplandı ve PBS (20mmol/L, pH:7.4) ile 1 litreye tamamlandı.

PBS (20 mmol/L, pH:7.4) hazırlanması: Na₂HPO₄’den 5.796 gr, KH₂PO₄’den 0.52 gr ve NaCl’den 8.71 gr tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

10 µl plazma/Chloramine-T standart sol. tüplere aktararak üzerlerine 160 µL PBS eklenip karıştırılarak 25 sn inkübe edildi. 20 µl %96’lık asetik asit eklenip 25 sn inkübe

edildikten sonra üzerlerine 10 µl KI ilave edilerek 25 sn inkübe edildi. Blank ise 160 µl PBS+20 µl asetik asit+10 µl KI'dan oluştu. Reaksiyon karışımının absorbanı blank'e karşı 340 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Ölçülen AOPP konsantrasyonları Chloramine-T ünitesi ile µmol/L olarak ifade edildi.

3.2.3.6. Plazma ve Böbrek Dokusunda Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Aktivitesinin Ölçümü:

Kullanılan çözeltiler:

- **Red GSH Solüsyonu:** 6 mg Red Glutasyon alınarak hacim tampon I ile 10 mL'ye tamamlandı.
- **DTNB Solüsyonu:** 0.099 gr DTNB alınıp hacim metanolle 25 mL'ye tamamlandı
- **TCA:** % 10'luk TCA çözeltisi hazırlandı.
- **TAMPON I-Tris-HCl tamponu (50mM pH:7.6):** 6.057 g Trishidroksi metilaminometan ve 0.372 gr EDTA-Na₂ ve 3.90 mL hidroklorik asit alınıp toplam hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.
- **TAMPON II- Tris tamponu (0.4M pH: 8.9):** 48.46 g Trishidroksi metilaminometan alınarak hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı ve pH HCl ile 8.9'a ayarlandı.
- **CHPO:** 5µL alınarak tampon I ile 10mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Bir örnek birde kontrol tüpü her numune için hazırlandı.

Tüplere 0.1 mL kan (0.5 mL süpernatant) konularak üzerlerine 0.7 mL Tris-HCl tamponu ilave edildi (dokuda 0.3 mL). Örnek tüplerine 0.1 mL CHPO konuldu. Beşer saniye aralıklarla örnek ve kontrol tüplerine 0.1 mL Red. GSH eklenerek 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. 1 mL TCA solüsyonu beşer saniye aralıklarla eklendikten sonra 5 dakika inkübe edilerek 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve ardından yeni tüplere

1mL süpernatantlar aktarıldı. Tampon II 2 mL ve 0.1 mL DTNB eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilerek 412 nm’de ölçümler yapıldı (Matkovics, 1988).

Hesaplama: (E Kontrol- E Örnek) x Ekstinksiyon katsayısı/mg protein

Ekstinksiyon katsayısı: 0.76989

3.2.3.7. Plazma ve Böbrek Dokusunda Katalaz Aktivitesinin Ölçümü:

Katalaz tayininde H₂O₂ ile numunelerin inkübe edilmesinden sonra ortamda kalan hidrojen peroksitin amonyum molibdatla stabil bir kompleks oluşturması ve bunun spektrofotometrik ölçümü temeline dayanan bir metottur.

Fosfat tamponu ile 20 kat dilue edilmiş plazmanın 0.2 mL’si, 1 mL substrat (60 µmol/L, pH: 7.4 sodyum potasyum fosfat tamponu içinde 65 mmol/mL H₂O₂) ile 37 °C’de 60 sn inkübe edildi. Enzimatik reaksiyon 1 mL amonyum molibdat (32.4 mmol/L) eklenerek durduruldu ve hidrojen peroksidin molibdatla oluşturduğu sarı renkli kompleksin absorbansı 405 nm’de köre karşı spektrofotometrede ölçülerek A numune’nin absorbans değeri elde edildi. A kör 1’in absorbans değeri 1 mL substrat, 1mL molibdat ve 0.2 mL plazmanın ilave edilmesi sonucu elde edilerek aşağıdaki formüle göre sonuçlar hesaplandı (Goth, 1991).

Katalaz aktivite hesabı (kU/L) = ((A kör1 –A numune) / (A kör2-A kör3)) x 271

3.2.3.8. Plazma ve Böbrek Dokusunda SOD Aktivitesinin Ölçümü:

Kullanılan çözeltiler:

- **Ölçüm Karışımı:** 0.3 mM Ksantin, 0.6 mM EDTA-150 µM NBT, 0.4 M Na₂CO₃; 1.2 g/L BSA (Bovin Serum Albumin)
- **SOD enziminin aktivitesini ölçmek için kullanılan çözelti (167 U/L Xanthine oksidaz):** Hazır olarak temin edilen (1 mL’inde 32 mg protein ve 0.3 U enzim

ihativa eden) enzimden 70 µL alındı ve üzerine 4 ml soğuk 2 M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ilave edildi.

○ **2M (NH₄)₂SO₄ (Amonyum sülfat):** 1.0571 g (NH₄)₂SO₄ alındı, bir miktar distile suda çözöldü ve hacmi saf soğuk su ile 4 mL' ye tamamlandı. Bu çözelti taze olarak hazırlandı ve +4°C'de bekletilerek soğuk bir şekilde kullanıldı.

○ **0.8 mM CuCl₂ (Bakır klorür):** 0.0136 g CuCl₂ alındı, bir miktar saf suda çözölüp hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Prensibi: Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik asite dönüştürölüğünde oluşan süperoksit radikalleri, ortamda NBT'nin (nitrobluetetrazolium) varlığında NBT ile reaksiyona girerek 560 nm dalga boyunda, maksimum absorbans veren formazon bileşğini meydana getirirler. Eğer ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikalleri bu enzim tarafından H₂O₂'ye dönüştürölüğü için formazon oluşumu azalır ve buna bağılı olarak 560 nm'de ölçölen absorbans azalır. Absorbanstaki azalmanın miktarı SOD aktivitesi ile ilgili bilgi verecektir.

SOD' un ölçümü ve aktivitesinin belirlenmesi oluşan formazon miktarları dikkate alınarak geliştirilen formülle hesaplandı (Sun et al., 1988).

Deneyin Yapılışı: 25 g böbrek dokusu tartıldı ve homojenat tamponu ile hacmi 2.5 mL'ye tamamlanarak TissueLyser II ile 45 sn homojenize edildi. 5000 g'de 60dakika santrifölj edildi ve süpernatantlar ayrı bir tüpe alındı. Boş deney tüplerine 2.85 mL ölçüm tamponu ilave edildi. Örnek tüplerine 100 µL hazırlanan supernatant/sulandırılmış plazma eklenirken kör tüpüne 100 µL distile su eklendi. 50 µL Xanthine Oxidase tüm tüplere eklendikten sonra 25°C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra tüm tüplere 1 mL CuCl₂ ilave edilip, 560 nm'de çözeltisine karşı okundu.

$$\text{Hesaplama (EU/mg doku)} = (\Delta \text{Akör} - \Delta \text{Anumune}) / \Delta \text{Akör}$$

$$(\text{U/mL plazma}) = (\Delta \text{Akör} - \Delta \text{Anumune}) / \Delta \text{Akör}$$

3.2.3.9. Böbrek Dokusunda MDA Tayini:

Kullanılan çözeltiler ve Kimyasalar:

-Renk ayracı: % 10'luk TCA ile perklorik asitle karıştırıldı ve TBA bu solüsyonla çözdürüldü.

-Homojenat Tamponu: 0.2 mM, pH 7.4 olan, 150 mL Tris-HCl.

Deneyin Yapılışı: Tiyobarbitirik asit ile düşük pH'da bir MDA molekülü ve iki TBA molekülünün tepkimeye girmesi ile oluşan kromojenden dolayı kırmızı-pembe renk elde edilir ve 535 nm'de absorbans değerleri alınır. MDA'nın bir kısmı peroksidasyon sırasında oluşur. Geri kalan büyük kısım ise ısıtma ve ortamın asitleştirilmesi sonucu peroksidlerin yakılması ile oluşur.

10 mL etanol alındı ve üzerine 10 µL 1.1.3.3 tetraethoxypropane eklendi ve çözdürüldü. +4 °C'de koyu bir şişede saklandı. Daha sonra standart kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve nmol/g olarak hesaplama yapıldı (Tablo 3.2.) (Placer et al., 1966).

Tablo 3.2. Dokuda MDA tayini

Çözelti/Numune	Test	Kör
FTS (fizyolojik tuzlu su)	-	250 µL
Örnek	250 µL	-
Renk ayracı	2250 µL	2250 µL

Vortekslendi.

100 °C'de 20 dakika inkübe edildi.

1008 g' 10 dk santrifüj edildi.

532 nm'de okundu.

3.2.3.10. Böbrek Dokusunda GSH tayini

Deneyin Yapılışı: GSH'ın doku analizi için 0.5 g doku tartıldı. Doku üzerine 5 mL % 5'lik sülfosalisilik asit çözeltisi eklenerek dokular TissueLyser II homojenize

edildi. Homojenat 4500 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatanttan 1 mL alınarak yeni tüplere aktarıldı. Ardından 5 mL fosfat tamponu eklenerek 60 °C’de 10 dakika bekletildi. Daha sonra oda ısısına getirildi ve 1 mL DTNB çözeltisi eklendi. 412 nm’de ayraç körüne karşı absorbans okundu. Glutasyon hesaplaması ($\mu\text{mol GSH/g doku}$), glutasyon standardı (% 5 sülfosalisilik asit) ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplandı (Ball, 1966; Fernandez & Videla, 1981).

Hesaplama (mmol/g) = $((\text{OD}_{\text{numune}} - \text{OD}_{\text{kör}}) \times \text{Ekstinksiyon kat sayısı} - \text{OD}_{\text{std}}) / f$
 f: Sulandırma katsayısı

3.2.3.11. Plazma ve Böbrek Dokusunda Nitrit Tayini:

Analizde kullanılan çözeltiler: Coupling ayırıcı ve distile sudan oluşur.

-Coupling ayırıcı: 300 mL distile su, 100 mL fosforik asit, 40 g sülfanilamid, 2 g N-(1-naftil) etilen diamin hidroklorid alınarak karışım 1 litreye distile su ile tamamlanır (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Nitrat tayini

Çözelti/Numune	Test	Kör
Numune	100 μL	--
Distile su	--	100 μL
3 mL distile su		
Vortekslenir ve üzerine 1 mL Coupling		
Vortekslenir, 10 dk beklenir ve 520 nm’de köre karşı okunur.		

Nitrit standartı olarak (100ppm) stok sodyum nitritten (koruyucu olarak % 0.1 kloroform kondu.) 0.5, 1.0, 3.0, 6.0, 10.0, 20.0 ppm standart solüsyonlar çift distilesuyla hazırlandı. Standart eğriden nitrit düzeyi ölçüldü (Oehme, 1977).

3.2.3.12. Plazma ve Böbrek Dokusunda Nitrat Tayini

Analizde kullanılan çözeltiler:

-**CuSO₄ (Bakır (II) sülfat):** 0.0025 g alınarak 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.

-**Hidrazin Sülfat:** 0.05 g hidrazin sülfat alınır, 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.

-**NaOH (Sodyum hidroksit):** 0.4 g NaOH alınıp 50 mL'ye distile su ile tamamlanır.

-**Coupling ayracı:** 300 mL distile su, 100 mL fosforik asit, 40 g sülfanilamid, 2g N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorid alınarak karışım 1 litreye distile su ile tamamlanır (Tablo 3.4.)

Tablo 3.4. Nitrit analizinin yapılışı

Çözelti/Numune	Test	Kör
Numune	100 µL	--
Distile su	--	100 µL
1 mL CuSO ₄ eklenir.		
1 mL hidrazin sülfat eklenir.		
1 mL NaOH eklenir.		
Vortekslenir üzerine 1 mL Coupling eklenir.		
Vortekslenir, 10 dk beklenir ve 520 nm'de köre karşı okunur.		

Nitrat standartı olarak (100 ppm) potasyum nitrattan 2.5, 5.0, 7.5, 10, 12.5, 15.0, ppm sulandırma solüsyonları double distile suyla hazırlandı. Standart eğriden nitrat düzeyi ölçüldü (Oehme, 1977).

3.2.3.13. Real Time PCR Analizi

- Primer Dizaynının Yapılması

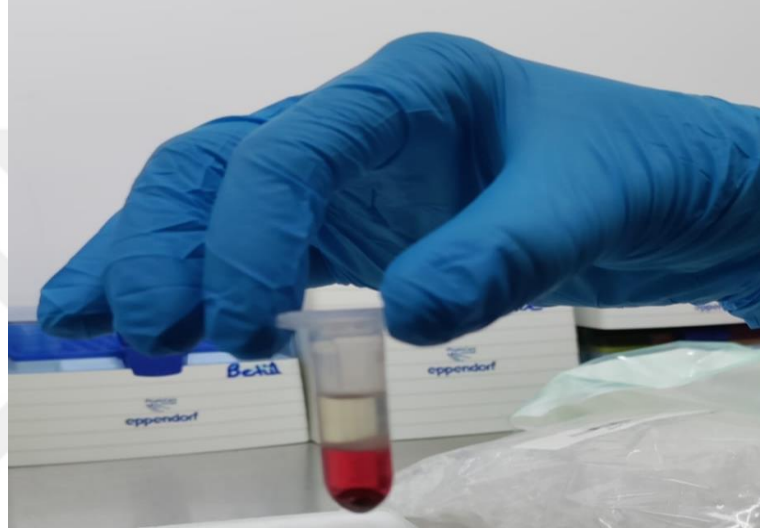
Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, COX-2, HO-1, Nrf-2, NF- κ B, TLR-4 ve GAPDH genlerine ait mRNA transkript seviyeleri Real Time PCR ile ölçülebilmesi için gerekli primerler <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> linkindeki Primer Dizayn programı ile tasarlandı (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. Dizayn edilen primer sekansları

Gen Adı	Erişim Numarası	Sekans	T _m (°C)
Bax-F	NM_017059.2	5'-TTTCATCCAGGATCGAGCAG-3'	56.15
Bax-R		5'-AATCATCCTCTGCAGCTCCA-3'	55.99
Bcl-2-F	NM_016993.2	5'-GACTTTGCAGAGATGTCCAG-3'	56.15
Bcl-2-R		5'-TCAGGTACTCAGTCATCCAC-3'	55.99
Kaspaz-3-F	NM_012922.2	5'-ACTGGAATGTCAGCTCGCAA-3'	59.96
Kaspaz-3-R		5'-GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA-3'	59.19
COX-2-F		5'-AGGTTCTTCTGAGGAGAGAG-3'	55.29
	NM_017232.4		
COX-2-R		5'-CTCCACCGATGACCTGATAT-3'	56.20
HO-1-F	NM_012580.2	5'-ATGTCCCAGGATTTGTCCGA-3'	58.71
HO-1-R		5'-ATGGTACAAGGAGGCCATCA-3'	58.40
NF-KB-F	NM_001276711.2	5'-AGTCCCGCCCCTTCTAAAAC-3'	59.67
NF-KB-R		5'-CAATGGCCTCTGTGTAGCCC-3'	60.75
Nrf-2-F	NM_031789.3	5'-TTTGTAGATGACCATGAGTCGC-3'	58.48
Nrf-2-R		5'-TCCTGCCAACTTGCTCCAT-3'	59.89
TLR4-F	NM_019178.2	5'-ACCGTTCTGTCATGGAAGGA-3'	58.65
TLR4-R		5'-TATCTGAGACTTGGCAGAGC-3'	56.73
GAPDH-F	NM_017008.4	5'-GAGTATGTCGTGGAGTCTAC-3'	54.48
GAPDH-R		5'-CAGGATGGATTGCTGACAAT-3'	56.75

- Total RNA İzolasyonu Aşaması

Deneyisel gruplardan elde edilen böbrek dokularından her grup için 50 mg tartıldıktan sonra üzerine 1 ml Qiazol (Katalog No:79306, QIAGEN) eklenerek QIAGEN TissueLyser LT cihazı kullanılarak 30 saniye homojenize edilerek karıştırıldı (Şekil 3.6.). Daha sonra 200 µL kloroform eklendi ve 4°C koşullarında 12.000 x g'de 15 dk santrifuj edildi.



Şekil 3.6. Qiazol ile RNA izolasyonu

Ardından süpernatant yeni bir ependorfa alındı ve üzerine 500 µL isopropanol eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 12.000 x g'de 4°C de 10 dk santrifuj yapıldı. Ardından süpernatant atılıp pelet üzerine 1 mL % 75'lik etanol eklendi ve 7.500 x g'de 4°C de 5 dk santrifuj edildi. Son olarak etanol uzaklaştırıldı ve altta kalan RNA peleti 100 µL RNA parçalayıcı enzim olmayan (RNase free ve DEPC bulunan) su eklendi ve pipetaj yapılarak çözündürüldü. Elde edilen RNA'nın saflığı ve miktarını ölçmek için pleyte ilk önce 2 µL DEPC water yüklendi ve Biotek Epoch cihazı ile spektrometrede 260-280 nm okuma yapıldı. Okuma sonucunda yeşil çıkan kuyucuklara RNA'lardan 1 µL yüklendi ve tekrar okuma yapıldı. Çıkan konsantrasyonlar sonucunda excelde her grup 1000 ng olacak şekilde RNA eşitlemesi yapıldı (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Her bir grup için 1000 ng total RNA içeren miktarlar

Gruplar	1000 ng RNA (µL)	Nucleasae-free H ₂ O	Total Hacim (µL)
Kontrol	1.88	8.12	10
Cr 25	1.63	8.37	10
Cr 50	1.64	8.36	10
Gm	1.62	8.38	10
Gm + Cr 25	1.71	8.29	10
Gm + Cr 50	1.57	8.43	10

Komplementer (cDNA) Sentezi Aşaması

İzole edilen total mRNA'lar uygun sıcaklıkta muhafaza edildikten sonra cDNA sentez işlemi için iScript cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, Katalog No:#1708891) ticari kiti kullanıldı. cDNA sentezi için PCR tüplerine hazırlanan solüsyonlar Tablo3.7 ve reaksiyon protokolü Tablo3.8.'de gösterildi.

Tablo 3.7. cDNA sentez reaksiyon solusyonu bileşenleri

Bileşenler	µL
5X iScript Reaction Mix	2 µL
iScript Reverse Transcriptase	1 µL
RNase free Water	2 µL
RNA	10 µL
Total volume	20 µL

Tablo 3.8. cDNA sentezinin reaksiyon protokolü

Reaksiyon Protokolü	dk	°C
Step 1	5	25
Step 2	20	46
Step 3	1	95
Step 4	∞	4

cDNA sentezi için yapılan protokol,

- Steril PCR tüplerine 5X Reaksiyon karışımı, Reverse Transcriptase ve RNase free Water yukarıdaki tabloda gösterilen miktarlarda konuldu.
- RNA örnekleri konulmadan önce buz üzerine alındı ve vortekslendi.
- İzole edilen RNA'lar steril PCR tüpünde bulunan karışıma uygun miktarda eklendi.
- cDNA sentez kitinin protokol aşamaları cihazda ayarlandı ve PCR tüpleri cihaza yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı.
- Reaksiyon bittikten sonra tüpler cihazdan alındı ve Real-Time PCR aşamasına kadar -20 °C'de saklandı.

- Real Time PCR Aşaması

İlgili Genlerin mRNA transkript seviyelerini ölçmek amacıyla QIAGEN marka Rotor-Gene Q cihazı kullanılarak Real-Time PCR yapıldı (Tablo 3.9.). Real-Time PCR için ENZO marka AMPIGENE qPCR Green Mix Lo-ROX (Katalog No: ENZ-NUC103) ticari kiti kullanıldı. Kitin protokolünde belirtilen miktar ve koşullar aşağıdaki tablolarda gösterildi. 5 µL cDNA PCR strip tüplerine soğutulmuş pleyt üzerinde yüklemesi yapıldı. Üzerine tabloda belirtilen miktarlarda karışım eklendi. PCR strip tüplerine yükleme

yapıldıktan sonra Rotor-Gene Q cihazı belirtilen koşullara ayarlandı ve SYBR Green ile genlerin ekspresyon miktarları ölçüldü (Tablo 3.10.).

Tablo 3.9. Her bir örneğe ait Real-Time PCR karışımı

PCR reaksiyon karışım içeriği	Miktar (µL)
SYBR Green	10
Primer Forward	0.8
Primer Reverse	0.8
Nucleas Free Water	3.4
cDNA	5
Toplam Hacim	20

Tablo 3.10. Real-Time PCR reaksiyon şartları

Döngü Sayısı	Süre	Süre
1	2 dakika	2 dakika
40	5 saniye	5 saniye
	20-30 saniye	20-30 saniye
Melt analizi	-	-

Kontrol (housekeeping) olarak GAPDH geni kullanıldı ve çıkan sonuçlar 2 delta delta threshold cycle ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanılarak hesaplandı (Livak & Schmittgen, 2001).

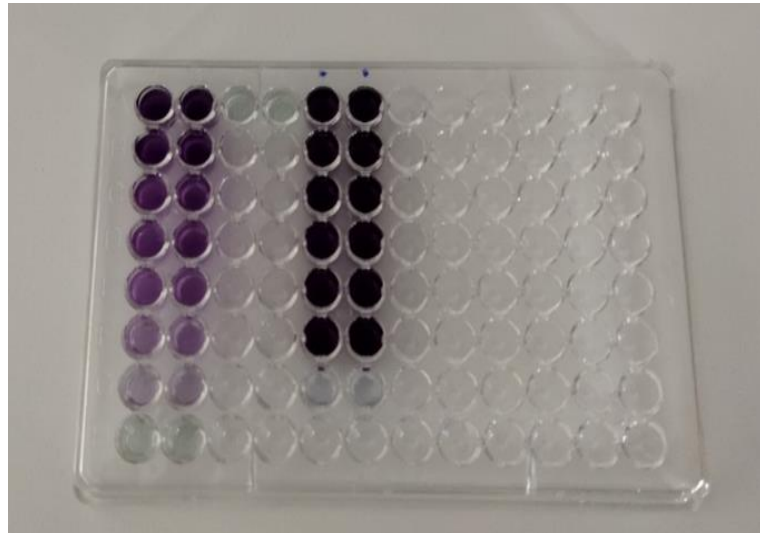
3.2.3.14. Western Blot Analizi

Doku homojenatını hazırlamak için her gruptan 30 mg doku tartıldı. Üzerine buz soğukluğunda 600 µL RIPA liziz tamponu (sc-24948, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA) eklendi ve 30 saniye Qiagen TissueLyser II homojenizasyon cihazı ile homojenize edildi. Ardından 16.000 g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı. Elde ettiğimiz süpernatantların Pierce™ BCA Protein Assay

Kit (Katalog No: 23225, ABD) kullanılarak protein konsantrasyonları belirlendi. Kit ile birlikte gelen BSA (bovine serum albumin) solüsyonu (2mg/ml) kullanılmış olup her bir doku örneğine ait total protein miktarı BSA-protein standart eğrisi kullanılarak hesaplandı (Smith et al., 1985).

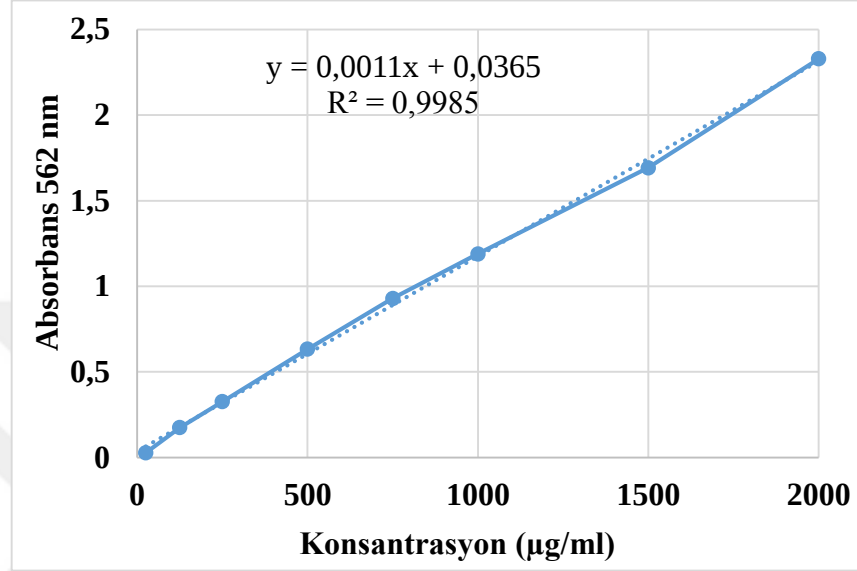
Protein konsantrasyonları aşağıda anlatıldığı gibi yapıldı.

- İlk olarak BSA standartları protokolde gösterildiği gibi dilue edildi. Dilue edilen BSA standartlarının her birinden 25 µL alınarak double şekilde pleyte yüklendi.
- RIPA liziz ile hazırlanan süpernatantlardan da 25 µL alınarak double şeklinde pleyte yüklendi.
- BSA standartları ve numuneler yüklendikten sonra kit içindeki A ve B reagentler sırasıyla 50:1 oranında karıştırıldı ve 200 µL her bir kuyucuğa eklendi.
- Pleyt üzeri streç film ile kapatılıp 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. BSA ve numunelerin protein ölçümü

- İnkübasyondan sonra 562 nm’de okuma yapıldı ve çıkan sonuçlar excele aktarılıp protein konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. BSA protein standart eğrisi

Her bir jel kuyucuğuna 30 µg protein olacak şekilde hesaplama yapıldı ve aşağıdaki tabloda gösterildi (Tablo 3.11.).

Tablo 3.11. Her bir gruba ait 30 µg protein içeren total hacim

Gruplar	Örnek (µL)
Kontrol	12.4 µL
Cr 25	12.0 µL
Cr 50	12.0 µL
Gm	13.7 µL
Gm + Cr 25	13.8 µL
Gm + Cr 50	12.5 µL

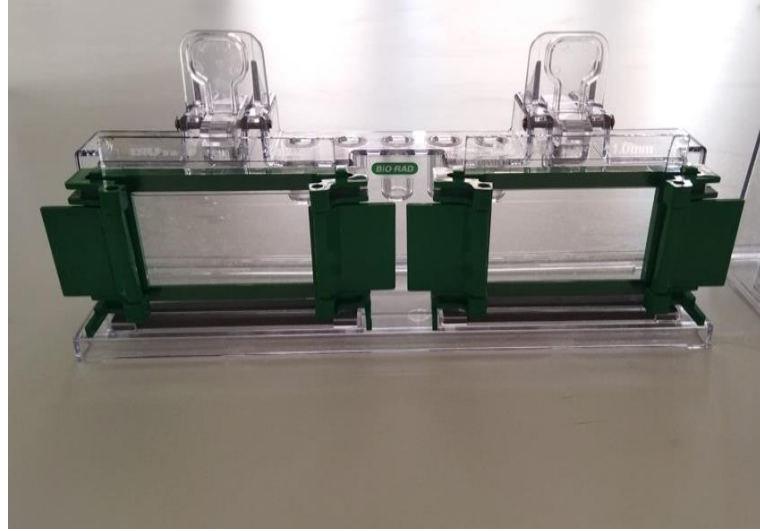
Protein konsantrasyonundan sonra kalan süpernatantlardan 400 µL yeni ependorflara alındı. Bu süre içinde süpernatantlar buz içerisinde bekletildi. Üzerine 100 µL 5X Laemmli tamponu (sample buffer) eklendi ve vortekslenerek jele yükleme yapılıncaya kadar +4 °C’de saklandı (Laemmli, 1970).

5X Laemmli Tamponu Hazırlanması (sample buffer):

Hazırlanan solüsyon +4 C’de saklanır.

- 3 mL % 20 SDS
- 3.75 mL Tris Tamponu (pH:6.8)
- 9 mg bromphenol
- 2.4 mL β-merkoptoethanol
- 4.5 mL gliserol
- 1.35 mL dH₂O

Eşit konsantrasyonlardaki proteinler hazırlandıktan sonra % 10 sodyum dodesil sülfat poliakrilamid (SDS-PAGE) jeli hazırlandı. SDS-PAGE’deki resolving jel için solüsyonlar Tablo 3.12.’de gösterildiği gibi 50 mL’lik falkona konuldu. Alt üst edildikten sonra önceden hazırlanan plaka standına jeller şekildeki gibi döküldü (Şekil 3.9.). Jelin daha düzgün olması için pastör pipeti ile bir miktar isopropil alkol eklendi. 50 dakika sonra jel kurudu ve üstündeki isopropil alkol distile su ile yıkanıp kurutma kağıtlarıyla kurutuldu.



Şekil 3.9. Standa yerleştirilen plaka ve jellerin görüntüsü

Tablo 3.12. Resolving jelin bileşimi

Solüsyonlar	% 10
% 30 Akrilamid	6.7 mL
1.5 M Tris-HCl (pH:8.8)	5 mL
% 10 SDS	0.2 mL
ddH₂O	8 mL
% 10 amonyum persülfat	100 µL
TEMED	6.7 µL

Yine 50'lik falkona Tablo 3.13.'de belirtilen solüsyonlar eklendi ve alt üst edildikten sonra resolving jelin üstüne plakalardan taşacak şekilde döküldü. 10 tane kuyucuktan oluşan taraklar stacking jelin içine yerleştirildi ve 50 dakika polimerleşmesi beklendi.

Tablo 3.13. Stacking jelin bileşimi

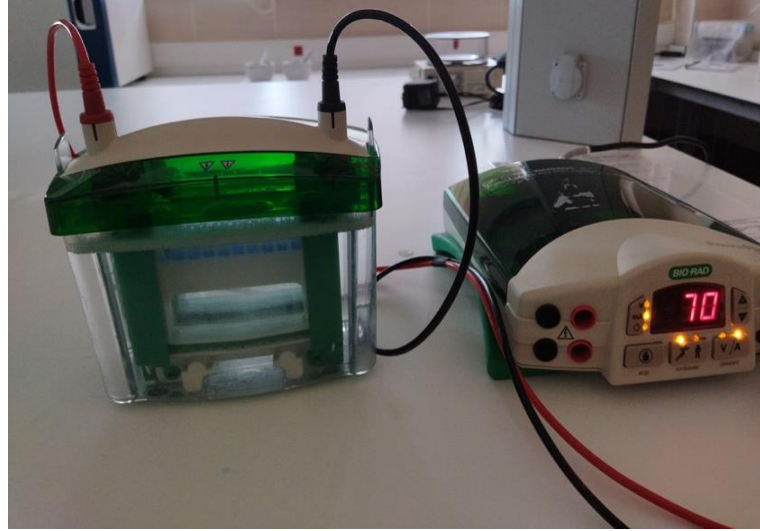
Solüsyonlar	1.5 mm
% 30 Akrilamid	1.76 mL
0.5 M Tris-HCl (pH:6.8)	3.32 mL
% 10 SDS	132 µL
ddH₂O	8.12 mL
% 10 amonyum persülfat	66.8 µL
TEMED	6.6 µL

Polimerleşmenin ardından taraklar çıkartıldı ve plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Daha sonra hazırlanan 1X running buffer uygun miktarda elektroforez tankına döküldü (Tablo 3.14.).

Tablo 3.14. 1X Running buffer bileşimi

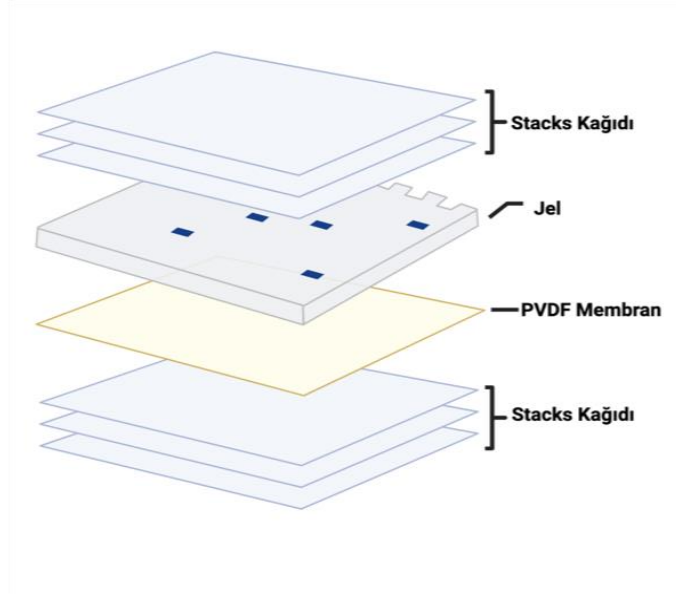
Bileşenler	Miktar
Tris (MA:121.1)	3.028 g
Glisin (MA:75.07)	14.413 g
SDS	1 g
ddH₂O	1000 mL

Yüklemeye hazır hale gelen jellere daha önceden hesaplanan protein miktarına göre numune yüklendi. Marker olarak Biorad “Dual color” kullanılarak transferin olup olmadığı kontrol edildi. Yükleme bittikten sonra elektroforez tankının kapağı takıldı ve 70 Amper’de 1 saat boyunca proteinler yürütüldü (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10. Proteinlerin SDS-PAGE jelde yürütülmesi

Elektroforezden sonra jeldeki proteinler poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarılma işlemi yapıldı. İlk olarak PVDF membranlar 10 dakika methanolde bekletildi. Stacks kağıtları ise hazırlanan transfer buffer içine konuldu. Aktarma işlemi Thermo blotlama cihazı ile yarı kuru (semi-dry) sistem ile yapıldı. Ardından Thermo blotlama kaseti üzerine ilk önce stacks kağıdı onun üzerine PVDF membran konuldu. Yürütülme işlemi tamamlanan jel PVDF membran üzerine yerletirildi ve tekrar stacks kağıdı ile kapatıldı. Her aşamada hava boşluğu kalmayacak şekilde stacks ve membranın üzerinden geçildi. Membran, jel ve stacks kağıtlarının dizilme şekli Şekil 3.11’de gösterildi (Towbin et al., 1979).



Şekil 3.11. Membran, jel ve stacks kağıtlarının dizilimi

10X Tranfer Buffer Solusyonu Hazırlanması:

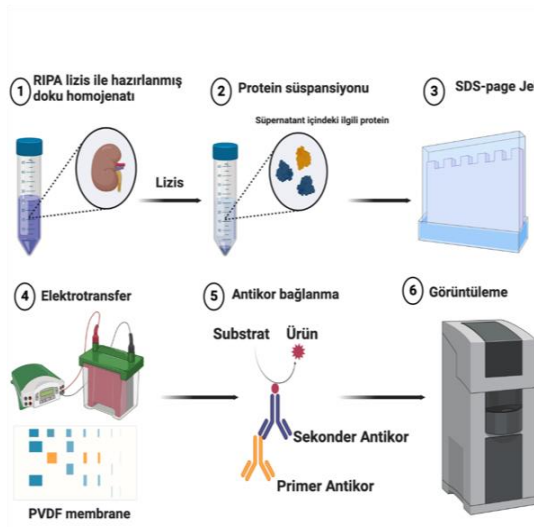
- 144.13 g Glisin
- 30.28 g Trizma Base
- En son hacim ddH₂O ile 1000 mL'ye tamalanır.

1X TBS-T Hazırlanması:

- Tris: 2.42 g
- NaCl: 8.76 g
- % 0.1'lik Tween: 1 mL
- En son hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanır.

Thermo blotlama cihazında 10 dakika 25 Volt'da jeldeki proteinlerin PVDF membrana geçmesi beklendi. PVDF membrana aktarılan proteinler non-spesifik bağlanmaları engellemek için % 0.1 Tween 20 içeren tris tamponu (TBS-T) ile hazırlanan %5'lik BSA içinde 1.5 saat oda sıcaklığında bloke edildi. 1.5 saat sonra 5 dakika arıyla

3 kez 0.1% Tween 20 içeren tris tamponu (TBS-T) ile yıkaması yapıldı. Her seferinde bir önceki kirli TBS-T döküldü. Yıkaması yapılan membranlara TBS-T ile 1/1000 oranında sulandırılan Santa Cruz marka primer antikolar β -tubulin (sc-47778), Bax (sc-20067), Bcl-2 (sc-7382), kaspaz-3 (sc-56053), Nrf-2 (sc-365949), HO-1 (sc-390991), TLR-4 (sc-293072), NF-kB (sc-8008) ve COX-2 (sc-19999) eklendi ve bir gece 4 °C'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Ertesi gün primerler falkona alındı ve tekrar kullanılmak üzere +4 °C'ye konuldu. Primer antikorları alınan membranlar TBS-T ile 5 dakika süreyle 5 defa yıkaması yapıldı. Sekonder antikor olarak TBS-T ile 1:1000 oranında sulandırılan goat anti-mouse IgG-HRP (1:1000 dilüsyon, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA) ile oda sıcaklığında 1.5 saat inkübe edildi. 1.5 saat süre bitiminden sonra sekonder antikorlarda tekrar kullanılmak üzere falkona alındı ve +4 °C'ye konuldu. Membranlar tekrar TBS-T ile 5 defa 5'er dakika arayla yıkandı. Membran üzerindeki bantlar enzim katalizli kemilüminesans substrat olan Trident femto Western HRP Substrate (Katalog No: GTX14698) marka ECL substrat ile görselleştirildi (Bass et al., 2017; Kielkopf et al., 2021). ECL substrat çözeltisi kit içinden çıkan koyu ve açık şişelerden her birinden 200 μ L alınarak 1:1 oranında epondorf tüpte karıştırıldı ve membran üzerine döküldü. Çalışma çözeltisi ışığa duyarlı olduğundan bu işlem karanlık ortamda gerçekleştirildi. Daha sonra Biorad GelDoc XR jel görüntüleme cihazı (Model:10000076955, ABD) kullanılarak bantların görüntüsü alındı. Analiz edilecek protein seviyeleri Image Lab 6.1 yazılımı ile hesaplandı (Şekil 3.12.) (Bass et al., 2017).



Şekil 3.12. Western blotlamanın özeti

3.2.4. Nekropsi İşlemi ve Histopatolojik İncelemeler

Deney sonunda tüm grupta bulunan ratlar genel anestezi altında dekapite edilerek, histopatolojik incelemeler için böbrek doku örnekleri alındı.

Alınan böbrek dokuları % 10 tamponlu formalin içinde 48-72 saat tespit edildikten sonra küçültme ve trimleme işlemleri yapılarak dokular kasetlere alındı. Kasetlerde bulunan örnekler 12 saat süre ile akan çeşme suyu altında yıkandı. Dokuların dehidrasyon ve şeffaştırma işlemleri için otomatik takip cihazı (Shandon Citadel 2000, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılarak, rutin doku takip aşamasında alkol (70°, 80°, 90°, 96°, 100°) ve ksilol serilerinden geçirildi. Ardından parafinde bloklanarak, histopatolojik incelemeler için mikrotomda (Leica RM 2255, Almanya) 4µ kalınlığında kesitler lamlara alındı.

3.2.4.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Alınan kesitlere 57°C etüvde deparafinizasyon işlemi uygulandı. Ardından ksilol ve alkol serilerinde 3'er dk bekletildi. Dokular distile suda 5 dk bekletilerek rehidrasyon sağlandıktan sonra hematoksilen ile 3 dk boyandı. Hematoksilenin ardından dokular

eoizin solüsyonuna alınarak 10-15 sn bekletilip dereceli alkol (100°, 96°,90°,80°,70°) ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra üzerlerine entellan damlatılarak lamelle kapatılıp ışık mikroskobunda incelendi. Kesitler histopatolojik bulguların şiddetine göre; yok (0), hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Bulgu gösteren örneklerden mikroskobik resimler alındı. (Olympus BX51 with DP72).

3.2.4.2. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama

Rutin takibi yapılan böbrek dokuları önce % 10'luk nötr tamponlu formalinde 48-72 saat süreyle tespit edildi. Trimlenen dokular 12 saat akan çeşme suyu altında yıkanarak formalin uzaklaştırıldı. Rutin doku takip aşamasında, alkol (70°, 80°, 90°, 96°, 100°) ve ksilol serilerinden geçirilen doku örnekleri sonrasında parafinde bloklanarak 4µ kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere deparafinizasyon işlemi uygulanarak ardından ksilol ve alkol serilerinde 3'er dk bekletildi. Dokular distile suda 5 dk bekletilerek rehidrasyon sağlandıktan sonra Periodic Acid Schiff (PAS) boyama yöntemleriyle boyandı. Bu aşamada;

- A-Periodic Acid çözeltisi 10 damla damlatıldı 10 dk bekletildikten sonra distile suda 2 dk yıkandı.
- B-Schiff's Reagent çözeltisi 10 damla damlatıldı 20 dk bekletildi ve distile suda 5 dk yıkandı.
- Preparatlar akan suda 5 dakika yıkandı.
- C- Hematoksilen solüsyonu 10 damla damlatıldı 5 dk bekletildi.
- Preparatları akan çeşme suyunda 2 dakika yıkayıp distile su ile 5 dk yıkandı.

Ardından alkol ve ksilol serilerinden geçirildi ve entellan damlatılarak lam ile kapatıldı ve Olympus BX51 with DP72 marka ışık mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.5.İstatistiksel Analizler

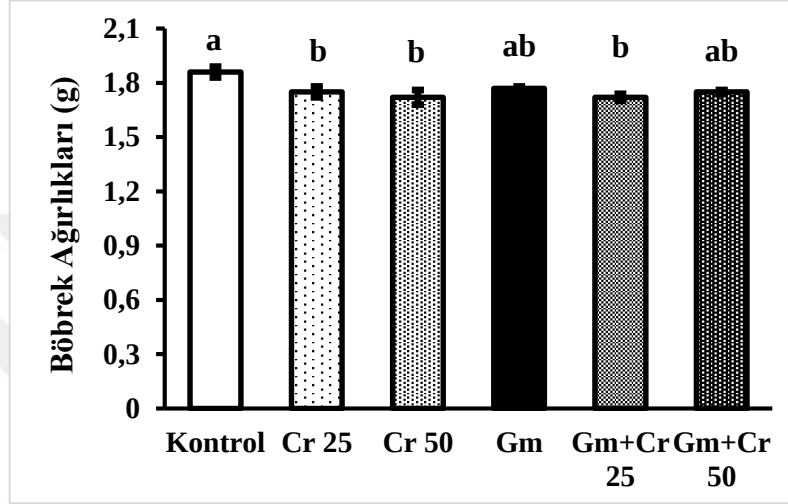
Kontrol, Crosin 25, Crosin 50, Gentamisin, Gentamisin+Crosin 25 ve Gentamisin+Crosin 50 uygulanan grupların gruplar arasındaki farklılığın önemi için SPSS 28.0.1.1 paket programı kullanılarak One Way (ANOVA) analizi yapıldı. Çoklu karşılaştırma için de Tukey testi yapıldı. Sonuçlar ortalama değer ve standart hata şeklinde ($\bar{X} \pm S\bar{x}$) verildi.



4. BULGULAR

4.1. Böbrek Ağırlıkları

Kontrol, Cr 25, Cr 50, Gm, Gm+Cr 25 ve Gm+Cr 50 grubundaki ratların ortalama böbrek ağırlıkları Şekil 4.1.'de sunuldu.



Şekil 4.1. Tüm gruplardaki kesim anında ölçülen böbrek ağırlıkları

Cr: Crosin, Gm: Gentamisin, ^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir ($p<0.001$).

Gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisite sonucunda kesim anında ratlardan alınan böbrek ağırlıklarının ortalamaları kontrol, Cr 25, Cr 50, Gm, Gm+Cr 25 ve Gm+Cr 50 gruplarında sırasıyla 1.86, 1.75, 1.72, 1.77, 1.72 ve 1.75 g olup gruplar arası karşılaştırmada kontrol grubuna göre tüm gruplarda düşüş saptandı ($p<0.001$). Kontrol grubu hariç diğer gruplara göre Gm uygulaması ile böbrek ağırlığında artış olduğu görüldü ($p<0.001$).

4.2. Biyokimyasal Analizler

4.2.1. Böbrek Fonksiyon Testleri

Kontrol, Cr 25, Cr 50, Gm, Gm+Cr 25 ve Gm+Cr 50 grubu ratlara ait plazma ürik asit, kreatinin ve üre düzeylerinin ortalamaları Tablo 4.1.'de verildi.

Tablo 4.1. Tam kanda ürik asit, kreatinin ve üre düzeyleri

Gruplar	Ürik asit (mg/dL)	Kreatinin (mg/dL)	Üre (mg/dL)
Kontrol	0.09 $\pm$ 0.00 ^b	0.42 $\pm$ 0.00 ^d	5.53 $\pm$ 0.07 ^d
Cr 25	0.09 $\pm$ 0.00 ^b	0.41 $\pm$ 0.00 ^d	5.54 $\pm$ 0.32 ^d
Cr 50	0.10 $\pm$ 0.00 ^b	0.41 $\pm$ 0.00 ^d	5.63 $\pm$ 0.9 ^d
Gm	0.12 $\pm$ 0.00 ^a	0.92 $\pm$ 0.03 ^a	27.27 $\pm$ 0.77 ^a
Gm+Cr 25	0.09 $\pm$ 0.00 ^b	0.56 $\pm$ 0.01 ^b	14.31 $\pm$ 0.47 ^b
Gm+Cr 50	0.09 $\pm$ 0.00 ^b	0.51 $\pm$ 0.00 ^c	12.42 $\pm$ 0.32 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001

Cr: Crosin, Gm: Gentamisin,^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).

Gm grubundaki ratların ürik asit, kreatinin ve üre düzeyleri kontrol ve crosin uygulanan gruplardaki ratlara göre gentamisin uygulanan grupta istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi (p <0.001). Bakılan böbrek fonksiyon test parametrelerinin Gm ile birlikte crosin uygulaması ile birlikte Gm grubuna göre önemli oranda azaldığı belirlendi (p<0.001).

4.2.2. Plazma Sitokin Düzeyleri

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen plazma sitokin düzeyleri Tablo 4.2.'de sunuldu. Gm grubunda tüm gruplara göre plazma TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyinde önemli oranda artış tespit edilirken, crosin ile tedavi gruplarında Gm grubuna göre bu değerlerde azalış saptandı (p<0.001).

Tablo 4.2. Tüm grupların plazma sitokin düzeyleri

Gruplar	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (pg/L)	IL-6 (pg/mL)
Kontrol	82.72 $\pm$ 0.71 ^d	253.27 $\pm$ 3.03 ^c	36.37 $\pm$ 0.28 ^d
Cr 25	78.64 $\pm$ 0.85 ^d	244.24 $\pm$ 1.13 ^c	34.00 $\pm$ 0.38 ^e
Cr 50	76.85 $\pm$ 0.71 ^d	237.34 $\pm$ 2.47 ^c	33.09 $\pm$ 0.29 ^e
Gm	284.06 $\pm$ 5.17 ^a	497.39 $\pm$ 7.99 ^a	137.72 $\pm$ 0.74 ^a
Gm+Cr 25	119.30 $\pm$ 3.26 ^b	315.26 $\pm$ 3.77 ^b	54.47 $\pm$ 0.44 ^b
Gm+Cr 50	99.07 $\pm$ 1.98 ^c	298.42 $\pm$ 6.36 ^b	42.56 $\pm$ 0.41 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001

Cr: Crosin, Gm: Gentamisin,^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).

4.2.3. Plazma ve Böbrek Dokusu Oksidatif Stres Parametreleri ve TLR-4

Plazma oksidatif stres ve TLR-4 parametreleri Tablo 4.3.'de sunulurken böbrek dokusunda bakılan parametreler Tablo 4.4.'de sunuldu. Plazma ve böbrek dokusu MDA, Nitrat, Nitrit, TLR-4 ve plazma AOPP düzeyleri Gm grubunda kontrol grubuna göre önemli oranda arttı (p<0.001). Bu düzeyler crosin uygulanan gruplarda Gm grubuna göre önemli oranda azaldı (p<0.001).

Plazma ve böbrek dokusu GSH düzeyi, SOD, CAT ve GPx aktivitelerinde kontrol grubuna göre Gm grubunda istatistiksel olarak azalma (p<0.001) saptanırken crosin uygulanan gruplarda Gm grubuna göre belirtilen parametrelerde önemli oranda artış saptandı (p<0.001).

Tablo 4.3. Tüm grupların plazmasında ölçülen bazı biyokimyasal parametreler

Gruplar	MDA (nmol/g)	GSH (nmol/g)	SOD (EU/g protein)	CAT (U/g)	GPx (U/mL)	Nitrit (ppm)	Nitrat (ppm)	AOPP (μmol/L)	TLR-4 (ng/mL)
Kontrol	20.15±0.90 ^d	2.40±0.09 ^{bc}	15.39±0.20 ^{ab}	120.19±2.00 ^a b	0.27±0.00 ^{abc}	3.23±0.08 ^{cd}	11.68±0.17 ^{cd}	0.04±0.00 ^e	2.50 ±0.11 ^d
Cr 25	17.93±0.71 ^d	2.58±0.04 ^{ab}	15.11±0.21 ^{ab}	123.24±0.9 ^{ab}	0.27±0.01 ^{ab}	3.48±0.06 ^d	12.32±0.11 ^d	0.08±0.00 ^d	1.79±0.13 ^d
Cr 50	17.61±0.27 ^d	2.72±0.03 ^a	15.47±0.14 ^a	126.19±1.1 ^a	0.30±0.01 ^a	3.50±0.05 ^d	12.08±0.21 ^d	0.07±0.01 ^{de}	1.49 ±0.21 ^d
Gm	45.10±1.44 ^a	2.04±0.0 ^d	13.93±0.11 ^d	87.10±1.3 ^d	0.21±0.00 ^d	8.90±0.00 ^a	32.36±0.17 ^a	0.25±0.01 ^a	19.08±0.43 ^a
Gm+Cr 25	34.44±1.34 ^b	2.26±0.01 ^c	14.30±0.15 ^c	109.31 ±29 ^c	0.24±0.00 ^e	6.71±0.21 ^b	22.14±0.14 ^b	0.14±0.00 ^{cd}	8.83 ±0.63 ^b
Gm+Cr 50	26.53±0.73 ^c	2.35±0.01 ^c	14.69±0.20 ^{bc}	118.58±0.64 ^b	0.26±0.00 ^{bc}	5.73±0.27 ^c	18.98±0.52 ^c	0.11±0.00 ^{bc}	5.90±0.24 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Cr: Crosin, Gm: Gentamisin, ^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).

Tablo 4.4. Tüm grupların böbrek dokusunda ölçülen bazı biyokimyasal parametreler

Gruplar	MDA (nmol/g)	GSH (nmol/g)	SOD (EU/g protein)	CAT (U/g)	GPx (U/mL)	Nitrit (ppm)	Nitrat (ppm)	TLR-4 (ng/mL)
Kontrol	23.80 $\pm$ 0.27 ^d	1.77 $\pm$ 0.00 ^b	53.19 $\pm$ 0.55 ^{bc}	139.08 $\pm$ 1.95 ^c	5.69 $\pm$ 0.10 ^c	6.46 $\pm$ 0.08 ^{cd}	45.12 $\pm$ 0.25 ^{cd}	2.70 $\pm$ 0.07 ^d
Cr 25	23.30 $\pm$ 0.33 ^d	1.78 $\pm$ 0.00 ^b	56.83 $\pm$ 0.60 ^{ab}	175.99 $\pm$ 4.2 ^b	6.03 $\pm$ 0.03 ^b	6.29 $\pm$ 0.03 ^d	44.18 $\pm$ 0.29 ^d	1.90 $\pm$ 0.03 ^d
Cr 50	22.57 $\pm$ 0.26 ^d	1.79 $\pm$ 0.00 ^a	58.05 $\pm$ 1.00 ^a	186.59 $\pm$ 2.3 ^a	6.30 $\pm$ 0.03 ^a	6.26 $\pm$ 0.02 ^d	43.82 $\pm$ 0.38 ^d	1.73 $\pm$ 0.01 ^d
Gm	52.43 $\pm$ 0.87 ^a	1.13 $\pm$ 0.00 ^e	40.01 $\pm$ 0.90 ^e	99.25 $\pm$ 2.15 ^e	4.04 $\pm$ 0.01 ^f	8.55 $\pm$ 0.05 ^a	54.10 $\pm$ 0.55 ^a	19.58 $\pm$ 0.60 ^a
Gm+Cr 25	29.03 $\pm$ 0.67 ^b	1.71 $\pm$ 0.00 ^d	47.14 $\pm$ 1.34 ^d	125.32 $\pm$ 1.1 ^d	4.93 $\pm$ 0.09 ^e	6.73 $\pm$ 0.10 ^b	48.24 $\pm$ 0.45 ^b	14.02 $\pm$ 0.1 ^b
Gm+Cr 50	26.60 $\pm$ 0.32 ^c	1.72 $\pm$ 0.00 ^c	49.44 $\pm$ 0.91 ^{cd}	136.83 $\pm$ 1.08 ^c	5.30 $\pm$ 0.02 ^d	6.62 $\pm$ 0.06 ^{bc}	46.49 $\pm$ 0.51 ^{bc}	11.31 $\pm$ 0.39 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Cr: Crosin, Gm: Gentamisin, ^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).

4.2.4. Real-Time PCR Bulguları

Böbrek dokusu örneklerinde transkripsiyonel düzeyde Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, COX-2, NF- κ B, HO-1, Nrf-2 ve TLR-4 ekspresyonunun qRT-PCR yöntemi ile belirlenmesine yönelik olarak kalite ve miktarlar belirlendikten sonra elde edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi yapılarak Real-Time PCR ile analiz edilen tüm örneklerin Bax, Bcl-2, Kaspaz-3, COX-2, NF- κ B, HO-1, Nrf-2 ve TLR-4 ekspresyon düzeyleri ve referans geni olarak kullanılan GAPDH genine göre Threshold Cycle (Ct) değerlerinden hesaplandı ve Tablo 4.5’de gösterilerek Şekil 4.2-9.’da grupların dağılımı sunuldu.

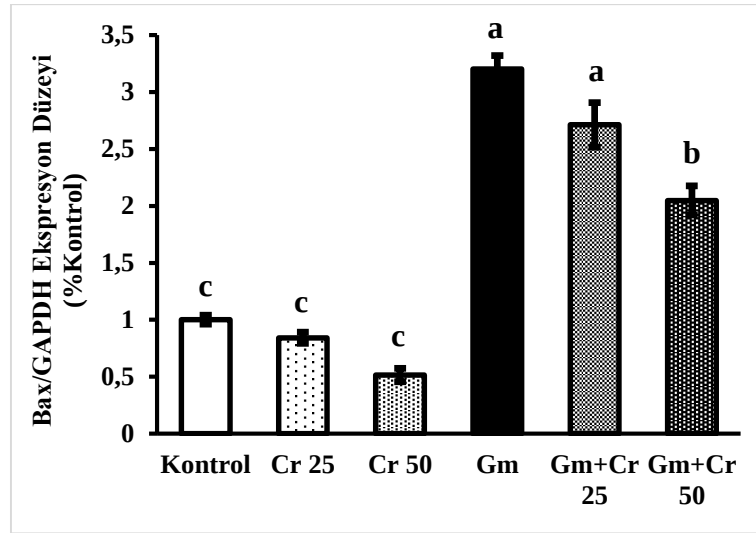
Gm grubunda tüm gruplara göre Bax, Kaspaz-3, COX-2, NF- κ B ve ve TLR-4 ekspresyon düzeyleri önemli oranda arttığı saptandı ($p<0.001$). Crosin uygulanan tedavi gruplarında ise Gm grubuna göre bu ekspresyon düzeylerinin önemli oranda azaldığı bulunarak Tablo 4.5.’de gösterildi.

Gm ile nefrotoksisite oluşturulan grupta Bcl-2, HO-1 ve Nrf-2 genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre önemli oranda azaldı ($p<0.001$). Crosin uygulanan grupların Gm grubuna göre Bcl-2, HO-1 ve Nrf-2 genlerinin ekspresyon seviyelerinin artırdığı tespit edildi.

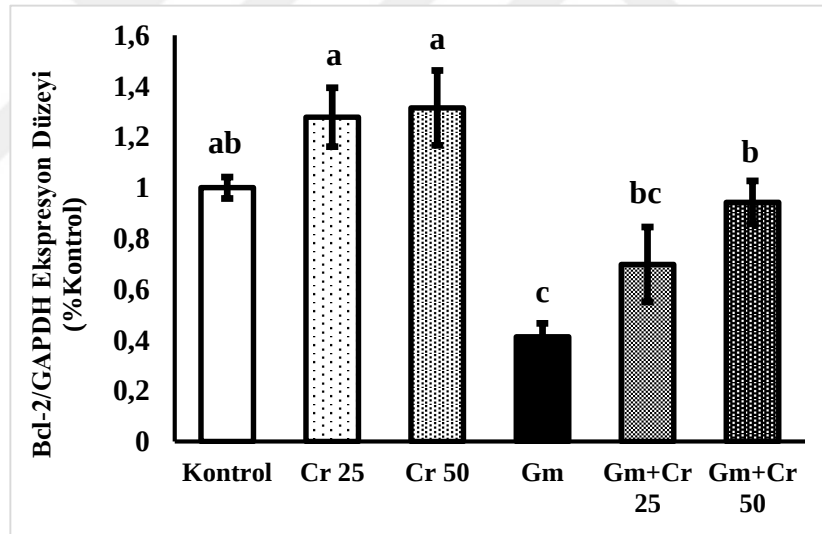
Tablo 4.5. Tüm grupların böbrek dokusunda ölçülen bazı genlerin ekspresyon düzeyleri

Gruplar	Bax	Bcl-2	Kaspaz-3	COX-2	HO-1	NF- κ B	Nrf-2	TLR-4
Kontrol	1.02 $\pm$ 0.04 ^c	1.49 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.93 $\pm$ 0.05 ^d	0.08 $\pm$ 0.01 ^d	0.96 $\pm$ 0.02 ^a	0.97 $\pm$ 0.03 ^c	13.10 $\pm$ 0.42 ^a	0.84 $\pm$ 0.11 ^d
Cr 25	0.86 $\pm$ 0.05 ^c	1.90 $\pm$ 0.12 ^a	0.71 $\pm$ 0.08 ^d	0.06 $\pm$ 0.00 ^d	0.93 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.66 $\pm$ 0.04 ^c	13.33 $\pm$ 0.60 ^a	0.86 $\pm$ 0.07 ^d
Cr 50	0.53 $\pm$ 0.07 ^c	1.96 $\pm$ 0.15 ^a	0.69 $\pm$ 0.11 ^d	0.06 $\pm$ 0.01 ^d	1.09 $\pm$ 0.08 ^a	0.70 $\pm$ 0.05 ^c	14.21 $\pm$ 1.12 ^a	0.87 $\pm$ 0.07 ^d
Gm	3.26 $\pm$ 0.12 ^a	0.67 $\pm$ 0.06 ^c	2.78 $\pm$ 0.11 ^a	0.80 $\pm$ 0.04 ^a	0.12 $\pm$ 0.02 ^d	2.12 $\pm$ 0.10 ^a	1.09 $\pm$ 0.22 ^d	4.63 $\pm$ 0.17 ^a
Gm+Cr 25	2.80 $\pm$ 0.20 ^a	1.04 $\pm$ 0.14 ^{bc}	1.94 $\pm$ 0.11 ^b	0.54 $\pm$ 0.05 ^b	0.53 $\pm$ 0.04 ^c	2.05 $\pm$ 0.22 ^a	4.42 $\pm$ 0.55 ^c	3.62 $\pm$ 0.35 ^b
Gm+Cr 50	2.09 $\pm$ 0.14 ^b	1.40 $\pm$ 0.83 ^b	1.39 $\pm$ 0.09 ^c	0.35 $\pm$ 0.03 ^c	0.68 $\pm$ 0.06 ^{bc}	1.49 $\pm$ 0.13 ^b	8.16 $\pm$ 0.48 ^b	2.23 $\pm$ 0.14 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

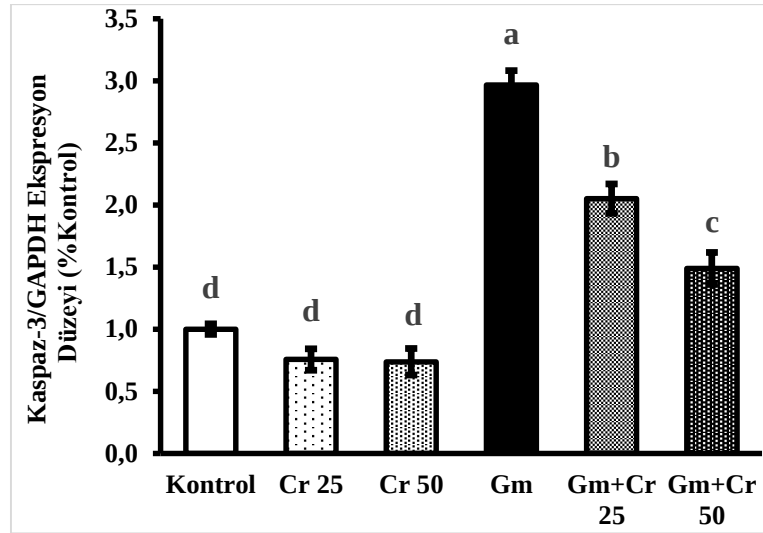
Cr: Crosin, Gm: Gentamisin, ^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).



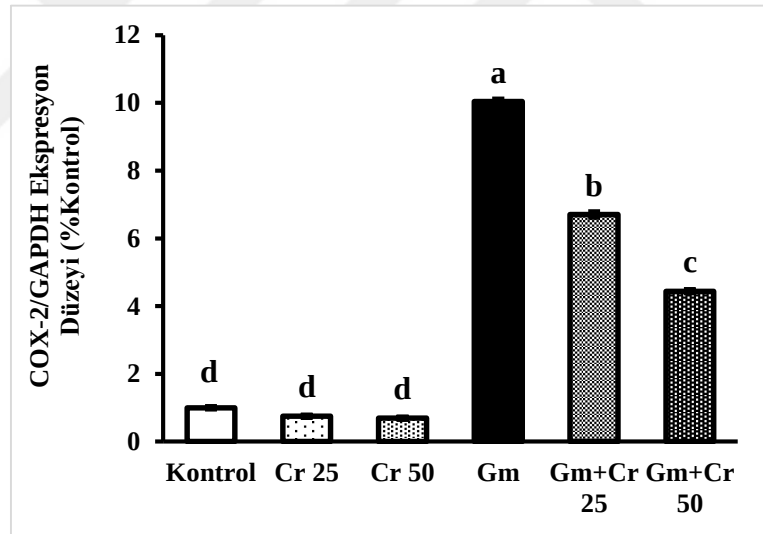
Şekil 4. 1. Bax ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



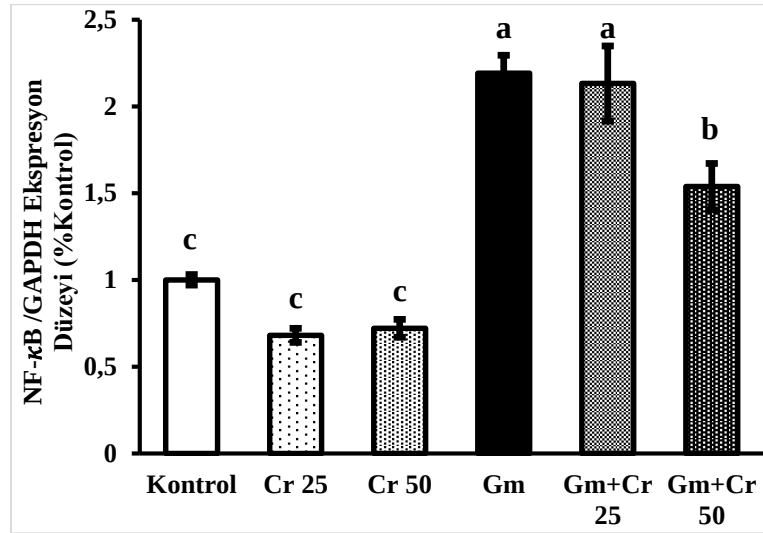
Şekil 4.3. Bcl-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



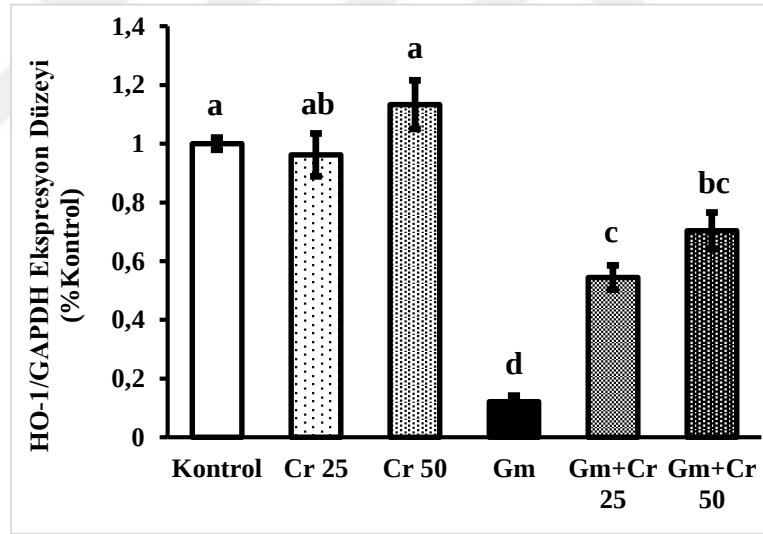
Şekil 4. 2. Kaspaz-3 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



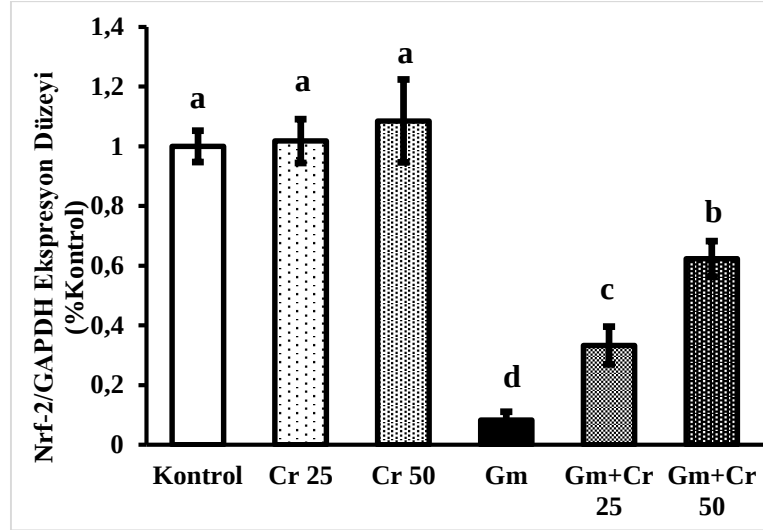
Şekil 4. 3. COX-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



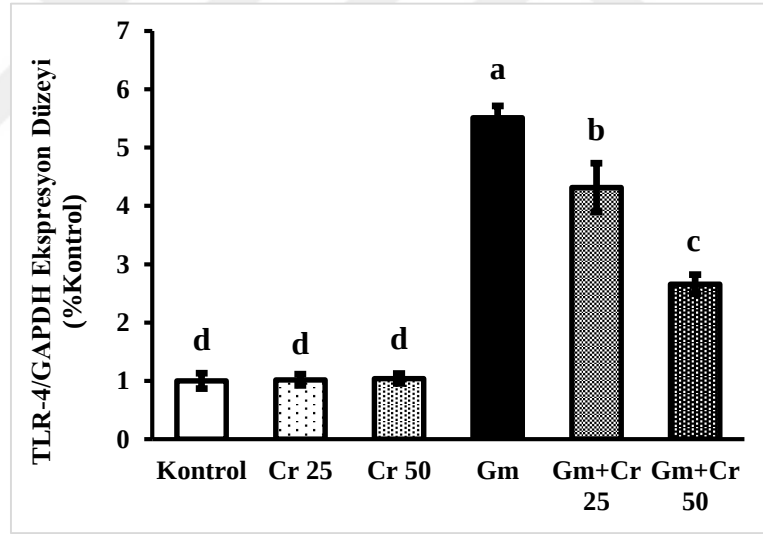
Şekil 4. 4. NF-κB ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 5. HO-1 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 6. Nrf-2 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı



Şekil 4. 7. TLR-4 ekspresyon düzeyinin gruplara göre dağılımı

4.2.5. Western Blot Analizi Bulguları

Western blotlama sonuçları kemiluminesans filtreye sahip kameralı bir sistem ile görüntülenerek protein ekspresyon düzeyleri Image Lab. programı ile belirlenerek Tablo 4.6.'da, bantlar ve gruplara göre dağılımlar ise Şekil 4.10-17.'de gösterildi.

Bax ve Kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde en yüksek seviyenin Gm grubunda olduğu, en düşük düzeyin ise Cr 50 grubunda olduğu saptandı. Gm grubu ile karşılaştırıldığında crosin uygulanan tedavi gruplarında istatistiksel olarak önemli bir azalmanın olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Bcl-2 düzeyinin Gm grubunda en düşük düzeyde olduğu görüldü. Crosin tedavi gruplarının ise hasar grubu olan Gm grubuna göre Bcl-2 seviyesini önemli oranda artırdığı belirlendi ($p<0.001$). Elde edilen sonuçlara göre crosinin Bcl-2 yolağını aktif hale getirerek böbrek toksisitesini önemli ölçüde durdurduğu tespit edildi.

Çalışma gruplarında böbrek hasarı oluşturulan Gm grubunda COX-2 protein ekspresyon düzeyinin en yüksek (1.41) olduğu tespit edildi. Gm ile birlikte uygulanan crosin gruplarında Gm grubuna göre COX-2 protein seviyesinin önemli oranda azaldığı saptandı ($p<0.001$). NF- κ B proteininin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, en yüksek değerin Gm grubunda olduğu belirlendi. Gm ile birlikte uygulanan Cr 50 dozunun NF- κ B protein ekspresyon düzeyini önemli ölçüde azalttığı istatistiksel olarak tespit edildi ($p<0.001$).

TLR-4 proteininin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, en yüksek değerin Gm grubunda, en düşük değerin ise Cr 50 grubunda olduğu gözlemlendi. Gm ile birlikte uygulanan crosin tedavi dozlarının TLR-4 proteininin ekspresyon düzeyini azalttığı istatistiksel olarak belirlendi ($p<0.001$).

HO-1 proteininin ekspresyon düzeyleri Tablo 4.6.'da incelendiğinde Gm grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli oranda azaldığı saptandı. Gm ile birlikte

uygulanan Crosin 25 ve 50 dozlarının HO-1 protein seviyesini önemli oranda artırdığı tespit edildi ($p<0.001$).

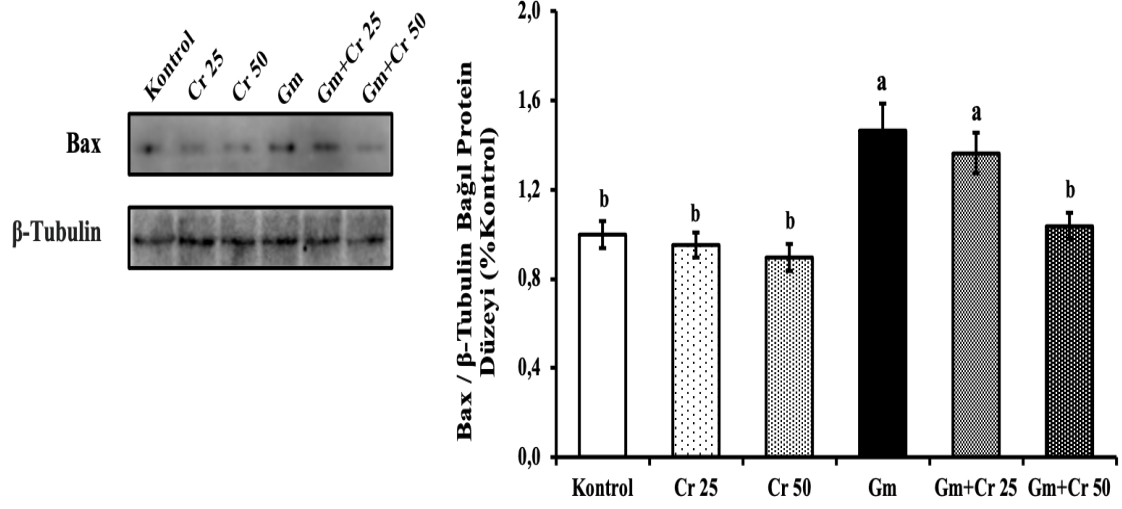
Çalışma gruplarının Nrf-2 protein ekspresyon düzeyleri incelendiğinde en yüksek değerin Cr 50 grubunda, en düşük değerin ise Gm grubunda olduğu gözlemlendi. Gm ile birlikte uygulanan Cr 50 dozunun Nrf-2 protein ekspresyon seviyesini önemli oranda artırdığı saptandı ($p<0.001$).



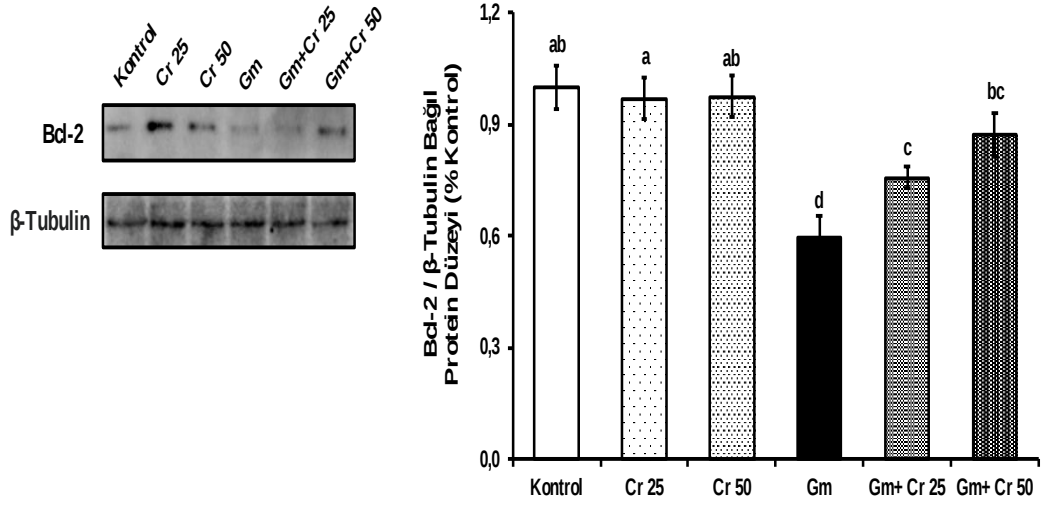
Tablo 4.6. Böbrek dokusu Western blot ile ölçülen bazı proteinlerin ekspresyon düzeyleri

Gruplar	Bax	Bcl-2	Kaspaz-3	COX-2	HO-1	NF- κ B	Nrf-2	TLR-4
Kontrol	1.00 $\pm$ 0.03 ^b	1.00 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.04 ^d	1.00 $\pm$ 0.03 ^c	1.00 $\pm$ 0.03 ^a	1.00 $\pm$ 0.04 ^c	1.00 $\pm$ 0.03 ^{ab}	1.00 $\pm$ 0.11 ^c
Cr 25	0.95 $\pm$ 0.03 ^b	1.05 $\pm$ 0.03 ^a	0.94 $\pm$ 0.03 ^d	0.99 $\pm$ 0.03 ^c	1.02 $\pm$ 0.03 ^a	0.91 $\pm$ 0.04 ^c	1.01 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.95 $\pm$ 0.07 ^c
Cr 50	0.90 $\pm$ 0.03 ^b	0.98 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.92 $\pm$ 0.04 ^d	1.00 $\pm$ 0.03 ^c	1.05 $\pm$ 0.03 ^a	0.92 $\pm$ 0.04 ^c	1.05 $\pm$ 1.03 ^a	0.94 $\pm$ 0.07 ^c
Gm	1.47 $\pm$ 0.07 ^a	0.60 $\pm$ 0.03 ^d	2.97 $\pm$ 0.07 ^a	1.41 $\pm$ 0.06 ^a	0.48 $\pm$ 0.02 ^c	2.12 $\pm$ 0.04 ^a	0.69 $\pm$ 0.03 ^d	1.83 $\pm$ 0.17 ^a
Gm+Cr 25	1.36 $\pm$ 0.05 ^a	0.76 $\pm$ 0.02 ^c	2.03 $\pm$ 0.05 ^b	1.32 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.71 $\pm$ 0.02 ^b	1.95 $\pm$ 0.04 ^a	0.83 $\pm$ 0.03 ^{cd}	1.42 $\pm$ 0.35 ^b
Gm+Cr 50	1.04 $\pm$ 0.03 ^b	0.87 $\pm$ 0.03 ^{bc}	1.68 $\pm$ 0.05 ^c	1.18 $\pm$ 0.03 ^b	0.81 $\pm$ 0.03 ^b	1.73 $\pm$ 0.04 ^b	0.89 $\pm$ 0.03 ^{cb}	1.39 $\pm$ 0.14 ^b
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

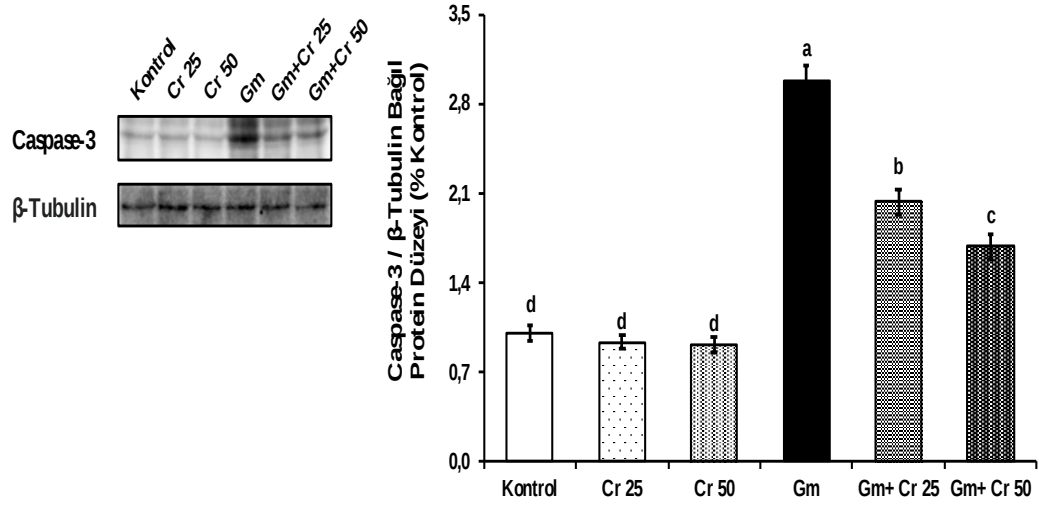
Cr: Crosin, Gm: Gentamisin,^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (p<0.001).



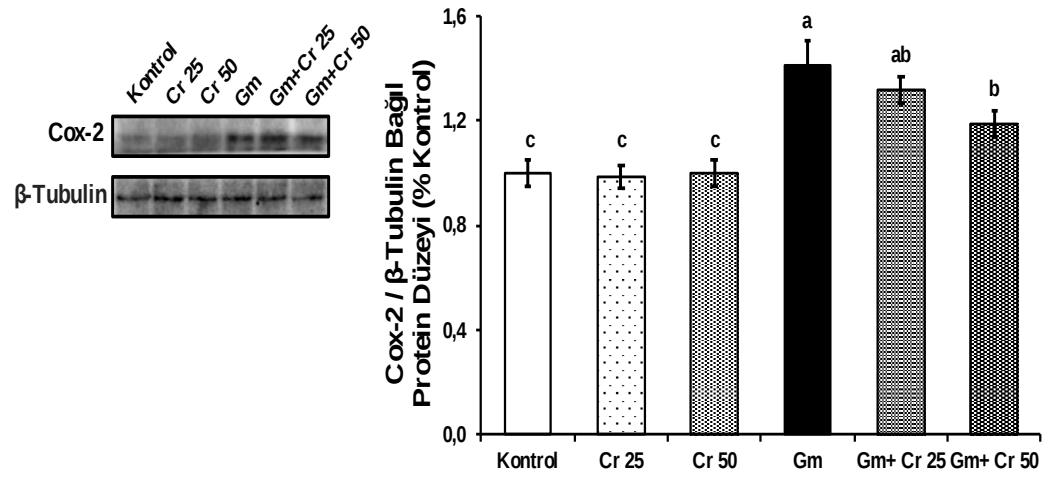
Şekil 4. 8. Bax protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



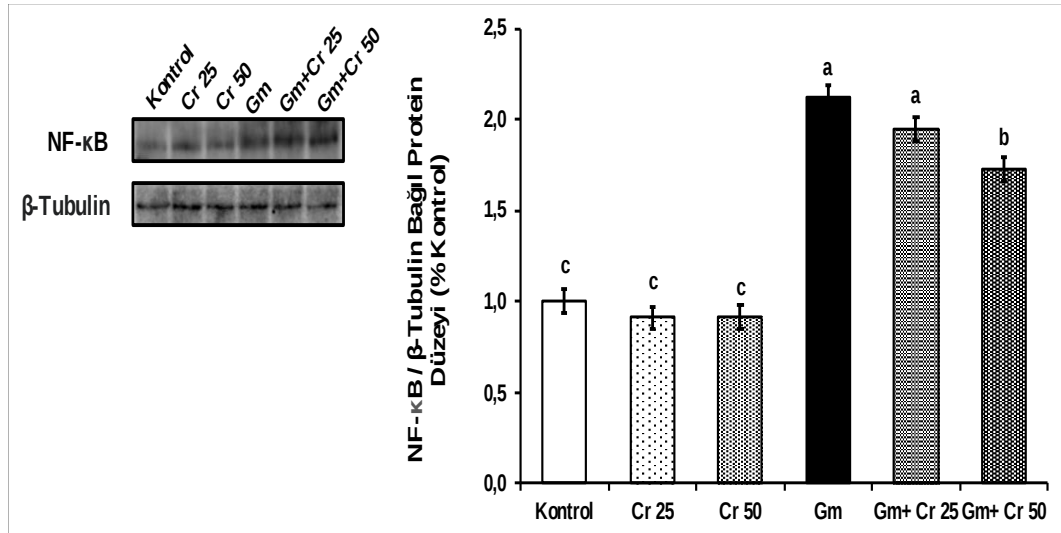
Şekil 4. 9. Bcl-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



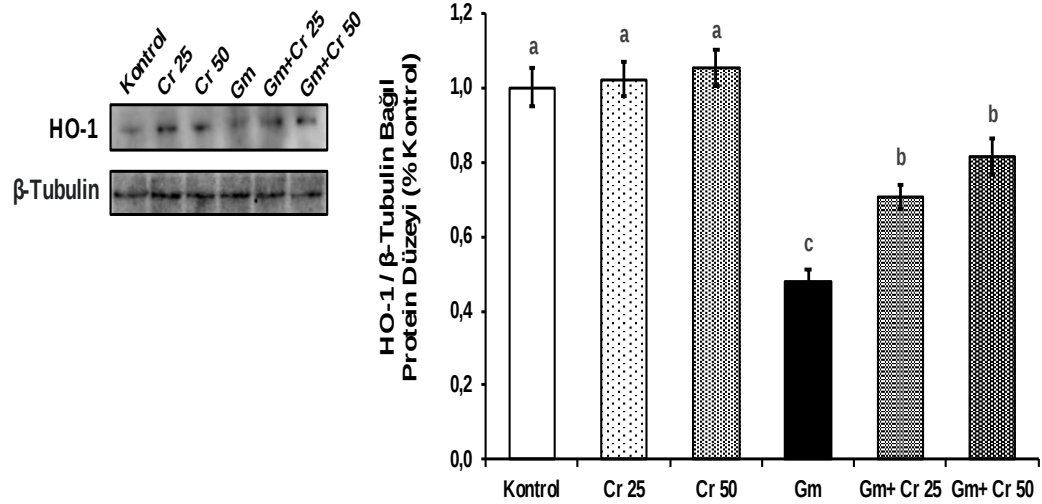
Şekil 4. 10. Kaspaz-3 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



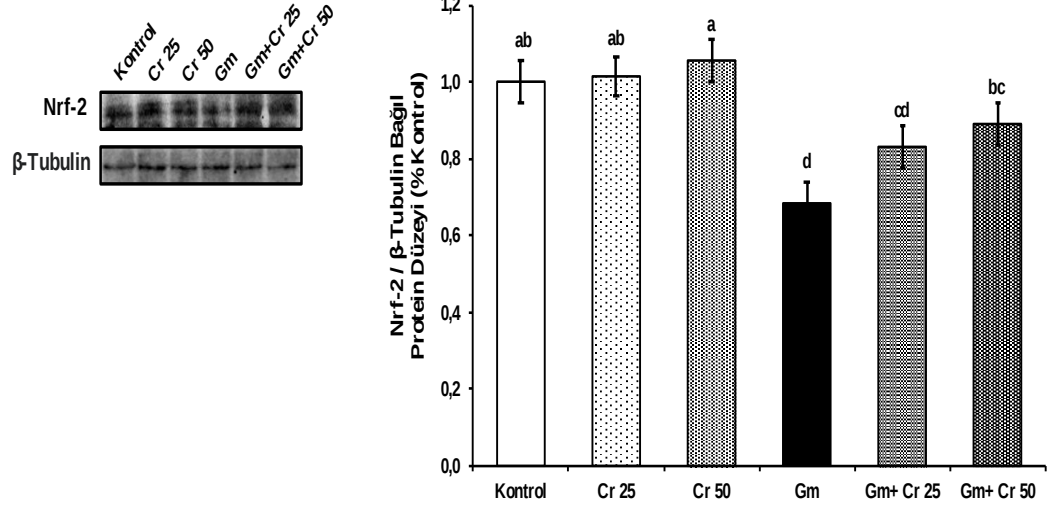
Şekil 4. 11. COX-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



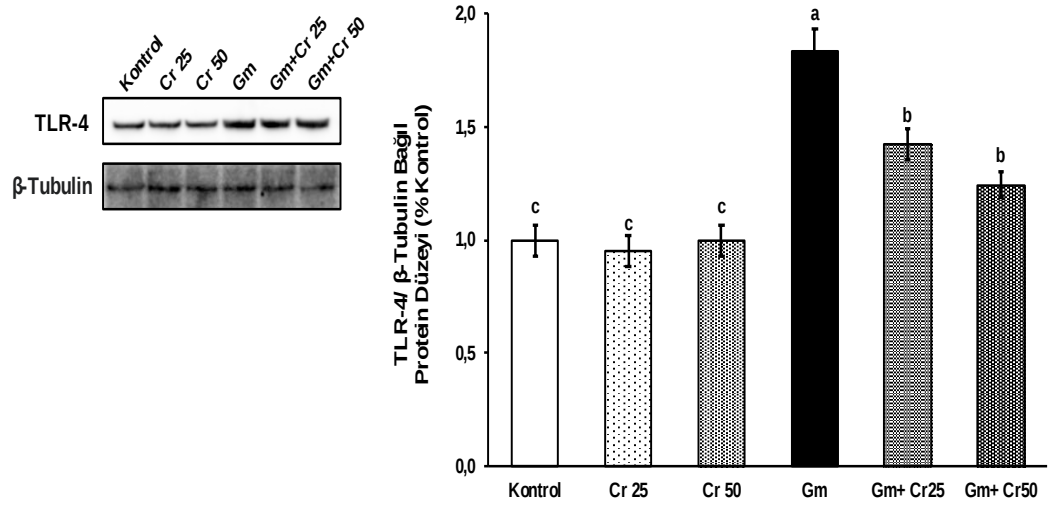
Şekil 4. 12. NF-κB protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



Şekil 4. 13. HO-1 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



Şekil 4. 14. Nrf-2 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları



Şekil 4. 15. TLR-4 protein ekspresyon düzeyinin ve bantların Western blot sonuçları

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Makroskopik Bulgular

Böbrek dokuları makroskopik olarak incelendiğinde, Kontrol, Cr 25 ve Cr 50 gruplarında normal görünümde olduğu gözlenirken (Şekil 4.18-20), Gm grubundaki böbrek dokularının şiddetli düzeyde ödemli, ıslak ve açık renkte olduğu, konjesyon ve yer yer hemorajilerin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21.). Gm+Cr 25 ve Gm+Cr 50 gruplarında ise çok hafif ödem ve konjesyon gözlemlendi (Şekil 4.22-23.).



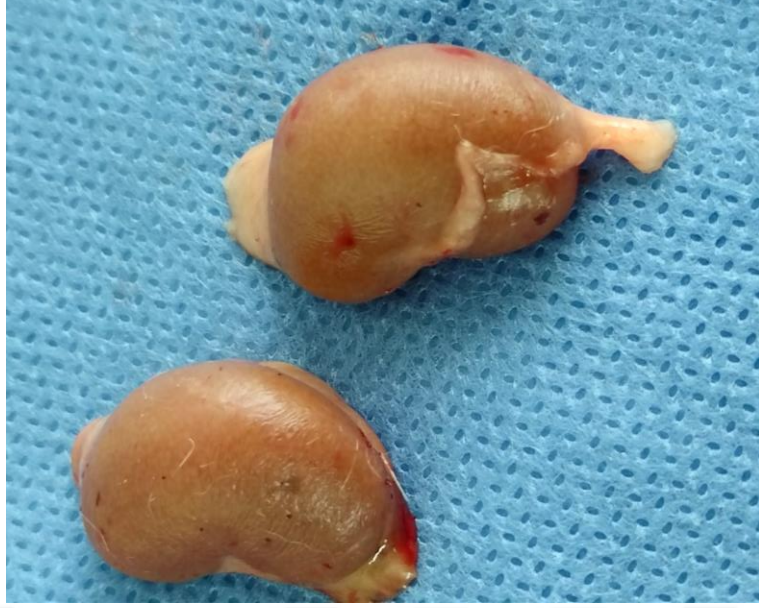
Şekil 4. 16. Kontrol grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü



Şekil 4. 17. Cr 25 grubu böbrek böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü

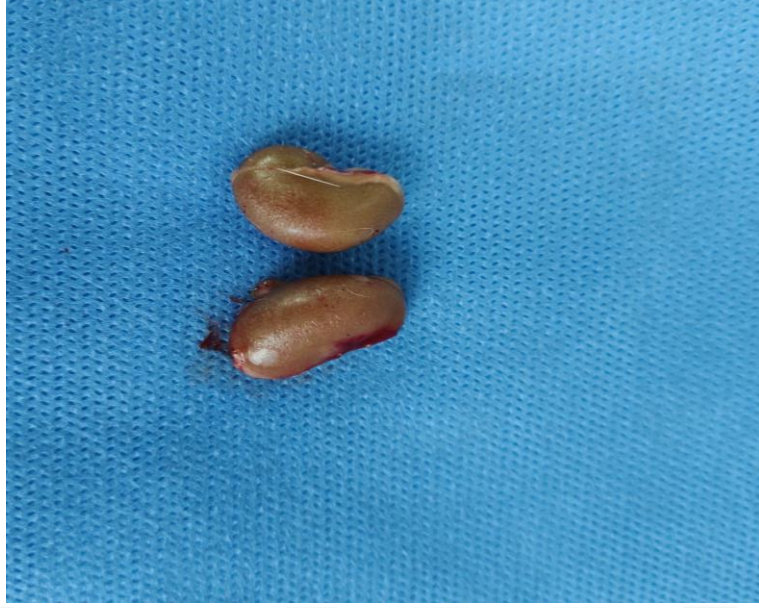


Şekil 4. 18. Cr 50 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü



Şekil 4. 19. Gentamisin grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü





Şekil 4. 20. Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü



Şekil 4. 21. Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun makroskopik görüntüsü

4.3.2. Mikroskopik Bulgular

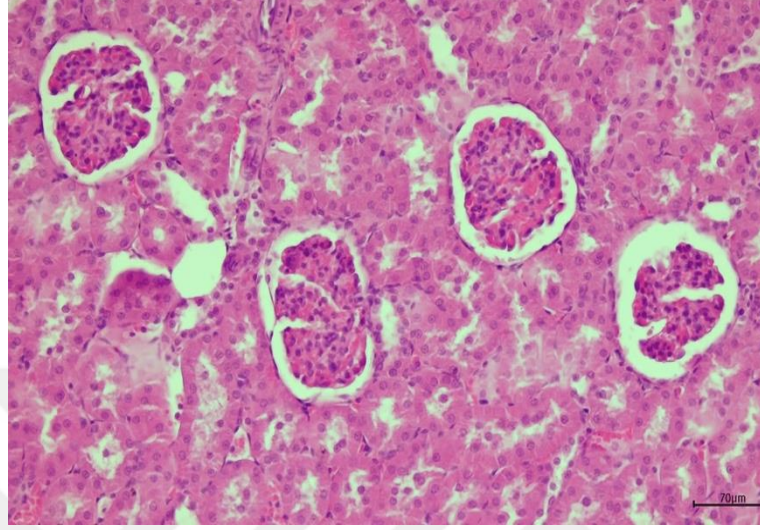
Böbrek dokusundan alınan örneklerin histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda elde edilen skorlama değerlerinin istatistiksel verileri Tablo 4.7.'de sunuldu. Histopatolojik parametreler incelendiğinde grupların böbrek örneklerinde dejenerasyonun en şiddetli Gm grubunda, en hafif ise kontrol grubunda olduğu tespit edildi ($p<0.001$). Çalışma gruplarının böbrek doku örneklerinde Gm grubunda yangının şiddetli olduğu, yangının en az olduğu grupların kontrol ve Cr 50 olduğu saptandı. Gm ile birlikte crosin uygulanan gruplarda ise yangının Gm grubuna göre azaldığı istatistiksel olarak saptandı ($p<0.001$). Böbrek doku örneklerinden nekroz bulguları en şiddetli Gm grubunda olduğu belirlenerek, Gm ile birlikte uygulanan crosin 50 dozunun nekrozu önemli derecede azalttığı gözlemlendi ($p<0.001$). Grupların böbrek doku örneklerinde hemoroji bulguları yine en yüksek Gm grubunda ve en düşük kontrol grubunda olduğu belirlendi. Crosin ile tedavi gruplarında hemoroji bulgularının önemli oranda azaldığı tespit edildi ($p<0.001$).

Tablo 4.7. Böbrek dokusu kesitlerindeki histopatolojik bulguların skorlaması

Gruplar	Dejenerasyon	Nekroz	Yangı	Hemoraji
Kontrol	0.00 $\pm$ 0.00 ^d	0.00 $\pm$ 0.00 ^d	0.00 $\pm$ 0.00 ^d	0.00 $\pm$ 0.00 ^d
Cr 25	1.67 $\pm$ 0.21 ^c	1.50 $\pm$ 0.22 ^{bc}	0.33 $\pm$ 0.21 ^d	0.33 $\pm$ 0.21 ^{cd}
Cr 50	1.00 $\pm$ 0.00 ^c	0.50 $\pm$ 0.22 ^{cd}	0.00 $\pm$ 0.00 ^d	0.17 $\pm$ 0.17 ^d
Gm	3.67 $\pm$ 0.21 ^a	3.17 $\pm$ 0.31 ^a	3.50 $\pm$ 0.22 ^a	3.17 $\pm$ 0.17 ^a
Gm+Cr 25	2.67 $\pm$ 0.21 ^b	2.00 $\pm$ 0.26 ^b	2.33 $\pm$ 0.21 ^b	2.00 $\pm$ 0.00 ^b
Gm+Cr 50	1.67 $\pm$ 0.21 ^c	1.00 $\pm$ 0.26 ^{bcd}	1.33 $\pm$ 0.33 ^c	0.83 $\pm$ 0.17 ^c
p-value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

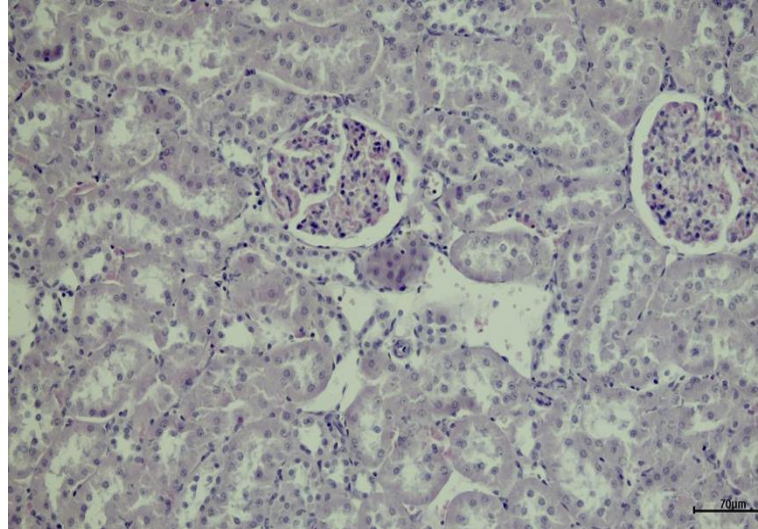
Cr: Crosin, Gm: Gentamisin, ^{a,b,c}: Aynı sütundaki farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir ($p<0.001$).

Tüm gruplardaki böbrek dokusu kesitlerindeki H&E boyama ve Gm grubu PAS boyama histopatolojik görüntüleri Şekil 4.24-35’de gösterildi.



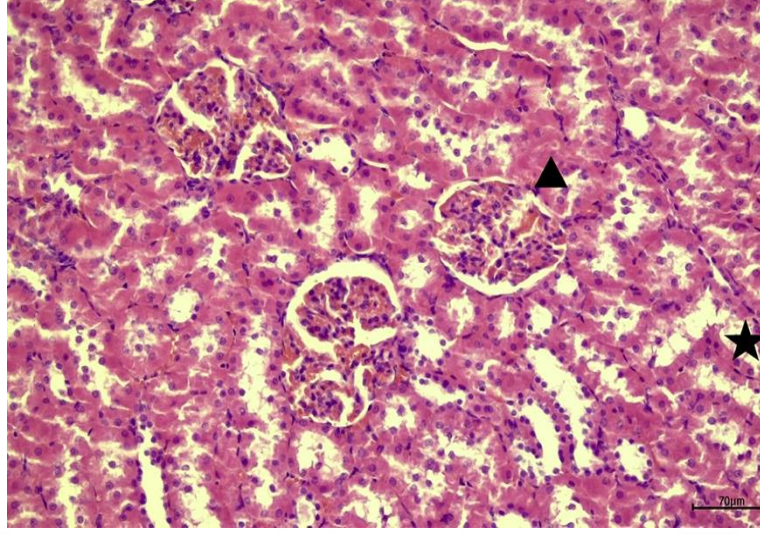
Şekil 4. 22. Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü

Kontrol grubu böbrek dokusu normal histolojik yapıdadır. H&E, Bar:70µm.



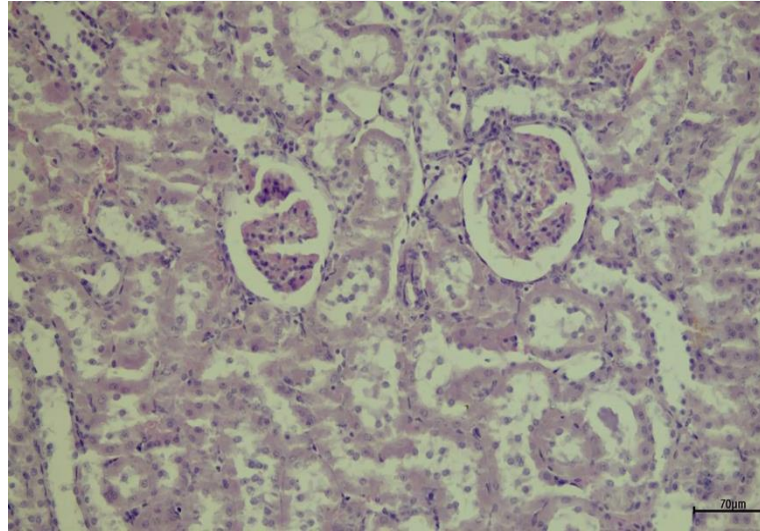
Şekil 4. 23. Kontrol grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü

Kontrol grubu normal histopatolojik yapıdadır. PAS, Bar:70µm.



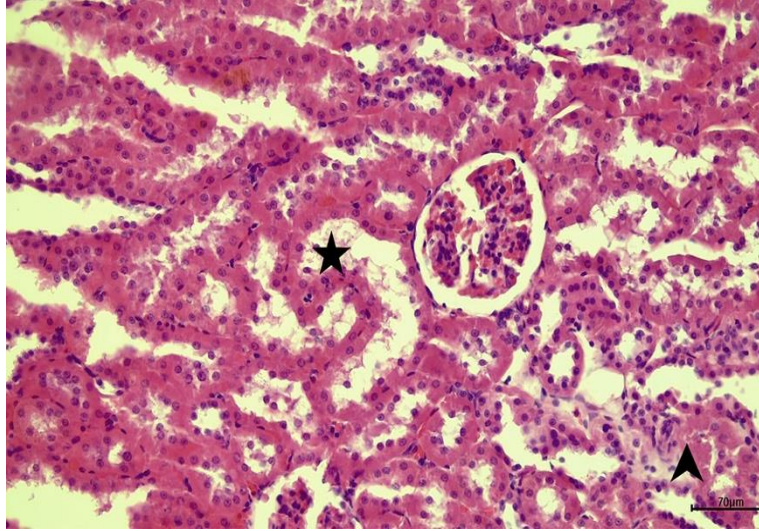
Şekil 4. 24. Cr 25 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.

Cr 25 grubu; böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon (yıldız), nekroz (ok başı),
H&E, Bar:70µm.



Şekil 4. 25. Cr 25 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.

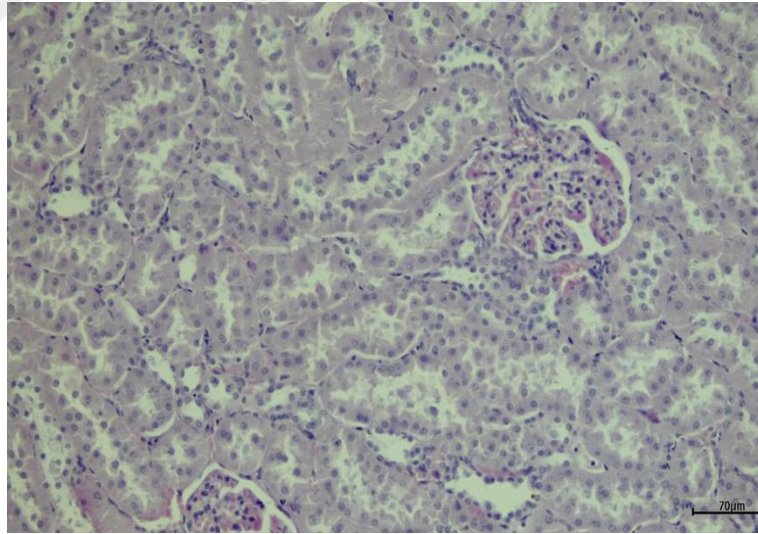
Cr 25; normal histopatolojik yapıdadır. PAS, Bar:70µm.



Şekil 4. 26. Cr 50 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü.

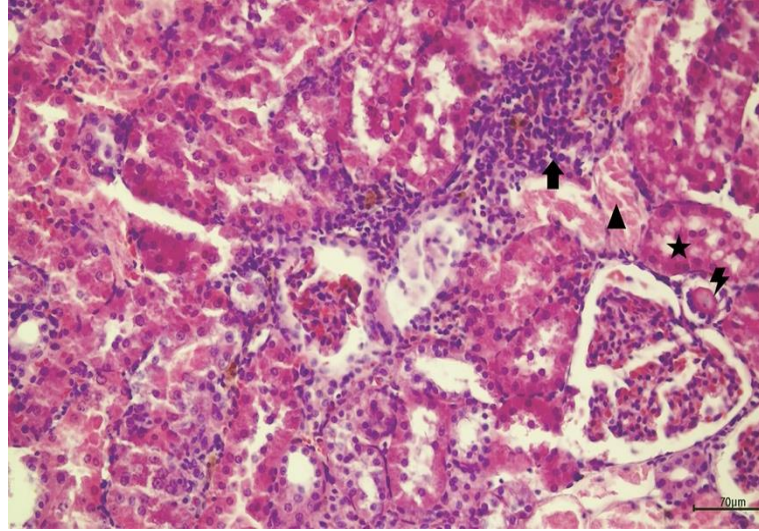
Cr 50 grubu; böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon (yıldız), nekroz (ok başı),

H&E, Bar:70µm



Şekil 4. 27. Cr 50 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.

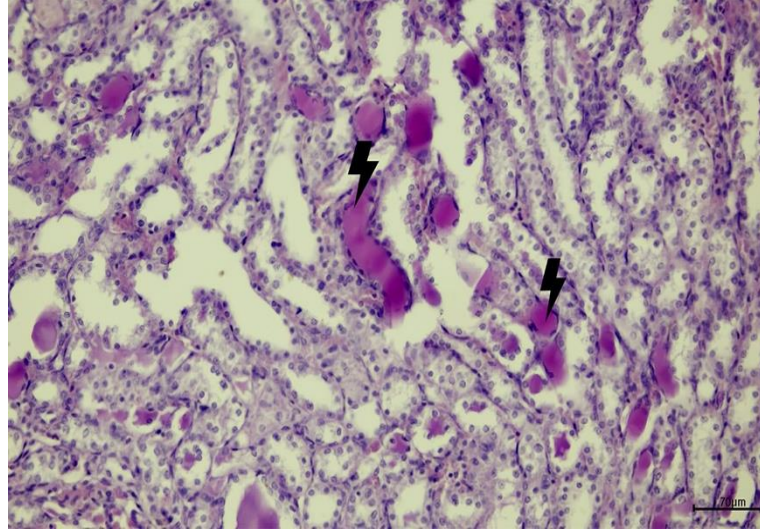
Cr 50; normal histopatolojik yapıdadır. PAS, Bar:70µm.



Şekil 4. 28. Gm grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü

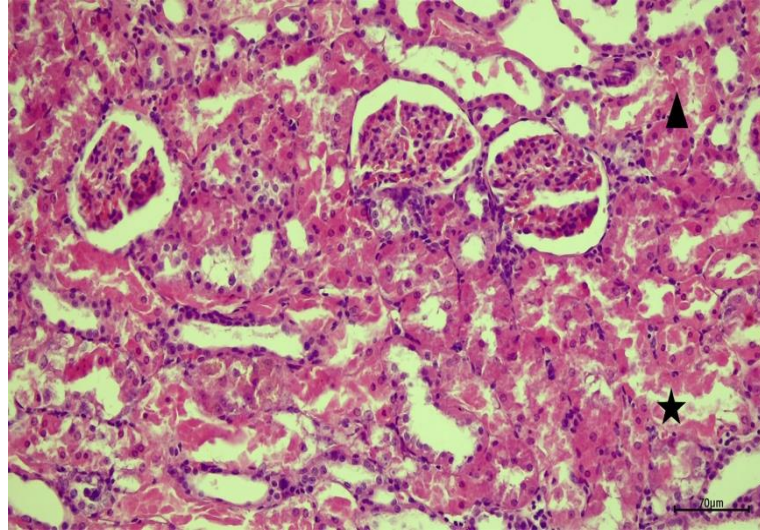
Gentamisin grubu; böbrek tubül epitellerinde dejenerasyon (yıldız), nekroz (ok başı) ve interstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu (ok) ve hiyalin silindirleri (şimşek), H&E, Bar:70µm.

Gentamisin uygulanan grupta, renal damarlarda konjesyon ve dilatasyon saptandı. Proksimal tubullerin epitel hücrelerinde şiddetli dejenerasyon ve nekroz tespit edildi. Bu tubullerin lumenlerinin dejenere ve dökülmüş epitel hücreleri ile dolduğu dikkati çekti. Ayrıca intersitisyel alanda yoğun mononükleer hücreler görüldü. Bazı glomerulusların atrofik görünümde olduğu ve bazı tubul lumenleri içerisinde hiyalin silindirleri fark edildi. Yapılan PAS boyamada bu silindirler pembe, homojen renkte görüldü (Şekil 4.28.).



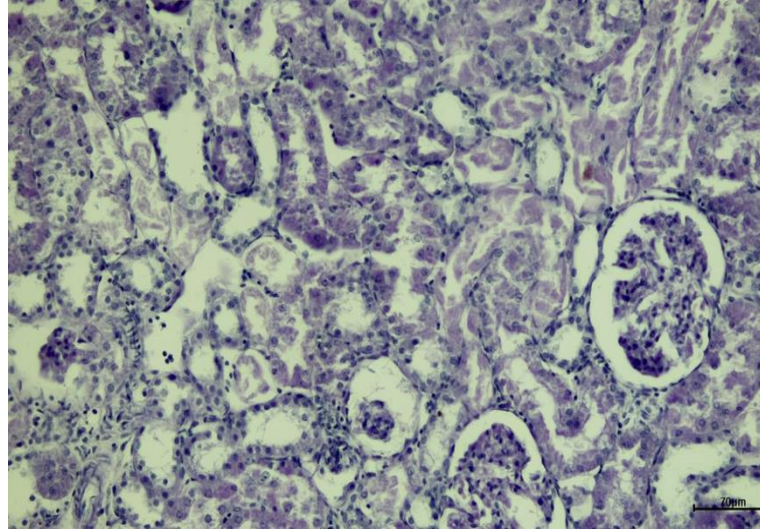
Şekil 4. 29.Gentamisin grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü.

Gentamisin grubu; böbrek tubül epitellerinde hiyalin silindirleri (şimşek), PAS,
Bar:70µm.



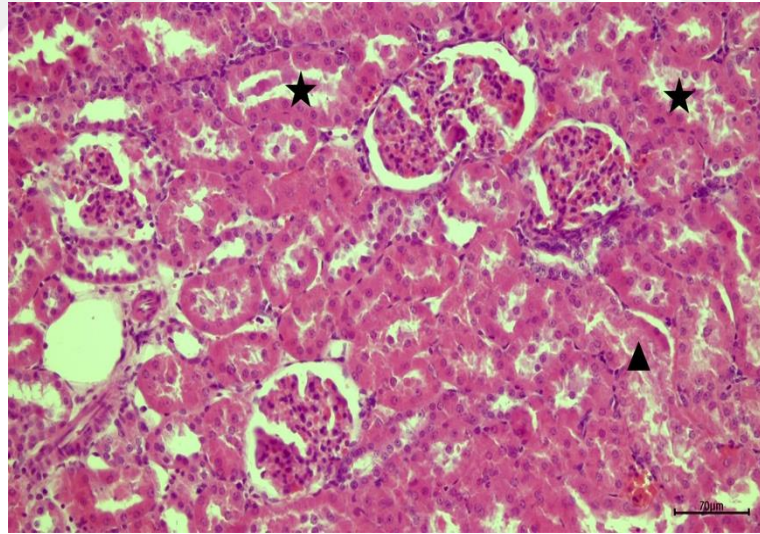
Şekil 4. 30. Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü

Gm+ Cr 25, Böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon (yıldız), nekroz (ok başı),
H&E, Bar:70µm.



Şekil 4. 31. Gm+Cr 25 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü

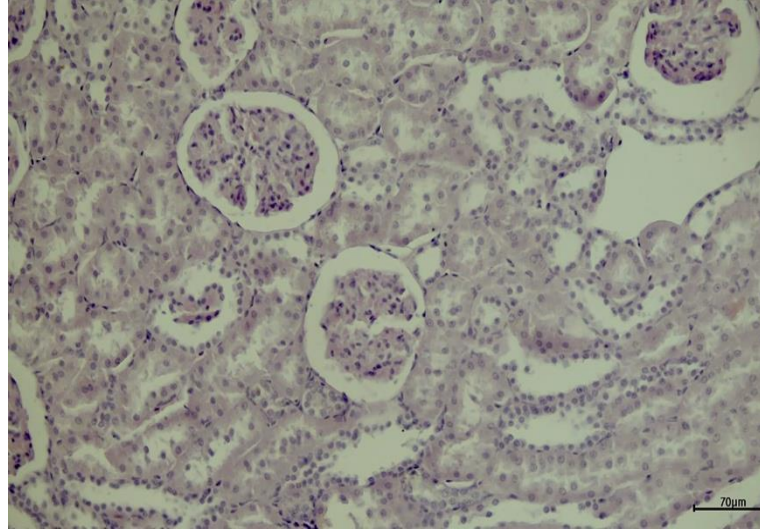
Gm+Cr 25; normal histopatolojik yapıdadır. PAS, Bar:70µm.



Şekil 4. 32. Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun histopatolojik görüntüsü

Gm+Cr 50, Böbrek tubul epitellerinde dejenerasyon (yıldız), nekroz (ok başı), H&E,

Bar:70µm.



Şekil 4. 33. Gm+Cr 50 grubu böbrek dokusunun PAS boyama histopatolojik görüntüsü

Gm+Cr 50; normal histopatolojik yapıdadır. PAS, Bar:70µm.

5. TARTIŞMA

Böbrekler, toksik maddelerin ve metabolitlerinin atılımındaki önemi nedeniyle kimyasal kaynaklı toksisite için birincil hedef organ olarak kabul edilir (Jacob et al., 2020a; Xue et al., 2006). Birçok terapötik ajanın klinik kullanımı nefrotoksisiteye neden olmaktadır (Perazella, 2018). Yaygın olarak kullanılan bir aminoglikozit grubu antibiyotiklerden olan gentamisin sık kullanılması, ilaca bağlı nefrotoksisitenin önde gelen nedenlerinden biridir (Randjelovic et al., 2017). Böbrek hastalığı dünya çapında 750 milyondan fazla insanı etkileyen ciddi bir sağlık sorunu olup akut böbrek yetmezliği ve kronik böbrek yetmezliği olarak 2'ye ayrılır. Akut böbrek yetmezliği, böbrek boşaltım fonksiyonunun hızlı kaybı ile karakterize klinik bir sendromdur (Nassan et al., 2021; Perazella, 2018).

Gentamisin kullanan bireylerde gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede renal korteks içindeki proksimal tübül epitel hücrelerinde ve glomeruluslarda hasar ile bağlantılı olarak böbrek yetmezliği görülmektedir (Heidarian et al., 2017). Ratlara 4-10 gün boyunca gentamisin (40-200 mg/kg) enjeksiyonu ile nefrotoksisite indüklenebilir (Apaydin Yildirim et al., 2017; Heidarian et al., 2017; Jacob et al., 2020b). Gentamisin uygulandıktan sonra vücutta glomeruluslar aracılığıyla filtre edilerek endositoz yoluyla proksimal tübül lizozomlarında birikerek lizozomal membran yırtılmasına ve sonuç olarak tübüler nekroza neden olur. Gentamisinin böbrek dokusunda birikmesi inflamasyona, apoptoza, oksidatif hasara ve böbrek hasarının gelişimine neden olmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda gentamisin kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozu inhibe eden moleküller üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Azouz et al., 2022; Jado et al., 2020).

Safran, Iridaceae ailesine ait *Crocus sativus* L. bitkisinin çiçeklerinden elde edilen, iyi bilinen bir baharattır. Bitkinin kullanılan kısmı, karotenoidler, apokarotenoidler,

flavonoidler ve vitaminler açısından zengin olan kurutulmuş ta yapraklarıdır. Bu aktif bileşikler arasında, safranın karakteristik çoklu farmakolojik etkinliklerinden sorumlu olan ana bileşik olarak kabul edilen crosin yer almaktadır (Alavizadeh & Hosseinzadeh, 2014). Crosin, safranın kırmızı renginden sorumlu olan, suda çözünen bir karotenoid pigmenttir ve antioksidan, anti-inflamatuar ve antikanser aktiviteleri bulunmaktadır (Kalantar et al., 2019). Son yıllarda crosinin ratlarda böbrek yetmezliğini önemli ölçüde azalttığına dair çalışmalar yapılmaktadır (Hashemzaei et al., 2020).

Yapılan birçok çalışmada gentamisin uygulaması sonrasında renal dokuda inflamasyonun ve akut tubüler nekrozun artışından dolayı dem gelişimi söz konusu olduğu için böbrek ağırlıklarında artış görüldüğü bildirilmiştir (Erdem et al., 2000; Sharawy et al., 2018). Gülmez ve ark.'nın gentamisin ile oluşturulan deneysel nefropati modelinde adropinin terapotik etkisini inceledikleri çalışmada, gentamisinin 100 mg/kg/gün intraperitoneal olarak uygulandığı gruptaki ratların böbrek ağırlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak $p < 0.05$ düzeyinde yüksek olduğunu saptamışlardır (Gulmez et al., 2018).

El-Ashmawy ve ark. (2022) randomiyolize bağlı gelişen böbrek hasarında böbrek ağırlığının kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı ve randomiyoliz ile birlikte uygulanan crosinin böbreklerdeki hasarı azaltarak böbrek ağırlığını azalttığını bildirilmişlerdir (El-Ashmawy et al., 2022). Chowdhury ve ark. (2019), 50 mg/kg streptozotosin uygulayarak diyabet oluşturdukları ratlarda, böbrek ağırlıklarının diğer gruplara göre yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Crosin uygulaması yapılan gruptaki böbrek ağırlıklarının diyabetik gruba göre düştüğünü tespit etmişlerdir (Chowdhury et al., 2019). Bu çalışmada ratlara uygulanan Gm'nin böbrek ağırlıklarında artışa neden olduğunun tespit edilmesi literatür bilgilerini destekler niteliktedir.

Nefrotoksisite, gentamisin gibi ilaçların böbrek korteksinde birikmesi sonucunda

oluşur. Sonuçta böbrek fonksiyon bozukluğu sırasında glomeruler filtrasyon hızının azalması nedeniyle böbreklerde meydana gelen hasar sonucu kandaki üre, ürik asit ve kreatinin seviyeleri artmaktadır. Bu durum, renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik gibi patolojik durumları içerir (Kang et al., 2022; Kadir et al., 2022; Ullah et al., 2014). Gentamisin uygulanan ratlarda plazma üre, kreatinin ve ürik asit düzeyinin kontrol grubuna göre kıyaslandığında önemli derecede yüksek olduğunu ve histopatolojik bulgularında bu bulguları desteklediğini bildirmişlerdir (Ullah et al., 2014).

Crosinin gentamisin kaynaklı nefrotoksisite üzerindeki iyileştirici etkisi ve antioksidan rolünün araştırıldığı bir çalışmada 100 mg/kg dozda gentamisin uygulanarak nefrotoksisite oluşturulan grupta plazma üre ve kreatinin düzeyinin kontrol grubuna göre yükseldiği, gentamisin ile birlikte 100 mg/kg crosin verilen grupta plazma üre ve kreatinin seviyelerinin düştüğü belirtilmiştir (Yarijani et al., 2016). Böbrek iskemisi üzerine yapılan bir çalışmada plazma üre, kreatini ve BUN düzeyinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığı ve tedavi grubu olan crosinin (20 mg/kg) bu belirteçleri önemli oranda azalttığı ve böbrek fonksiyonlarını düzenlediği bildirilmiştir (Naghizadeh et al., 2010).

Linjuan ve ark. (2021), hiperglisemik ratlarda böbrek fonksiyon bozukluğunu belirlemek için diyabetik nefropatinin klasik biyobelirteçleri olan plazma BUN, kreatinin, ürik asit düzeyleri ve idrar albumin/idrar kreatinin oranını ölçmüşlerdir. Diyabete bağlı gelişen nefrotoksisitede serum BUN, kreatinin, ürik asit düzeyleri ve idrar albumin/idrar kreatinin oranının arttığını, crosin ile tedavi sonrası bu düzeylerin önemli ölçüde azaldığını belirlenmişlerdir (Zhang. et al., 2021). El-Ashmawy ve ark (2022), ratlarda crosinin (200 mg/kg/i.p./7 gün) rabdomiyolize bağlı gelişen nefrotoksisite üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada, rabdomiyoliz sonucu BUN ve kreatinin seviyelerinin

yükseldiğini ve renal hasara yol açtığını tespit etmişlerdir. Crosin tedavisinden sonra bu parametrelerde iyileşme görüldüğünü bildirilmişlerdir (El-Ashmawy et al., 2022).

Yapılan tez çalışmasıyla ratlara 8 gün boyunca uygulanan Gm'nin böbrek hasarının rutin biyobelirteçleri olan üre, kreatinin ve ürik asit düzeylerinde artışa neden olarak nefrotoksisite oluşturduğu tespit edildi. Gm ile birlikte Cr uygulanan gruplarda (özellikle Gm+Cr 50 mg/kg) ürik asitin kontrol grubuna yaklaştığı, üre ve kreatinin düzeylerinin ise Gm grubuna göre önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir.

Hücrel hasara karşı etkili bir biyokimyasal savunma mekanizması olan inflamasyon, oldukça karmaşık bir süreçtir. Bağışıklık hücreleri tarafından inflamasyon bölgelerinde salgılanan reaktif oksijen türleri, hücre hasarının temel sebepleri arasında yer almaktadır (Wang et al., 2014). Sitokinler, bağışıklık yanıtlarının başlatılması ve düzenlenmesinde önemlidirler. Sitokin ağı, bağışıklık sisteminde birçok bağışıklık ve bağışıklık dışı hücre üzerinde doğrudan veya dolaylı olarak etkisi olan en karmaşık ve hassas biyolojik ağlardan biridir (Opal & DePalo, 2000). Sitokin ağı bozulursa, çeşitli bağışıklık sistemi bozukluklarının ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Lenfositler ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulan aktive makrofajlar, interlökinler ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler inflamasyon sürecinde önemli belirteçlerdir. Proinflamatuvar sitokinler, sistemik akut faz reaksiyonlarını tetikleme, endotel üzerinde etki yapma ve fibroblastlarda etki yapma gibi başlıca üç etkiye sahiptirler. Bakteriyel ürünler, immun kompleksler, toksinler, fiziksel yaralanmalar ve çeşitli inflamatuvar olaylarda sitokin salınımı gerçekleşir (Vilcek & Feldmann, 2004).

Pyelonefritte, böbrek dokusunda TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar mediatörlerin arttığı gözlemlenmiştir (Balaha et al., 2023). Tümör nekroz faktörü, inflamatuvar ve bağışıklık yanıtlarının temel düzenleyicisidir. TNF- α sinyalizasyonunda düzensizlikler, şiddetli inflamatuvar ve otoimmün hastalıklara yol açabilir (Webster &

Vucic, 2020). Farklı patolojik durumlarla mücadelede crosinin biyolojik etkisinin olası bir mekanizması olarak TNF- α baskılanması bildirilmektedir (Moallem et al., 2014; Rezaee-Khorasany et al., 2020; Shoja et al., 2018).

Gentamisin ile yapılan çalışmalarda Gm grubunda kontrol grubuna göre TNF- α , IL-1 β ve IL-6, proinflatuarların arttığı saptanmıştır (Diao et al., 2023; Elkhoely, 2023).

Diyabetik nefropati sonucu artan TNF- α , IL-1 β proinflatuarları ve inflamasyonu crosin uygulamasının azalttığı saptanmıştır (Zhang. et al., 2021). Yapılan hipertansiyon ve hepatotoksisite çalışmalarının sonucu olarak artan sitokin düzeylerinin crosin uygulaması ile (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) önemli oranda düştüğü ve inflamasyona engel olduğu kanıtlanmıştır (Chen et al., 2021; Liang et al., 2020).

Bu çalışmada proinflatuar düzeylerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) Gm grubunda istatistiksel olarak önemli oranda arttığı görüldü. Crosin uygulanan gruplarda (özellikle crosin 50 mg/kg uygulanan grupta) proinflatuar parametrelerin azaldığı tespit edilmiş olup elde edilen bulguların yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak böbreği inflamasyona karşı koruduğu anlaşılmıştır.

Oksidatif stres, biyolojik sistemlerde serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge bozulduğunda ortaya çıkan bir durumdur. Bu dengenin bozulması, özellikle mitokondri ve diğer hücre organellerinde gerçekleşen normal metabolizma, yaşlanma, iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, yüksek oksijen basıncı, radyasyon ve kimyasal ajanlara maruz kalma gibi durumlar sonucu üretilen ROS'ların yüksek reaktiviteye sahip moleküller olmasıyla ilişkilidir (Durackova, 2010). Oksidatif stres, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar, diyabet, ateroskleroz ve inflamatuvar bozukluklar gibi birçok hastalığın patogenezinin sorumludur. Bazı ilaçların tedavi sürecinde oksidatif strese neden olabileceği ve buna bağlı komplikasyonlar ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Araştırmalar ayrıca, meydana gelen

oksidatif stresin tek bir organı değil, diğer organları da etkileyebileceğini göstermektedir (Neha et al., 2019).

Gentamisin gibi yaygın olarak kullanılan ve vücutta serbest radikal oluşumunu tetikleyen ilaçlar, özellikle gram negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkilidir. Gentamisinin oluşturduğu oksidatif stres, doza bağlı olarak değişebilir. Gm, organizmada metabolize olurken aşırı serbest radikal oluşumunu tetikleyebilir. Bu serbest radikaller, hücre zarlarındaki lipitlere, nükleik asitlere ve hücre içi proteinlere zarar vererek, bu makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere ve hücre hasara yol açarlar (Elkhoely, 2023).

Böbrekteki glomeruluslar oksidatif strese oldukça hassastırlar. Böylece antioksidan uygulamaları böbrek hasarındaki serbest radikalleri süpürücü etkilerinden dolayı böbrek hasarını ciddi oranda azaltmaktadırlar (Ha & Lee, 2001; Jalili et al., 2020). Lipid peroksidasyonunun bir ürünü olarak bilinen MDA'nın enzim aktivitelerini bozduğu, hücre membranlarının geçirgenliğini artırdığı, iyon alışverişini etkileyerek hücre içi iyon dengesini değiştirdiği ve DNA yapısında kırılmalar ve baz değişimlerine neden olduğu rapor edilmiştir. Gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede, birçok çalışma MDA düzeyinde artış olduğunu göstermektedir (Balaha et al., 2023; Diao et al., 2023; Elkhoely, 2023). Crosin, glutatyon düzeyinin azalmasını önleyerek ve antioksidan kapasiteyi artırarak proteinlerin ve lipidlerin peroksidasyonunu inhibe etmektedir ve oksidatif stresin yıkıcı etkilerini azaltmaktadır. Dahası crosin inflamatuvar yolları ve apoptozisi inhibe ederek hücreleri korumaktadır (Jalili et al., 2017; Roshankhah et al., 2017; Salahshoor et al., 2016).

Antioksidanlar, hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyan savunma sistemleridir. Bu savunma mekanizmaları, ilaçlar, karsinojenler ve çeşitli toksik radikal reaksiyonlarının neden olduğu serbest radikal hasarına karşı hücreleri korumak

için hem doğrudan hem de dolaylı olarak etki gösterirler (Begum et al., 2021; Durackova, 2010). Bu mekanizmaların bir kısmı serbest radikal oluşumunu önlemeye yönelik işlev görürken, diğer bir kısmı ise ortamdaki serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemektedir. Serbest radikaller, proteinler, DNA ve doymamış yağlar gibi birçok hücrenel bileşenle etkileşime girerek kimyasal reaksiyonlara ve yapısal değişikliklere yol açabilir. Bu etkileşimler, apoptozis gibi hücrenel süreçlere neden olabilecek potansiyel reaksiyonlardır. Antioksidanlar, bu zararlı etkilerin önlenmesi veya azaltılması için serbest radikaller ile etkileşime girerler. Bu şekilde hücrelerin oksidatif hasara maruz kalma riskini azaltırlar ve hücrelerin sağlıklı işlevlerini sürdürebilmelerini sağlarlar. SOD, CAT ve GPx, canlı hücrelerin serbest radikal hasarından korunmasında önemli roller üstlenen başlıca antioksidan enzimlerdir (Davidovic et al., 2021; Qi & Dong, 2021).

Ratlarda gentamisin ile oluşturulan böbrek hasarında TGF- β 1 rolünün incelendiği çalışmada; gentamisin grubundaki ratların böbrek dokusunda SOD, GPx ve CAT aktivitelerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır (Diao et al., 2023).

Cisplatin kaynaklı böbrek yetmezliğinde MDA'nın artışına ek olarak SOD, GPx, CAT aktivitelerinin ve GSH düzeyinin azaldığı görülmüştür. Crosinin cisplatin kaynaklı böbrek yetmezliğini önlediği ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı ve MDA düzeyini istatistiksel olarak azalttığı saptanmıştır (Naghizadeh et al., 2010).

Ayrıca, rabdomiyoliz kaynaklı böbrek hasarında crosin uygulmasının ratların böbreklerini koruduğu, CAT aktivitesini artırdığı ve MDA düzeyini azalttığı belirtilmiştir (El-Ashmawy et al., 2022).

Crosinin arsenik kaynaklı kardiyotoksisite üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada; arsenik grubunun MDA düzeylerinin arttığı, SOD, GPx, CAT aktivitelerinin ve GSH düzeyinin azaldığı görülmüştür. Uygulanan crosin tedavisi ile oksidatif stres engellenmiş, MDA düzeyi azalmış, GSH ve antioksidan enzim aktiviteleri artmıştır

(Liang et al., 2020).

Gentamisinin vücuttaki SOD, GPx ve CAT gibi antioksidan enzimleri azaltarak redoks dengesini bozduğu da çeşitli çalışmalar tarafından bildirilmiştir (Elkhoely, 2023; Govindappa et al., 2019; Kang et al., 2022; Medic et al., 2019; Yarijani et al., 2016).

Crosin 100 mg/kg dozda doksorubisin ile nefrotoksisite oluşturulmuş ratlarda doksorubisin grubunda MDA seviyesini yükseltmiş, SOD aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli oranda düşürmüştür. Crosin uygulaması ile birlikte MDA düzeyinin azaldığı, SOD aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Hussain et al., 2021).

Yapılan bir böbrek iskemi-reperfüzyon çalışmasında oksidatif strese karşı crosinin etkileri araştırılmış, iskemi oluşturulan ratlarda MDA seviyesinin arttığı, SOD aktivitesinin ise azaldığı bulunmuştur. Crosin uygulanan ratlarda MDA seviyelerinin düştüğü ve SOD aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Naderi et al., 2021).

Crosinin diyabetik nefropati üzerine etkisi ile ilgili bir çalışmada nefr opati grubunda MDA düzeyinin arttığı, SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. Crosin (50 mg/kg) ile tedavi sonucu MDA düzeyinin azaldığı, SOD, GPx ve CAT aktivitelerinin önemli oranda arttığı belirlenmiştir (Zhang. et al., 2021).

Arsenik kaynaklı kardiyotoksistide crosinin 40 mg/kg uygulanan dozu ile beraber toksikasyon grubuna göre MDA düzeyinde azalma, GSH düzeyinde, CAT ve SOD aktivitelerinde artma olduğu görülmüştür (Liang et al., 2020).

Bu tez çalışmasında GSH düzeyinin Gm grubunda en az olduğu görüldü. Uygulanan tedavi gruplarında GSH düzeyinin arttığı istatistiksel olarak saptandı. Yine crosinin özellikle 50 mg/kg dozunun antioksidan enzimleri uyararak Gm kaynaklı nefrotoksisiteyi önlediği görüldü.

Proteinler, oksidan maddelere maruz kaldıklarında iki farklı yolla etkilenirler. Birincisi, serbest radikallerin doğrudan protein moleküllerine etkisiyle gerçekleşir.

İkincisi ise oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent bağlarla bağlanması sonucu ortaya çıkar. Bu süreçler proteinlerde birçok kovalent değişikliğe yol açar. Protein oksidasyon ürünleri, oksidatif stresin önemli bir göstergesi olarak kabul edilir. Ayrıca, hastalığın ilerlemesiyle protein oksidasyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde, oksidasyona uğramış modifiye ürünlerin ikincil ürünleri önem kazanmıştır (Piwowar et al., 2007; WitkoSarsat et al., 1996). Özellikle oksidatif stres sürecinde, aktive olan nötrofillerde bulunan myeloperoksidaz enzimi tarafından hipokloröz asit ve kloraminlerin etkileşimiyle oluşan AOPP, proteinlerin oksidatif modifikasyonunun güvenli bir ölçüm parametresi olarak kullanılmaktadır. AOPP değerleri, oksidasyon kaynaklı protein hasarını ölçmek ve oksidatif stresi azaltmaya yönelik tedavi stratejileri geliştirmek için önemlidir (Yıldırım & Albayrak, 2023).

Yılmaz ve ark. (2018), ratlarda nefrotoksisite oluşturmak amacıyla 8 gün boyunca 80 mg/kg/gün gentamisin uygulamışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, gentamisin verilen gruptaki AOPP değeri, gentamisin+fucoidan grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme göstermiştir. 5-Fluorourasil'in neden olduğu hepatoksisite çalışmasında crosinin AOPP seviyesini düşürdüğü ve yine yapılan bir iskemi çalışmasında crosin ile tedavide AOPP düzeyinin istatistiksel olarak düştüğü kanıtlanmıştır (Yılmaz et al., 2018). Gentamisin ile böbrek hasarı oluşturulan grupta en yüksek AOPP düzeyinin belirlenmesi belirtilen çalışmayla uyumludur. Gentamisin ile birlikte crosin uygulanan gruplarda AOPP düzeyinin kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlendi.

Bu çalışmada serum ve dokuda en yüksek MDA düzeyi Gm grubunda olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre crosin uygulamasının MDA düzeyini azalttığı ve lipid peroksidasyonunu önlediği görüldü ve bu konuda yapılan çalışmalar ile sonuçların uyumlu olduğu saptandı. Sonuç olarak, fazla miktardaki serbest radikaller lipid

peroksidasyonuna ve MDA üretimine yol açmaktadır. Bu bulgulara dayanarak, crosinin protein oksidasyonunu engellediği ve oksidatif hasarı azalttığı kanaatine varıldı.

Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunun artması böbrekteki tübüler hücrelerdeki ksantin oksidaz ve mitokondri aracılığıyla üretilen ROS kaynaklı böbrek hasarının patofizyolojisinde rol oynayarak MDA'nın artışı, SOD, CAT, GPx aktivitesinin ve GSH düzeyinin azalması sonucu apoptoza sebep olmaktadır (Bastani et al., 2022; Su et al., 2019).

Crosinin tedavisinden sonra bu parametrelerde iyileşme görüldüğü ve bu iyileşmenin crosinin oksidatif stresi önleyerek renoprotektif etki göstermelerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (El-Ashmawy et al., 2022).

NF- κ B, hücrel transkripsiyonu, hayatta kalma ve sitokin üretimini düzenleyen önemli bir sinyal yoludur. NF- κ B, inflamasyonla ilişkili farklı genlerin ifadesini kontrol eder ve inflamatuvar yanıtların aracısı olarak kritik rol oynar (Su et al., 2019). Farklı çalışmalar, crosinin antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitelerinin NF- κ B inhibisyonu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Boozari & Hosseinzadeh, 2022; Rahim et al., 2019). Crosin, serum NF- κ B düzeylerini, miyeloperoksidaz, COX-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), fosfolipaz A2 ve prostanoidler gibi pro-inflamatuvar enzimleri aşağı regüle edebilir (Asbaghi et al., 2021; Pashirzad et al., 2019; Zeinali et al., 2019).

Yapılan bu çalışmada crosinin NF- κ B ve COX-2 gen ekspresyonlarını toksikasyon grubuna göre önemli oranda düşürdüğü saptandı. NF- κ B'nin aşağı regüle olması ile western blot bulgularında protein ekspresyon düzeyinin Gm grubuna göre azaldığı ve inflamasyona karşı böbreği koruduğu tespit edilirken elde edilen bulgular ile literatür bulgularının uyumlu olduğu belirlendi. Crosinin antiinflamatuvar özellikleri, iNOS ve COX-2 mRNA seviyelerinin ve IL-1 β ve TNF- α konsantrasyonlarının azalmasıyla kanıtlanmıştır (Huang & Jia, 2021). Çalışmada gen ve protein ekspresyonu düzeyinde

bakılan COX-2 düzeyi Gm grubunda önemli oranda arttığı ve crosin uygulaması ile birlikte COX-2 seviyesinin düştüğü tespit edildi (Hashemzaei et al., 2020).

Apoptotik yolak, nefrotoksisite patojenitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu yolak, antiapoptotik protein Bcl-2 ile proapoptotik protein Bax arasındaki denge tarafından kontrol edilir. Bax/Bcl-2 oranı yükselirse, kaspaz-3 aktivitesi artar ve apoptotik yolak güçlenir (Boussabbeh et al., 2016). Bcl-2, Bcl ailesinin prototipidir ve mitokondrinin dış tabakasında bulunur ve anti-apoptotik özellikler üreterek antioksidan yolları düzenler (Kinra et al., 2005). Diğer yandan, Bax iyi bilinen bir apoptoz hızlandırıcısıdır. Vücut herhangi bir stresle karşılaştığında, Bax konfigürasyonunu değiştirir ve mitokondriyal membranın içine taşınarak sitokrom C salınımına yol açarak kaspaz-3'ün aktivasyonuna ve Bcl-2'nin inhibisyonuna dolayısıyla apoptozun aktive olmasına neden olur (Albalawi et al., 2023; Sun et al., 2015). İnisiyator kaspazlar, kaspaz-8 ve kaspaz-9, etki kaspazı olan kaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3 diğer protein substratlarını keserek apoptozu gerçekleştirir. İnisiyator kaspazlar, hücre yüzeyinde aktive olanlar (ekstrinsik apoptoz) veya mitokondride aktive olanlar (intrinsik apoptoz) olarak sınıflandırılır. Ekstrinsik yolak, TNF- α 'nın reseptöre bağlanmasıyla başlarken, intrinsik yolak, oksidatif hasar veya endoplazmik retikulum stresıyla başlar (Becker et al., 2013).

Crosin ile ilgili daha önce yapılan kolorektal kanser çalışmasında Bcl-2 ve Bax dengesini düzenlediği bildirilmiştir (Hosseini et al., 2022). Bu tez çalışmasında gentamisin ile oluşturulan nefrotoksisitede Bax'ın arttığı, Bcl-2'nin düştüğü ve her iki apoptotik yolak olan intrinsik ve ekstrinsik yolları aktive ettiği saptandı. Ancak, Gm grubundaki ratlara crosin uygulandığında, Bcl-2 ekspresyonunun anlamlı olarak yükseldiği Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Çalışmada western blot ile bakılan Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 parametrelerinin RT-PCR bulgularıyla doğru

orantılı olduğu ve crosin uygulamasının (özellikle crosin 50 mg/kg dozunun) Bcl-2 proapoptotik protein seviyesini artırdığı, Bax ve Kaspaz-3 protein seviyelerini düşürdüğü görüldü. Crosin ile ilgili daha önce yapılan kolorektal kanser çalışmasında Bcl-2 ve Bax dengesini düzenlediği bildirilmiştir (Hosseini et al., 2022), ancak crosinin Gm kaynaklı böbrek toksisitesindeki bu etkilerini bildiren herhangi bir literatüre rastlanmamıştır.

Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), bakteri ve virüs gibi patojenlere karşı bağışıklık tepkisinde yer alan önemli bir yoldur. TLR'lerin aşırı aktivasyonu otoimmün ve inflamatuvar hastalıklara yol açabilir. TLR inhibitörleri, bu hastalıkların tedavisinde umut verici terapötik ajanlar olarak ortaya çıkmıştır (Boozari et al., 2019). TLR'ler sitokin, kemokin üretimini düzenlemek için NF- κ B ve MAPK gibi birçok iltihaplanma kaskadını aktive ederler (Gonzalez-Guerrero et al., 2017). TLR-4 sinyal yolları, gentamisin de dahil olmak üzere çeşitli ilaçlar tarafından oluşturulan organ hasarıyla ilişkilendirilmiştir. TLR-4 aktivasyonu, gentamisin uygulanan ratların böbreklerinde tespit edilmiş ve bu aktivasyonun birden fazla iltihaplanma yolağını etkilediği ve inflamasyonu artırdığı gösterilmiştir (Gonzalez-Guerrero et al., 2017; Mahmoud et al., 2021; Mohamed et al., 2020).

Doksorubisin ile oluşturulan kardiyotoksisite çalışmasında crosinin doksorubisin kardiyotoksisitesine karşı koruyucu etkisini TLR-2/NF- κ B yolağını düzenleyerek, iltihaplanmayı ve oksidatif stresi inhibe ederek gösterdiği kanıtlanmıştır (Chu et al., 2020). İzoprotenerol tarafından indüklenen miyokardiyal fibroza karşı TLR-4/NF- κ B yolağını hedefleyen crosin tedavisi, kardiyovasküler hastalıklarda umut verici bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır (Jin et al., 2020).

Crosinin TLR-4'ün inhibisyonunu sağladığı, iskemi-reperfüzyon kaynaklı akut böbrek hasarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Oral crosin uygulamasının böbrek hasarında antioksidan savunmayı artırdığı, TLR-4 ve IL-6

ifadelerini azalttığı, böbrek histopatolojisini iyileştirdiği ve oksidatif stresi azalttığı saptanmıştır (Abou-Hany et al., 2018b). Crosinin bleomisin ile indüklenen akciğer fibrozisinde anti-inflamatuar özelliğinden dolayı TLR-4 ifadesini azalttığı belirtilmiştir (Zaghloul et al., 2019).

Ratlarda Gm ile oluşturulan nefrotoksisite çalışmasında elde edilen bulgular doğrultusunda crosinin 50 mg/kg dozunun Gm ile beraber uygulandığı grupta TLR-4 seviyesini azalttığı saptandı. Sonuç olarak crosin uygulaması ile TLR-4/NF- κ B yollarının inhibe edildiği ve Gm kaynaklı nefrotoksisiteye karşı böbrekleri iyileştirdiği tespit edildi.

Gm maruziyetinden sonra oksidatif stresin artması aynı zamanda nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna ve inflammatuar faktörlerin ekspresyonunun yukarı regülasyonuna yol açarak inflammatuar hasarı teşvik eder. Hücreler oksidatif baskı altında olduğunda, hücre ölüm sinyallerine dahil olan genler aktive olur ve apoptoz veya nekroz indüklenerek geri dönüşümsüz hasarlı hücreler ortadan kaldırılır. Bu nedenle, apoptoz artışının böbrek hasarının patogeneğinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Nrf-2 antioksidan enzimleri aktive eder ve oksidatif stres kaynaklı hasarı inhibe eder (Balaha et al., 2023; Kang et al., 2022). Nrf-2'nin hücreleri serbest radikallerin hasarından, apoptozdan koruduğu ve hücrenin hayatta kalmasını sağladığı ve birçok hastalıkta koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, HO-1, Nrf-2'ye bağımlı hücresel tepkilerin ana etkileyicilerinden biri olarak kabul edilir. HO-1 ve metabolik ürünleri, hücresel homeostazın korunmasında ve hücresel stresle adaptif yanıtta ve sağlıklı hücrelerin neoplastik hücrelere dönüşmesini önlemede önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Ryter & Choi, 2005).

Son zamanlarda Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 gibi apoptoz parametreleri, TLR-4, NF-kB, COX-2, Nrf-2 ve HO-1 gibi inflamasyon yollarının etkilendiği bildirilmiştir (Hassanein et al., 2021; Karimi et al., 2020).

Elde edilen bulgular ışığında Gm'nin böbrek hasarında oksidatif strese yol açarak antioksidan aktiviteyi baskılayarak, renal Nrf-2 ve HO-1 ekspresyonunu baskıladığı saptandı. Crosin 50 mg/kg tedavi dozunun gentamisin ile birlikte uygulandığında renal Nrf-2 ve HO-1 protein düzeylerini artırdığı bulgusu literatüre öncü çalışma olarak sunulmuştur.

Naderi ve ark. (2021) IR/R sonucu böbreklerdeki hasarın crosin ile azaldığını histopatolojik olarak kanıtlamışlardır (Naderi et al., 2021). Buna ilave olarak histopatolojik çalışmalar temelinde cisplatin ile oluşturulan böbrek toksikasyonundaki nekroz ve proksimal tübül hasarını crosinin önlediğine dair birçok çalışma mevcuttur (Gholampour & Sadidi, 2018; Mahmoudzadeh et al., 2017).

Ratlarda gentamisin ile indüklenen böbrek hasarı sonrasında gelişen dejenerasyon, akut tübüler nekroz, inflamasyon ve hemorajinin artışından dolayı şiddetli histopatolojik değişiklikler görüldü. Özellikle Gm ile birlikte uygulanan crosin 50 mg/kg dozunun histopatolojik bulguları iyileştirdiği tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gentamisin uygulaması sonrasında gelişen dejenerasyon, akut tubüler nekroz, inflamasyon ve hemorajinin artışından dolayı böbreklerde ödem gelişimi sonucu böbrek ağırlıklarında artış saptanmıştır. Nefrotoksisite, gentamisin gibi ilaçların böbrek korteksinde birikmesi sonucunda olduğu için glomeruler filtrasyon hızının azalması nedeniyle Gm grubunda kontrol grubuna göre böbreklerde meydana gelen hasar sonucu kandaki ürik asit, kreatinin ve üre düzeylerinde artışın olduğu tespit edilmiştir. Gm ile crosin uygulamasının bu belirteçleri önemli oranda azalttığı, böbrek fonksiyonlarını düzenlediği ve histopatolojik bulgularında bu bulguları desteklediği saptanmıştır.

Böbrek dokusunda gentamisin uygulaması ile birlikte proinflamatuvar mediatörlerden TNF- α , IL-1 β ve IL-6 düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir. Crosin uygulamasının inflamasyonu ve proinflamatuvarları önemli oranda azalttığı saptanmıştır.

Plazma ve böbrek dokusunda, crosinin gentamisin kaynaklı nefrotoksisitede serbest radikalleri ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA düzeyini azaltarak lipid peroksidasyonunu önlediği, AOPP düzeyini azalttığı; GSH düzeyini, SOD, CAT ve GPx aktivitesini artırarak antioksidan savunma mekanizmasına anlamlı olarak katkı sağlayarak oksidatif stresi önlediği tespit edilmiştir.

Gentamisin kaynaklı nefrotoksisite durumunda apoptozis ile inflamasyonda rol alan proapoptotik Bax; kaspaz-3, COX-2, NFk-B ve TLR-4 protein ekspresyon düzeylerinin arttığı, antiapoptotik Bcl-2, HO-1 ve Nrf-2 ekspresyon düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ratlara crosin uygulandığında, Bax, kaspaz-3, COX-2, NF-kB ve TLR-4 protein ekspresyon düzeylerinin azaldığı; Bcl-2, HO-1 ve Nrf-2 ekspresyonlarının anlamlı olarak yükseldiği hem RT-PCR hem de western blotlama bulgularıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Crosinin Gm kaynaklı böbrek toksisitesinde etkilerini inceleyen çalışma olmasına

rağmen crosinin Gm ile birlikte uygulaması sonucu renal Nrf-2/HO-1 protein düzeylerini artırdığı bulgusunu bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmadığı için elde edilen bulgular literatüre öncü çalışma olarak sunulmuştur.

Sonuç olarak; elde edilen veriler ışığında yapılan çalışmada Gm kaynaklı böbrek hasarına karşı crosin 50 mg/kg uygulamasının oksidatif stresi, apoptozu, inflamasyonu inhibe ederek histopatolojik değişiklikleri ortadan kaldırdığı ortaya konulmuştur. Ayrıca crosinin Gm kaynaklı böbrek hasarına karşı Bax, Bcl-2, Kaspaz-3 gibi apoptoz parametrelerini, TLR-4, NF-kB, COX-2, Nrf-2 ve HO-1 gibi inflamasyon yollarını düzenlenmeye aracılık ederek gentamisin kaynaklı böbrek hasarını tedavi edebileceği, böbrek hasarına karşı crosinin terapötik faydalarının ardındaki moleküler süreçlerin belirlenmesinin ardından terapötik ajan olarak kullanılabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- Abernethy, V. E., & Lieberthal, W. (2002). Acute renal failure in the critically ill patient. *Critical Care Clinics*, 18(2), 203-+. [https://doi.org/Pii_S0749-0704\(01\)00002-1](https://doi.org/Pii_S0749-0704(01)00002-1)
1Doi 10.1016/S0749-0704(01)00002-1
- Abou-Hany, H. O., Atef, H., Said, E., Elkashef, H. A., & Salem, H. A. (2018a). Crocin mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 284, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.02.001>
- Abou-Hany, H. O., Atef, H., Said, E., Elkashef, H. A., & Salem, H. A. (2018b). Crocin reverses unilateral renal ischemia reperfusion injury-induced augmentation of oxidative stress and toll like receptor-4 activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.017>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alavizadeh, S. H., & Hosseinzadeh, H. (2014). Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 65-80. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.016>
- Albalawi, G. A., Albalawi, M. Z., Alsubaie, K. T., Albalawi, A. Z., Elewa, M. A. F., Hashem, K. S., & Al-Gayyar, M. M. H. (2023). Curative effects of crocin in ulcerative colitis via modulating apoptosis and inflammation. *International Immunopharmacology*, 118. <https://doi.org/ARTN11013810.1016/j.intimp.2023.110138>
- Albarakati, A. J. A., Baty, R. S., Aljoudi, A. M., Habotta, O. A., Elmahallawy, E. K., Kassab, R. B., & Moneim, A. A. E. (2020). Luteolin protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic,

- and Nrf2/HO-1 signaling pathways. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2591-2603. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05346-1>
- Ali, B. H., Al Za'abi, M., Blunden, G., & Nemmar, A. (2011). Experimental gentamicin nephrotoxicity and agents that modify it: a mini- review of recent research. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 109(4), 225-232.
- Alonso, G. L., Salinas, M. R., Garijo, J., & Sanchez-Fernandez, M. A. (2001). Composition of crocins and picrocrocin from Spanish saffron (*Crocus sativus* L.). *Journal of Food Quality*, 24(3), 219-233. <https://doi.org/DOI 10.1111/j.1745-4557.2001.tb00604.x>
- Apaydin Yildirim, B., Aydin, T., Kordali, S., Yildirim, S., Cakir, A., & Yildirim, F. (2020). Antihemorrhoidal activity of organic acids of *Capsella bursa-pastoris* on croton oil-induced hemorrhoid in rats. *J Food Biochem*, 44(9), e13343. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13343>
- Apaydin Yildirim, B., Kordali, S., Terim Kapakin, K. A., Yildirim, F., Aktas Senocak, E., & Altun, S. (2017). Effect of *Helichrysum plicatum* DC. subsp *plicatum* ethanol extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 18(6), 501-511. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500291>
- Arab, H. H., Ashour, A. M., Eid, A. H., Arafa, E. S. A., Al Khabbaz, H. J., & Abd El-Aal, S. A. (2022). Targeting oxidative stress, apoptosis, and autophagy by galangin mitigates cadmium-induced renal damage: Role of SIRT1/Nrf2 and AMPK/mTOR pathways. *Life Sciences*, 291. <https://doi.org/ARTN 12030010.1016/j.lfs.2021.120300>
- Asbaghi, O., Sadeghian, M., Sadeghi, O., Rigi, S., Tan, S. C., Shokri, A., & Mousavi, S. M. (2021). Effects of saffron (*Crocus sativus*L.) supplementation on

- inflammatory biomarkers: A systematic review and meta-analysis. *Phytotherapy Research*, 35(1), 20-32. <https://doi.org/10.1002/ptr.6748>
- Azouz, A. A., Hanna, D. A., Abo-Saif, A. A., & Anwar Shehata Messiha, B. (2022). Interference with megalin expression/endocytic function by montelukast mitigates gentamicin nephrotoxicity: Downregulation of ClC-5 expression. *Saudi Pharm J*, 30(2), 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.12.013>
- Bae, E., Lee, T. W., & Park, D. J. (2020). Drug-induced nephrotoxicity. *Journal of the Korean Medical Association*, 63(1), 30-35. <https://doi.org/10.5124/jkma.2020.63.1.30>
- Balaha, M. F., Alamer, A. A., Eisa, A. A., & Aljohani, H. M. (2023). Shikonin Alleviates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats by Targeting Renal Endocytosis, SIRT1/Nrf2/HO-1, TLR-4/NF-kappaB/MAPK, and PI3K/Akt Cascades. *Antibiotics (Basel)*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050826>
- Ball, C. R. (1966). Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment: relevance to protection against nitrogen mustards. *Biochem Pharmacol*, 15(7), 809-816. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(66\)90157-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(66)90157-2)
- Bass, J. J., Wilkinson, D. J., Rankin, D., Phillips, B. E., Szewczyk, N. J., Smith, K., & Atherton, P. J. (2017). An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 27(1), 4-25. <https://doi.org/10.1111/sms.12702>
- Bastani, S., Vahedian, V., Rashidi, M., Mir, A., Mirzaei, S., Alipourfard, I., Pouremamali, F., Nejabati, H., Kadkhoda, J., Maroufi, N. F., & Akbarzadeh, M. (2022). An evaluation on potential anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Crocin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 153. <https://doi.org/ARTN11329710.1016/j.biopha.2022.113297>

- Becker, C., Watson, A. J., & Neurath, M. F. (2013). Complex Roles of Caspases in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 144(2), 283-293. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.035>
- Begum, R., Howlader, S., Mamun-Or-Rashid, A. N. M., Rafiquzzaman, S. M., Ashraf, G. M., Albadrani, G. M., Sayed, A. A., Peluso, I., Abdel-Daim, M. M., & Uddin, M. S. (2021). Antioxidant and Signal-Modulating Effects of Brown Seaweed-Derived Compounds against Oxidative Stress-Associated Pathology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/Artn997489010.1155/2021/9974890>
- Bia, M., Adey, D. B., Bloom, R. D., Chan, L., Kulkarni, S., & Tomlanovich, S. (2010). KDOQI US Commentary on the 2009 KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Kidney Diseases*, 56(2), 189-218. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2010.04.010>
- Bledsoe, G., Crickman, S., Mao, J., Xia, C. F., Murakami, H., Chao, L., & Chao, J. (2006). Kallikrein/kinin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity by inhibition of inflammation and apoptosis. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(3), 624-633. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi225>
- Bolhasani, A., Bathaie, S. Z., Yavari, I., Moosavi-Movahedi, A. A., & Ghaffari, M. (2005). Separation and purification of some components of iranian saffron. *Asian Journal of Chemistry*, 17(2), 725-729. <Go to ISI>://WOS:000229096600014
- Bonavia, A., Vece, G., & Karamchandani, K. (2021). Prerenal acute kidney injury-still a relevant term in modern clinical practice? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 36(9), 1570-1577. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfaa061>
- Boozari, M., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2019). Impact of curcumin on toll-like receptors. *J Cell Physiol*, 234(8), 12471-12482. <https://doi.org/10.1002/jcp.28103>

- Boozari, M., & Hosseinzadeh, H. (2022). Crocin molecular signaling pathways at a glance: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 36(10), 3859-3884. <https://doi.org/10.1002/ptr.7583>
- Boussabbah, M., Ben Salem, I., Belguesmi, F., Neffati, F., Najjar, M. F., Abid-Essefi, S., & Bacha, H. (2016). Crocin protects the liver and kidney from patulin-induced apoptosis in vivo. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9799-9808. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6195-2>
- Brunelle, J. K., & Letai, A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science*, 122(4), 437-441. <https://doi.org/10.1242/jcs.031682>
- Cai, Y., Huang, C. M., Zhou, M. Y., Xu, S. Q., Xie, Y. W., Gao, S. H., Yang, Y. T. Y., Deng, Z. R., Zhang, L. B., Shu, J. C., Yan, T. D., & Wan, C. C. (2022). Role of curcumin in the treatment of acute kidney injury: research challenges and opportunities. *Phytomedicine*, 104. <https://doi.org/ARTN15430610.1016/j.phymed.2022.154306>
- Capellini, V. K., Celotto, A. C., Baldo, C. F., Olivon, V. C., Viaro, F., Rodrigues, A. J., & Evora, P. R. B. (2010). Diabetes and Vascular Disease: Basic Concepts of Nitric Oxide Physiology, Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress and Therapeutic Possibilities. *Current Vascular Pharmacology*, 8(4), 526-544. <Go to ISI>://WOS:000280122900009
- Carneiro, B. A., & El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- Cerda-Bernad, D., Valero-Cases, E., Pastor, J. J., & Frutos, M. J. (2022). Saffron bioactives crocin, crocetin and safranal: effect on oxidative stress and mechanisms

- of action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(12), 3232-3249.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864279>
- Chen, X., Huang, J. Y., Lv, Y. C., Chen, Y. F., & Rao, J. H. (2021). Crocin exhibits an antihypertensive effect in a rat model of gestational hypertension and activates the Nrf-2/HO-1 signaling pathway. *Hypertension Research*, 44(6), 642-650.
<https://doi.org/10.1038/s41440-020-00609-7>
- Chiaradia, E., Tancini, B., Emiliani, C., Delo, F., Pellegrino, R. M., Tognoloni, A., Urbanelli, L., & Buratta, S. (2021). Extracellular Vesicles under Oxidative Stress Conditions: Biological Properties and Physiological Roles. *Cells*, 10(7).
<https://doi.org/ARTN 176310.3390/cells10071763>
- Chowdhury, F. I., Yasmin, T., Akter, R., Islam, M. N., Hossain, M. M., Khan, F., Aldhahrani, A., Soliman, M. M., Subhan, N., Haque, M. A., & Alam, M. A. (2022). Resveratrol treatment modulates several antioxidant and anti-inflammatory genes expression and ameliorated oxidative stress mediated fibrosis in the kidneys of high-fat diet-fed rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 30(10), 1454-1463. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2022.07.006>
- Chowdhury, S., Ghosh, S., Das, A. K., & Sil, P. C. (2019). Ferulic Acid Protects Hyperglycemia-Induced Kidney Damage by Regulating Oxidative Insult, Inflammation and Autophagy. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
<https://doi.org/ARTN 2710.3389/fphar.2019.00027>
- Chu, X., Zhang, Y. Y., Xue, Y. C., Li, Z. L., Shi, J., Wang, H. F., & Chu, L. (2020). Crocin protects against cardiotoxicity induced by doxorubicin through TLR-2/NF-kappa B signal pathway in vivo and vitro. *International Immunopharmacology*, 84. <https://doi.org/ARTN 10654810.1016/j.intimp.2020.106548>

- Comba, B., Cinar, A., Comba, A., & GENCER, Y. G. (2016). Effects of ACTH application on kidney function tests, the electrolytes and hematological parameters in rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63(3), 229-233.
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Davidovic, L. M., Laketic, D., Cumic, J., Jordanova, E., & Pantic, I. (2021). Application of artificial intelligence for detection of chemico-biological interactions associated with oxidative stress and DNA damage. *Chemico-Biological Interactions*, 345. <https://doi.org/ARTN 10953310.1016/j.cbi.2021.109533>
- Diao, H. Y., Zhu, W., Liu, J., Yin, S., Wang, J. H., & Li, C. L. (2023). Salvianolic Acid A Improves Rat Kidney Injury by Regulating MAPKs and TGF-beta 1/Smads Signaling Pathways. *Molecules*, 28(8). <https://doi.org/ARTN 363010.3390/molecules28083630>
- Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European Journal of Immunology*, 37, S34-S45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8-27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>
- Durackova, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 59(4), 459-469. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931844>
- El-Ashmawy, N. E., Khedr, E. G., Doghish, A. S., & Elballal, M. S. (2022). Carnosine and crocin ameliorate oxidative stress in rats with rhabdomyolysis-induced acute

- kidney injury through upregulating HO-1 gene expression. *Food Bioscience*, 49. <https://doi.org/ARTN 10197210.1016/j.fbio.2022.101972>
- Elkhoely, A. (2023). Liraglutide ameliorates gentamicin-induced acute kidney injury in rats via PGC-1 α - mediated mitochondrial biogenesis: Involvement of PKA/CREB and Notch/Hes-1 signaling pathways. *International Immunopharmacology*, 114. <https://doi.org/ARTN 10957810.1016/j.intimp.2022.109578>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Erdem, A., Gundogan, N. U., Usubutun, A., Kilinc, K., Erdem, S. R., Kara, A., & Bozkurt, A. (2000). The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 15(8), 1175-1182. <https://doi.org/DOI 10.1093/ndt/15.8.1175>
- Erdemli, M. E., Gul, M., Altinoz, E., Aksungur, Z., Gul, S., & Bag, H. G. (2018). Can crocin play a preventive role in Wistar rats with carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity? *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 21(4), 382.
- Evans, W. E., Schentag, J. J., & Jusko, W. J. (1986). Applied pharmacokinetics: principles of therapeutic drug monitoring. (*No Title*).
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., & De Laurenzi, V. (2012). Role of Apoptosis in disease. *Aging-Us*, 4(5), 330-349. <https://doi.org/DOI 10.18632/aging.100459>
- Fernandez, V., & Videla, L. A. (1981). Effect of Acute and Chronic Ethanol Ingestion on the Content of Reduced Glutathione of Various Tissues of the Rat. *Experientia*, 37(4), 392-394. <https://doi.org/Doi 10.1007/Bf01959881>

- Fernandez-Mendivil, C., Luengo, E., Trigo-Alonso, P., Garcia-Magro, N., Negredo, P., & Lopez, M. G. (2021). Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism. *Redox Biology*, 38. <https://doi.org/ARTN10178910.1016/j.redox.2020.101789>
- Ferrence, S. C., & Bendersky, G. (2004). Therapy with saffron and the goddess at Thera. *Perspectives in biology and medicine*, 47(2), 199-226.
- Fields, J. K., Gunther, S., & Sundberg, E. J. (2019). Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/ARTN141210.3389/fimmu.2019.01412>
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress - Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358. <https://doi.org/Doi10.2165/00007256-200636040-00004>
- Forman, H. J., & Zhang, H. Q. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy (Jun, 10.1038/s41573-021-00233-1, 2021). *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(8), 652-652. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00267-5>
- Fujii, J., Homma, T., Kobayashi, S., Warang, P., Madkaikar, M., & Mukherjee, M. B. (2021). Erythrocytes as a preferential target of oxidative stress in blood. *Free Radical Research*, 55(5), 562-580. <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.1873318>
- Gholampour, F., & Sadidi, Z. (2018). Hepatorenal protection during renal ischemia by quercetin and remote ischemic preconditioning. *Journal of Surgical Research*, 231, 224-233. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2018.05.036>

- Giaccio, M. (2004). Crocetin from saffron: An active component of an ancient spice. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(3), 155-172. <https://doi.org/10.1080/10408690490441433>
- Girndt, M. (2017). Diagnosis and treatment of chronic kidney disease. *Internist*, 58(3), 243-256. <https://doi.org/10.1007/s00108-017-0195-2>
- Gonzalez-Guerrero, C., Cannata-Ortiz, P., Guerri, C., Egido, J., Ortiz, A., & Ramos, A. M. (2017). TLR4-mediated inflammation is a key pathogenic event leading to kidney damage and fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Archives of Toxicology*, 91(4), 1925-1939. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1830-8>
- Goth, L. (1991). A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), 143-151. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
- Govindappa, P. K., Gautam, V., Tripathi, S. M., Sahni, Y. P., & Raghavendra, H. L. S. (2019). Effect of *Withania somnifera* on gentamicin induced renal lesions in rats. *Revista Brasileira De Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 29(2), 234-240. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.12.005>
- Gowda, S., Desai, P. B., Kulkarni, S. S., Hull, V. V., Math, A. A., & Vernekar, S. N. (2010). Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci*, 2(4), 170-173. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22624135>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 74(3), 391-401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Griffin, B. R., Faubel, S., & Edelstein, C. L. (2019). Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Therapeutic Drug Monitoring*, 41(2), 213-226. <https://doi.org/10.1097/Ftd.0000000000000589>

- Guder, W. G., & Ross, B. D. (1984). Enzyme Distribution Along the Nephron. *Kidney International*, 26(2), 101-111. <https://doi.org/DOI 10.1038/ki.1984.143>
- Gulmez, A., Celiker, H., Bicim, S., Aydin, S., & Kuloglu, T. (2018). The Investigation of the Therapeutic Effect of Adropin on Gentamicin-Induced Experimental Nephropathy. *Turkish Nephrology Dialysis and Transplantation Journal*, 27(3), 240-248. <https://doi.org/10.5262/tndt.2018.3121>
- Gupta, A., Behl, T., Sehgal, A., Bhatia, S., Jaglan, D., & Bungau, S. (2021). Therapeutic potential of Nrf-2 pathway in the treatment of diabetic neuropathy and nephropathy. *Molecular Biology Reports*, 48(3), 2761-2774. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06257-5>
- Ha, H., & Lee, H. B. (2001). Oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. *Curr Diab Rep*, 1(3), 282-287. <https://doi.org/10.1007/s11892-001-0047-1>
- Habib, S. A., Suddek, G. M., Rahim, M. A., & Abdelrahman, R. S. (2021). The protective effect of protocatechuic acid on hepatotoxicity induced by cisplatin in mice. *Life Sciences*, 277. <https://doi.org/ARTN 11948510.1016/j.lfs.2021.119485>
- Hajyzadeh, M., Olmez, F., & Khawar, K. M. (2020). Molecular approaches to determine phylogeny in saffron. In *Saffron* (pp. 57-68). Elsevier.
- Hariharan, A., Hakeem, A. R., Radhakrishnan, S., Reddy, M. S., & Rela, M. (2021). The Role and Therapeutic Potential of NF-kappa-B Pathway in Severe COVID-19 Patients. *Inflammopharmacology*, 29(1), 91-100. <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00773-9>
- Hashemzaei, M., Mamoulakis, C., Tsarouhas, K., Georgiadis, G., Lazopoulos, G., Tsatsakis, A., Asrami, E. S., & Rezaee, R. (2020). Crocin: A fighter against

- inflammation and pain. *Food and Chemical Toxicology*, 143. <https://doi.org/ARTN 11152110.1016/j.fct.2020.111521>
- Hashiramoto, A., Yamane, T., Tsumiyama, K., Yoshida, K., Komai, K., Yamada, H., Yamazaki, F., Doi, M., Okamura, H., & Shiozawa, S. (2010). Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha. *J Immunol*, 184(3), 1560-1565. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903284>
- Hassanein, E. H. M., Ali, F. E. M., Kozman, M. R., & Abd El-Ghafar, O. A. M. (2021). Umbelliferone attenuates gentamicin-induced renal toxicity by suppression of TLR-4/NF-kappaB-p65/NLRP-3 and JAK1/STAT-3 signaling pathways. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(9), 11558-11571. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11416-5>
- Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38(2), 167-197. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.06.001>
- Hayward, R. S., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., & Ross, J. D. C. (2018). Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(2), 223-238. <https://doi.org/10.1111/bcp.13439>
- He, L. Y., Peng, X. F., Zhu, J. F., Liu, G. Y., Chen, X., Tang, C. Y., Liu, H., Liu, F. Y., & Peng, Y. M. (2015). Protective effects of curcumin on acute gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(4), 275-282. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2014-0459>
- Heidarian, E., Jafari-Dehkordi, E., Valipour, P., Ghatreh-Samani, K., & Ashrafi-Eshkaftaki, L. (2017). Nephroprotective and Anti-Inflammatory Effects of Pistacia atlantica Leaf Hydroethanolic Extract Against Gentamicin-Induced

- Nephrotoxicity in Rats. *J Diet Suppl*, 14(5), 489-502.
<https://doi.org/10.1080/19390211.2016.1267062>
- Hibi, M., Nakajima, K., & Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: A model of the cytokine system. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, 74(1), 1-12. <https://doi.org/Doi 10.1007/Bf00202068>
- Hoshyar, R., & Mollaei, H. (2017). A comprehensive review on anticancer mechanisms of the main carotenoid of saffron, crocin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(11), 1419-1427. <https://doi.org/10.1111/jphp.12776>
- Hosseini, S. S., Reihani, R. Z., Doustvandi, M. A., Amini, M., Zargari, F., Baradaran, B., Yari, A., Hashemi, M., Tohidast, M., & Mokhtarzadeh, A. (2022). Synergistic anticancer effects of curcumin and crocin on human colorectal cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 49(9), 8741-8752. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07719-0>
- Hu, B. F., Gong, Q., Chen, S. Q., Yue, L., Ma, W. X., Wang, F., Feng, X. W., Wang, J. N., Li, C., Liu, M. M., Wang, X. F., Meng, X. M., Li, J., & Wen, J. G. (2022). Protective effect of inhibiting necroptosis on gentamicin-induced nephrotoxicity. *Faseb Journal*, 36(9). <https://doi.org/ARTN e2248710.1096/fj.202200163R>
- Hu, J. J., Zhu, Z. J., Ying, H. L., Yao, J., Ma, H. B., Li, L., & Zhao, Y. F. (2021). Oleylethanolamide Protects Against Acute Liver Injury by Regulating Nrf-2/HO-1 and NLRP3 Pathways in Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/ARTN 60506510.3389/fphar.2020.605065>
- Huang, A. Q., & Jia, L. H. (2021). Crocin enhances hypothermia therapy in hypoxic ischemia-induced brain injury in mice. *Acta Neurologica Belgica*, 121(2), 429-436. <https://doi.org/10.1007/s13760-019-01198-0>

- Huang, Y., Li, W. J., Su, Z. Y., & Kong, A. N. T. (2015). The complexity of the Nrf2 pathway: beyond the antioxidant response. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1401-1413. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.001>
- Hussain, M. A., Abogresha, N. M., AbdelKader, G., Hassan, R., Abdelaziz, E. Z., & Greish, S. M. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory effects of crocin ameliorate doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.
- Jacob, J., Dannenhoffer, J., & Rutter, A. (2020a). Acute Kidney Injury. *Prim Care*, 47(4), 571-584. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.008>
- Jacob, J., Dannenhoffer, J., & Rutter, A. (2020b). Acute Kidney Injury. *Primary Care*, 47(4), 571-584. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2020.08.008>
- Jado, J. C., Humanes, B., Gonzalez-Nicolas, M. A., Camano, S., Lara, J. M., Lopez, B., Cercenado, E., Garcia-Bordas, J., Tejedor, A., & Lazaro, A. (2020). Nephroprotective Effect of Cilastatin against Gentamicin-Induced Renal Injury In Vitro and In Vivo without Altering Its Bactericidal Efficiency. *Antioxidants*, 9(9). <https://doi.org/ARTN 82110.3390/antiox9090821>
- Jalili, C., Ghanbari, A., Roshankhah, S., & Salahshoor, M. R. (2020). Toxic Effects of Methotrexate on Rat Kidney Recovered by Crocin as a Consequence of Antioxidant Activity and Lipid Peroxidation Prevention. *Iran Biomed J*, 24(1), 39-46. <https://doi.org/10.29252/ibj.24.1.39>
- Jalili, C., Makalani, F., Roshankhah, S., Sohrabi, K., & Salahshoor, M. R. (2017). Protective Effect of Resveratrol Against Morphine Damage to Kidneys of Mice. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1409-1415. <https://doi.org/Doi 10.4067/S0717-95022017000401409>

- Jam, I. N., Sahebkar, A. H., Eslami, S., Mokhber, N., Nosrati, M., Khademi, M., Foroutan-Tanha, M., Ghayour-Mobarhan, M., Hadizadeh, F., Ferns, G., & Abbasi, M. (2017). The effects of crocin on the symptoms of depression in subjects with metabolic syndrome. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(6), 925-930. <https://doi.org/10.17219/acem/62891>
- Javadi, B., Sahebkar, A., & Emami, S. A. (2013). A Survey on Saffron in Major Islamic Traditional Medicine Books. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), 1-11. <Go to ISI>://WOS:000313801100001
- Jiang, M. X., Qi, L., Li, L. S., & Li, Y. J. (2020). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discovery*, 6(1). <https://doi.org/ARTN 11210.1038/s41420-020-00349-0>
- Jin, W., Zhang, Y., Xue, Y., Han, X., Zhang, X., Ma, Z., Sun, S., Chu, X., Cheng, J., Guan, S., Li, Z., & Chu, L. (2020). Crocin attenuates isoprenaline-induced myocardial fibrosis by targeting TLR4/NF-kappaB signaling: connecting oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 393(1), 13-23. <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01704-4>
- Kalantar, M., Kalantari, H., Goudarzi, M., Khorsandi, L., Bakhit, S., & Kalantar, H. (2019). Crocin ameliorates methotrexate-induced liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation in rats. *Pharmacological Reports*, 71(4), 746-752. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.04.004>
- Kandel, L., Laster, M. J., Eger, E. I., Kerschmann, R. L., & Martin, J. (1995). Nephrotoxicity in Rats Undergoing a One-Hour Exposure to Compound-A. *Anesthesia and Analgesia*, 81(3), 559-563. <https://doi.org/10.1097/00000539-199509000-00024>

- Kang, S. Y., Chen, T. T., Hao, Z. H., Yang, X., Wang, M. F., Zhang, Z. F., Hao, S. J., Lang, F. T., & Hao, H. X. (2022). Oxymatrine Alleviates Gentamicin-Induced Renal Injury in Rats. *Molecules*, 27(19). <https://doi.org/ARTN620910.3390/molecules27196209>
- Karabagias, I. K., Koutsoumpou, M., Liakou, V., Kontakos, S., & Kontominas, M. G. (2017). Characterization and geographical discrimination of saffron from Greece, Spain, Iran, and Morocco based on volatile and bioactivity markers, using chemometrics. *European Food Research and Technology*, 243(9), 1577-1591. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2866-6>
- Karimi, Z., Pakfetrat, Z., Roozbeh, J., & Janfeshan, S. (2020). Toll-like receptor-2 mediates systemic inflammation in gentamicin-induced rat nephrotoxicity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(9), 1584-1590. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13334>
- Kayukov, I., Galkina, O., Timshina, E., Zubina, I., Miheeva, A., & Berdichevsky, G. (2020). Creatinin in the modern evaluation of the kidneys functional condition (literature review and own data). *Nephrology (Saint-Petersburg)*, 24(4), 21-36.
- Kedir, W. M., Dubiwak, A. D., & Ahmed, E. T. (2022). Nephroprotective Effect of *Asparagus africanus* Lam. Root Extract against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Swiss Albino Mice. *Journal of Toxicology*, 2022. <https://doi.org/Artn844001910.1155/2022/8440019>
- Kellum, J. A., Romagnani, P., Ashuntantang, G., Ronco, C., Zarbock, A., & Anders, H. J. (2021). Acute kidney injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). <https://doi.org/ARTN5210.1038/s41572-021-00284-z>
- Khan, H. A., & Ola, M. S. (2012). Markers of blood coagulation, lipid profile, renal function test and serum electrolytes in streptozotocin-induced diabetic rats.

Biomedical Research-India, 23(3), 421-424. <Go to
ISI>://WOS:000314399600020

Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2021). Expressing cloned genes for protein production, purification, and analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(2), pdb. top102129.

Kinra, P., Turlapati, S., Mehta, A., & Rai, R. (2005). Study of p53 and bcl-2 Oncoproteins in Ulcerative Colitis with Dysplasia. *Med J Armed Forces India*, 61(2), 125-129. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(05\)80006-1](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(05)80006-1)

Klementa, V., Petejova, N., Zadrazil, J., Horak, P., Proskova, J., & Klementova, O. (2022). Acute kidney injury due to antimicrobial therapy. *Vnitr Lek*, 68(4), 227-233. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36220420> (Akutni poškodení ledvin vlivem antimikrobiální terapie.)

Korani, S., Korani, M., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2019). Therapeutic effects of Crocin in autoimmune diseases: A review. *Biofactors*, 45(6), 835-843. <https://doi.org/10.1002/biof.1557>

Krinsky, N. I. (1998). The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Towards Prolongation of the Healthy Life Span*, 854, 443-447. [https://doi.org/DOI 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09923.x](https://doi.org/DOI%2010.1111/j.1749-6632.1998.tb09923.x)

Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lalier, L., Cartron, P. F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., & Vallette, F. M. (2007). Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*, 12(5), 887-896. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0749-1>
- Liang, Y. R., Zheng, B., Li, J. H., Shi, J., Chu, L., Han, X., Chu, X., Zhang, X., & Zhang, J. P. (2020). Crocin ameliorates arsenic trioxide-induced cardiotoxicity via Keap1-Nrf2/HO-1 pathway: Reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131. <https://doi.org/ARTN11071310.1016/j.biopha.2020.110713>
- Lindstrom, N. O., McMahon, J. A., Guo, J. J., Tran, T., Guo, Q. Y., Rutledge, E., Parvez, R. K., Saribekyan, G., Schuler, R. E., Liao, C., Kim, A. D., Abdelhalim, A., Ruffins, S. W., Thornton, M. E., Basking, L., Grubbs, B., Kesselman, C., & McMahon, A. P. (2018). Conserved and Divergent Features of Human and Mouse Kidney Organogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(3), 785-805. <https://doi.org/10.1681/Asn.2017080887>
- Liu, T., Chu, X., Wang, H., Zhang, X., Zhang, Y. Y., Guo, H., Liu, Z. Y., Dong, Y. S., Liu, H. Y., Liu, Y., Chu, L., & Zhang, J. P. (2016). Crocin, a carotenoid component of *Crocus sativus*, exerts inhibitory effects on L-type Ca^{2+} current, Ca^{2+} transient, and contractility in rat ventricular myocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(3), 302-308. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0214>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lode, H. (1998). Tobramycin: a review of therapeutic uses and dosing schedules. *Current therapeutic research*, 59(7), 420-453.

- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., Ralph, D. J., Cellek, S., Musumeci, G., Giunta, S., Djinoic, R., Basic, D., & Sansalone, S. (2014). The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease. *Biomed Research International*, 2014. <https://doi.org/Artn 61614910.1155/2014/616149>
- Lotfi, L., Kalbasi-Ashtari, A., Hamed, M., & Ghorbani, F. (2015). Effects of enzymatic extraction on anthocyanins yield of saffron tepals (*Crocus sativus*) along with its color properties and structural stability. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(2), 210-218. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.10.011>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
- Mahi-Birjand, M., Yaghoubi, S., Abdollahpour-Alitappeh, M., Keshtkaran, Z., Bagheri, N., Pirouzi, A., Khatami, M., Sineh Sepehr, K., Peymani, P., & Karimzadeh, I. (2020). Protective effects of pharmacological agents against aminoglycoside-induced nephrotoxicity: A systematic review. *Expert Opin Drug Saf*, 19(2), 167-186. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1712357>
- Mahmoud, A. M., Abd El-Ghafar, O. A. M., Alzoghaibi, M. A., & Hassanein, E. H. M. (2021). Agomelatine prevents gentamicin nephrotoxicity by attenuating oxidative stress and TLR-4 signaling, and upregulating PPARgamma and SIRT1. *Life Sciences*, 278, 119600. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119600>
- Mahmoudzadeh, L., Najafi, H., Ashtiyani, S. C., & Yarijani, Z. M. (2017). Anti-inflammatory and protective effects of saffron extract in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology*, 22(10), 748-754. <https://doi.org/10.1111/nep.12849>

- Mates, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Marquez, J. (2012). Sulphur-containing non enzymatic antioxidants: therapeutic tools against cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4(2), 722-748. <https://doi.org/10.2741/s296>
- Matkovics, B. (1988). Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 15, 248-250.
- Medic, B., Stojanovic, M., Rovcanin, B., Kekic, D., Skodric, S. R., Jovanovic, G. B., Vujovic, K. S., Divac, N., Stojanovic, R., Radenkovic, M., & Prostran, M. (2019). Pioglitazone attenuates kidney injury in an experimental model of gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/ARTN 1368910.1038/s41598-019-49835-1>
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, 63(1), 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.05.005>
- Moallem, S. A., Hariri, A. T., Mahmoudi, M., & Hosseinzadeh, H. (2014). Effect of aqueous extract of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma against subacute effect of diazinon on specific biomarkers in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 30(2), 141-146. <https://doi.org/10.1177/0748233712452609>
- Mohamed, M. E., Abduldaum, Y. S., & Younis, N. S. (2020). Ameliorative Effect of Linalool in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity: The Role of HMGB1/TLR4/NF-kappa B and Nrf2/HO1 Pathways. *Biomolecules*, 10(11). <https://doi.org/ARTN 148810.3390/biom10111488>
- Mohammed, E. T., & Safwat, G. M. (2020). Grape Seed Proanthocyanidin Extract Mitigates Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO₂)-NPs-Induced Hepatotoxicity Through TLR-4/NF-kappaB Signaling Pathway. *Biol Trace Elem Res*, 196(2), 579-589. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01955-5>

- Mohiti, S., Zarezadeh, M., Naeini, F., Tutunchi, H., Ostadrahimi, A., Ghoreishi, Z., & Mamaghani, M. E. (2021). Spirulina supplementation and oxidative stress and pro-inflammatory biomarkers: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 48(8), 1059-1069. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13510>
- Morales, M., & Munne-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and Artifacts. *Plant Physiology*, 180(3), 1246-1250. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00405>
- Mousavi, S. Z., & Bathaie, S. Z. (2011). Historical uses of saffron: Identifying potential new avenues for modern research. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 1(2), 57-66. <Go to ISI>://WOS:000215170900001
- Murray, M., Selby-Pham, S., Colton, B. L., Bennett, L., Williamson, G., & Dordevic, L. A. (2021). Does timing of phytonutrient intake influence the suppression of postprandial oxidative stress? A systematic literature review. *Redox Biology*, 46. <https://doi.org/ARTN 10212310.1016/j.redox.2021.102123>
- Nadeem, R. I., Aboutaleb, A. S., Younis, N. S., & Ahmed, H. I. (2023). Diosmin Mitigates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats: Insights on miR-21 and -155 Expression, Nrf2/HO-1 and p38-MAPK/NF-kappa B Pathways. *Toxics*, 11(1). <https://doi.org/ARTN 4810.3390/toxics11010048>
- Naderi, R., Pardakhty, A., Abbasi, M. F., Ranjbar, M., & Iranpour, M. (2021). Preparation and evaluation of crocin loaded in nanoniosomes and their effects on ischemia-reperfusion injuries in rat kidney. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/ARTN 2352510.1038/s41598-021-02073-w>
- Naghizadeh, B., Mansouri, S. M. T., & Mashhadian, N. V. (2010). Crocin attenuates cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2650-2655. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.035>

- Nair, A. R., Masson, G. S., Ebenezer, P. J., Del Piero, F., & Francis, J. (2014). Role of TLR4 in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury: protection by blueberry. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 16-25.
- Nair, S. C., Kurumboor, S. K., & Hasegawa, J. H. (1995). Saffron Chemoprevention in Biology and Medicine - a Review. *Cancer Biotherapy*, 10(4), 257-264. <https://doi.org/DOI 10.1089/cbr.1995.10.257>
- Nam, K. N., Park, Y. M., Jung, H. J., Lee, J. Y., Min, B. D., Park, S. U., Jung, W. S., Cho, K. H., Park, J. H., Kang, I., Hong, J. W., & Lee, E. H. (2010). Anti-inflammatory effects of crocin and crocetin in rat brain microglial cells. *European Journal of Pharmacology*, 648(1-3), 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.003>
- Nassan, M. A., Soliman, M. M., Aldhahrani, A., Althobaiti, F., & Alkhedaide, A. Q. (2021). Ameliorative impacts of Glycyrrhiza glabra root extract against nephrotoxicity induced by gentamicin in mice. *Food Science & Nutrition*, 9(7), 3405-3413. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2183>
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Nikbakht-Jam, I., Khademi, M. M., Nosrati, M., Eslami, S., Foroutan-Tanha, M., Sahebkar, A. H., Tavalae, S., Ghayour-Mobarhan, M., Ferns, G. A. A., Hadizadeh, F., Tabasi, S. A. S., Mohajeri, S. A., & Emamian, M. (2016). Effect of crocin extracted from saffron on pro-oxidant-anti-oxidant balance in subjects with metabolic syndrome: A randomized, placebo-controlled clinical trial. *European Journal of Integrative Medicine*, 8(3), 307-312. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2015.12.008>

- Nishimura, Y., Kanda, Y., Sone, H., & Aoyama, H. (2021). Oxidative Stress as a Common Key Event in Developmental Neurotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021. <https://doi.org/Artn 668520410.1155/2021/6685204>
- O'Brien, M. A., & Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18(6), 572-585. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2008.00363.x>
- Oehme, F. W. (1977). Analytical Toxicology Methods Manual. *Canine Practice*, 4(6), 55-55. <Go to ISI>://WOS:A1977EE20900011
- Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 117(4), 1162-1172. <https://doi.org/DOI 10.1378/chest.117.4.1162>
- Ozbek, E., Cekmen, M., Ilbey, Y. O., Simsek, A., Polat, E. C., & Somay, A. (2009). Atorvastatin prevents gentamicin-induced renal damage in rats through the inhibition of p38-MAPK and NF-kappaB pathways. *Ren Fail*, 31(5), 382-392. <https://doi.org/10.1080/08860220902835863>
- Pakfetrat, Z., Janfeshan, S., Masjedi, F., Rafiei, M., & Karimi, Z. (2022). Involvement of oxidative stress and toll-like receptor-4 signaling pathways in gentamicin-induced nephrotoxicity in male Sprague Dawley rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(6), 2568-2575.
- Paşayeva, L., & Tekiner, H. (2014). TÜRK-İSLAM TIBBİNDA SAFRANIN YERİ. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 4(3), 11-15.
- Pashirzad, M., Shafiee, M., Avan, A., Ryzhikov, M., Fiuji, H., Bahreyni, A., Khazaei, M., Soleimanpour, S., & Hassanian, S. M. (2019). Therapeutic potency of crocin in

- the treatment of inflammatory diseases: Current status and perspective. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14601-14611. <https://doi.org/10.1002/jcp.28177>
- Pena-Blanco, A., & Garcia-Saez, A. J. (2018). Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *Febs Journal*, 285(3), 416-431. <https://doi.org/10.1111/febs.14186>
- Perazella, M. A. (2018). Pharmacology behind Common Drug Nephrotoxicities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12), 1897-1908. <https://doi.org/10.2215/Cjn.00150118>
- Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14(3-4), 185-191. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(03\)00022-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00022-4)
- Pham, T. Q., Cormier, F., Farnworth, E., Tong, V. H., & Van Calsteren, M. R. (2000). Antioxidant properties of crocin from *Gardenia jasminoides* Ellis and study of the reactions of crocin with linoleic acid and crocin with oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1455-1461. <https://doi.org/DOI10.1021/jf991263j>
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging-Us*, 8(4), 603-619. <https://doi.org/DOI10.18632/aging.100934>
- Piowar, A., Knapik-Kordecka, M., & Warwas, M. (2007). AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus.

- Diabetes Research and Clinical Practice*, 77(2), 188-192.
<https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.12.007>
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359-364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90167-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90167-9)
- Poljsak, B., Suput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013. <https://doi.org/Artn 95679210.1155/2013/956792>
- Poon, I. K. H., Lucas, C. D., Rossi, A. G., & Ravichandran, K. S. (2014). Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166-180. <https://doi.org/10.1038/nri3607>
- Premkumar, K., Abraham, S. K., Santhiya, S., & Ramesh, A. (2003). Protective effects of saffron (*Crocus sativus* Linn.) on genotoxins- induced oxidative stress in Swiss albino mice. *Phytotherapy Research*, 17(6), 614-617.
- Pu, X., Storr, S. J., Zhang, Y. M., Rakha, E. A., Green, A. R., Ellis, I. O., & Martin, S. G. (2017). Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival. *Apoptosis*, 22(3), 357-368. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1323-5>
- Qi, J. H., & Dong, F. X. (2021). The relevant targets of anti-oxidative stress: a review. *Journal of Drug Targeting*, 29(7), 677-686. <https://doi.org/10.1080/1061186x.2020.1870987>
- Que, Q. H., Guo, X. H., Zhan, L. X., Chen, S. D., Zhang, Z. L., Ni, X. M., Ye, B., & Wan, S. L. (2019). The GLP-1 agonist, liraglutide, ameliorates inflammation through the activation of the PKA/CREB pathway in a rat model of knee osteoarthritis.

Journal of Inflammation-London, 16. <https://doi.org/ARTN 1310.1186/s12950-019-0218-y>

- Quiros, Y., Vicente-Vicente, L., Morales, A. I., Lopez-Novoa, J. M., & Lopez-Hernandez, F. J. (2011). An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. *Toxicological Sciences*, 119(2), 245-256. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq267>
- Rahim, V. B., Khammar, M. T., Rakhshandeh, H., Samzadeh-Kermani, A., Hosseini, A., & Askari, V. R. (2019). Crocin protects cardiomyocytes against LPS-Induced inflammation. *Pharmacological Reports*, 71(6), 1228-1234. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.07.007>
- Rahman, N., Khan, H., Zia, A., Khan, A., Fakhri, S., Aschner, M., Gul, K., & Saso, L. (2021). Bcl-2 Modulation in p53 Signaling Pathway by Flavonoids: A Potential Strategy towards the Treatment of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21). <https://doi.org/ARTN 1131510.3390/ijms222111315>
- Randjelovic, P., Veljkovic, S., Stojiljkovic, N., Sokolovic, D., & Ilic, I. (2017). Gentamicin Nephrotoxicity in Animals: Current Knowledge and Future Perspectives. *Excli Journal*, 16, 388-399. <https://doi.org/10.17179/excli2017-165>
- Razak, S. I. A., Anwar Hamzah, M. S., Yee, F. C., Kadir, M. R. A., & Nayan, N. H. M. (2017). A review on medicinal properties of saffron toward major diseases. *Journal of herbs, spices & medicinal plants*, 23(2), 98-116.
- Razavi, B. M., Hosseinzadeh, H., Abnous, K., & Imenshahidi, M. (2014). Protective effect of crocin on diazinon induced vascular toxicity in subchronic exposure in rat aorta ex-vivo. *Drug and Chemical Toxicology*, 37(4), 378-383. <https://doi.org/10.3109/01480545.2013.866139>

- Renault, F., Chabriere, E., Andrieu, J. P., Dublet, B., Masson, P., & Rochu, D. (2006). Tandem purification of two HDL-associated partner proteins in human plasma, paraoxonase (PON1) and phosphate binding protein (HPBP) using hydroxyapatite chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 836(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.029>
- Rezaee-Khorasany, A., Razavi, B. M., Taghiabadi, E., Yazdi, A. T., & Hosseinzadeh, H. (2020). Effect of crocin, an active saffron constituent, on ethanol toxicity in the rat: histopathological and biochemical studies. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23(1), 51-62. <https://doi.org/10.22038/Ijbms.2019.37133.8845>
- Romagnani, P., Remuzzi, G., Glassock, R., Levin, A., Jager, K. J., Tonelli, M., Massy, Z., Wanner, C., & Anders, H. J. (2017). Chronic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/ARTN 1708810.1038/nrdp.2017.88>
- Roshankhah, S., Salahshoor, M. R., Jalili, F., Karimi, F., Sohrabi, M., & Jalili, C. (2017). Crocin Effects on the Nicotine-Induced Ovary Injuries in Female Rat. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 7(4), P1-P8. <Go to ISI>://WOS:000435230400001
- Rosner, M. H., & Bolton, W. K. (2006). Renal function testing. *Am J Kidney Dis*, 47(1), 174-183. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.08.038>
- Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2005). Heme oxygenase-1: Redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1-2), 80-91. <https://doi.org/DOI 10.1089/ars.2005.7.80>
- Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E., & Saso, L. (2020). An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules*, 25(22). <https://doi.org/ARTN 547410.3390/molecules25225474>

- Saini, S., Dhiman, A., & Nanda, S. (2020). Immunomodulatory Properties of Chitosan: Impact on Wound Healing and Tissue Repair. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 20(10), 1611-1623. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200503054605>
- Salahshoor, M. R., Khashiadeh, M., Roshankhah, S., Kakabaraei, S., & Jalili, C. (2016). Protective effect of crocin on liver toxicity induced by morphine. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 120-129. <Go to ISI>://WOS:000381110500004
- Schmidt, M., Betti, G., & Hensel, A. (2007). Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 157(13-14), 315-319. <https://doi.org/10.1007/s10354-007-0428-4>
- Seifried, H. E. (2007). Oxidative stress and antioxidants: a link to disease and prevention? *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(3), 168-171. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2006.12.003>
- Sharawy, M. H., Abdelrahman, R. S., & El-Kashef, D. H. (2018). Agmatine attenuates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats in a dose dependent manner. *Life Sciences*, 208, 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.019>
- Shoja, M., Mehri, S., Amin, B., Askari, V. R., & Hosseinzadeh, H. (2018). The Prophylactic and Therapeutic Effects of Saffron Extract and Crocin on Ethanol Withdrawal Syndrome in Mice. *Journal of Pharmacopuncture*, 21(4), 277-283. <https://doi.org/10.3831/Kpi.2018.21.031>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- Stenken, J. A., & Poschenrieder, A. J. (2015). Bioanalytical chemistry of cytokines - A review. *Analytica Chimica Acta*, 853, 95-115.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.009>
- Su, L. J., Zhang, J. H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D. X., Jiang, F., & Peng, Z. Y. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Subramanian, P., Anandan, R., Jayapalan, J. J., & Hashim, O. H. (2015). Hesperidin protects gentamicin-induced nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling and inhibits inflammation mediated by NF-kappa B in rats. *Journal of Functional Foods*, 13, 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.035>
- Sue, Y. M., Cheng, C. F., Chang, C. C., Chou, Y., Chen, C. H., & Juan, S. H. (2009). Antioxidation and anti-inflammation by haem oxygenase-1 contribute to protection by tetramethylpyrazine against gentamicin-induced apoptosis in murine renal tubular cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(3), 769-777.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfn545>
- Sun, J., Zhang, H. J., Guan, L., Zhou, H., & Sun, M. J. (2015). Alpha-lipoic acid attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 358-367. <Go to ISI>://WOS:000349897200039
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide-Dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500. <Go to ISI>://WOS:A1988M709700006
- Suzuki, S., Takamura, S., Yoshida, J., Shinzawa, Y., Niwa, O., & Tamatani, R. (1995). Comparison of Gentamicin-Nephrotoxicity between Rats and Mice. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 112(1), 15-28. [https://doi.org/Doi 10.1016/0742-8413\(95\)00075-5](https://doi.org/Doi%2010.1016/0742-8413(95)00075-5)
- Tian, R., Geng, Y., Yang, Y., Seim, I., & Yang, G. (2021). Oxidative stress drives divergent evolution of the glutathione peroxidase (GPX) gene family in mammals. *Integr Zool*, 16(5), 696-711. <https://doi.org/10.1111/1749-4877.12521>
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27(3), 502-522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5)
- Tong, Y. N., Chuan, J. L., Bai, L., Shi, J. Y., Zhong, L., Duan, X. M., & Zhu, Y. X. (2018). The protective effect of shikonin on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 701-708. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.112>
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354. [https://doi.org/DOI 10.1073/pnas.76.9.4350](https://doi.org/DOI%2010.1073/pnas.76.9.4350)
- Tsikas, D. (2017). Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*, 524, 13-30. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.021>
- Ullah, N., Khan, M. A., Khan, T., & Ahmad, W. (2014). Protective potential of Tamarindus indica against gentamicin-induced nephrotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 52(4), 428-434. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.840318>
- Unsal, V., Dalkiran, T., Cicek, M., & Kolukcu, E. (2020). The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity:

- A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 184-202.
<https://doi.org/10.34172/apb.2020.023>
- Ustuner, M. A., Kaman, D., & Colakoglu, N. (2017). Effects of benfotiamine and coenzyme Q10 on kidney damage induced gentamicin. *Tissue and Cell*, 49(6), 691-696.
- Valaei, K., Taherkhani, S., Arazi, H., & Suzuki, K. (2021). Cardiac Oxidative Stress and the Therapeutic Approaches to the Intake of Antioxidant Supplements and Physical Activity. *Nutrients*, 13(10). <https://doi.org/ARTN348310.3390/nu13103483>
- Vansnick, J. (1990). Interleukin-6 - an Overview. *Annual Review of Immunology*, 8, 253-278. <https://doi.org/DOI10.1146/annurev.immunol.8.1.253>
- Vilcek, J., & Feldmann, M. (2004). Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(4), 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.02.011>
- Vogetseder, A., Karadeniz, A., Kaissling, B., & Le Hir, M. (2005). Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochemistry and Cell Biology*, 124(2), 97-104. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0023-y>
- Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., & Matarrese, P. (2021). The Impact of Oxidative Stress in Human Pathology: Focus on Gastrointestinal Disorders. *Antioxidants*, 10(2). <https://doi.org/ARTN20110.3390/antiox10020201>
- Walker, P. D., Barri, Y., & Shah, S. V. (1999). Oxidant mechanisms in gentamicin nephrotoxicity. *Renal Failure*, 21(3-4), 433-442. <https://doi.org/Doi10.3109/08860229909085109>
- Wang, R. X., Yu, C. R., Dambuza, I. M., Mahdi, R. M., Dolinska, M. B., Sergeev, Y. V., Wingfield, P. T., Kim, S. H., & Egwuagu, C. E. (2014). Interleukin-35 induces

- regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nature Medicine*, 20(6), 633-641. <https://doi.org/10.1038/nm.3554>
- Wang, Y. M., Ji, R., Chen, W. W., Huang, S. W., Zheng, Y. J., Yang, Z. T., Qu, H. P., Chen, H., Mao, E. Q., Chen, Y., & Chen, E. Z. (2019). Paclitaxel alleviated sepsis-induced acute lung injury by activating MUC1 and suppressing TLR-4/NF-kappaB pathway. *Drug Des Devel Ther*, 13, 3391-3404. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S222296>
- Webster, A. C., Nagler, E. V., Morton, R. L., & Masson, P. (2017). Chronic kidney disease. *Lancet*, 389(10075), 1238-1252. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
- Webster, J. D., & Vucic, D. (2020). The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/ARTN36510.3389/fcell.2020.00365>
- WitkoSarsat, V., Friedlander, M., CapeillereBlandin, C., NguyenKhoa, T., Nguyen, N. T., Zingraff, J., Jungers, P., & DescampsLatscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49(5), 1304-1313. <https://doi.org/DOI10.1038/ki.1996.186>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30. <https://doi.org/Artn8710.1186/1756-9966-30-87>
- Xi, L., Qian, Z. Y., Du, P., & Fu, H. (2007). Pharmacokinetic properties of crocin (crocin digentiobiose ester) following oral administration in rats. *Phytomedicine*, 14(9), 633-636. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2006.11.028>

- Xu, J., Xu, Z., & Zheng, W. M. (2017). A Review of the Antiviral Role of Green Tea Catechins. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/ARTN133710.3390/molecules22081337>
- Xue, J. L., Daniels, F., Star, R. A., Kimmel, P. L., Eggers, P. W., Molitoris, B. A., Himmelfarb, J., & Collins, A. J. (2006). Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(4), 1135-1142. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005060668>
- Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., Rezaee, R., & Sahebkar, A. (2018). Crocin improves renal function by declining Nox-4, IL-18, and p53 expression levels in an experimental model of diabetic nephropathy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 6080-6093. <https://doi.org/10.1002/jcb.26806>
- Yaribeygi, H., Mohammadi, M. T., & Sahebkar, A. (2018). Crocin potentiates antioxidant defense system and improves oxidative damage in liver tissue in diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.077>
- Yarijani, Z. M., Najafi, H., & Madani, S. H. (2016). Protective effect of crocin on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(3), 337-343. <Go to ISI>://WOS:000372327800016
- Yildirim, B. A., & Albayrak, S. (2023). Effect of crocin on experimental gastrocnemius muscle ischemia/reperfusion injury in rat. *Vet Res Forum*, 14(4), 201-206. <https://doi.org/10.30466/vrf.2022.548566.3383>
- Yilmaz, M., Mert, H., Irak, K., Erten, R., & Mert, N. (2018). The Effect of Fucoidan on the Gentamicin Induced Nephrotoxicity in Rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(4), 2235-2241. <Go to ISI>://WOS:000430372900032

- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., & Mori, M. (1979). Lipid Peroxidation in Maternal and Cord Blood and Protective Mechanism against Activated-Oxygen Toxicity in the Blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 135(3), 372-376. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(79\)90708-7](https://doi.org/10.1016/0002-9378(79)90708-7)
- Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., & Hu, H. (2020). Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther*, 5(1), 209. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00312-6>
- Zaghloul, M. S., Said, E., Suddek, G. M., & Salem, H. A. (2019). Crocin attenuates lung inflammation and pulmonary vascular dysfunction in a rat model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Life Sciences*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116794>
- Zeinali, M., Zirak, M. R., Rezaee, S. A., Karimi, G., & Hosseinzadeh, H. (2019). Immunoregulatory and anti-inflammatory properties of *Crocus sativus* (Saffron) and its main active constituents: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 22(4), 334-344. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.34365.8158>
- Zhang, J., Cai, X., Zhang, Q., Li, X. Z., Li, S. Y., Ma, J. Y., Zhu, W. E., Liu, X., Wei, M. L., Tu, W., Shen, Y. F., Liu, J. P., Lai, X. Y., & Yu, P. (2021). Hydrogen sulfide restores sevoflurane postconditioning mediated cardioprotection in diabetic rats: Role of SIRT1/Nrf2 signaling-modulated mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 5052-5068. <https://doi.org/10.1002/jcp.30214>
- Zhang, J. M., & An, J. X. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, 45(2), 27-37. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>

- Zhang, Q., Liu, J., Duan, H. X. Y., Li, R. L., Peng, W., & Wu, C. J. (2021). Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *Journal of Advanced Research*, 34, 43-63. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.023>
- Zhang, J., Jing, M. M., & Liu, Q. (2021). Crocin alleviates the inflammation and oxidative stress responses associated with diabetic nephropathy in rats via NLRP3 inflammasomes. *Life Sciences*, 278. <https://doi.org/ARTN11954210.1016/j.lfs.2021.119542>
- Zuo, Y., Wang, C., Zhou, J., Sachdeva, A., & Ruelos, V. C. (2008). Simultaneous determination of creatinine and uric acid in human urine by high-performance liquid chromatography. *Anal Sci*, 24(12), 1589-1592. <https://doi.org/10.2116/analsci.24.1589>

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Tuba DOĞAN	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Veterinerlik Biyokimyası	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	%2	% 15
II. Genel Bilgiler	%46	% 35
III. Materyal ve Metod	%33	% 35
IV. Bulgular	%8	% 15
V. Tartışma	%05	% 20
Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Eşlik, Kaynaçça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'ten büyük olması gerekir.		
¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısi imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla DBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.		

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Veteriner Fakültesi Dekanlığı



Sayı : E-36643897-000-2200203899

04.07.2022

Konu : HADYEK Kararı.

VETERİNER HEKİMLİĞİ TEMEL BİLİMLERİ BÖLÜMÜ BAŞKANLIĞINA

İlgi : 13.06.2022 tarihli ve E-36643897-000-2200175973 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Bölümünüz Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Betül APAYDIN YILDIRIM'ın yürütücüsü olduğu **"Ratlarda Gentamisinle Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerine Crosinin İnflamasyon, Oksidatif Stres ve Apoptoz Parametreleri Üzerine Etkilenin Araştırılması ve NF-κB, Nrf-2/HO-1 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi"** isimli doktora tez çalışmasına ait Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığının 04.07.2022 tarihli ve E-75296309-050.01.04-2200200421 sayılı yazısı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

EK-3. TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU

 SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU	
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Tuba DOĞAN
Ana Bilim Dalı	Veterinerlik Biyokimyası
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora
Ana Bilim Dalı Başkanlığına Danışmanlığımı yürüttüğüm ve yukarıda bilgileri yazılı olan bilim dalımız öğrencisinin Tez adı aşağıda belirtilen şekilde değiştirilmiştir. Bilgilerinize arz ederim.	
Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM	
Değişiklik Türü	Tez Adı Değişikliği ☒
Tezin Eski Adı	Ratlarda Gentamisinle Oluşturulan Nefrotoksisite Üzerine Crosinin İnflamasyon, Oksidatif Stres, Apoptoz Parametreleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması ve NF-κB, Nrf-2/HO-1 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi
Tezin Yeni Adı	Ratlarda Gentamisinle Oluşturulan Nefrotoksisitede Crosinin İnflamasyon, Oksidatif Stres, Apoptoz, NF-κB, TLR-4 ve Nrf-2/HO-1 Yolakları Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi
Tezin İngilizce Adı	Investigation of the Effects of Crosin on Inflammation, Oxidative Stress, Apoptosis, NF-κB, TLR-4 and NRF-2/HO-1 Pathways in Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats
Değişikliğin Gerekçesi	TLR-4 parametresinin başlığa eklenmesi