T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ (ANATOMİ)
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Enis ULUÇAM

FORMALDEHİT İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARI ÜZERİNE BAİCALEİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Emine MUT KEÇECİ

Referans no:10245446

EDİRNE-2023

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ (ANATOMİ)
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Enis ULUÇAM

FORMALDEHİT İLE OLUŞTURULAN BÖBREK HASARI ÜZERİNE BAİCALEİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Emine MUT KEÇECİ

Destekleyen Kurum: TÜBAP 2019/237

EDİRNE-2023

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca deneyim ve bilgilerinden faydalandığım, tez danışmanım Prof. Dr. Enis ULUÇAM'a teşekkür ederim. TÜBAP'a çalışmamızı desteklediği için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ **1**
GENEL BİLGİLER **3**
BÖBREK HİSTOLOJİSİ **6**
FORMALDEHİT **7**
BAICALEIN **8**
OKSİDATİF STRES VE SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ **10**
APOPTOZİS **11**
NİTRİK OKSİT **12**
GEREÇ VE YÖNTEMLER **16**
BULGULAR **21**
TARTIŞMA **28**
SONUÇLAR **32**
ÖZET **33**
SUMMARY **34**
KAYNAKLAR **35**
ŞEKİLLER LİSTESİ **46**
ÖZGEÇMİŞ **48**
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

BAI: Baicalein

THB: Tetrahidrobiopterin

CA1: Hipokampüste bellekle alakalı bir bölge

CAS-3: Caspase 3

CAS-9: Caspase 9

CAT: Katalaz

cGMP: Siklik guanizin monofosfat

eNOS: Endotelyal NOS

FA: Formaldehit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

FMN: Flavin mononükleotid

GSH: Glutatyon

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

H_2O_2: Hidrojen peroksit

iNOS: İndüklenebilir NOS

IP: İntraperitoneal

L-NMA: N-metil-L-arjinin

L-NNA: N-nitro-L-arjinin

LPO: Lipid peroksidasyonu

MDA: Malondialdehit

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NMDA: N-metil-D-aspartatik asit

GİRİŞ VE AMAÇ

Kimyasal formülü CH_2O olan formaldehit (FA) organizmanın doğal yapısında da bulunmaktadır. FA aldehit ailesinin en basit üyesidir. Keskin kokulu, renksiz ve suda iyi çözünen FA, formik aldehit, metil aldehit, metanol ve metil oksit olarak da adlandırılmaktadır (1-4).

Dünya Sağlık Örgütü'nün kanserojen olarak sınıflandırdığı FA deri, solunum ve sindirim yolu ile vücuda alınmaktadır (5). FA sigara dumanı ve ortamdaki buharlaşan formalin ile solunum yoluyla, içme suyu, gıdalarda bulunan bazı katkı maddeleri, meyve ve sebzeler ile sindirim yoluyla vücuda giriş sağlamaktadır (6-9). FA vücuda girdikten sonra formaldehit dehidrogenaz enzimi ile formik aside dönüşmektedir. Formik aside dönüşen FA idrar veya feçes ile ya da karbondioksite okside olup solunum yoluyla vücuttan atılmaktadır (9-12).

FA günümüzde sunta, zemin panelleri, yalıtım malzemeleri, mobilyalar, kumaşlar, ayakkabı, kâğıt, ilaç, ekstazi vb. uyuşturucu maddelerin üretiminde, mumyacılıkta, ev ve temizlik ürünlerinde dezenfeksiyon olarak ve patoloji, histoloji ve anatomi laboratuvarlarında tespit solüsyonu olarak çok sık kullanılmaktadır. Özellikle inatçı sistit tedavilerinde ve bazı ilaçlarda koruyucu madde olarak tercih edilmektedir (13-15).

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada FA'nın böbrekler üzerine pek çok olumsuz etkisi olduğu belirtilmiştir. İntihar girişimi nedeni ile 150 ml formalin alan bir hastada akut böbrek yetmezliğinin meydana geldiği ve kronik alkoliklerde, FA'nın formik aside metabolize olarak metanol ile böbrek dokusunda meydana gelen nekrozun böbrek yetmezliğine yol açtığı bildirilmiştir (16,17). Sıçanlarda intraperitoneal uygulanan FA'nın böbrek dokusundaki mast hücrelerinde degranulasyon olduğu ve sayıca arttığı gözlenmiştir (18).

Baicalein (BAI) (5,6,7-trihidroksiflavon) *Scutellaria baicalensis*'in köklerinden elde edilen bir flavonoidtir (19). BAI anti-bakteriyel (20), anti-viral (21), anti-oksidatif (22), anti-inflamatuar (23) özelliklere sahiptir. Kanser hücrelerindeki metastazı baskılar ve apoptozu indükleyip birçok kanser türünde anti-tümör etkiler meydana getirdiği gözlenmiştir (24,25). BAI anti-tümör etkisiyle hücre döngüsü tutulmalarını indükler, apaptozda rol alan proteinleri düzenleyip, adhezyon ve migrasyon kapasitelerini düşürür ve metastaz inhibisyonunu sağlar (26).

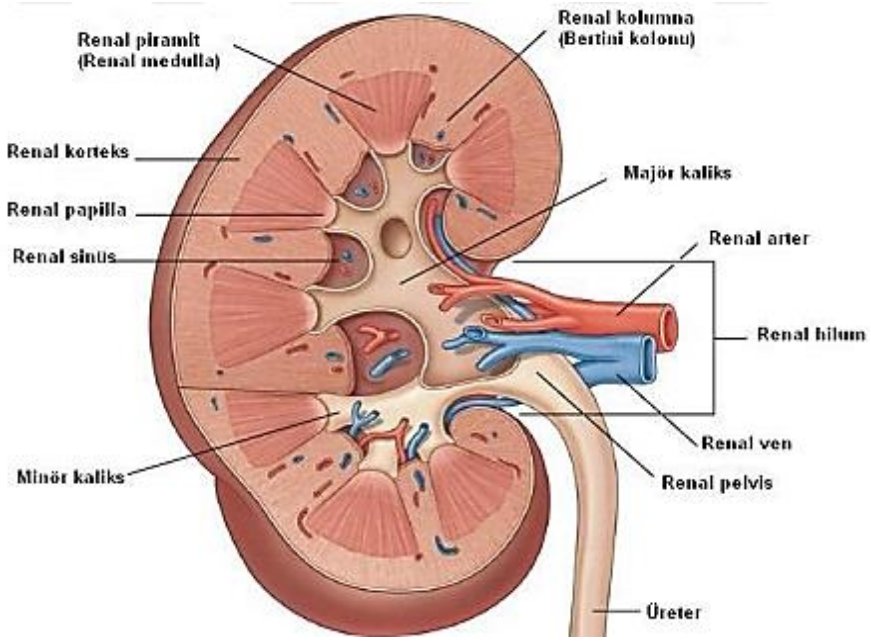
Son yıllarda terapötik etkinlikten ödün vermeden yan etkileri azaltabilen nispeten toksik olmayan bir ilaç bulmak için aşırı ilgi vardır. Bir çalışma da BAI'nin böyle bir potansiyel aday olduğunu göstermiştir (27). Bu çalışmada FA toksistesini önlemede daha önce çalışılmamış olan BAI'nin etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

BÖBREK ANATOMİSİ

Böbrekler paravertebral alanda yerleşmiş retroperitoneal organlardır. Her iki böbrek de oblik pozisyonda *m.psoas major*'un dış yanında yer alır. Sağ böbrek karaciğerin konumu nedeni ile sola göre daha aşağıda bulunmaktadır. Sağ böbrek sol böbreğe göre daha kısadır (28). Erişkin bir kişinin böbreği 10-14 cm uzunluğunda, 5-7 cm genişliğinde ve 2,5-3 cm kalınlığındadır. Böbreğin ağırlığı kadınlarda yaklaşık 135gr, erkeklerde 150gr'dır (29).

Her bir böbreğin ön ve arka iki yüzü, üst ve alt iki ucu, konveks bir iç kenarı ve konkav bir dış kenarı bulunmaktadır (30). Böbreğin üst uç kısmı glandula suprarenalis ile sarılmıştır. Konkav kısmında böbreğe giren damar ve sinirlerin giriş yeri olan *hilum renale* bulunur. Ayrıca bu bölgeden idrar çıkışı da sağlanır. *Hilum renale*'den sonra yapılar *sinüs renalis, medulla renalis* ve *cortex renalis* olarak devam eder. *Hilum renale*'de *a. renalis*'in dalları, *pelvis renalis, ureter* ve *v. renalis* bulunur (31). (Şekil.1)



Şekil 1. Embriyolojik Gelişim Sonrası Böbreğin Son Hali

Böbrekler periton aracılığı ile ön yüzde intraperitoneal organlarla komşuluk yapmaktadır. Sol böbrek üst tarafta *gl. suprarenalis sinister*, üst dış kısımda *splen*, üst iç tarafta *gaster*, hilus bölgesinde *cauda pancreatis* ve alt tarafta da *intestinum tenue* ve *intestinum crassum*'lar ile komşuluk yapmaktadır. Sağ böbrek üst tarafta *glandula suprarenalis dexter*, üst iç kısımda *hepar*, hilus bölgesinde *duodenum* ve alt kısımda *intestinum crassum*'lar ile komşuluk yapar (28,32-33).

Böbrek sagital olarak kesildiğinde dış tarafta korteks, iç kısımda ise medulla görülür. Medulla 10-18 adet *pyramides renales'ten* meydana gelir. Piramitlerin taban kısımları corticomedular bölgede, tepe kısımları da *calices renalis minor* içine uzanır. *Calyx* içine açılan kısımlar *papilla renalis* adını alır. Korteks böbreğin hem dış kısmında hem de *pyramides renales*'ler arasında bulunur ve bu kısım *columna renalis* (Bertin) olarak adlandırılır (29).

Nefron böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük üniteye verilen isimdir. Her böbrekte hemen hemen bir milyon nefron vardır. Gelişimini tamamlayan böbrekte yeni nefron yapılmamaktadır. Dolayısı ile böbrek hastalıkları, travma, ya da yaşlanma sebebi ile hasarlanan nefronların yerine yenisi yapılamamaktadır. Her bir nefron bir glomerül ve tübüllerden oluşmaktadır. Tüm glomerül Bowman kapsülü ile sarılıdır. Böbrek tubülleri, proksimal tübül, distal tübül, Henle kulpu ve toplayıcı kanallardan oluşmaktadır. Glomerülden filtre edilen idrar sırasıyla proksimal tübül, Henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı

kanallardan geçerek *papilla renales*'ten geçerek *pelvis renalis*'e ulaşmaktadır (29). Nefronlar istenmeyen maddeleri plazmadan ayırarak vücuttan uzaklaştırma işlemini başlatır. Tübüllerde filtre edilen sıvı, yine tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir ve böylece istenmeyen maddeler idrar oluşumuna katılır (29,34).

Böbreklerin Damarları ve Sinirleri

Böbrekler, 1. ve 2. lumbar vertebralar seviyesinde *aorta abdominalis*'ten ayrılan *a.reanlis'ten* gelen kanı süzer. Böbreklere gelen kanın %90'ı böbreğin *cortex renalis* kısmına %10'u da *medulla renalis* kısmına dökülür. Böbreklerden süzülen kanın %99'u geri emilir ve %1'i idrar olarak vücut dışına atılmaktadır (35).

*Hilum renale'*den giren *a.renalis* önce *aa.interlobares* daha sonra da *aa.arcuatae* adını alan dallarına ayrılarak devam eder. A.arcuatae'dan dik olarak çıkan dallar *aa.interlobulares (aa.corticales radiatae)* adını alır. Glomerüle giden *arteriola glomerularis afferens, a.interlobulari*s'ten köken almaktadır. Glomerülü oluşturan kapillerler birleşir ve efferent arteioller meydana gelir. Daha sonra effernt arterioller dallanıp peritübüler kapiller ağı oluşturur. Peritübüler kapiller ağ tübülüsleri sarar ve böbrekte bulunan ikinci kapiller ağ sistemidir. Peritübüler kapilerden gelen kan daha sonra venöz sisteme dökülüp *v.interlobularis, v.arcuatae, v.interlobaris* ve *v.renalis*'i takip etmektedir. Renal venler de *vena cava inferior*'a drene olmaktadır. Böbrekteki kan akım miktarı kalp debisinin %22'si kadardır. Yani böbrekte yaklaşık olarak dakikada 1100 ml kan akımı sağlanmaktadır (29).

Böbreğin lenf damarları üç pleksustan meydana gelmektedir. Birincisi renal tübüllerin çevresi, ikincisi *fascia renalis*'in altı, üçüncüsü *corpus adiposum pararenale*'dedir. Üç pleksus da *hilum renale*'den çıkarken birleşip *v.reanlsi*'i takip ederek *aorta*'nın yan kısmında bulunan *nodi lymphatici lumbales*'e drene olmaktadırlar (36).

Böbreğin sempatik lifleri *truncus sympathicus'*un lumbal bölümünden, *n.splanchnicus minör* ve *n. splanchnicus imus*, parasempatik lifleri de *n. vagus*'tan gelir. Önce *plexus coeliacus'*tan gelen bu lifler daha sonra *a.renalis* etrafında bulunan *pleksus renalis* ile böbreğe gelir. *Pleksus renalis*'ten çıkan sinir lifleri böbreğin parankimi içerisine girip nefronlara kadar devam eder (36).

BÖBREK HİSTOLOJİSİ

Böbreğin dokusu sırasıyla *capsula renales, cortex renalis, medulla renalis, calyces renales, pelvis renalis* ve *hilum renale*'den oluşur (30,37-40). Böbrekler fibröz bağ dokusu ile çevrilmiştir. Yapıları birleşik tübüler bez şeklindedir. Kapsüllerin iç kısmı ağırlıklı olarak miyofibroblast, dış kısmında da kollejen lifler ve fibroblast bulunmaktadır. Böbrek dokusunda bağ dokusu çok az miktardadır. *Cortex renalis, corpusculum renale, tubulus renales*'lerden oluşur. *Medulla renalis*'te *tubulus renales*'ler vardır (30,37).

Böbreğin en küçük fonksiyonel ünitesine *nephron* adı verilir. *Nephron* sayısı insan vücudunda yaklaşık 1-4 milyon, sıçanlarda da 300.000 adettir (41-42). *Nephron* böbrekte bulunduğu yere göre isimlendirilir. Dış kortekste lokalize ise kortikal, medullaya yakın ve iç kortekste lokalize ise jukstamedüller adını almaktadır. *Nephron, corpusculum renale* (Malpighi cisimciği, renal cisimcikler) denilen kör bir uç ve *tubulus renalis* denilen tübüler kısım olmak üzere iki kısımdan meydana gelmektedir (41-43).

Corpusculum renale glomerulus ve Bowman kapsülü olmak üzere iki parçadan oluşmaktadır. İdrar oluşumunun ilk evresi olan kan filtrasyonu *corpusculum renale* ile sağlanır (44).

Glomerulus, bir ucu *arteriola glomerularis afferens* diğer ucu *arteriola glomerularis efferens*'ten meydana gelen glomerül kapillerden oluşmuş ve Bowman kapsülü ile çevrili kapiller bir yumaktır. Glomerulus kapillerleri *arteriola glomerularis afferens*'ten çıkarak Bowman kapsülünün içine girer ve birbiriyle anastomoz yapan uç dallara ayrılır. Bu dallar birleşip Bowman kapsülünü terk eden *arteriola glomerularis efferens*'i meydana getirir. *Arteriola glomerularis efferens* ile Bowman kapsülü içinde bulunan glomerüler yatağa ulaşan kan filtre edilip ortaya çıkan ultrafiltrat Bowman boşluğuna, filtrasyon edilmiş kan da *arteriola glomerularis efferens* ile glomerustan uzaklaşır (42-45). Glomerulun kapiller yapısı, bazal membranda tutunan tek sıralı endol hücrelerden meydana gelmiştir. Endotel üzerinde bulunan, 0.1 μm çapındaki "fenestra" ya da "filtrasyon yarıkları'' glomerüle filtrasyon işlevini kazandırmıştır (37-38).

FORMALDEHİT

FA günümüzde çok yaygın olarak kullanılan keskin kokulu, suda çok iyi çözünebilen aldehit ailesinin en basit üyesidir (1-2). Kimyasal formülü CH_2O'dur. Erime noktası -92 °C, kaynama noktası -21 °C ve molekül ağırlığı 30.03(g/mol^{-1})'tür (46). Metanol oksidasyonundan elde edilen %37'lik sulu çözeltisi formalin olarak adlandırılır. Polimerize katı formu olan paraformaldehit ısıtılıp depolimerize edilebilmektedir. FA oldukça reaktiftir ve bu nedenle her ortamda gaza dönüşebilir (47-48).

1867 yılında FA'nın saf olmayan formu August Wilhem von Hofmann tarafından keşfedilmiştir. 1892 yılında ise saf hali Friedrich August Kekulé von Stradonitz tarafından izole edilmiştir. Bakır, gümüş veya molibden alaşımı olan katalizör ile 400-650 °C'de metanol oksidasyonu ile FA meydana gelir (49). Dünyada her yıl yaklaşık olarak 20 milyon ton %37'lik formalin üretimi yapılmaktadır (3).

FA'nın klinik ve deneysel alanda yapılan çalışmalarda üriner sistem üzerinde yüksek ölçüde toksik etkilerinin olduğu ve insanlarda mesleki alanda uzun süre FA'ya maruz kalması nedeni ile böbrek hasarı meydana geldiği bildirilmiştir (50).

Formaldehit'in Toksikokinetiği

FA ilk olarak vücuda solunum ve sindirim yoluyla alınır. Bununla birlikte FA maruziyeti nedeni ile başta solunum sistemi olmak üzere, sinir sistemi, gastrointestinal sistem, bağışıklık sistemi ve üreme sistemi üzerinde de zararlı etkileri görülür (5,13,51-52).

FA'nın koku eşiği 0,8 ppm'dir. Fakat bu eşik FA'ya duyarlı kişilerde 0,1 ppm değerindedir (53). Ayrıca FA 0,24 ppm gibi düşük konsantrasyon seviyesinde solunum yollarında iritasyon meydana getirebilir (54). 0,4-3 ppm arasındaki konsantrasyonda FA'ya maruz kalındığında gözyaşı miktarı artar, göz, burun ve boğaz iritasyonu, nefes darlığı, baş ağrısı, burun akıntısı gözlenir. Yüksek konsantrasyonda FA'ya maruz kalındığında keskin kokuyla birlikte akciğerler, burun ve gözde yanma hissi meydana gelmekte ve solunum yollarında mukus ve silia oluşumunu ve akışkanlığı engellenmektedir (55-56). Ayrıca 10 ppm FA maruziyetinde de, nazal epitelde metaplazi ve rinit geliştiği gözlenmiştir (57).

FA'nın oral alımında üst gastrointestinal sistemde lokal korozotif etkiyle histopatolojik olarak gastrit meydana gelir ve karın ağrısı, mide bulantısı ve şiddetli ishal gibi semptomlar ortaya çıkar. Kanama, nekroz ve daha sonra meydana gelen perforasyon, şiddetli metabolik asidoz, dolaşım kollapsı görülerek birkaç gün içinde ölüme neden olabilmektedir

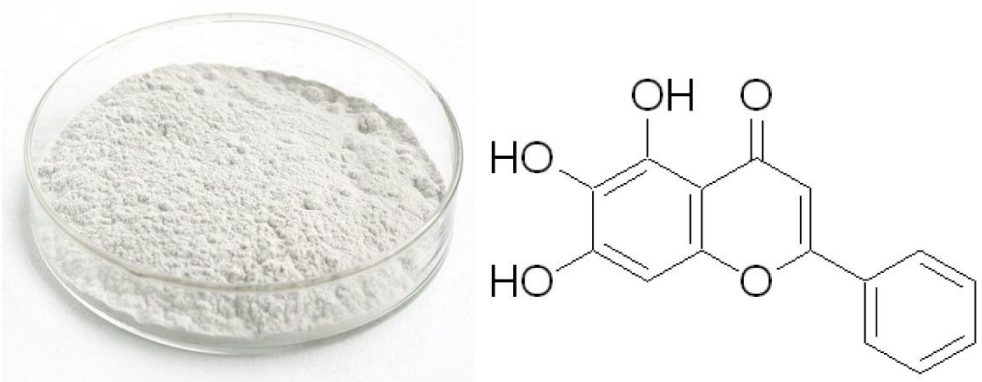
(2,58-60). 40 ppm gibi yüksek konsantrasyonda maruz bırakılan fare ve sıçanlarda ağırlık kaybı, ölüm, uterus ve ovaryum hiperplazisi meydana gelmiştir (57).

Yapılan bir çalışmada FA toksisitesi sonucu böbrekte mononüklear hücre infiltrasyonu, tubul ve Henle kulpunda hipertrofiye uğramış hücreler gözlenmiştir. Ayrıca da glomerulde epitel doku hasarı, tübül membranında hasar ve bütünlük kaybı ile piknotik nukleuslar izlenmiştir (50,61-62). Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), hekzokinaz enzim aktivitelerinde azalma, laktat dehidrogenaz (LDH), malat dehidrogenaz (MDH) ve katalaz (CAT) enzim aktivitelerine artma tespit edilmiştir. Yine bu çalışmalarda süperoksit dismutaz (SOD) ile glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivitelerinin de düştüğü bildirilmiştir. Böylece FA'nın böbrek dokusunda antioksidan savunma sistemi üzerinde zararlı etki oluşturduğu ve oksidatif hasar oluşturduğu tespit edilmiştir. Oksidatif hasarın tespiti için kullanılan bir başka parametre de malondialdehittir (MDA). Bu çalışmada MDA seviyesinin artışının gözlenmesi ile böbrekte lipid peroksidasyonunun (LPO) ortaya çıktığı ve oksidatif hasarın meydana geldiği görülmüştür (50,61-63).

FA diş hekimliğinde saprodonti tedavisinde kullanılmaktadır. Saprodonti tedavisinde uygulanan doz miktarı deneysel bir çalışmada sıçanlara uygulanmış ve böbrek fonksiyonlarının belirleyici göstergeleri üre ve kreatinin seviyelerinde artış gözlenmiştir (64).

BAICALEIN

Baicaleinin (BAI, 5,6,7-trihidroksi-2-fenil-4H-1-benzo-piran-4-on), anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etkileri olan doğal bir flavonoiddir (65-66). *Scutellaria Baicalensis*'in köklerinden izole edilmektedir (67). Çin tıbbında hipertansiyon, aterosklerozis, soğuk algınlığı, dizanteri, hepatit ve hiperlipidemi gibi birçok sağlık sorunlarının tedavisinde kullanılmaktadır (68). Bu potansiyel biyoaktif flavonoid bileşiği Çin ve Güney Kore başta olmak üzere birçok Asya ülkesinde yetişmektedir (69). (Şekil.2)



Şekil 2. Baicalein ve Formülü

Yüksek düzeyde anti-kanser etkilere sahip olduğu için yaygın olarak kullanılmakta olan bu maddenin ana bileşenleri baicalin, baicalein ve wogonin biyoaktif flavonlar olduğu bilinmektedir. Bu flavonların tümör büyümesini baskıladığı bildirilmiştir (70). Anti-tümör etkilerini hücre döngüsü tutulmalarını indükleme, apoptoz ile ilişkili proteinlerin ifadelerini düzenleme, adhezyon ve migrasyon kapasitelerini düşürme ve metastaz inhibisyonu ile göstermektedirler (70).

BAI, apoptozu indükleme ve tümör hücresinin büyümesini inhibe etme özelliği ile son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Ayrıca çeşitli kontrol noktalarında hücre döngüsünün durdurulmasını uyararak, tümör hücrelerinde sitostatik etkileri olduğu bildirilmiştir (68).

Baicalein'in Pro-apoptotik Etkisi

Kanser ve mitokondriyal dinamik birbiri ile bağlantılıdır (71). Mitokondri hücrede (metabolizma, sağ kalım, farklılaşma, proliferasyon, apoptozis) birçok fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (72). Mitokondri dinamik bir ağdır; devamlı olarak morfolojilerini değiştirmektedir (73). Füzyon ve fizyon dengesi, hücrelerin morfolojileri ve mitokondriyal DNA dağılımını (mtDNA) belirlemektedir (71).

Otofaji ve apoptozis çeşitli streslerle uyarılarak hücrenin devamlılığını ya da sonlanmasını sağlarlar ve mitokondri fizyonuna neden olmaktadırlar (74). Aktive edilmiş protein kinaz mitokondri fizyonu gibi çeşitli mitokondriyal işlevleri etkinleştirip apoptozis ve otofajinin meydana gelmesinde rol almaktadır (75). Kaspaz (CAS) aktivasyonu apoptoziste önemli rol alır. BAI ile etkileşim, aktif hale gelen CAS8 ve CAS9 tarafından tetiklenen internal ve eksternal yollar önemli bir effektör protein olan CAS-3 ile sonlanmaktadır (76-77). CAS3,8,9 aktivasyonu hücre içi apoptotik sinyal indüksiyonu, transdüksiyon ve amplifikasyonunda önemlidir (78). Yapılan bazı araştırmalar BAI tedavisinde farklı zamanlarda CAS-3,8,9 aktivitesinin olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında CAS3 ve CAS9 belirgin aktivsyonu ile BAI'nin apoptozisin daha çok mitokondriyal yolağını tetiklediğini göstermiştir (79). Ayrıca BAI, MAPK, p53, NF-KB ve TNF- alfa gibi pro-apoptotik proteinleri düzenlemede de rol oynamaktadır (80).

OKSİDATİF STRES VE SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Yörüngelerinde bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron bulunduran yapılar olan serbest radikaller (81), eşleşmemiş bu elektronlar nedeni ile karasız haldeki serbest radikal molekülü elektronunu başka bir elektron ile eşleştirerek kararlı hale geçebilmektedir. Bu da serbest radikallerin kimyasal aktivite potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir (82). Oksidan ürünleri arttığında, membran yapısındaki hedef moleküller olan membran proteinleri, doymamış yağ asitleri, glikolipidler ve fosfolipidler oksidatif strese maruz kalarak metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve bazen ölüme sebep olabilmektedir (83-84).

Oksidatif stres antioksidan sistem ile nitrojen türleri ve reaktif oksijen arasında gözlenen dengenin oksidan yön tarafına bozulmasıdır (85). Doğal bir süreç olan oksitadif stresi kontrol altında tutan özelleşmiş bir takım mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmaların yetersizliği sonucu oksidatif hasara meydana gelmektedir (86). Oksidatif streste etkili reaktif oksijen türleri, peroksil (RO_2), süperoksit (O_2^-), hidroperoksil (HRO_2^-), hidroksil (OH), gibi serbest radikaller ve hipoklorik asiti (HOCl), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi nonradikallerdir. Bunun yanında reaktif nitrojen türlerinde de peroksinitrit ($ONOO^-$), nitröz oksit (HNO_2), alkil peroksinitrat (RONOO) gibi nonradikaller ile nitrik oksit (NO), nitrojen dioksit (NO_2^-) gibi serbest radikaller bulunmaktadır (87).

Serbest radikallerin oluşumu hücrelerdeki endojen ve ekzojen kaynaklara bağlıdır (88). Oksidatif stresin, toksikolojide olası bir mekanizma olarak son 20 yıldır araştırmaların odağı haline gelmiştir (89).

Serbest oksijen radikallerinin (SOR) meydana gelmesi, radikal zincir reaksiyonları ile diğer ürünlerin üretimine neden olmaktadır. Süperoksit radikali, organizmada çeşitli oksidazlar, bazı koşullarda endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) vaıtası ile oksijenin bir elektron redüksiyonu sonucu oluşmaktadır.

Normal şartlarda süperoksit radikali antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilmekte ve mitokondride manganez SOD, sitoplazmada bakır SOD ile H_2O_2'e dönüştürülmektedir. H_2O_2 ise lizozomda CAT, mitokondride GSH-Px tarafından H_2O ve O_2'ye parçalanmaktadır. Bunun yanında H_2O_2 Fe, Cu gibi elementler bulunduğunda, reaktif hidroksil radikaline dönüştürülebilmektedir (87). Süperoksitten daha az toksik özellik gösteren H_2O_2, dokularda bulunan peroksidaz, CAT ve GSH-Px enzimleri vasıtasıyla H_2O ve O_2 gibi daha zayıf etki gösteren yapılara dönüştürülüp etkisiz hale getirilmektedir (89-91).

Lipid hidroperoksitlerin yıkımı ile oluşan aldehitler, hücre düzeyinde metabolize olurlar. Başlangıçtaki etki alanlarında yayılıp hücrenin diğer kısımlarında da tahribat yapıp sekonder bozukluğa da neden olabilirler (91).

Serbest radikallerin etkisiyle membranlarda LPO bozukluğu ortaya çıkmaktadır (92). LPO, serbest radikaller tarafından başlatılan ve membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan kimyasal bir olaydır. Malondialdehid (MDA) LPO'nun en önemli ürünüdür (92). Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda MDA ortaya çıkmaktadır. MDA, hücre zarlarından iyon alış-verişine etki eder ve membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. Bu da iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlar meydana getirmektedir. Bu özellik MDA'nın DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilmesi, mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojenik etki göstermesine yol açmaktadır (89-90,92).

Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Ekzojen radikal kaynakları arasında bağışıklık yapan maddeler, hava kirliliği, pestisitler, radyasyon, anestezikler, alkol, sigara, solvent ve antineoplastikler yer alır. Endojen radikal kaynaklar ise, iskemi, intoksikasyon, peroksizomlar, katekolaminler, travma, hidrokinonlar, prostaglandin sentetaz, flavinler, tioller, mitokondrial elektron transport sistemi, NADPH oksidaz, lipooksijenaz gibi enzimlerdir (93).

APOPTOZİS

Apoptozis yaşam fonksiyonlarını kaybeden hücrelerin fizyolojik olarak programlı bir şekilde yok edilmesini olayıdır. Apoptozis sayesinde hücrenin normal yaşam döngüsünün devamlılığı, embriyonik gelişim ve bağışlık sisteminin düzgün çalışması sağlanmaktadır (94). Bunlara ilaveten endokrin yapılarda kantrofik hormon seviyesinin düşmesi ile ortaya çıkan atrofi, kemoterapi nedeni ile veya tümör dokularında kendiliğinden apoptoz meydana gelir. Ayrıca hipertermi tedavileri sonrası görülen ölüm, iyonize radyasyon ve allerjilerde T lenfositlerin hedef hücreye olan etkisinde apoptoz rol almaktadır (95).

Işık mikroskopu ve histopatolojik yeni boyama metotlarının gelişmesi sonucu hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler elde edilmiş ve nekrozun tanımı yapılmıştır (96). Son 30 yılda yapılan araştırmalar, hücrelerin kendilerini ölüme götürecek genetik düzeneğe sahip olduğu keşfedilmiştir. Çok hücreli organizmalardaki hücre sayısının belli bir sayıda tutulabilmesi için hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki bir dengenin sağlanması gereklidir (97). Zedelenmiş ve yaşlanmış hücreler organizmanın hücresel homeostazı sağlamak için iltihabi olmayan ve enerji gerektiren bir tür hücre ölümü olan apoptozis ile sonlanmaktadırlar (98). İlk

kez 1972'de iskemi nedeni ile ortaya çıkan doku nekrozundan daha farklı bir olay olan programlanmış hücre ölümü gösterilmiştir (99). Organizmanın iltihabi reaksiyonlardan veya otoreaktiviteden korunması için apoptozis ve hücrelerin ortadan kaldırılması arasındaki dengenin oldukça önem taşıdığı bildirilmiştir (100).

Apoptozis, intrensek (mitokondrial yolak) ve ekstrensek (ölüm reseptör yolağı) olmak üzere iki ayrı yoldan uyarılmaktadır. İntrensek yolda mitokondriyumdaki membran potansiyeli üzerinde değişikliklere yol açan birbirinden farklı uyaranlar bulunmaktadır. SOR uyaranların en önemlisidir. İntrensek yolda apoptozis süreci boyunca SOR üretiminde artış izlenmektedir. Bu nedenle SOR düzeyinin düşürülmesi, apoptozisin engellemesinde ve geciktirilmesinde önemlidir. Bu yolda mitokondriyum membranında değişiklik ortaya çıktıktan sonra Bcl-2 ailesi uyarılır ve böylece sitokrom-C (Sit-C) salınımı gözlenir. Sit-C salımına cevap olarak ortaya çıkan apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1), apoptozom olarak bilinen büyük bir kompleks meydana getirir. Mitokondriyal yolağın temel mekanizması olan apoptozom sırasıyla CAS-9 ve CAS-3 aktivasyonunu sağlayarak apoptozisi gerçekleşmektedir (94).

Ekstrensek yolda, TNF-alfa, FasL ve Toll like reseptörü gibi ölüm reseptörleri yolu ile apoptozisin uyarısı başlatılır. CAS-8 aktivasyonu ile CAS-3 aktivasyonu gerçekleşir. Böylece ekstrensek yoldan apoptozisi uyarılır. Bunun yanında mitekodnriyal yolağın apoptozis yolunu da aktive eder. Apoptozisin iki yolağı da birlikte çalışmaktadır. CAS-3 her iki yolağın sonunda aktifleşip her iki yola katılmaktadır (94).

NİTRİK OKSİT

Asetilkolin damar endotelinden nitrik oksit (NO) salınımını aktifleyerek kan damarlarının gevşeme ve akımın artmasına yol açar (101-102). NO oldukça reaktif ve diatomiktir (103). Biyolojik membranlardan hızlı bir şekilde geçebilme özelliği vardır. Oksijen veya hava ile nitrojen formunda kolay bir şekilde birleşir, ultraviyole ışınlarıyla NO üretmek için ayrılır ve yüksek derecede O_2 atomu ile reaksiyona girebilmektedir. O_2 atomları da canlı organizma membranlarını irrite eden, zararlı bileşikler oluşturan hidrokarbonlar ile birleşerek bitki örtüsüne büyük ölçüde zarar vermektedir. NO seviyesi katalizden okside gaza geçerken önemli oranda azalmaktadır. Bu sebeple kendisini oluşturan O_2 ve nitrojene tekrar dönmektedir. NO bazı bakterilerde bir dakikalık enerji sağlar. Vücutta geniş bir fonksiyonel alanda habercilik yapmaktadır (104-106).

NO yüksek oranda toksiktir ve sitotoksik özelliği olduğu bildirilmiştir. İmmün hücrelerde mikropları ve tehlikeli hücreleri öldürmek için kullanılır. Hücrelerde toksik etki yapan bu maddenin hücrenin kendisi tarafından üretildiğini, dokularda NO tayini yapılmasıyla anlaşılmıştır (107). Ayrıca NO üreten hücre tipleri için açık bir bilgi bulunmamaktadır. Endotelde nötrofil ve monositler tarafından üretilmektedir. Endotel NO için tek bir kaynak olmamıştır. NO endotel yüzeyinde anti-trombotik etki gösterir (108). NOS aktitivitesi inhibisyonunun, mikrovasküler permiabiliteyi arttırması ile lökositlerin imigrasyonunu ve adhezyonunun seviyesini yükseltmektedir. Garg ve Hassid (109) damar düz kas hücresinin büyümesi ve gelişmesini baskılayara hücre proliferasyonunu NO'in düzenlediğini yaptıkları in vitro çalışmada bildirmişlerdir. İn vivo çalışmalar bu bulguları doğrulamaktadır. Damarın hasarlı bölgesindeki endotel NOS'u intimanın proliferatif yanıtını azaltmaktadır. Bu etkiler, olasılıkla, yüksek konsantrasyondaki NO'in düz kas hücresinde direk toksik etki göstermesine bağlıdır. Bunun sonucunda, endotel hücre proliferasyonunu hızlandıran, fibroblastik büyüme faktörü salınmaya başlamaktadır (104,106-107).

NO, potent bir vasodilatör olması yanında ayrıca sitotoksik etkili, immünomodülatör, nörotransmiter ve ayrıca doku hasarı oluşturmayan bir otakoid (opoid benzeri bir madde) madde olarak bildirilmiştir (104).

Nitrik Oksid Sentaz (NO)

NO, L-arjininden üç ayrı NOS enzimi sayesinde sentezlenir. NOS enzimi işlevsel yönden etkin ve dimerik şekilde bulunmaktadır. NOS monomerlerinin herbirinin N-terminal uç ve C-terminal uç olmak üzere iki uca sahiptir. Enzimlerin flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD) ve NADPH gibi kofaktörler için redüktaz bölgesinde bağlanma bölgeleri vardır. Oksijenaz bölgesinde hem ve tetrahidrobiopterin (BH4) kofaktöleri ile L-arjinin için bağlanma sahaları bulunmaktadır (110-113).

NO'in L-arjininden sentezlenmesi farklı iki reaksiyon ile sağlanmaktadır. İlki NOS monooksijenasyon-I ile L-arjinin NO sentezi için N-omega-hidroksil-L-arjinine dönüşmesidir. NADPH ve oksijene bu reaksiyonun gerçekleşmesi için ihtiyaç vardır. İkincisi NOS monooksijenasyon-II ile N-omega-hidroksil-L-arjinin bileşeni NO ve sitrüline oksidize edilmektedir. FAD ve FMN, kalmodulin ile BH4 bu süreçte kofaktör görevindedir (113-117).

NOS enzimleri üç tanedir. Birincisi nöronal NOS (nNOS veya NOS1), ikincisi endoteliyal NOS (eNOS veya NOS3) ve üçüncüsü indüklenebilir NOS (iNOS veya NOS2). (114,118).

Nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS)

nNOS ilk olarak granül hücre kültüründeki N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörüne etkisi ile glutamattan ayırt edildiği bildirlmiştir (119). Nöronal enzimin aktivitesi kalsiyum kalmoduline bağlıdır. Sitoplazmik bir enzim olan nNOS yapısal olarak zara tutunmasını sağlayan kimyasal grup içermemektedir 12.kromozomdan sentezlenen nNOS 26 ekzondan oluşmaktadır. NMDA veya glutamat ile uyarılan bazı nöronların enzim aktivitesi üç katına çıkmakta ve siklik guanizin monofosfat (cGMP) düzeyi artışı göstermektedir. Bu hücrelerde N-metil-L-arjinin (L-NMA) ve N-nitro-L-arjinin (L-NNA) ile NO ve cGMP sentezi inhibe edilmektedir (120). Merkezi sinir sisteminde koku sistemi, *cortex cerebri, diencephalon, truncus cerebri, cerebellum* ve *medulla spinalis*'te yer almaktadır. nNOS birçok fizyolojik olayda (uzun süreli potensiasyon, nöroproteksiyon, nöronal dejenerasyon, peptiderjik sekresyonun düzenlenmesi gibi) etkili olmaktadır. Ayrıca organizmanın üreme aşamalarında rol almaktadır (119). Bunun yanında nNOS iskelet kasında, *pancreas*'ın beta hücrelerinde, adrenal medullada, *testis, hypophysis*, böbrekte *macula densa* ve distal tübülde de görülmüştür (121).

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)

iNOS ilk olarak makrofaj ve karaciğer hücrelerinde görülmüştür. Başta makrofajlar olmak üzere polimorfonükleer lökositler, hepatositler, damar düz kasları, damar endoteli, astrosit ve kondrositler tarafından üretilmektedir. Enzim indüklendiğinde NO üretimi, yapısal formdaki gibi kısa sürmemektedir. Ayrıca non spesifik immünitede önemli etkiye sahiptir. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda rol oynadığı saptanmıştır. iNOS hücrenin genel yapısında bulunmamaktadır. Fakat hücrenin bakteriyel ürünler ve sitokinler ile teması ile birlikte, birçok hücre tipinde üretimi uyarılmaktadır. Bu uyarılmayı transkripsiyonel indüksiyon (enzimi sentezleten mRNA'nın artışı) sağlamaktadır (122-125).

Endotel kaynaklı nitrik oksit sentaz (eNOS)

Endotel hücrelerinin üretilmesiyle eş zamanlı NO üretimi başlamaktadır. Uyarıya ani cevap oluşması NO sentezini katalizleyen enzimin yapısal bir enzim olduğunu gösterir. Ayrıca uyarıya yanıt için yeni bir protein sentezine ihtiyaç olmadığını göstermektedir. NADPH ve kalsiyum kalmodüline kofaktör olarak ihtiyaç duyan eNOS, L- NMA ve L- NNA gibi arjinin analogları tarafından yarışımcı olarak inhibe edilmesi sağlanmaktadır. Uyarılarla

hücrede geçici olarak yükseltilen sitoplazmik kalsiyum, kalsiyum-kalmodülin kompleksi şeklinde eNOS'u aktive etmektedir. NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçip guanilat siklazı aktive ederek cGMP seviyesini arttırır, böylece düz kaslarda gevşeme meydana gelmektedir (120). eNOS'un kalmodulin bağımlılığı ile fonksiyon olarak nNOS'a benzemektedir(121). Ayrıca eNOS zarsal/zarla etkileşimde bulunan enzim özelliğindedir. eNOS 7. kromozomdan sentezlenir ve 26 ekzondan oluşmaktadır. Esas olarak vasküler epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Farklı dokularda gösterilse de, bu aktivitenin kaynağı dokulardaki vasküler endotel hücreleridir. . Böbrek tübülleri epitelyum hücrelerinde ve CA1 nöronlarında da bulunmaktadır (120).

Nitrik Oksitin Apoptotik Etkileri

NO, hücre tipine göre proapoptik veya antiapoptik etki göstermektedir. Endotel hücrelerde, hepatositlerde ve nöronlarda antiapoptotik etki; düz kas hücrelerinde ve tümör hücrelerinde proapoptotik etki meydana getirmektedir. Apoptotik etkisi çoğunlukla cGMP/protein kinaz G sisteminden bağımsız olarak oluşmaktadır.

NO, düz kas hücrelerinde iNOS indüksiyonu ile sentezlenir ve p53 tümör baskılayıcı proteinin sentezini arttırıp apoptozisin meydana gelmesini sağlar. Transkripsiyon sırasında ve sonrasında NO'nun bazı etkenleri apoptozisi baskılayabilmektedir (120). Apoptotik sinyal iletiminde kaspaz enzimleri anahtar proteindir. Kaspaz enzimleri TNF-α ile uyarı, Fas-reseptör aktivasyonu, büyüme faktörlerinin yokluğu nedeni ile aktive olmaktadırlar (126). NO'in proapoptik ya da antiapoptik etkisini ortamdaki NO derişimi belirlemektedir. eNOS tarafından sentezlenen NO antiapoptotik olarak etki etmektedir. NO sentezi yüksek derişimde iNOS enzimi tarafından sağlanır. Ayrıca aşırı uyarı ile NO, nNOS enzimi tarafından sağlanmaktadır. Bu nedenle NO, iNOS ve nNOS enzimleri ile sentezlendiğinde proapoptotik etki göstermektedir (120).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı (etik kurul karar no: 2019.03.01). Deney hayvanlarının temini Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Birimi'nden yapıldı. Hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (22±1 ºC ısı, %55 nem, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu) barındırıldı ve standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Hayvanlar deney ortamına adaptasyonları için 24 saat önceden laboratuvar ortamına getirildi.

Deney 1 kontrol ve 2 deney grubu olmak üzere 3 grup halinde yapıldı. Her grup 8 hayvan randomize seçilerek oluşturuldu.

Kontrol Grubu: 14 gün boyunca her gün intraperitoneal serum fizyolojik verildi.

FA Grubu: 14 gün boyunca her gün serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozunda intraperitoneal FA verildi.

BAI+FA Grubu: 14 gün boyunca her gün serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozunda intraperitoneal FA ve günlük intraperitoneal 200 mg/kg dozunda Baicalein (BLDpharm BD6298) verildi.

Deney süresinin sonunda tüm deneklerin 10 mg/kg Xylazin HCl ve 50 mg/kg Ketamin HCl anestezisi altında böbrek dokuları alınarak ötenazi uygulandı. Dokuların yarısı patolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer parçalar ise sıvı azota alınarak hızlıca donmaları sağlandıktan sonra mRNA izolasyonu yapılıncaya kadar -80°C' de saklandı.

Gen Ekspresyon Düzeylerinin Tayini

RNA İzolasyonu

Deneklerden elde dokulardan RNA izolasyonu, İnvitrogen by Thermo Fisher Scientific izolasyon kiti kullanılarak yapıldı. Bu yönteme göre yapılan izolasyon işleminde aşağıdaki takip sırası izlendi. Örneklerin içlerine daha iyi homojenize olmaları amacıyla 1 mm çapındaki ZrSiO boncuklar konuldu. Sonra sıvı azotta bekletilerek doku parçalayıcıdan geçirildi. Bunu takiben RNA'yı kolay izole edebilmek amacıyla örneklere protein denatürasyon işlemini hızlandıran % 1 merkaptoetanol ve liziz tamponu ilave edildi. Bu işlemi takiben hücre homojenatlarına suyun uzaklaştırılması amacıyla örnekle aynı hacimde %70 etanol konuldu. Boncukların uzaklaştırılması amacıyla 21380 G'de santrifüjlendi. Santrifügattan 700 µL dökelti kitte bulunan kolonlu tüplere alındı. Bu tüplerdeki örnekler 12000 g'de 15 saniye santrifüjlendi ve bunu takiben tüplerin filtre kısımları toplama tüplerine aktarıldı. Örneklere 700'er µL yıkama tamponu 1 kondu ve 12000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı ve kolonlu tüplerin filtre kısımları yeni tüplere alındı. Üzerlerine 500'er µL yıkama tamponu 2 ilave edildi ve 12000 g'de 15 saniye santrifüj yapıldı. Daha sonra tekrar 500'er µL yıkama tamponu 2 eklenerek 2 dk santrifüj yapıldı ve bunu takiben tüpler kapaklı tüplere alınarak RNase içermeyen su bileşiminin 50'şer µL'lik kısmı tüplere eklendi. 50 µL eklenmesinin sebebi yapılan çalışmalarda optimum hacim olarak belirlenmesidir. Karışım 2 dk inkübasyondan sonra 2 dk, 30 sn 12000 g'de santrifüjlendi. Filtre kısımları atılarak alt kısımları ölçüm için alındı. Elde edilen RNA örneklerinden 2 µL alınmış olup Nanodrop cihazı (NaNoQ OPTIZEN) üzerine pipetlendi ve 260-280 nm'de okunarak saflık ve absorbans değerleri belirlendi. Ölçülen saflık değerleri 1.8-2.0 aralığında ölçülmüş olup bu örneklerden c- DNA sentezi yapıldı.

Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, izole edilen RNA'lardan High-Capacity cDNA Reverse Transcription sentez kiti (Katalog No: 4368814) ile uygun protokol adımları yapılarak gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar, -20°C'de saklandı. PCR şartları Step 1: 25°C, 09:53 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlanarak cDNA sentezi yapıldı. cDNA sentez protokolü Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. cDNA sentez protokolü

Madde	Hacim
Total RNA	10
10 X RT tampon	2µL
25 X dNTP mix (100 mM)	0.8 µL
10 X RT Random Primer	2 µL
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1 µL
Nukleaz free su	4.2 µL
Son hacim	20 µL

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Aktif glutatyon (GSH), Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), P53, Sitokrom-C (Sit-c, Caspase-3 (Cas-3), Caspase-9 (Cas-9), iNOS ve eNOS ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Gen ekspresyon çalışmalarında "RNA izolasyonu" bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Yapmış olduğumuz çalışmada 384 kuyucuklu mikroplaka okuyabilen Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanıldı. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları Tablo 2'de belirtildi. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak GAPDH kullanıldı ve örnekler analiz edildi. Genlerin ekspresyon düzeylerini tayini SYBR Green yöntemi kullanılarak yapıldı. qRT-PCR karışımı; cDNA, SYBR Green ve ilgili genleri içermektedir. qRT-PCR reaksiyonu karışımının içeriği, 384 kuyucuklu plakanın her bir kuyusu için 6 µL SYBR Green Master Mix, 2 µL cDNA ve 2 µL RNaz free su ve 0,5 µL primer forward, 0,5 µL reverse'den ibarettir. PCR programı: 1 döngü 2 dk 50ºC ve 10 dk 95ºC, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95ºC 15 s) ve annelling ve uzatma (60ºC 'de 1 dk) ile çoğaltıldı.

Tablo 2. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları

Target gene	Forward Primer Sequence (5'- 3')	Reverse Primer Sequence (5'- 3')
SOD	AGCTGCACCACAGCAAGCAC	TCCACCACCCTTAGGGCTCA
CAT	TCCGGGATCTTTTTAACGCCATTG	TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC
GSH	ACTTGGCACTCCTCTCCTGA	AGGCACTAGAACCTGCTGGA
Sit-C	AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTTAC	TCATGATCTGAATTCTGGTGTATGAG
P53	CACAGTCGGATATGAGCATC	GTCGTCCAGATACTCAGCAT
CAS-3	AGTTGGACCCACCTTGTGAG	AGTCTGCAGCTCCTCCACAT
CAS-9	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	CAGGAACCGCTCTTCTTGTC
iNOS	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
eNOS	ACCAGCACCTTTGGCAATGGAG	GAGACGCTGTTGAATCGGACCT

Histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme

Doku örnekleri %10 formalin solüsyonunda 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldükten sonra artan oranda alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90,99.9) geçirildiler. Dokular, şeffaflaştırma amacıyla 2 değişim xylene ve parafinizasyon aşamasına maruz tutulduktan sonra parafin bloklar hazırlandı. Bloklarından alınan 4µ'luk kesitlerin deparafinizasyon işleminden sonra birer tanesine öncelikle genel doku histolojik incelenmesi için hematoksilen-eozin (H&E) boyası, diğerlerine immünohistokimyasal olarak iNOS (Thermo Invitrogen PA3-030A) ve eNOS (Thermo Invitrogen MA5-15559) boyaları uygulandı. immünohistokimya boyama için Ventana BenchMark Ultra IHC/ISH System platformu kullanıldı. Doku slaytları gece boyunca 37°C'de ve 2 saat süreyle 56°C'de inkübe edildi. Burada slaytlara 60 ºC'de 10'ar dakikalık ksilen serisi, %96, %80, %70 alkol serisi ve üç kez distile su serisi uygulandı. Antijen alımı için "Sitrat tamponu 10 X pH 8.0" (Kod: 15-M820, Lot. 50930) kullanıldı (95-100 C'de ısıtma ve oda sıcaklığında 20 dakika/soğutma 20 dakika). Fosfat tamponlu salin, %3 H_2O_2 ile endojen peroksit blokjı yapıldıktan 10 dakika sonra uygulandı. Slaytlar, iNOS ve eNOS antikorları ile oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra standart immünoperoksidaz boyama yöntemi adımları uygulandı. Kesitlerde boyanmalar değerlendirilirken patolog grup özelliklerini bilmeden tarafsız değerlendirme yaptı. Hazırlanan preparatlar Nikon Eclipse E600 model ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Kesitlerden Visia imaging programında görüntüler alınarak kaydedildi. Bütün H&E kesitler mikroskobun rastgele seçilen 10 büyük büyütme alanında

(x400) değerlendirildi. Doku kesitleri, nekrozun derecesini değerlendirmek için tasarlanmış önceden tanımlanmış bir yarı nicel skala ile 0 ile 4 arasında puanlandı: 0, normal doku; 1, minimal nekroz (<%5 tutulum); 2, hafif nekroz (%5–25 tutulum); 3, orta derecede nekroz (%25-75 tutulum); ve 4, şiddetli nekroz (>%75 tutulum). Böbrek dokusu tubul ve glomerül çapları ölçüldü. eNOS ve iNOS antikorlarının değerlendirilmesi için her bir olguda pozitif boyanan hücrelerin yaygınlığı ve yoğunluğu belirlendi. Boyanma yaygınlığı 0 (% 0-5), 1 (% 6-24), 2 (% 25-49), 3 (% 50-74) ve 4 (≥% 75) şeklinde derecelendirildi. Boyanma şiddeti 0 (negatif), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (güçlü) şeklinde derecelendirildi. Elde edilen iki derece çarpılarak 0 ile 300 arasında değişen immünreaktivite skoru belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler ortalama ± std olarak alındı. Verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Değişkenler normal dağılıma uyuyorsa tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Değişkenler arasındaki çoklu karşılaştırmalar için "Bonferoni post-hoc" testi yapıldı. Normal dağılıma uymayan değişkenler arasındaki çoklu karşılaştırmalar için Kruscal-Wallis testi uygulandı. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak seçildi.

BULGULAR

Toplam 24 adet 10-12 haftalık ve 200-250 gr ağırlığında Wistar albino erkek sıçanın kullanıldığı çalışmamızda elde ettiğimiz gen ekspresyon düzeyleri ile ilgili sonuçlar tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablo 3. Böbrek Dokusu Gen Ekspresyon Düzeyleri.

Parametreler	Kontrol	FA	BAI+FA
SOD	6,62±1,25	10,52±0,79*	137,75±4,75*ɣ
GSH	0,34±0,16	0,86±0,10*	3,59±0,43*ɣ
CAT	1,40±0,26	1,40±0,32	38,98±4,01*ɣ
P53	1,48±0,22	0,25±0,24*	7,11±0,46*ɣ
Sit-c	0,72±0,14	1,94±0,32*	10,81±1,08*ɣ
CAS-9	1,68±0,24	27,95±3,24*	131,80±4,82*ɣ
CAS-3	1,57±0,21	13,18±3,18*	146,29±32,59*ɣ
iNOS	1,38±0,48	68,12±4,05*	104,42±4,41*ɣ
eNOS	11,30±2,28	1,83±0,19*	8,17±0,57*ɣ

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Tüm gruplar için n: 8'dir.

*: Kontrol grubu karşılaştırma $p<0.05$; γ: FA ve BAI+FA grubu karşılaştırması, $p<0.05$

Yukarıdaki tabloda böbrek dokusu gen ekspresyon ölçümlerinde kontrol grubu ile FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda CAT düzeyi hariç tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar olduğu ($p<0,05$) görülmüştür. Kontrol grubu ile BAI+FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda tüm parametreler arasında istatiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. FA grubu ile BAI+FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda da tüm parametrelerde anlamlı düzeyde farklılıklar olduğu ($p<0,05$) görülmüştür. Tablo 3.

Araştırmamız sonucunda böbrek dokusu histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucu elde ettiğimiz veriler tablo 2 de gösterilmiştir.

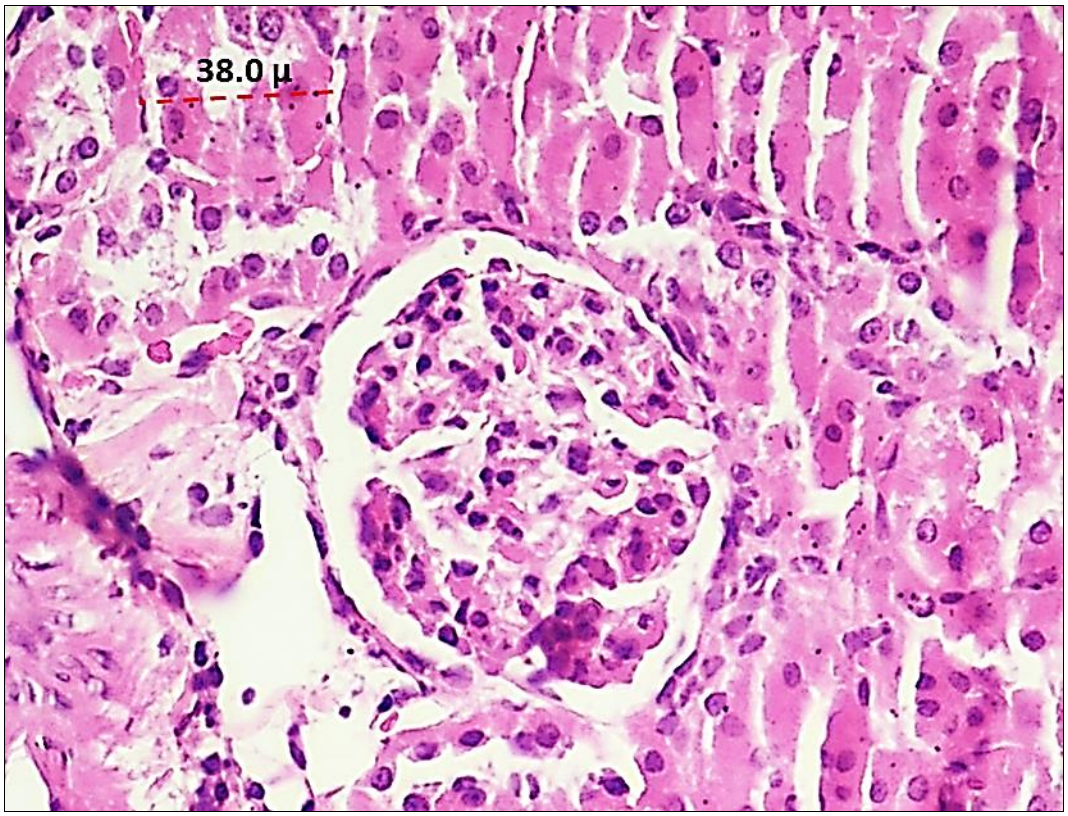
Tablo 4. Böbrek dokusu histopatoloji bulguları

Grup	Tubul çapı	Glomerül çapı	iNOS	eNOS	Hasar Skoru
Kontrol	41,00 ± 0,93	416,25 ± 4,43	111,25 ± 21,00	180,00 ± 15,12	0,13 ± 0,35
FA	48,50 ± 2,393*	398,13 ± 5,31*	226,25 ± 17,68*	106,25 ± 9,16*	2,63 ± 0,52*
BAI+FA	49,50 ± 1,42*	399,38 ± 4,17*	227,50 ± 16,69*	107,50 ± 10,35*	2,50 ± 0,52*

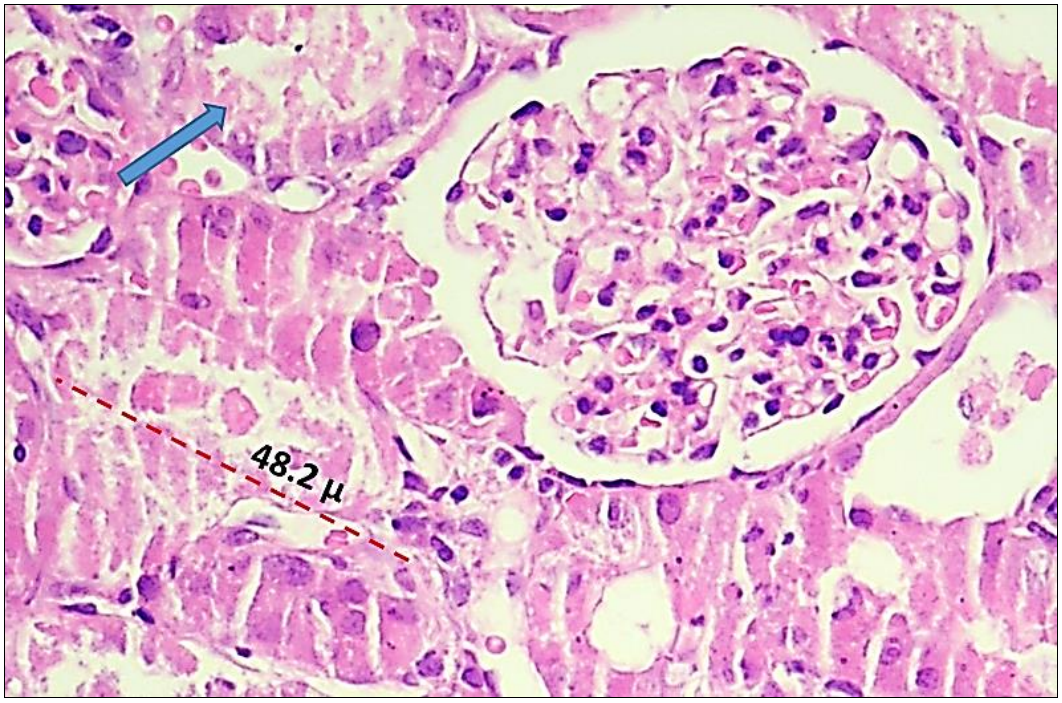
Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Tüm gruplar için n: 8'dir. *: Kontrol grubu karşılaştırma $p<0.05$

Yukarıdaki tabloda böbrek dokusu histopatolojik ölçümlerinde kontrol grubu ile FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda tüm ölçüm parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubu ile BAI+FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda da tüm parametreler de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar olduğu görülmüştür ($p<0,05$). FA grubu ile BAI+FA grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar olmadığı ($p>0,05$) ortaya konmuştur.

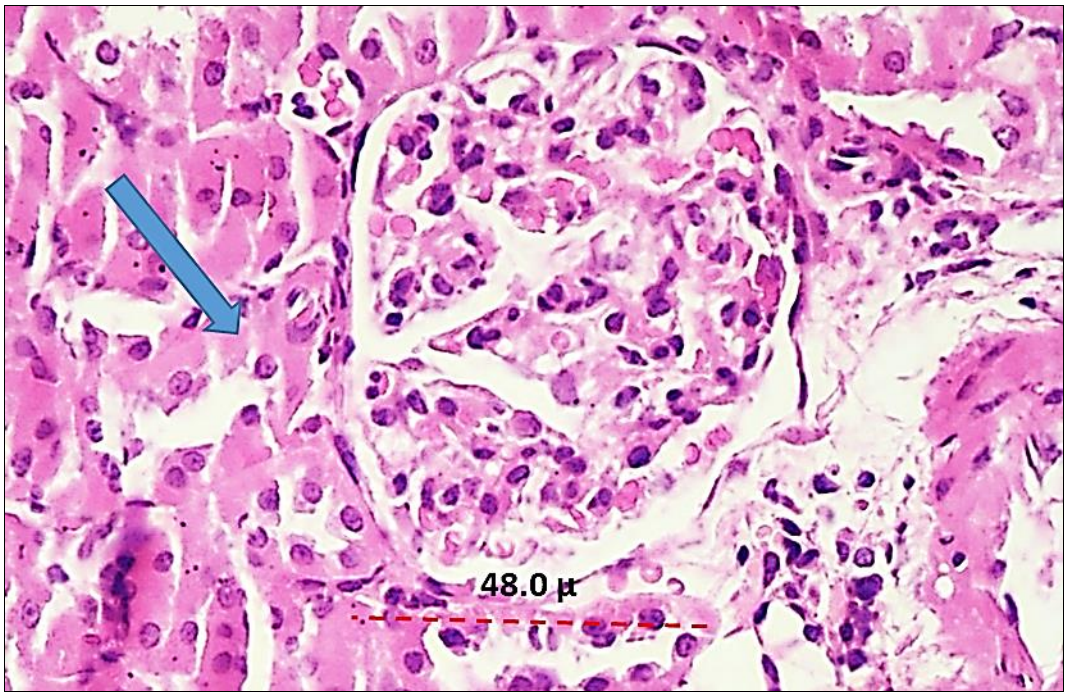
Böbrek dokuları ışık mikroskobu ile incelendiğinde kontrol dokusunda düzenli yapıda tubul ve glomerül izlendi FA grubu değerlendirildiğinde tubullerde belirgin dejenerasyon ve dilatasyon bulguları ve glomerül çaplarında azalma izlendi. BAI+FA grubunda FA grubu ile benzer özellikler saptandı. eNOS antikor değerlendirmesinde kontrol grubunda yaygın kuvvetli boyama izlenirken diğer iki grupta boyama düzeyleri azalmıştı. iNOS antikoru ile kontrol grubunda fokal hafif boyanma mevcutken, FA grubunda ve BAI+FA grubunda artmış derecede yaygın boyama mevcuttu.



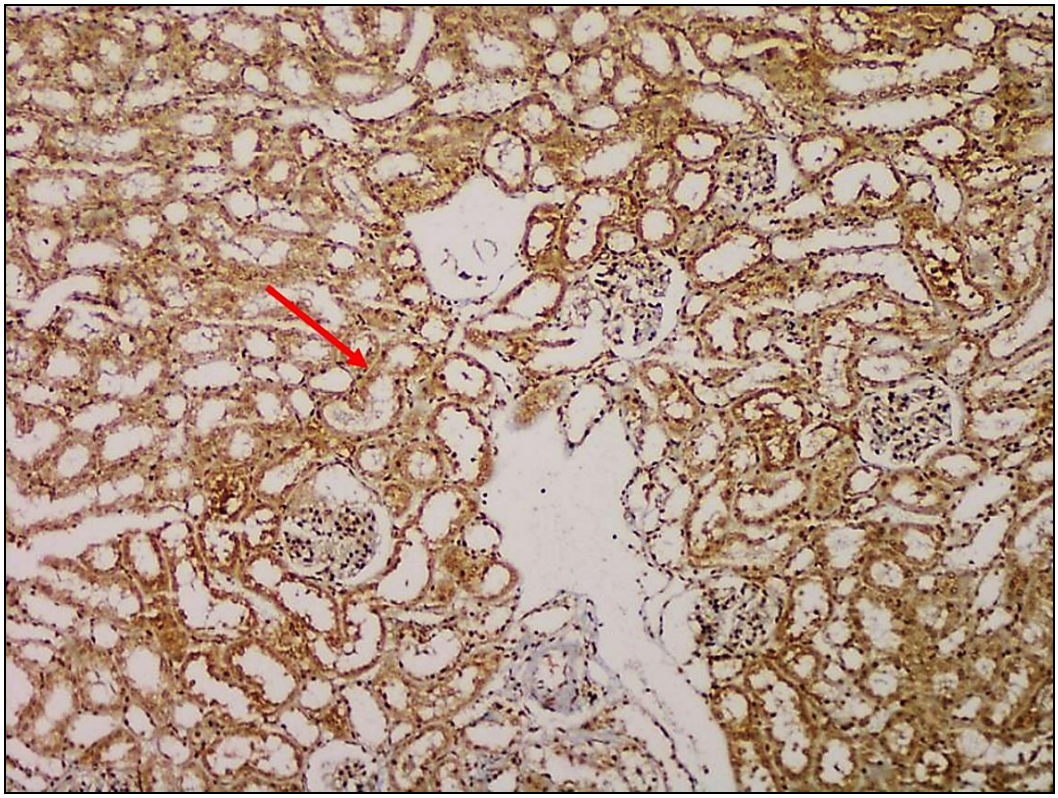
Şekil 3. Kontrol grubu ışık mikroskobu bulguları. Düzenli yapıda glomerül ve tubuller (H&E x400).



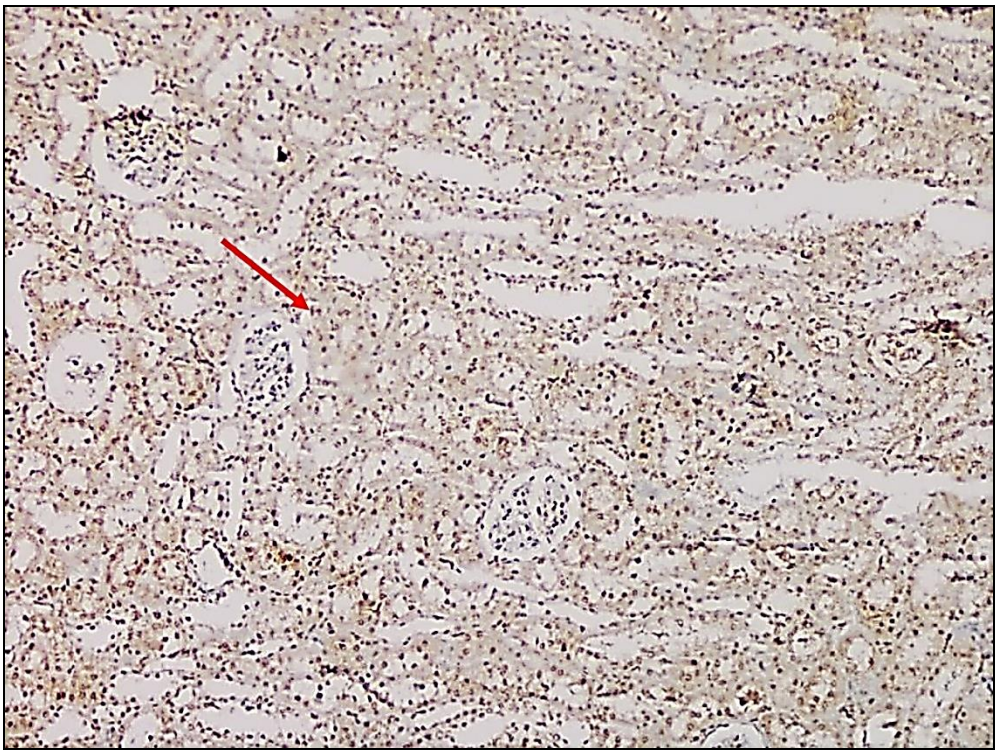
Şekil 4. FA grubu ışık mikroskobu bulguları. Tubuler dejenerasyon (ok) ve dilatasyon (yanı sıra glomerülde konjesyon mevcut (H&E x400).



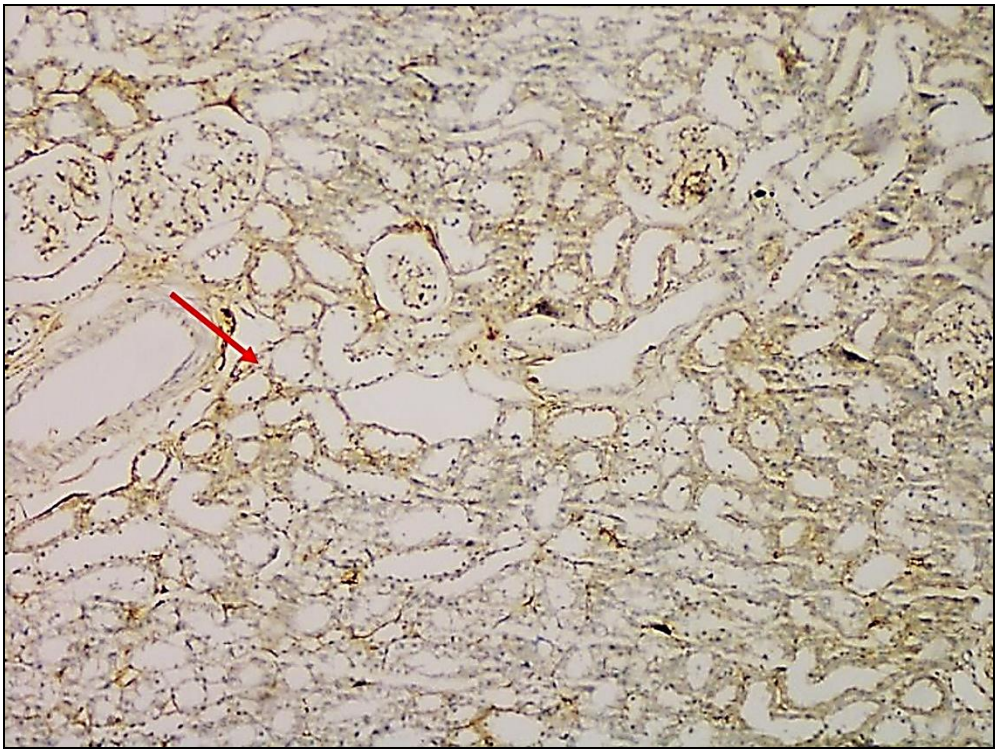
Şekil 5. BAI+FA grubu ışık mikroskobu bulguları. FA grubuna benzer şekilde tubuler dejenerasyon ve glomerüler konjesyon bulguları (H&E x400)



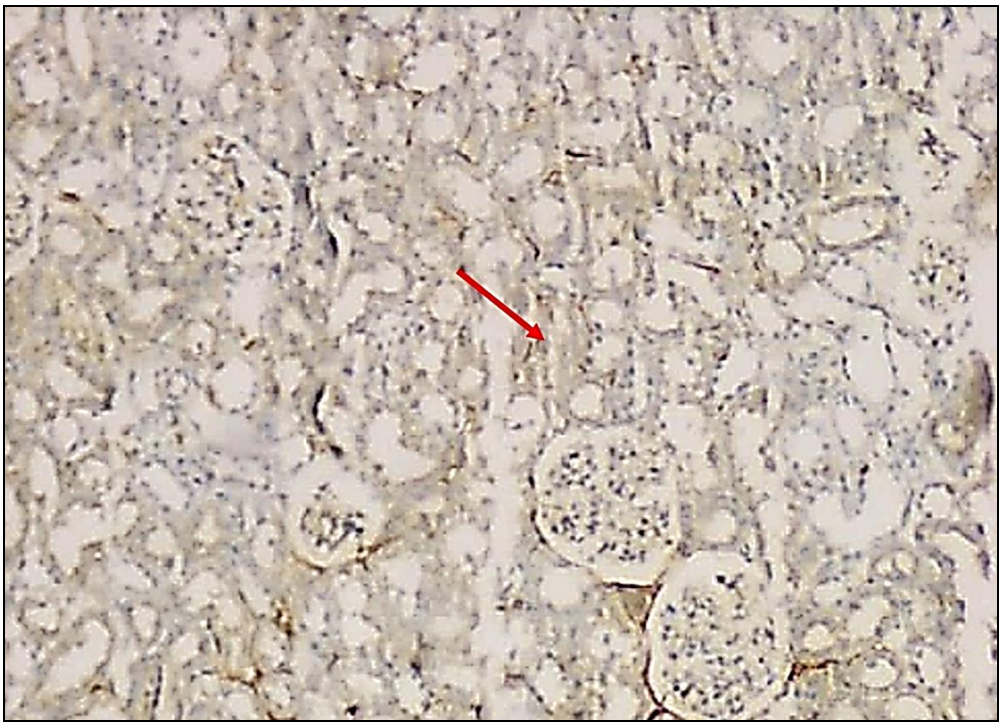
Şekil 6. Kontrol grubu eNOS immünohistokimya bulguları. Yaygın şiddetli boyanma (eNOS abx100).



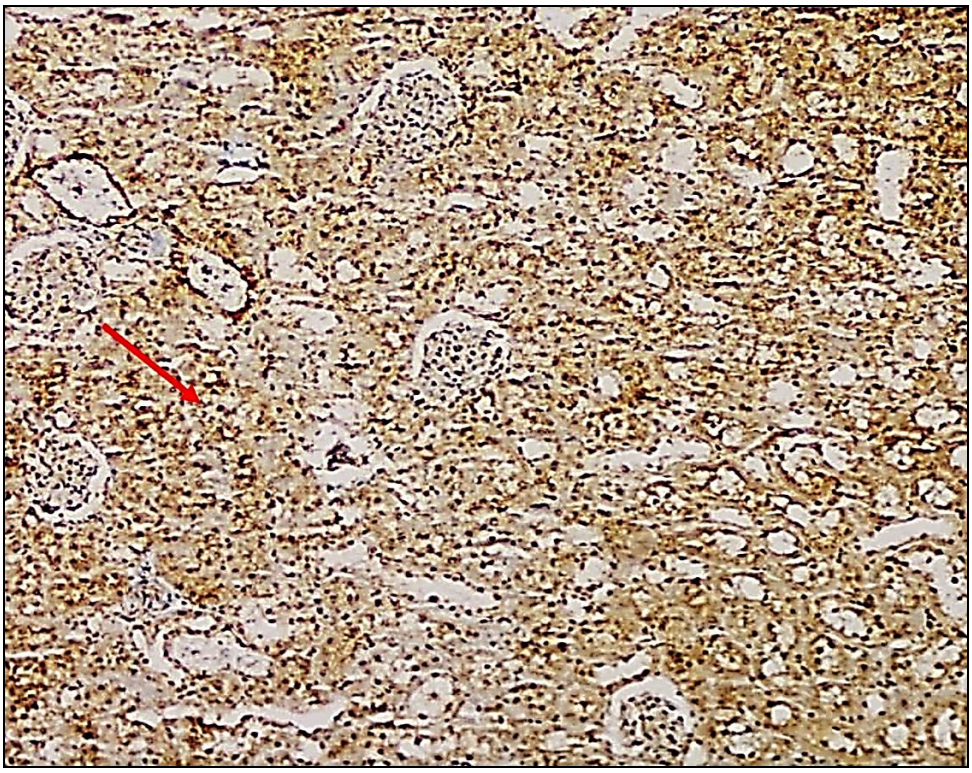
Şekil 7. FA grubu eNOS immünohistokimya bulguları. Hafif/orta dereceli boyanma (eNOs abx100).



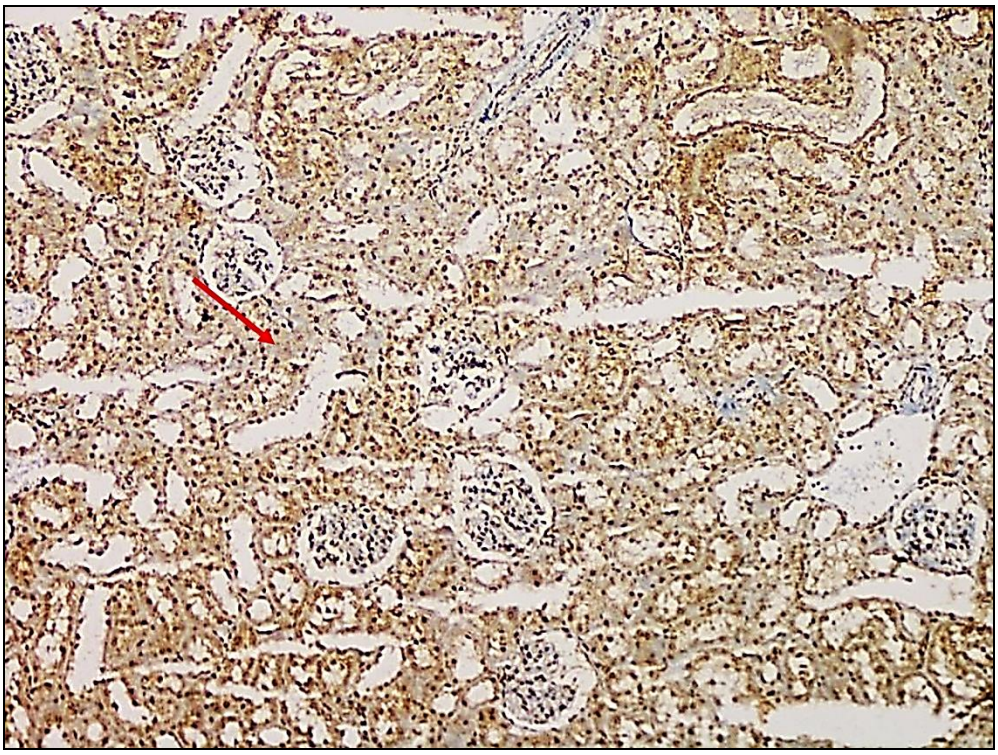
Şekil 8. BAI+FA grubu eNOS immünohistokimya bulguları. FA grubuna benzer şekilde hafif/orta dereceli boyanma (eNOs abx100).



Şekil 9. Kontrol grubu iNOS immünohistokimya bulguları. Hafif dereceli boyanma (iNOS abx100)



Şekil 10. FA grubu iNOS immünohistokimya bulguları. Yaygın, orta /şiddetli boyanma (iNOS abx100)



Şekil 11. BAI+FA grubu immünohistokimya bulguları. FA grubu ile benzer şekilde yaygın şiddetli boyanma (iNOS abx100).

TARTIŞMA

FA'nın toksik etkilerini aydınlatmak için hem deneysel hem klinik olarak birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda FA, protein, DNA, RNA ve doymamış yağ asitleri ile nonenzimatik yolla birleşerek toksik etkilerini ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Oluşturduğu bu toksik etkilerin ortadan kaldırılması veya önlemesi için çeşitli antioksidan maddelerin kullanıldığı çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. FA toksisitesine karşı bir antioksidan olan BAI'nin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bununla birlikte BAI'nin koruyucu etkileri ekspresyon düzeyinde in vitro çalışmalarla farklı hücre hatları üzerinde değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. (23,127-128).

Çalışmamızda FA grubunda böbrek dokusunda Bowman kapsülü parietal yaprağında endotel hasarı, proksimal ve distal tubüllerin apikal yüzeylerinde membran hasarı belirlenmiştir. Bunlara ilaveten böbrek tubül hücrelerinde hipertrofi, tubüllerde belirgin dejenerasyon, tubül çaplarında dilatasyon, glomerül çaplarında azalma, doku bütünlüğünde bozulma ve mononükleer hücre infiltrasyonu tespit edilmiştir. Golalipour ve ark. inhalasyon yolu ile uyguladıkları FA toksisitesinde böbrek dokusunda doz artışına bağlı olarak glomerül çaplarında azalma olduğu ifade etmişlerdir. Bu sonuç çalışmamızla uyumluluk göstermektedir (129). Ancak araştırıcılar 1,5 ppm FA maruziyetine bıraktıkları sıçanların böbrek dokularına ait tubül çaplarının kontrol grubu ile kıyaslandığında artmadığını belirtmişleridir. Oysa çalışmamızda tubül çaplarında FA toksisitesine bağlı olarak tubül çaplarında artış gözlenmiştir. İnhalasyon yolu ile böbrek dokusunda FA toksisitesi oluşturulan bir başka çalışmada bizim bulgumuz ile paralel olarak tubül çaplarında artış belirtilmiştir (130). İntraperitoneal olarak FA uygulanan diğer çalışmalarda, Bowman kapsülü parietal yaprağında endotel hasarı, tubüllerin apikal yüzeylerinde membran hasarı, doku bütünlüğünde bozulma,

tubül hücrelerinde hipertrofi, mononükleer hücre infiltrasyonu, tubüllerde belirgin dejenerasyon ile dilatasyon tespit edilmiştir (50,61-62,131-133). Bu bulgular çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Literatürde FA toksisitesi ile BAI arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma mevcut değildir. BAI'nin myoglobirunik akut böbrek hasarı üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada intraperitoneal 200 mg/kg BAI verilen grupta böbrek tubüllerinde kistik oluşumlar, nekroz ve doku kaybının gözlendiği ifade edilmiştir (134). Diğer bir araştırmada Tip-2 diabetik sıçanlarda BAI'nin böbrek dokusunda basal membran kalınlaşmasını azaltığı, artmış olan mesengial matriksi normal düzeye indirdiği ifade edilmiştir (135). Wu ve ark.'nın böbrek iskemi ve perfüzyonu üzerine BAI'nin etkilerini araştırdıkları çalışmada intravenöz olarak 30 mg/kg BAI verilen grupta tubüler epitel hücrelerinde kayıp, lümene dökülmeler, nekroz ve basal membran parçalanması olduğu bildirilmiştir (136). Araştırmamızda BAI+FA grubunda da FA grubunda gözlenen bulgulara benzer sonuçlar gözlenmiştir. Bu bulgularımız aynı doz ve uygulama biçimini kullanan Yalçınkaya Yavuz ve ark. ile uyumluluk göstermektedir. Ahad ve ark. Tip-2 diyabet oluşturulmuş sıçanlarda 20mg/kg BAI uygulamasının böbrek dokusunda koruyucu etkisi olduğunu ifade etmişlerdir (135).

Çalışmamızda kontrol grubu ile kıyaslandığında FA grubunda iNOS immünreaktivitesinde artış gözlenmiş olup BAI+FA grubunda FA grubuna göre herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. eNOS immünreaktivitesinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında hem FA hem de BAI+FA grubunda immun boyamada azalma tespit edilmiştir. Böbrek dokusunda BAI'nin FA toksistesine karşı immünreaktivite üzerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında FA'nın böbrek dokusunda hasara yol açtığı ve BAI'nin oluşan bu hasar üzerine morfolojik olarak iyileştirici etkisi olmadığı görülmüştür. FA toksisitesinde iNOS ve eNOS immünreaktivitesi üzerine BAI'nin etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Yalçınkaya ve ark.'nın BAI'nin böbrek dokusundaki koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada böbrek hasarına bağlı olarak iNOS immünreaktivitesinin arttığı ifade edilmiştir.

Çalışmamızda FA grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında SOD ve GSH ekspresyon düzeylerinin arttığı, CAT da ise bir artışın olmadığı belirlenmiştir. Bu durum oksitadif strese karşı SOD ve GSH üzerinden cevap verildiğini ortaya koymaktadır. BAI+FA grubunda ise tüm antioksidan enzimleri ekspresyon düzeylerine FA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu durum FA toksisitesine bağlı olarak enzim aktivitesinde bir artışın meydana gelmediği şeklinde yorumlanabilir. Bu sebepten

dolayı BAI+FA grubunda oksidatif strese karşı antioksidan enzimlerin ekspresyonunda artış söz konusu olmuştur. Ancak çalışmamızda enzim aktivite düzeylerine bakılmamış olması bu durumu açıkça ortaya koyamamaktadır. Bu durum çalışmamızın bir kısıtlılığıdır. Yapılan literatür taramasında FA toksisitesine karşı antioksidan enzimlerin ekspresyon düzeyleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ahad ve ark.nın çalışmalarında 50mg/kg BAI uygulanan grupta gerek SOD gerekse de CAT aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik tespit edilmiştir (135).

P53, DNA sentezi, onarımı, mRNA transkripsiyonu ve apoptoz süreçlerinde önemli fonksiyonlara sahiptir (137). Zhao ver ark.nın yaptığı çalışmada Hela hücrelerinde FA'nın, P53'ün önemli ölçüde ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (138). Çalışmamızda P53'ün FA toksisitesine bağlı olarak aşağı yönlü düzenlendiği ve böylece böbrek dokusunda tümör gelişimini destekleme ihtimalinin olduğu görülmektedir. FA grubunda P53 ekspresyon düzeyinin kontrol grubu ile kıyaslandığında düşmüş olması tümör baskılayıcı bir gen olan TP53 geninin oksidatif strese bağlı olarak hasar gördüğü ve bu nedenle P53 ekspresyon seviyesinin düştüğü biçiminde yorumlanmıştır. BAI+FA grubunda P53 ekspresyon düzeyinin kontrol ve FA grupları ile kıyaslandığında artmış olması, tümör gelişimi üzerine BAI'nin etkili olduğunu ve hasarlı hücre ölümünü tetiklediği şeklinde yorumlanmıştır.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında hem FA hem de BAI+FA gruplarında Sit-C, CAS9, CAS3 ekspresyon düzeylerinin arttığı görülmektedir. Mitokondri dış zarında meydana gelen hasar sonucu Sit-C sitoplazmaya salınmış olup, CAS-9'u aktive etmiş, buna bağlı olarak ta CAS-3 aktivasyonu gerçekleşmiştir. Işık bulgularımız FA toksistesine bağlı olarak tubüler epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde oluşan membranı hasarını kanıtlamaktadır. Hücre membranı ile benzerlik gösteren hücre içi organallerin membranlarında da hasarın ortaya çıkması olasıdır. FA toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stres sonucunda apoptotik sürecin iç mitokondriyal yolak üzerinden tetiklendiği düşünülmüştür. BAI uygulamasının hasarlı hücrelerde geri dönüşü sağlamadığı, hasarlı hücrelerin apoptoza yönelmesini arttırdığı düşünülmektedir.

Hücreler tarafından sentezi yapılan NO, endojen sinyal molekülüdür. NO'i sentezleyen nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi üyeleri, eNOS, nNOS ve iNOS'tur. Fizyolojik süreçler için eNOS ve nNOS ile üretilen NO'ya gereksinim vardır ancak, doku hasarı gibi durumlarda iNOS ile aşırı miktarlarda NO üretilir ve iNOS ile üretilen miktarlar zarar verici olabilmektedir. FA grubunda eNOS ekspresyon düzeyi düşmüştür. Bu durumun glomerular endotel hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu gerçekleşmiş olabileceği

düşünülmüştür. FA grubunda eNOS ekpresyonunun düşmüş olması hücrenin fizyolojik süreçlerinin sağlıklı işlemediğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. BAI uygulamasına bağlı olarak ekspresyonunun artması, endotel ve hücresel fizyolojik süreçler üzerinde iyileştirici bir etkisinin olduğu şeklinde yorumlanabilir. FA ve BAI+FA grubunda iNOS ekpresyon düzeyinin artmış olması FA toksisitesine bağlı olarak hücresel strese bir cevap olarak değerlendirilmiştir. BAI'nin iNOS ekpresyon düzeyini aşağı yönde baskılamadığı görülmüştür.

SONUÇLAR

Yapmış olduğumuz FA toksisitesinde BAI'nin gen ekpresyon düzeyinde etkilerinin araştırıldığı bu çalışmamız literatürdeki ilk çalışma olmaktadır.

FA toksistesinin antioksidan enzim ekpresyonları arttırdığı görülmüştür. BAI'nin oksidatif stresi azaltmak üzere antioksidan enzimlerin ekpresyon düzeylerini yukarı yönde düzenlediği belirlenmiştir.

FA toksistesinin P53 ekpresyonunu baskılayarak tümörogenezi tetiklediği, BAI'nin ise P53 ekpresyonunu arttırdığı ve tümörogeneze karşı koruyucu etkisinin olabileceği tespit edilmiştir.

FA'nın Sit-C, CAS-9, CAS-3 ekpresyonlarını arttırarak apoptoza neden olduğu ve BAI'nin hasarlı hücreleri apoptoza yönlendirdiği belirlenmiştir.

BAI'nin FA toksisitesine bağlı olarak gelişen endotel hasarı üzerine iyileşmeye neden olduğu ve bunun sonucu olarak eNOS ekpresyon düzeyini arttığı gözlenmiştir.

BAI'nin ekpresyon düzeyinde gözlemlenen etkileri morfolojik olarak hücresel düzeyde gözlenmemiştir. BAI uygulamasında süre artışına bağlı olarak morfolojik değişikliklerin ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

ÖZET

Bu çalışmada başlıca Formaldehit toksisitesinin önlenmesinde Baicaleinin etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Erkek sıçanlardan oluşan 3 gruba 14 gün süre ile intraperitoneal yoldan 10 mg/kg dozunda formaldehid, serum fizyolojik ve 10 mg/kg dozunda intraperitoneal formaldehid ve günlük intraperitoneal 200 mg/kg dozunda Baicalein verildi. Tüm denek gruplarına histolojik inceleme için böbrek dokuları alınarak ötenazi uygulandı. Böbrek dokusu gen ekspresyon ölçümlerinde Baicalein ve formaldehit verilen grup ile kontrol grubu ve formaldehit grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır. Histolojik kesitler incelendiğinde kontrol grubu ile formaldehit grubu arasındaki karşılaştırmalarda tüm ölçüm parametrelerinde istatiksel olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmiştir. Baicalein ve formaldehit verilen grup ile kontrol grubu arasında istatiksel olarak anlamlı seviyede farklılıklar saptanmıştır. Baicalein ve formaldehit verilen grup ile formaldehit verilen grup arasında istatiksel olarak anlamlı düzeyde farklılıklar olmadığı tespit edilmiştir. Baicalein ve formaldehit verilen grup ile formaldehit verilen grupta tubullerde belirgin dejenerasyon ve dilatasyon bulguları ve glomerül çaplarında azalma görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Anatomi, böbrek, toksisite

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF BAICALEIN ON KIDNEY DAMAGE INDUCED BY FORMALDEHYDE

SUMMARY

In this study, it is determined whether Baicalein is effective or not on Formaldehyde toxicity. 3 groups of rats which has both male members used in the study, first group received 10 mg/kg dose of formaldehyde via intraperitoneal for 14 days, second group received serum physiological for 14 days and the third group received 10 mg/kg dose of formaldehyde via intraperitoneal and 200 mg/kg baicalein daily. All three experiment groups' kidney tissues were taken and then the rats were euthanized. Significant statistical difference determined on gene expression evaluation between formaldehyde and baicalein group and other groups. When histological sections have been evaluated there has been significant statistical difference on all evaluation parameters between formaldehyde group and control group. Significant statistical difference between baicalein and formaldehyde group and control group has been confirmed. No significant statistical differences between baicalein and formaldehyde group and formaldehyde group has been detected. On both baicalein and formaldehyde group and formaldehyde group significant degeneration on tubules, dilatation evidence and reduction on glomerulus diameter has been detected.

Key words: Anatomy, kidney, toxicity

KAYNAKLAR

1. Cheney JE, Collins CH. Formaldehyde disinfection in laboratories: limitations and hazards. Br J Biomed Sci 1995; 52: 195-201.
2. Smith AE. Formaldehyde. Occup Med 1992; 42: 83-88.
3. Salthammer T, Mentese S, Marutzky R. Formaldehyde in the indoor environment. Chem Rev 2010; 110: 2536-2572.
4. Loew OU. Formaldehyde und dessen Condensation. Journal für praktische Chemie 1886; 33: 321–351.
5. Kaden DA, Mandin C, Nielsen GD Wolkoff P. Formaldehyde. In: World Health Organization. WHO Guidelines For Indoor Air Quality: Selected Pollutants. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe 2010; 103-156.
6. Formaldehyde Sampling of FEMA Temporary- Housing Trailers. Erişim: 18 Temmuz 2012 http://www.atsdr.cdc.gov/substances/formaldehyde/pdfs/revised_formaldehyde_report_1007.pdf
7. IARC: International Agency For Research On Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 88. Formaldehyde, 2- Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy–2-propanol. Erişim: 18 Temmuz 2012 http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/volume88.pdf.
8. WHO Regional Office for Europe. Formaldehyde. Denmark: WHO Regional Office for Europe, 2001
9. Collins, JJ., Ness, R., Tyl, RW., Krivanek, N., Esmen, NA., Hall, TA. (2001). A review of adverse pregnancy outcomes and formaldehyde exposure in human and animal studies. Regul Toxicol Pharmacol, 34, 17-34.

10. Formaldehyde. Ten Carcinogenes in Toronto. Erişim: 20 Ağustos 2012 http://www.toronto.ca/health/pdf/cr_appendix_b_formaldehyde.pdf
11. Formaldehyde. Chronic Toxicity Summary. Erişim: 20 Ağustos 2012 http://www.oehha.ca.gov/air/chronic_rels/pdf/50000.pdf
12. Broder, I., Corey, P., Brasher, P., Lipa, M., Cole, P. (1991). Formaldehyde exposure and health status in households. Environ Health Perspect, 95, 101– 104.
13. De Groot AC, Veenstra M. Formaldehyde-releasers in cosmetics in the USA and in Europe. Contact Dermatitis 2010; 62: 221-224.
14. Duong A, Steinmaus C, McHale CM, Vaughan CP, Zhang L. Reproductive and developmental toxicity of formaldehyde: a systematic review. Mutat Res 2011; 728: 118-138.
15. Irmak Sapmaz H. Solunan Formaldehitin Sıçanlarda Humoral İmmünite Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Elazığ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı 2010.
16. Shimizu K, Sugita M, Yokote R, et al. Intestinal edema caused by ingested formalin. Chudoku Kenkyu. 2003; 16: 447-451.
17. Roldán J, Frauca C, Dueñas A. Alcohol intoxication. Anales Sist Sanit Navar 2003; 26: 129- 139.
18. Ertuğrul T, Çiftci G, Tütüncü Ş. Formaldehite maruz kalmış ratlarda böbrek dokusunda mast hücrelerinin dağılımı ve heterojenitesi. Vet Hekim Der Derg 2017; 88: 26-37.
19. Mu, J., Liu, T., Jiang, L., Wu, X., Cao, Y., Li, M., Dong, Q., Liu, Y., Xu, H. 2016. The Traditional Chinese Medicine Baicalein Potently Inhibits Gastric Cancer Cells. Journal of Cancer, 7(4): 453-461.
20. Luo, J., Kong, JL., Dong, BY., Huang, H., Wang, K., Wu, LH., Hou, CC., Liang, Y., Li, B., Chen, YQ. 2016. Baicalein attenuates the quorum sensingcontrolled virulence factors of Pseudomonas aeruginosa and relieves the inflammatory response in P.aeruginosa-infected macrophages by downregulating the MAPK and NFκB signal-transduction pathways. Drug Des Devel Ther., 10: 183-203.
21. Zhao, Q., Chen, XY., Martin, C. 2016. Scutellaria baicalensis, the golden herb from the garden of Chinese medicinal plants. Sci Bull (Beijing)., 61(18): 1391-1398.
22. Sithisarn, P., Nantateerapong, P., Rojsanga, P., Sithisarn, P. 2016. Screening for Antibacterial and Antioxidant Activities and Phytochemical Analysis of Oroxylum indicum Fruit Extracts. Molecules, 21(4): 446.

23. Li, J., Ma, J., Wang, KS., Mi, C., Wang, Z., Piao, LX., Xu, GH., Li, X., Lee, JJ., Jin, X. 2016. Baicalein inhibits TNF-α-induced NF-κB activation and expression of NF-κB-regulated target gene products. Oncol Rep., 36(5): 2771-2776.
24. Chen, K., Zhang, S., Ji, Y., Li, J., An, P., Ren, H., Liang, R., Yang, J., Li, Z. 2013. Baicalein Inhibits The Invasion And Metastatic Capabilities Of Hepatocellular Carcinoma Cells Via Down-Regulation of The ERK Pathway. PLoS One., 8(9): e72927.
25. Ye, F., Wang, H., Zhang, L., Zou, Y., Han, H., Huang, J. 2015. Baicalein Induces Human Osteosarcoma Cell Line MG-63 Apoptosis Via ROS-Induced BNIP3 Expression. Tumor Biology, 36: 4731-4740.
26. Gong, WY., Wu, JF., Liu, BJ., Zhang, HY., Cao, YX., Sun, J., Lv, YB., Wu, X., Dong, JC. 2014. Flavonoid Components in Scutellaria baicalensis Inhibit Nicotine-Induced Proliferation, Metastasis and Lung Cancer-Associated Inflammation in vitro. International Journal of Oncology, 44: 1561-1570.
27. Gao, Y., Snyder, S., A., Smith, J., N., and Chen, Y., C., 2016, Anticancer properties of Baicalein: A review, Medicinal Chemistry Research, 25(8): 1515– 1523p.
28. Erdogan H. Böbrek Iskemi-Reperfüzyon Hasarında Endotelin-A Reseptör Antagonisti BQ-123'ün Nitrik Oksit Üretimiyle İlişkili Koruyucu Etkisi. Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2003.
29. Guyton A. Böbrekler ve Vücut Sıvıları, Fizyoloji, Ed. A Kazancıgil, Güven Kitabevi Yayınları. 1978; 1: 349-50.
30. Eşrefoğlu, M. Genel Histoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2016
31. Hall, J.E. Guyton Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi, 2017
32. Muijsers Rb, Folkerts G, Henrick PA, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp FP. Peroxynitrite: a two faced metabolite of nitric oxide. Life Sci 1997;60:1833-45.
33. Boulanger C, Luscher TF, Release of endothelin from porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. J Clin Invest 1990;85-587-90.
34. Tisher C. Structure and Function of Kidneys: Cecil Textbook of Medicine. Yirmibirinci baskı. Goldman L, Bennet JC (ed). WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 2000, S. 532-539.
35. Ovale, W. K., Nahirney, C. P., Netter Temel Histoloji (Eds. S. Müftüoğlu, F. Kaymaz, P. Atilla,) Günes Tıp Kitabevleri. Ankara, 2009; s.353-372
36. Gray, H., Carter, H. V., 2008. Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40. Baskı.[Edinburgh]: Churchill Livingstone/Elsevier. 1551s

37. Ross, M.H., Pawlina, W. Histoloji Konu anlatımı ve Atlas. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2013
38. Gartner, L.P., Hiatt, J.L. Hücre Biyolojisi ve Histoloji. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi, 2016
39. Kierszenbaum, A.L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2020
40. Eroschenko, V.P. DiFiore Histoloji Atlası. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2013
41. Deetjen, P., 1989. The Function of the Kidneys. Içinde: Human Physiology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelb202erg; [kaynak 10 Ocak 2018]. s. 735–62. Available at: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-73831- 9_30
42. Hall, E. J., Guyton, C. A., 2011. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology - John Edward Hall, Arthur C. Guyton - Google Livres [Internet]. Elsevier, 1091s.Availableat:https://books.google.dj/books/about/Guyton_and_Hall_Te xtbook_of_Medical_Phys.html?id=di5PtQAACAAJ&redir_esc=y
43. Netter, F. H., 2006. Atlas of human anatomy. C. 97, Exp Neurol. 365-374 s.
44. Eaton, D. C., Pooler, J., Vander, A. J.,2009. Vander's renal physiology. Mc GrawHill Medical; 222 s.
45. Shirley, D. G., Unwin, R. J., 2010. Renal Physiology. Içinde: Comprehensive Clinical Nephrology.s. 15–28.
46. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Formaldehyde. Atlanta, 1999; 188-269
47. Formaldehyde Council Report. Air toxics, formaldehyde and risk characterization. http://www.formaldehyde.org 01.09.2017.
48. Feron VJ, Til HP, Vrijer F, Woutersen RA, Cassee FR, Bladeren PJ. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. Mutat Res. 1991; 259: 363-385.
49. The Perspective. http://www.theperspective.org/formaldehyde.html 01.09.2017.
50. İnci M, Zararsız İ, Davarcı M, Görür S: Toxic effects of formaldehyde on the urinary system. Türk Journal Urol. 2013; 39(1): 48-52.
51. Speit G, Linsenmeyer R, Duong G, Bausinger J. Investigations on potential comutagenic effects of formaldehyde. Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen 2014; 760: 48-56.
52. Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? J Neurochem 2013; 127: 7-21.

53. Golden, R. (2011). Identifying an indoor air exposure limit for formaldehyde considering both irritation and cancer hazards. Critical Reviews in Toxicology, 41(8), 672–721. Erişim : 26 Ağustos 2012. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3175005
54. Arts, J.H.E., Rennen, M.A.J., de Heer, C. (2006). Inhaled formaldehyde: Evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. Regulatory Toxicology and Farmacology, 44(2),144-160.Erişim: 26 Ağustos 2012. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230005002072
55. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Formaldehyde, Division of Toxicology and Environmental Medicine, 2008
56. IARC: International Agency For Research On Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 88. Formaldehyde, 2- Butoxyethanol and and 1-tert-Butoxy–2-propanol,Erişim: 25 Ağustos 2012. http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol88/volume88.pdf
57. Maronpot RR, Miller RA, Clarke WJ, et al. Toxicity of formaldehyde vapor in B6C3F1 mice exposed for 13 weeks. Toxicology 1986; 41: 253-266.
58. Canbilen, A., Sezen, Ş. , Avunduk, M.C. ,Çon, N.E.(1999). Formaldehit ve toksik etkileri. Genel Tıp Dergisi, 9(1), 33- 39.
59. Restani, P., Galli, C.L. (1991). Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. Crit Rev Toxicol, 21, 315-328. Erişim: 27 Ağustos 2012. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1741947
60. Ünsaldı, E. , Çiftçi, M.K. (2010). Formaldehit, kullanım alanları, risk grubu, zararlı etkileri ve koruyucu önlemler. YYÜ, Veteriner Fakültesi Dergisi, 21(1), 71- 75.
61. Zararsiz I, Sarsilmaz M, Tas U, et al. Protective effect of melatonin against formaldehydeinduced kidney damage in rats. Toxicol Ind Health 2007; 23: 573-579.
62. Zararsiz I, Sonmez MF, Yilmaz HR, et al. Effects of ω-3 essential fatty acids against formaldehyde-ınduced nephropathy in rats. Toxicol Ind Health 2006; 22: 223-229.
63. Abdelmonem Awad, H., et al., 2017. Effect of Formaldehyde on Rat Testis Structure. *Acad. Anat. Int.*, 3 (2), 15-23.
64. Boj JR, Marco I, Cortés O, Canalda C. The acute nephrotoxicity of systemically administered formaldehyde in rats. Eur J Paediatr Dent 2003; 4: 16-20
65. Chen C, Cai C, Lin H, Zhang W, Peng Y, Wu K. Baicalein protects renal tubular epithelial cells againsthypoxia-reoxygenation injury. Renal Failure. 2018;40(1):603-610.
66. Park JT. Postoperative acute kidney injury. Korean Journal of Anesthesiology. 2017;70(3):258.

67. Xing, J., Chen, X., and Zhong, D., 2005, Absorption and enterohepatic circulation of baicalin in rats, Life Sciences, 78(2): 140–146.
68. Li-Weber, M., New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Cancer treatment reviews, 2009. 35(1): p. 57-68.
69. Bruno M, Piozzi F, Rosselli S. Natural and hemisynthetic neoclerodane diterpenoids from scutellaria and their antifeedant activity. Natural Product Reports. 2002;19(3):357-378.
70. Gong, WY., Wu, JF., Liu, BJ., Zhang, HY., Cao, YX., Sun, J., Lv, YB., Wu, X., Dong, JC. 2014. Flavonoid Components in Scutellaria baicalensis Inhibit Nicotine-Induced Proliferation, Metastasis and Lung Cancer-Associated Inflammation in vitro. International Journal of Oncology, 44: 1561-1570.
71. Grandemange, S., Herzig, S. & Martinou, J. C. (2009). Mitochondrial dynamics and cancer. In Seminars in Cancer Biology (Vol. 19, Issue 1). doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.12.001
72. Nunnari, J. & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. In Cell (Vol. 148, Issue 6).doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035
73. Friedman, J. R. & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. In Nature (Vol. 505, Issue 7483). doi.org/10.1038/nature12985
74. Martinou, J. C. & Youle, R. J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? Cell Death and Differentiation, 13(8). doi.org/10.1038/sj.cdd.4401985
75. Zhang, C. S. & Lin, S. C. (2016). AMPK promotes autophagy by facilitating mitochondrial fission. In Cell Metabolism (Vol. 23, Issue 3). doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.017
76. Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 55(3). doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178
77. Budihardjo, I.., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. In Annual Review of Cell and Developmental Biology (Vol. 15).doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269
78. Ola, M. S., Nawaz, M. & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. In Molecular and Cellular Biochemistry (Vol. 351, Issues 1–2). doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x

79. Zhang Y.., Hu, H. & Jin, W. (2013). Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. Food Chem Toxicol. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.019.
80. Schwartz, G. K. & Shah, M. A. (2005). Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. Journal of Clinical Oncology, 23(36). doi.org/10.1200/JCO.2005.01.5594
81. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxigen species in the nervous system. Cell Mol Life Sci 2000; 57:1287-1305.
82. Gutteridge JMC, Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Ed, Oxford: Clarendon Press 1991; 1-276.
83. Gilbert, Colton CA. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Inter disciplinary Approach. Kluwer Academıc Publishers, 2002.
84. Boyunaga H, Çeik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. Bilim Teknik Dergisi 1996; 347:98-100.
85. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. Am J Med 1991; 91:31-38.
86. Floyd RA. DNA damage and repair in Oxidative Damage and Repair. Davies KJA. Ed. Pergamon Press 1992; 175-180.
87. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergül A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. Cardiovasc Diabetol 2005; 29;4(1):5.
88. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYU Vet Fak Derg. 2004: 15(1-2); 91-96
89. Valko M, Rhodes CJ, Mancol J, Izakovic M., Mazur M,. Free radicals,metals and antioxidants in oxidative stres-induced canser. Chemico-Biological Interactions. 2006: 160;1-40
90. Valko M, Leibfritz D, Mancol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry&Cell Biology. 2007: 39; 44-84
91. Diplock A.T, Charleux J.-L, Crozier-Willi G, Kok F. J, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W. and Vina-Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. British Journal of Nutrition. 1998: 80(Suppl 1); 77-112
92. Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Açikgöz F. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolizm in rats: the protective effect of vitamin E. Toxicology 2004: 202; 227-235

93. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil esterin etkinliğinin araştırılması. Doktora tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi 2007.
94. Chidlow G, Wood JPM, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. Drugs 2007; 67(5): 725-759.
95. Sungurluoğlu A, Erdemli EA, Tekelioğlu M. Programlanmış hücre ölümü: Apopitozis. T Klin Tıp Bilimleri 1996;16:333-337.
96. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apopitozisin önemi. Toraks Dergisi 2001;2(1):91-95.
97. Ayaşlıoğlu E. Apopitoz. T Klin J Med Sci 2001;21:57-62.
98. Güçer Ş, Tınaztepe K. Böbrek hastalıklarında apopitozisin rolü. Hacettepe Tıp Dergisi 2001;32(2):160-168.
99. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. Br J Cancer 1972;26:239-257.
100. Mene P, Amore A. Apoptosis: potential role in renal diseases. Nephrol Dial Transplant 1998;13: 1936-43.
101. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987; 327: 524- 26.
102. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chadhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 9265-69.
103. Bhagavan NV. Metabolism and Synthesis of Nitric Oxide. Medical biochemistry, (4nd ed), chapter 17 pp: 345.
104. Sezen, K. Nitrik oksid'in patolojik olaylardaki rolü. Ege Üniversitesi Basımevi. 1996; Bornova –İzmir
105. Halliwell, B. Free Radicals in Brain Metabolizm abd Pathology, Br Med Bull. 1993; 49(3), 577-587
106. Akkuş, I. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza Yayınları: 38, Sağlık dizisi: 5 KONYA (1995)
107. Guyton, A. C., Hall, J. H. Medical Physiology. 9th edition. October 1996.
108. Mendelson, M.E., O'Neil, S., George, D., Loscalzo, J: Inhibition of fibrinojen binding to human platelets by S-nitro-N-acetylsisteie. J Biol Chem. 1990; 265: 19028-19034.
109. Garg, U.C., Hassid, A: Nitric oxid generation vasodilators and 8-bromocyclic guanosin monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation cultured rat smooth muscle cells. J Clin Invest. 1989; 83: 1374-1377

110. Janssens SP, shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-rerived relaxing factor / nitric oxide synthase. J Biol Chem 1992; 267: 14519-22.
111. Lowenstein CJ, Glatt Cs, Bredt DS, Synder SH. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6711-15.
112. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 11419-23.
113. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibiton. Biochem J 2001; 357: 593-615.
114. Bredt DS, Synder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulinrequiring enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 682-85
115. Mayer B, Schmid M, Klatt P, Schmidt K. Reversible inactivation of endothelial nitric oxide synthase by NG-nitro-L-arginine. FEBS Lett 1993; 333(1-2): 203-6.
116. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Synder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature 1991; 351: 714-18.
117. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: An FAD- and FMN-containing flavoprotein. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7773-77.
118. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10769-72.
119. Panzica GC, Viglietti-Panzica C, Sica M, Gotti S, Martini M, Pinos H, Carrilo B and Collado P. Effects of gonadal hormones on central nitric oxide producing systems. J Neeurosci, 2006; 138: 987-995.
120. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.
121. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. Animal Reprod Sci, 2001; 65: 1-16.
122. Lowenstein C, Dinerman L, Synder S. Nitric Oxide: A physiologic messenger. Ann Intern Med 1994 ; 120 : 227-237.

123. Moncada S, Palmer M.J, Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991 ; 43 : 109-119.

124. Arto K, Avela K, Ranta V, Viinikka L. The calcium-dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cells in preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 1996 ; 174 : 1056-1060.

125. Tomasian D, Keaney J.F, Vita J.A. Antioxidants and the bioactivity of endotheliumderived nitric oxide. Cardiovas Res 2000 ; 47 : 426-435.

126. Eşsizoğlu A. Yıldırım EA. Nitrik oxide in the psychobiology of mental disorders. Dicle Tıp Derg,2009; 36(1): 67-74.

127. Chen, Y. C., et al., 2006. Baicalein inhibition of oxidative-stress-induced apoptosis via modulation of ERKs activation and induction of HO-1 gene expression in rat glioma cells C6. *Toxicol Appl Pharmacol*, 216 (2), 263-273.

128. Lin, H. Y., et al., 2007. Baicalein inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis via ROS-dependent heme oxygenase 1 gene expression. *Biochim Biophys Acta*, 1773 (7), 1073-1086.

129. Golalipour, M. J., et al., 2009. Can Formaldehyde Exposure Induce Histopathologic and Morphometric Changes on Rat Kidney? *Int. J. Morphol.*, 27, 1195-1200.

130. Ramos, C. O., et al., 2017. The exposure to formaldehyde causes renal dysfunction, inflammation and redox imbalance in rats. *Exp Toxicol Pathol*, 69 (6), 367-372.

131. Abdulqader, S. Z., and I. A. Mustafa, 2014. The Protective Role of Vitamin C against Formaldehyde induced- hepatotoxicity and nephrotoxicity in Male Rats. *IOSR J. Pharm.*, 9, 21-26.

132. Bakar, E., et al., 2015. Protective effects of proanthocyanidin and vitamin E against toxic effects of formaldehyde in kidney tissue. *Biotechnic and Histochemistry*, 90 (1), 69-78.

133. Sener, U., et al., 2021. Protective Effects of Curcumin against Formaldehyde-Induced Renal Toxicity in Rats. *West Indian Med. J.*, 69 (5), 338-343.

134. Yalcinkaya Yavuz, O., et al., 2018. The Effects of Baicalin on Myoglobinuric Acute Renal Failure in Rats. *Balkan Med. J.*, 35 (1), 68-76.

135. Ahad, A., et al., 2014. Prophylactic effect of baicalein against renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Biochimie,* 106, 101-110.

136. Wu, K. F., et al., 2015. Protective effect of baicalein on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. *Ren. Fail.* , 37 (2), 285-291.

137. Harris, C. C., 1996. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17 (6), 1187-1198.
138. Zhao, Y., et al., 2016. Formaldehyde-induced paxillin-tyrosine phosphorylation and paxillin and P53 downexpression in Hela cells. *Toxicol. Mech. Methods*, 26 (2), 75-81.

ŞEKİLLER LİSTESİ

TABLOLAR

Tablo 1. cDNA sentez protokolü 18
Tablo 2. qRT-PCR' da kullanılan genler ve sekansları 19
Tablo 3. Böbrek Dokusu Gen Ekspresyon Düzeyleri 21
Tablo 4. Böbrek dokusu histopatoloji bulguları 22

ŞEKİLLER

Şekil 1. Embriyolojik Gelişim Sonrası Böbreğin Son Hali 4
Şekil 2. Baicalein ve Formülü 8
Şekil 3. Kontrol grubu ışık mikroskobu bulguları. Düzenli Yapıda
glomerül ve tubuller(H&Ex400) 23
Şekil 4. FA grubu ışık mikroskobu bulguları. Tubuler dejenerasyon (ok)
ve dilatasyon (yanı sıra glomerülde konjesyon mevcut (H&E x400) 23
Şekil 5. BAI+FA grubu ışık mikroskobu bulguları. FA grubuna benzer
şekilde tubuler dejenerasyon ve glomerüler konjesyon bulguları (H&E x400) 24
Şekil 6. Kontrol grubu eNOS immünohistokimya bulguları.
Yaygın şiddetli boyanma(eNOSabx100 24
Şekil 7. FA grubu eNOS immünohistokimya bulguları.
Hafif/orta dereceli boyanma(eNOsabx100 25
Şekil 8. BAI+FA grubu eNOS immünohistokimya bulguları. FA grubuna

benzer şekilde hafif/orta dereceli boyanma (eNOs abx100) 25
Şekil 9. Kontrol grubu iNOS immünohistokimya bulguları. Hafif dereceli
boyanma(iNOS abx100) 26
Şekil 10. FA grubu iNOS immünohistokimya bulguları.
Yaygın, orta /şiddetli boyanma(iNOSabx100) 26
Şekil 11. BAI+FA grubu immünohistokimya bulguları. FA grubu ile
benzer şekilde yaygın şiddetli boyanma (iNOS abx100) 27

ÖZGEÇMİŞ

Ezine'de doğdum. Çanakkale Hasan Ali YÜCEL Lisesi'nden mezun oldum. Aynı yıl Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik bölümüne başlayıp mezun oldum. Namık Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde Hemşire olarak göreve başladım. Trakya Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

EKLER

EK-1 Etik kurul onayı

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Oturum Sayısı: 2019/03
Karar N0: 2019.03.01
Hayvan Sayısı ve Cinsi: Sıçan 26 Adet

Karar Tarihi: 29.03.2019

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. Enis ULUÇAM'ın yaptığı, Emine MUT KEÇECİ'nin yüksek lisans tezi olarak planlanan TÜHADYEK-2019/05 protokol nolu **"Formaldehit ile oluşturulan böbrek hasarı üzerine baicaleinin koruyucu etkilerinin araştırılması"** başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri etik kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmelik ve Trakya Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

-KATILMADI-
Prof. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☒ hayır

Vet. Hekim Didem DÖNMEZ
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Prof. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Hakan GURKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒ yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Doç. Dr. Elvan BAKAR
Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☒ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☒ hayır

Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Ayhan YILMAZ
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐ yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır