

Gentamisin ile Oluşturulan Deneysel Nefropati Modelinde Adropinin Terapotik Etkisi

The Investigation of the Therapeutic Effect of Adropin on Gentamicin-Induced Experimental Nephropathy

ÖZ

AMAÇ: Çalışmada adropinin, gentamisine bağlı oluşan nefrotoksitedeki koruyucu etkisi araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Ratlar 4 gruba ayrıldı: 1) Kontrol grubu: Oral yoldan beslenmesi sağlandı. Herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. 2) Adropin grubu (5 pmol/kg/gün): Ratlara her gün 5 pmol/kg/gün adropin intraperitoneal yolla uygulandı. 3) Gentamisin grubu (100 mg/kg/gün): Ratlara her gün 100 mg/kg/gün gentamisin intraperitoneal enjeksiyon şeklinde yapıldı. 4) Adropin+gentamisin grubu (5 pmol/kg/gün adropin+100 mg/kg/gün gentamisin): Ratlara her gün 5 pmol/kg/gün adropin ve 100mg/kg/gün gentamisin intraperitoneal enjeksiyon şeklinde eş zamanlı yapıldı. Sakrifiyon işlemi sonrası ratlardan, biyokimyasal değerlendirme için kan numuneleri, immüno-histokimyasal değerlendirme ve TUNEL incelemesi için ise böbrek doku örnekleri alındı. ELISA ile dokuda ve serumda adropin düzeyi çalışıldı. Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4:%26-50, 0.6:%51-75, 0.9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet olarak değerlendirildi. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde; Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı.

BULGULAR: Gentamisin verdiğimiz grubun böbrek dokularında adropin düzeyinin azaldığı hem ELISA yöntemiyle hem de immüno-histokimyasal olarak gösterildi. Adropin verdiğimiz grup ile gentamisin verdiğimiz grup karşılaştırıldığında; adropin grubunda TUNEL pozitifliğinde azalma saptandı.

SONUÇ: Çalışmamız, böbrek yetmezliğinde adropin adropin düzeyinin azaldığını ve dışarıdan verilen adropinin gelişen renal hasara karşı koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nefropati, Gentamisin, Adropin, Rat

ABSTRACT

OBJECTIVE: In this study, we aimed to evaluate the therapeutic effect of adropin on gentamicin nephrotoxicity.

MATERIAL and METHODS: Rats were divided into 4 groups: 1) Control group: It was allowed to nutrition orally. Did not any injection. 2) Adropin group (5 pmol/kg/day): Rats received daily (5 pmol/kg/day) dose of adropin intraperitoneal injections were performed. 3) Gentamicin group (100 mg/kg/day): Rats received daily (100 mg/kg/day) dose of gentamicin intraperitoneal injections were performed. 4) Adropin+Gentamicin group (5 pmol/kg/day adropin+100 mg/kg/day gentamicin): Rats received daily (5 pmol/kg/day) dose of adropin and (100 mg/kg/day) dose of gentamicin were performed simultaneously. At the end of the study, blood samples for biochemical tests, renal tissue samples for immuno-histochemical and tunnel tests, were taken. Serum and tissue adropin levels are examined with elisa. The prevalence of immunoreactivity in staining (0.1: <25%, 0.4: 26-50, 0.6: 51-75, 0.9: 76-100) and severity (0: none, +0.5: 2: moderate, +3: severe) Histoscore = prevalence x severity. Harris hematoxylin stain was used for the evaluation of TUNEL staining. Blue stained nuclei were normal, and brown stained cells were apoptotic. At least 500 cells were counted as normal and apoptotic in the 10x growth areas at randomly selected areas. Apoptotic index (AI) was calculated by the ratio of apoptotic cells to total (normal + apoptotic) cells

RESULTS: It was revealed with ELISA and immunohistochemically that the adropin levels of the kidney tissue was decreased in the gentamicin group. A decrease was detected on TUNNEL positivity in the adropin group when compared with the gentamicin group.

CONCLUSION: In conclusion, our data revealed that the adropin levels decrease in renal failure and exogenous adropin could potentially have a protective effect against renal injury.

KEY WORDS: Nephropathy, Gentamicin, Adropin, Rat

Ahmet GÜLMEZ¹
Hüseyin ÇELİKER²
Soykan BİÇİM³
Süleyman AYDIN⁴
Tuncay KULOĞLU⁵

- 1 Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi, İç Hastalıkları Kliniği, Kahramanmaraş, Türkiye
- 2 Fırat Üniversitesi Hastanesi, Nefroloji Bilim Dalı, Elazığ, Türkiye
- 3 Malatya Hekimhan Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Bölümü, Malatya, Türkiye
- 4 Fırat Üniversitesi Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye
- 5 Fırat Üniversitesi Hastanesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye



Geliş Tarihi : 24.12.2017

Kabul Tarihi : 03.04.2018

Yazışma Adresi:
Ahmet GÜLMEZ
 Kahramanmaraş Necip Fazıl Şehir Hastanesi,
 İç Hastalıkları Kliniği,
 Kahramanmaraş, Türkiye
 Tel : +90 551 232 77 71
 E-posta : doktor.ahmetgulmez@gmail.com

GİRİŞ

Gentamisin, organik polikasyon yapısında bir antibiyotiktir (1,2). Bakterisidal etkilidir. Aminoglikozid grubu içerisinde amikasiniden sonra en geniş etki spektrumu olan ve anti bakteriyel etki gücü en yüksek olan ajandır. Özellikle Enterobacteriaceae grubu (E. Coli, Klebsiella, Aerobacter vb.) bakterileri ile Pseudomonas aeruginosa gibi gram-negatif basiller ve metisilin dayanıklı Staph. aureus suşları için etkindir. Plazma proteinlerine çok az bir miktarda bağlanır. Vücuttan, değişime uğramadan böbrekler tarafından uzaklaştırılır (3).

Yan etkilerinden en önemli olanı nefrotoksisitedir. %5-15 arasında saptanır. Serum kreatinin seviyesinde, 0.4-0.5 mg/dl'lik artış anlamlı olarak kabul edilir ve nefrotoksiste olarak tanımlanır. Genellikle nefrotoksiste oluşan olgularda oligüri mevcut değildir. Nefrotoksiste (renal konsantrasyon bozukluğu, akut tübüler nekroz veya renal yetmezlik) ilacın renal kortekste birikmesinden dolayı oluşmaktadır.

Nefrotoksiste, ilacın dozu ve kullanım süresiyle doğru orantılıdır ve genelde geri dönüşümlüdür (4,5).

Gentamisin ilişkili nefrotoksiste, akut böbrek yetmezliği olgularının %10-20 kadarından sorumludur (6). Buna ek olarak, 1 haftadan daha uzun bir süre, gentamisin kullanılan hastaların %30 kadarında nefrotoksisteye ait bulgular saptanmakta ve bu durum da ilacın kullanımını kısıtlamaktadır (7).

Gentamisin ilişkili nefrotoksiste, Kan Üre Azotu (BUN), kreatinin konsantrasyonunda artış ve şiddetli tübüler nekrozla birlikteliktir (8).

Adropin; lipit metabolizmasının düzenlenmesine hizmet eden yeni bulunmuş bir hormondur. Bu hormon ilk defa 2008 yılında Kumar ve ark. tarafından karaciğer ve beyin dokusundan izole edilmiştir (9).

Enerji homeostazisini sürdüren bu hormon Energy Homeostasis Associated Gene (Encho) tarafından kodlanmaktadır ve alınan besin miktarı ile regüle edilir. Adropin molekülünün beslenme regülasyonu üzerine düzenleyici etkileri olduğunun kanıtı, Kumar ve ark. tarafından yapılan fare deneyinde kanıtlanmıştır (9). İlgili deney göstermiştir ki; zayıf, yağ oranı düşük farelerde yüksek yağlı diyetle (HFD) beslenme sonrası, adropin düzeylerinde kontrol grubuna göre hızlı bir artış meydana gelmiştir. Bunun tersine, aç olan farelerde adropin sentezlenmesi kontrol grubuna göre azalmıştır (9). Metabolik stres sonucu dolaşımda yükselen adropin değerleri, insülin direncini ve glikoz intoleransını azaltır (9-11). Serum adropin seviyeleri; yaş ve vücut kitle indeksiyle negatif korelasyon göstermektedir (12).

Adropin immünoreaktivitesi, böbrek dokusunda; glomerül, peritübüler interstisyel hücre ve peritübüler kapillerde; kalpte endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyumda ve pankreas dokusunda da saptanmıştır. Adropin sentezinin karaciğer dokusundaki immüno-histokimyasal sunumu sağlanmıştır (13).

Lovren ve ark.nın (14) yaptığı çalışmada, adropin kardiyak koruyucu etkileri araştırılmıştır. Adropinin; endotelial fonksiyonları düzelterek potansiyel bir kardiyak koruyucu etkisi saptanmıştır.

Adropin terminolojisi, iki latin kökenli kelimenin ilk üç harfi birleştirilerek elde edilmiştir: Kelimelerden ilki Adura olup ateşe vermek anlamına gelmektedir. İkinci kelime ise, pinquis olup; katı ya da sıvı yağlar anlamındadır. Adropin; (Encho) şeklinde sembolize edilen Energy Homeostasis Associated Gene tarafından kodlanmaktadır (9). Adropin 76 aminoasit içeren ve molekül ağırlığı yaklaşık 4500 dalton (Da) olan bir hormondur. İnsan, fare ve sıçan adropin aminoasit dizileri %100 özdeştir.

Yapmış olduğumuz literatür taramasında; adropin molekülü ile ilgili daha önceden yapılmış çalışmaların özellikle Diyabetes Mellitus ve obezite ile ilgili olduğu görüldü. Lovren ve ark. nın yapmış olduğu bir çalışmada ise endotelial fonksiyonları koruyucu mekanizma ile kardiyak hasarı engelleyici özelliği mevcut olduğu gösterilmiştir. Metabolik etkileri ön planda bir hormon olan adropinin; anabolik etkisi üzerinden akut böbrek hasarını engelleyebileceği düşünüldü. Anabolik ve endotelial fonksiyonları koruyucu etkisi olmasından dolayı; akut böbrek hasarından koruyucu etkisi olabileceği düşünülerek bu çalışmayı yapmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu araştırma, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları tarafından; Kasım 2015 tarihinde Fırat Üniversitesi Deneyisel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışma için Fırat Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri biriminden TF.15.31 proje numarasıyla onay alınmış ve gerekli maddi destek sağlandı. Grup I (n=7): Kontrol Grubu: Herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. Grup II (n=7): Adropin Grubu: Ratlara her gün 5 pmol/kg/gün adropin intraperitoneal enjeksiyon şeklinde yapıldı. 10. günde sakrifasyon uygulandı. Grup III (n=7): Gentamisin Grubu: Ratlara her gün 100 mg/kg/gün gentamisin intraperitoneal enjeksiyon şeklinde yapıldı. 10. Günde sakrifasyon uygulandı. Grup IV (n=7): Adropin+Gentamisin Grubu: Ratlara her gün 5 pmol/kg/gün adropin ve 100 mg/kg/gün gentamisin intraperitoneal enjeksiyon şeklinde eş zamanlı yapıldı. 10. günde sakrifasyon uygulandı. Çalışmamızda hiç rat kaybı yaşanmadı. Rutin biyokimyasal analizle Fırat Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarında gerçekleştirildi. Serum üre ve serum kreatinin değerleri çalışıldı. Ratlardan sağlanan serum ve doku süpernatantları -80 °C'den çıkartıldıktan sonra, ELISA yöntemi ile çalışıldı. ELISA'da elde edilen veriler pikogram/mL biriminde kıyaslama yapılarak değerlendirildi. Ratların böbrek dokularından elde edilen numuneler hem immüno-histokimyasal inceleme hem de TUNEL metodu ile incelendi. Boyamada immünoreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4:%26-50, 0.6:%51-75, 0.9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet olarak değerlendirildi. TUNEL

boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Çalışmamızda bütün istatistiksel veriler SPSS for Windows versiyon 21.0 programı kullanılarak yapıldı. Sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Gruplar arası değerlendirme için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Post-hoc değerlendirme için Tukey's testi uygulandı. Ayrıca gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

1. Vücut Ağırlığı Değişimi

Çalışmada 221-327 gr ağırlığı arasında winstar albino cinsi ratlar kullanıldı. 4 grup olacak şekilde gruplandırılan ratlar homojen olarak dağıtıldı. Çalışmaya dâhil edilen ratların ortalama ağırlıkları 276 gr'dır. Çalışmamızın başlangıcında homojen dağılımına dikkat ederek seçtiğimiz grupların, birbiri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını ANOVA testi ile saptandı.

Çalışma tamamlandığında yapılan ağırlık ölçümlerinin karşılaştırılmasında ise, kontrol ve adropin grubunda ağırlık artışı; gentamisin ve adropin+gentamisin grubunda ağırlık azalması tespit edildi. Kontrol grubunun çalışma sonundaki ağırlığı ile çalışma başlangıcındaki ağırlığı arasında 10.3 ± 8.4 gram olacak şekilde yaklaşık %4 lük bir ağırlık artışı tespit edildi ki bu değer istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Adropin grubunda ise yaklaşık 3.6 gramlık bir artış saptandı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi.

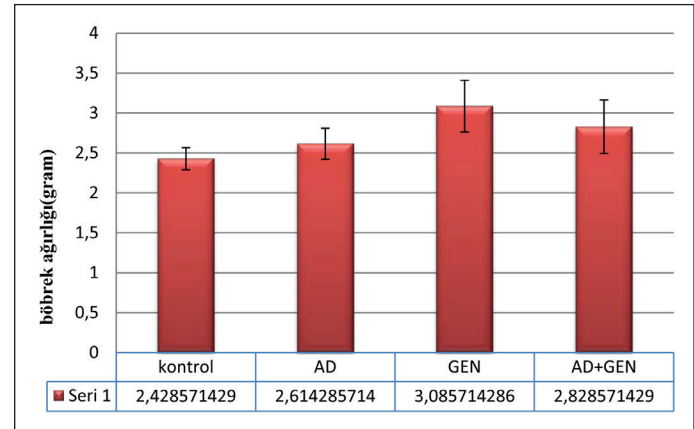
Gentamisin grubunda ise başlangıç ağırlığına göre 19.7 ± 10.1 gramlık bir azalma tespit edildi. Başlangıç vücut ağırlığına göre yaklaşık %7 kadar ağırlık kaybı saptandı. Bu değer kaybı istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

Adropin+gentamisin verilen grupta da ağırlık kaybı saptandı. Başlangıç ağırlığına göre yaklaşık %4.5 olacak şekilde ağırlık kaybı tespit edildi (12.4 ± 8.5 gr). Bu değer istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Ratların çalışmanın başlangıç ve bitiş zamanındaki ağırlıkları ve grup içi değişimleri Tablo I'de gösterilmiştir.

2. Böbrek Ağırlıkları

Kontrol grubu ile (2.43 ± 0.139 gr) adropin grubu (2.61 ± 0.196 gr) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Gentamisin grubunda ise böbrek ağırlıkları ortalaması (3.08 ± 0.324 gr) olarak tespit edildi ve kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcuttu ($p < 0.05$). Adropin+ gentamisin verilen grubun böbrek ağırlık ortalaması (2.83 ± 0.335 gr) olarak tespit edildi ve kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık mevcuttu ($p < 0.05$).

Adropin+gentamisin verilen grup (2.83 ± 0.335 gr) ile gentamisin (3.08 ± 0.324 gr) verilen grup arasında karşılaştırma yapıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi. Adropin verilen grup (2.61 ± 0.196 gr) ile gentamisin (3.08 ± 0.324 gr) verilen grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcut değildi. Ratların çalışmanın bitiş zamanındaki böbrek ağırlıkları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: Grupların ortalama böbrek ağırlıkları.

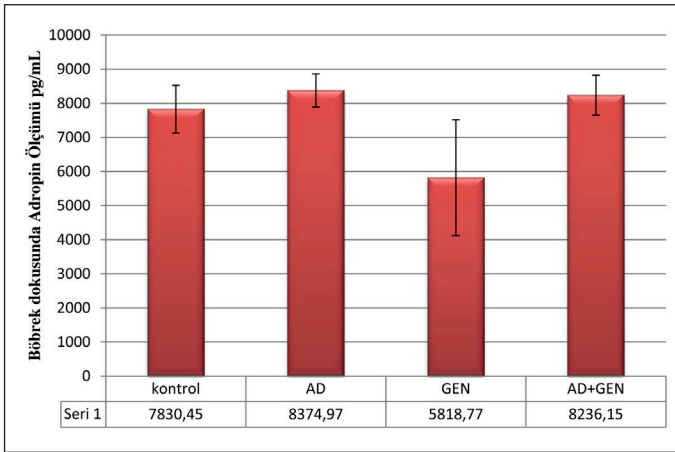
Tablo I: Çalışmanın başlangıç, bitiş ağırlıkları ve grup içi değişimleri.

Parametreler	Gruplar				
	Kontrol	Adropin	gentamisin	Adropin+gentamisin	p=
Başlangıç Ağırlığı, gr	263.00 $\pm$ 25.21	276.29 $\pm$ 30.74	289.14 $\pm$ 28.31	275.57 $\pm$ 16.89	0.332
Bitiş Ağırlığı, gr	273.29 $\pm$ 31.32	279.86 $\pm$ 35.55	269.43 $\pm$ 23.77	263.14 $\pm$ 15.11	0.718
Grup içi değişim, gr*	-10.286 $\pm$ 8.460	-3.571 $\pm$ 6.528	19.714 $\pm$ 10.095	12.429 $\pm$ 8.482	
p=	0.018	0.198	0.002	0.008	

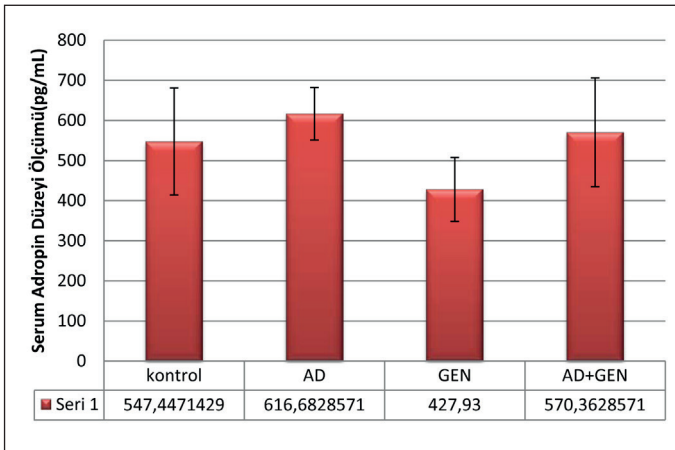
* Onuncu gün sonunda yapılan ölçümlere göre ratların ağırlık değişimi.

3. Böbrek Dokusunda Adropin Düzeyi Ölçümü

Dokuda adropin düzeyleri bakıldığında; kontrol grubunda doku adropin düzeyi ortalaması (7830.45 ± 697.76 pg/mL) olup adropin grubunda (8374.97 ± 484.49 pg/mL) gentamisin grubunda (5818.77 ± 1699.36 pg/mL) adropin+gentamisin grubunda ise (8236.15 ± 586.35 pg/mL) olarak saptandı. Doku adropin düzey ölçümü; gruplar arasında karşılaştırıldığında ise kontrol grubu ile adropin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Kontrol grubu ile gentamisin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile adropin+gentamisin grubu arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Adropin ile gentamisin grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Adropin ve adropin+gentamisin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$). Gentamisin grubu ile adropin+gentamisin grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$). Çalışma sonunda ratlardan elde edilen böbrek dokularında adropin düzeyi ölçümleri ve gruplar arası karşılaştırılması Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: Doku adropin ölçümleri ortalaması.



Şekil 3: Serum adropin ölçümleri ortalaması.

4. Serum Adropin Düzeyi Ölçümü

Kontrol grubuna (547.5 ± 133.6 pg/mL) göre sadece Adropin (616.7 ± 65.6 pg/mL) ve Adropin+Gentamisin verilen (570.4 ± 135.6 pg/mL) gruplarda serum adropin düzeyi ölçümü daha yüksek saptanmıştır. Ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamı tespit edilememiştir. Gentamisin verilen grupta (427.9 ± 79.7 pg/mL) serum adropin ölçümü, kontrol grubuna göre daha düşük tespit edilmiştir. Ancak bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildir.

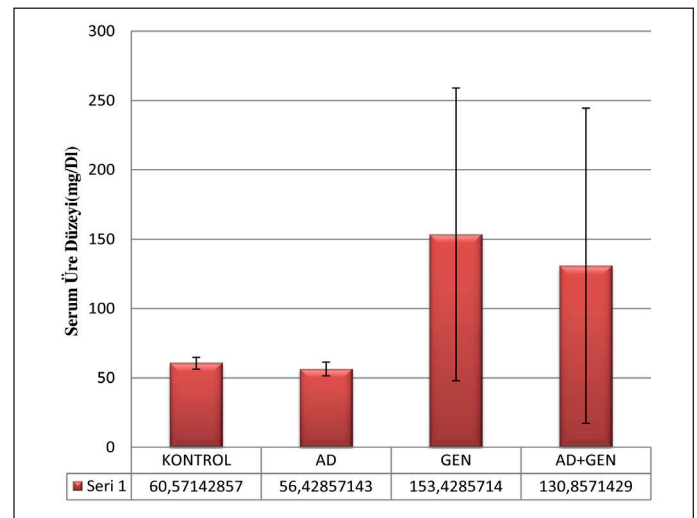
AAAdropin grubu ile gentamisin grubu arasında, serum adropin ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Çalışma sonunda ratlardan elde edilen serum örneklerinde adropin düzeyi ölçümleri ve gruplar arası karşılaştırılması Şekil 3’de gösterilmiştir.

5. Serum Üre Düzeyi

Serum üre düzeyinin, kontrol grubuna göre (60.57 ± 4.24 mg/dL), adropin verilen grupta (56.43 ± 4.96 mg/dL) daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

Gentamisin verilen grup (153.43 ± 105.57 mg/dL) ile adropin+gentamisin verilen (130.86 ± 113.66 mg/dL) grubun serum üre düzeyi, sadece adropin verilen gruba göre (56.43 ± 4.96 mg/dL) istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0.05$).

Yine benzer şekilde; Gentamisin verilen grup (153.43 ± 105.57 mg/dL) ile Adropin+Gentamisin verilen (130.86 ± 113.66 mg/dL) grubun serum üre düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0.05$). Buna karşılık Adropin+Gentamisin verilen (130.86 ± 113.66 mg/dL) grupta serum üre düzeyi ölçümü, Sadece gentamisin verilen gruba göre (153.43 ± 105.57 mg/dL) daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak bu düşüklüğün istatistiksel olarak



Şekil 4: Grupların serum üre düzey ölçüm ortalaması.

anlamı saptanmadı. Çalışma sonunda ratlardan elde edilen serum örneklerinde üre ölçümleri ortalaması ve gruplar arası karşılaştırılması Şekil 4'te gösterilmiştir.

6. Serum Kreatinin Düzeyi

Serum kreatinin düzeyinin, kontrol grubuna göre ($0,30 \pm 0,04$ mg/dL), sadece adropin verilen grupta ($0,26 \pm 0,02$ mg/dL) daha düşük olduğu tespit edildi. Ancak bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).

Sadece gentamisin verilen grup ($1,33 \pm 1,07$ mg/dL) ile adropin+gentamisin verilen ($1,23 \pm 1,08$ mg/dL) grubun serum kreatinin düzeyi, adropin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0,05$).

Yine benzer şekilde; Gentamisin verilen grup ($1,33 \pm 1,07$ mg/dL) ile Adropin+Gentamisin verilen ($1,23 \pm 1,08$ mg/dL) grubun serum kreatinin düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek tespit edildi ($p < 0,05$). Buna karşılık Adropin+Gentamisin verilen ($1,23 \pm 1,08$ mg/dL) grubun serum kreatinin düzeyi ölçümü, Gentamisin verilen gruba göre ($1,33 \pm 1,07$ mg/dL) daha düşük tespit edildi. Ancak bu düşüklük

istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışma sonunda ratlardan elde edilen serum örneklerinde kreatinin ölçümleri ve gruplar arası karşılaştırılması karşılaştırılması Şekil 5'te gösterilmiştir.

7. İmmünohistokimyasal Bulgular

(Adropin İmmünreaktivitesi)

Adropin immünoreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; glomerüllerde (siyah ok) gözlemlendi.

Böbrek dokusunda Adropin immünoreaktivitesi; Kontrol ve Adropin gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Adropin immünoreaktivitesi Gentamisin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($p < 0,05$). Gentamisin grubuyla kıyaslandığında ise adropin immünoreaktivitesi Gentamisin + adropin grubunda belirgin olarak artmıştı ($p < 0,05$) ve kontrole yakın gözlemlendi. Şekil 6-9 arasında sırasıyla (1-kontrol grubu, 2-adropin grubu, 3-gentamisin grubu, 4-gentamisin+adropin grubu) gösterilmiştir. Çalışmada 4 gruba ayrılan ratların Adropin immün-reaktivitesi histo-skor Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II: Adropin histoskor.

GRUP	Histoskor
Kontrol	$1,31 \pm 0,39$
Adropin	$1,41 \pm 0,77$
Gentamisin	$0,21 \pm 0,07a$
Gentamisin + adropin	$1,20 \pm 0,75b$

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

b Gentamisin grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p < 0,05$).

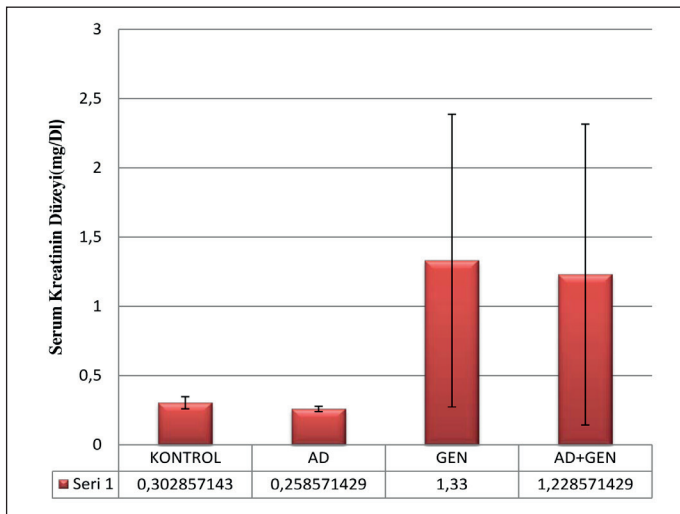
Tablo III: Apoptotik indeks (%).

GRUP	Apoptotik indeks (%)
Kontrol	$2,33 \pm 1,03$
Adropin	$2,83 \pm 1,83$
Gentamisin	$12,16 \pm 2,92a$
Gentamisin + adropin	$2,50 \pm 0,83b$

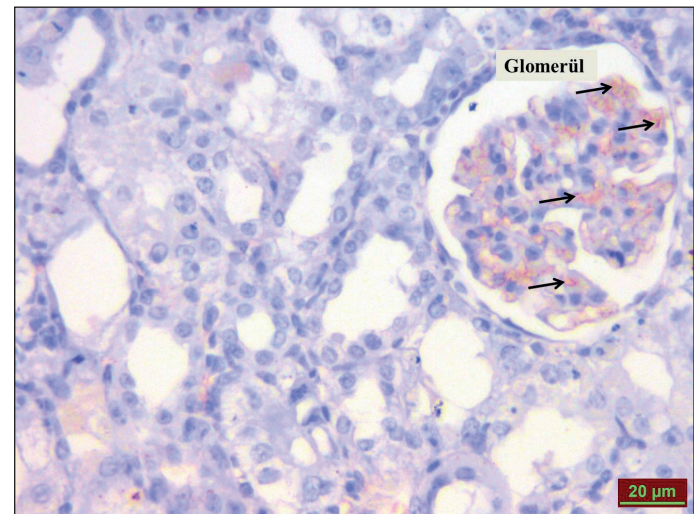
Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

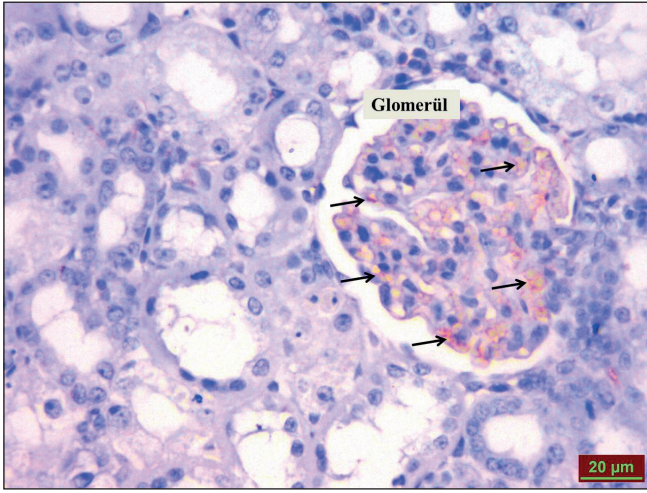
b Gentamisin grubuna göre karşılaştırıldığında, ($p < 0,05$).



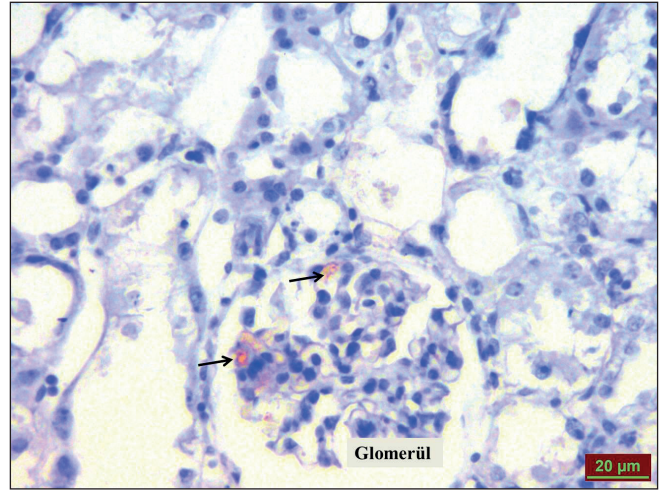
Şekil 5: Grupların serum kreatinin düzeyi ölçüm ortalaması.



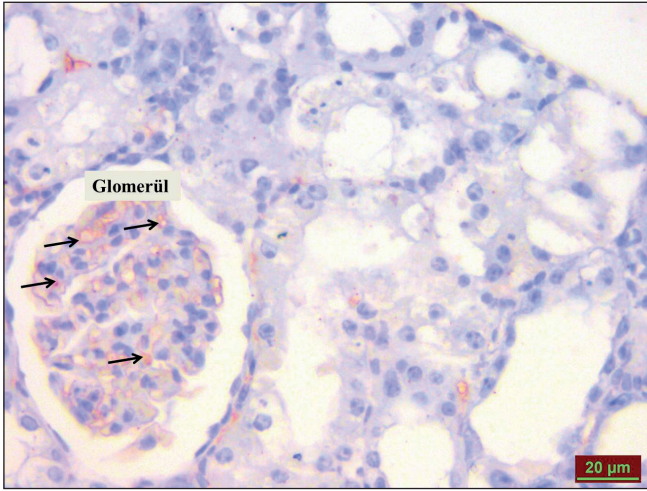
Şekil 6: Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda adropin immünreaktivitesi.



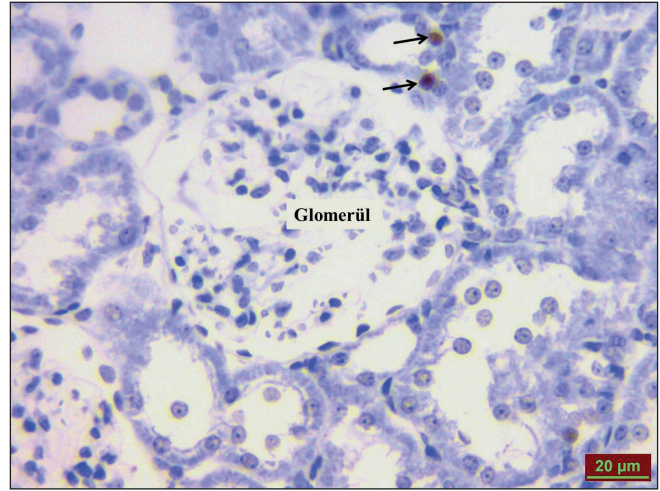
Şekil 7: Adropin grubuna ait böbrek dokusunda adropin immünreaktivitesi.



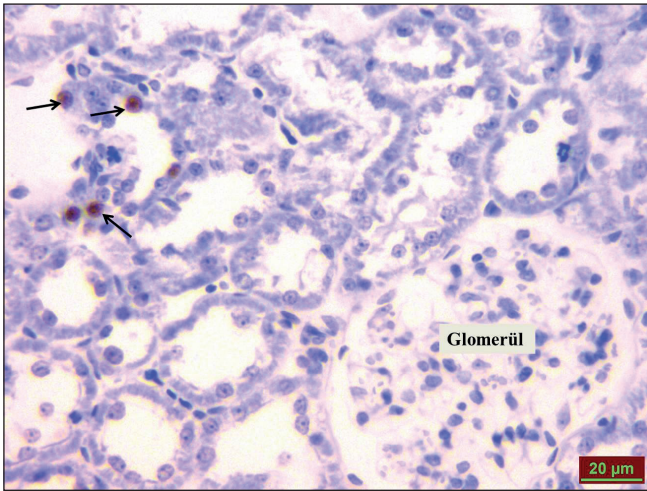
Şekil 8: Gentamisin grubuna ait böbrek dokusunda adropin immünreaktivitesi.



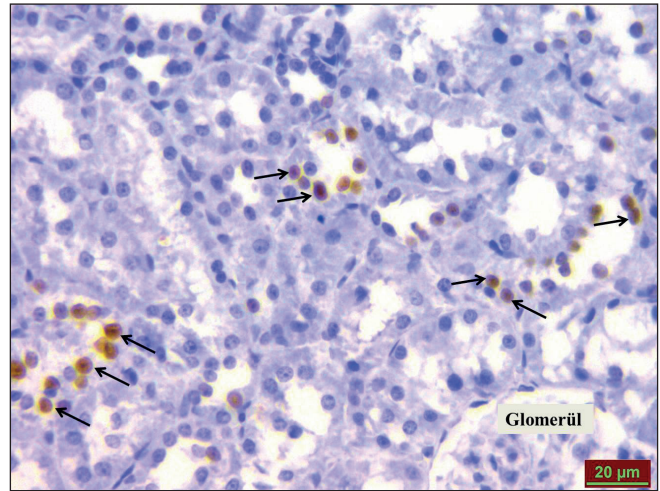
Şekil 9: Gentamisin + Adropin grubunun böbrek dokusu adropin immünreaktivitesi.



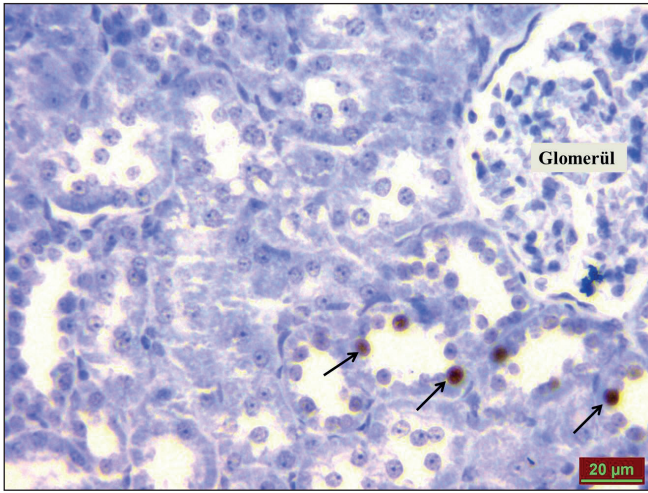
Şekil 10: Kontrol grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 11: Adropin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 12: Gentamisin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler.



Şekil 13: Gentamisin + Adropin grubuna ait böbrek dokusunda TUNEL pozitif hücreler.

8. TUNEL Bulguları

Apopitotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği böbrekte tübül hücrelerinde (siyak ok) gözlemlendi. Grupların tünel pozitif hücrelerinin mikroskopi görüntüleri Şekil 10-13 arasında sırasıyla (5-kontrol grubu, 6-adropin grubu, 7-gentamisin grubu, 8-gentamisin+adropin grubu) gösterilmiştir. Çalışmada 4 gruba ayrılan ratların Apopitotik indeks kıyaslaması Tablo III’de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada ve ülkemizde çok ciddi boyutlarda hasta konforunu bozan, hastalarda ciddi morbidite ve mortalite nedeni olan böbrek yetmezliği, önemli bir sağlık sorunudur. Böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nedenleri öğrenmek, bu nedenleri ortadan kaldırarak hastaların son dönem böbrek yetmezliğine olan gidişatını durdurmak veya son dönem böbrek yetmezliği gelişmişse bunun tedavisini sağlamak bilim insanlarının yaptığı ve yapacağı çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bu nedenledir ki; aynı amaçla çalışmamızı tamamladık.

Tamamlamış olduğumuz çalışmada, gentamisin ile deneysel olarak oluşturulan nefropati modelinde adropin adlı molekülün biyokimyasal ve immüno-histokimyasal olarak koruyucu etkisi incelendi. Yaptığımız çalışmada adropin molekülünün gentamisin nefrotoksitesine karşı koruyucu etkileri tespit edildi.

Çalışma sonunda rat serumlarında ve böbrek dokusu kesitlerinde ELISA yöntemi ile ölçülen adropin seviyeleri karşılaştırıldı. Böbrek dokusu adropin ölçümleri birbiri ile mukayese edildiğinde; gentamisin verilen grubun doku ölçümleri adropin verilen gruba göre, istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük saptandı. Daha önce böbrek yetmezliği oluşturulan ratlarda serum ve doku adropin düzeyi ile yapılmış

herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak metabolik olarak adropine benzer şekilde etkileri bulunan irisin adlı molekül ile Ebert ve ark.nın (15) yapmış olduğu çalışmada kronik böbrek yetmezliği bulunan hastalarda serum irisin ölçümü yapılmıştır. Ve yapılan bu çalışmada nefropati derecesiyle doğru orantılı olarak serum irisin seviyesinin anlamlı olacak şekilde düşük olduğu tespit edilmiştir. Tamamlamış olduğumuz çalışmada da; bu çalışmaya benzer şekilde, hem serum adropin düzeyi hem de böbrek dokusu adropin düzeyi, istatistiksel olarak anlamlı olacak kadar düşük tespit edildi.

Adropin ve gentamisin birlikte verilen grup ile sadece gentamisin verilen grup karşılaştırıldığında da gentamisin verilen grubun doku düzeyi ölçümleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük tespit edildi. Bu durum adropinin muhtemel renoprotektif etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Sadece adropin verilen grup ile adropin ve gentamisin verilen grupların doku adropin ölçümleri karşılaştırıldı. Adropin ve gentamisinin birlikte verildiği grupta doku adropin ölçümleri daha düşük saptanmıştır. Ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamı saptanmadı.

Doku adropin düzeyi ölçümüne ek olarak, serum adropin düzeyi ölçümleri de çalışıldı. Serum adropin düzeyi ölçümleri de doku düzeyi ölçümlerine benzer oranlarda tespit edildi. Sadece adropin verilen grup ile sadece gentamisin verilen grup arasında serum adropin ölçümleri birbiri ile mukayese edildi. Gentamisin verilen grubun serum adropin düzeyi, istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük saptandı. Bu tablonun nefrotoksiste durumunda serum adropin seviyelerinde düşme yaşanmasına bağlı olduğu düşünüldü. Adropin ve gentamisin birlikte verilen grup ile sadece gentamisin verilen grup karşılaştırıldığında doku düzeyi ölçümlerinin aksine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Sadece adropin verilen grup ile adropin ve gentamisin verilen grupların serum adropin düzeyleri karşılaştırıldı. Adropin ve gentamisinin birlikte verildiği grupta serum adropin seviyeleri daha düşük saptandı. Ancak bu durumun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Çalışma bitiminde ratların serum üre düzeyleri karşılaştırıldığında; serum üre düzeyi sadece adropin verilen grupta kontrol grubuna göre daha düşük tespit edildi. Ancak tespit edilen bu düşüklüğün istatistiksel olarak anlamı saptanmadı. Gentamisin verilen grupla kontrol grubu karşılaştırıldığında gentamisin verilen grubun serum üre düzeyi ölçümü istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı. Daha önce Parsons ve ark.ları (16) tarafından yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere gentamisin serum üre seviyesinde artışa sebep olmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışma da, bu çalışmayı destekler niteliktedir. Adropin ile birlikte gentamisin verilen ratların, serum üre ölçümü kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde yüksek tespit edildi. Sadece gentamisin verilen grup ile karşılaştırıldığında serum üre düzeyi adropin ile birlikte gentamisin verilen grupta daha düşük tespit edildi. Ancak bu düşüklük istatistiksel olarak bir anlam teşkil etmemektedir. Bu

durum adropinin muhtemel renoprotektif etkisi olabileceğini, belki de verilecek daha yüksek dozlarda bu etkinin daha açık bir şekilde ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Duque ve ark. nın (17) yapmış olduğu bir çalışmada gösterilmiştir ki gentamisin nefrotoksitesinin nedenlerinden bir tanesi de, gentamisinin reaktif oksijen radikallerini artırarak hücrelerde apoptozisi anlamli olacak şekilde artırmasıdır. Adropin ile gentamisin verilen grupta serum üre ölçümleri, sadece gentamisin verilen gruba göre düşük saptanmıştır. Bu durum, adropinin reaktif oksijen radikallerini azalarak oksidatif hasarı önleyici etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma bitiminde ratların serum kreatinin düzeyleri karşılaştırıldı. Serum kreatinin düzeyi serum üre düzeyine benzer olacak şekilde değişiklikler tespit edildi.

Yine yapılmış başka bir çalışmada da gentamisin ile nefropati oluşturulan ratlara NO sentaz inhibitörü olan L-NAME oral yolla verilmiş ve bu ratlarda kreatinin klirensi azalması ve serum kreatinin artışı sadece gentamisin verilen ratlara oranla daha fazla olmuştur (18). 2010 yılında Lovren ve ark.nın (14) yapmış olduğu çalışmada; adropinle tedavi edilmiş endotelial hücrelerde; artmış proliferasyon, migrasyon ve kapiller benzeri tüp biçimlenme saptanmış. Buna ek olarak azalmış geçirgenlik ve azalmış TNF alfa ilişkili apoptoz tespit edilmiştir. Bunun sebebi ise vazodilatör bir ajan olan NO sentezini upregüle etmesinden kaynaklı olabileceğine değinilmiştir. Bunun sebebi ise vazodilatör bir ajan olan NO sentezini upregüle etmesinden kaynaklı olabileceğine değinilmiştir. Yukarıda söz ettiğimiz çalışmalar gentamisin nefropatisi durumunun vazodilatör bir ajan olan NO seviyesine bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Adropin ise NO upregülasyonu sağlaması nedeniyle, gentamisin nefropatisinde renoprotektif etkili olabileceğini düşündürmektedir. Topuz ve ark.nın (19) yapmış olduğu bir çalışmada ise; araştırmacılar plazma adropin seviyesi ile akım-aracılı dilatasyon arasında pozitif bir korelasyon saptamıştır. Öyle ki araştırmacılar çalışma sonuçlarına göre, adropinin endotelial fonksiyon bozukluğu miktarını belirlemek için yeni bir belirteç olabileceğini önermiştir. Her iki çalışma sonuçlarında adropinin endotelial koruyucu etkisi irdelenmiştir. Bundan dolayı muhtemeldir ki adropinin daha yüksek dozlarda gentamisin nefropatisinde endotelial hasarını azaltarak, koruyucu etkisi asıl olarak ortaya çıkabilecektir.

İmmüno-histokimyasal tutulum açısından incelendiğinde ise gentamisin grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gentamisin grubunda kontrol grubuna göre anlamli bir düşüklük tespit edildi. Gentamisin+adropin grubunun immünoreaktivitesi ise gentamisin grubuna göre daha fazla saptandı. Bu sonuç bize renal yetmezlikte doku düzeyinde adropin seviyesinin azalabileceğini düşündürmektedir.

Daha önce bahsettiğimiz gibi, gentamisinin nefrotoksitesite mekanizmalarından bir tanesi de apoptozu indükleyerek sitotoksik etki aktivasyonu ile olmaktadır. Renal hücrelerde apoptozu arttırdığı daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir

(17). Bunlarla beraber tunel pozitifliğine bakıldığında adropin ve kontrol gruplarında tunel pozitifliği birbirine benzerken gentamisin grubunda ise istatistiksel olarak anlamli olacak şekilde artış saptandı. Gentamisin ile birlikte adropin verilen grupta ise sadece gentamisin verilen gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamli olacak bir şekilde azalma saptandı ve bu azalmanın kontrol grubuna yakın değerde olması; adropinin gentamisin nefrotoksitesine bağlı olarak oluşan apoptozisi önleyici özellikte olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; metabolik etkileri baskın bir hormon olan adropin; serum üre ve kreatinin değerlerinde azalma sağlamıştır ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamli gösterilememiştir. Histopatolojik olarak gösterilen apoptozisi önleyici etkileri olması ve anabolik etkisi ile bu tabloyu oluşturduğu düşünülmektedir. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda daha yüksek doz adropin verilerek bu etkinin ön plana çıkartılabileceği düşünülmektedir. Çalışmamız daha sonra yapılacak olan çalışmalara öncü olması ve alanında özgün olması sebebi ile de önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Hancock RE, Raffle VJ, Nicas TI: Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19:777-785
2. Balsam L, Nikbakht N: L-Arginine inhibits vasopressin-stimulated mesangial cell Ca²⁺. *Am J Physiol* 1998;275:C352-357
3. Mycek MJ, Howland RD: Lippincott illustrated review of Pharmacology. 3rd ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2004;130-171
4. Zaske DE. Aminoglycosides. In: Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ (eds). *Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. 2nd ed. Spokane, WA: Applied Therapeutics Inc. 1987;331-381
5. Reiter RJ, Tan D, Sainz RM: Melatonin: Reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2002;54:1299-1321
6. Erdem A, Gundogan NU, Usbutun A: The protective effect of taurine against gentamicin-induced acute tubular necrosis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1175-1182
7. Pedraza-Chaverri J, Maldonado PD, Mediana-Campos ON: Garlic ameliorates gentamicin nephrotoxicity: Relation to antioxidant enzymes. *Free Radic Biol Med* 2000;29:602-611
8. Smetana S, Khalef S, Nitsan Z: Enhanced urinary trypsin inhibitory activity in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Clin Chim Acta* 1988;76:333-342
9. Kumar KG, Trevaskis JL, Lam DD, Sutton GM, Koza RA, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Rogers PM, Kesterson RA, Thearle M, Ferrante AW Jr, Mynatt RL, Burris TP, Dong JZ, Halem HA, Culler MD, Heisler LK, Stephens JM, Butler AA: Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab* 2008;8:468-481

10. Celik E, Yilmaz E, Celik O, Ulas M, Turkuoglu I, Karaer A, Simsek Y, Minareci Y, Aydin S: Maternal and fetal adropin levels in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med* 2013;41:375-380
11. Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, Culler MD, Mynatt RL, Butler AA: Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:1394-1402
12. Butler AA, Tam CS, Stanhope KL, Wolfe BM, Ali MR, O'Keeffe M: Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3783-3791
13. Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Yilmaz M, Kalayci M: Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Cell Biochem* 2013;380:73-81
14. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M: Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation* 2010;122:185-192
15. Ebert T, Focke D, Petroff D, Wurst U, Richter J, Bachmann A, et al. Serum levels of the myokine irisin in relation to metabolic and renal function. *Eur J Endocrinol* 2014; 170(4): 501-506
16. Parsons PP, Garland HO, Harpur ES: Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: Dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 1997;122:570-576
17. Duque I, García-Escribano C, Rodríguez-Puyol M: Effects of reactive oxygen species on cultured rat mesangial cells and isolated rat glomeruli. *Am J Physiol* 1992;263:F466-F473
18. Can C, Şen S, Boztok N: Tuğlular I. Protective effect of oral L-arginine administration on gentamicin-induced renal failure in rats. *Eur J Pharmacol* 2000;390:327-334
19. Topuz M, Celik A, Aslantas T, Demir AK, Aydin S, Aydin S: Plasma adropin levels predict endothelial dysfunction like flow-mediated dilatation in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Investig Med* 2013;61:1161-1164