

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
ÇOCUK NEFROLOJİ BİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
PİYELONEFRİT MODELİNDE BİLİRÜBİNİN
RENAL KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. BELDE KASAP DEMİR

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

İZMİR – 2010

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI
ÇOCUK NEFROLOJİ BİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL
PİYELONEFRİT MODELİNDE BİLİRÜBİNİN
RENAL KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

DR. BELDE KASAP DEMİR

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ALPER SOYLU

Bu araştırma TÜBİTAK (Proje No: SBAG-HD-140, 106S126) tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve eğitimim süresince değerli katkı ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Alper Soylu'ya, yan dal uzmanlık eğitimim boyunca faydalandığım tecrübeleri, yakın ilgileri ve her zaman hissettiğim destekleri nedeni ile Prof. Dr. Salih Kavukçu ve Prof. Dr. Mehmet Türkmen'e, yetişmemde emeği olan anabilim dalımızın tüm değerli öğretim üyelerine, tez çalışmamda gösterdikleri yakın ilgi ve yardımları nedeni ile Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlusu Prof. Dr. Osman Yılmaz'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına, preparatları incelemede gösterdikleri titizlik ve desteklerinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Dilek Ertoy Baydar'a, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Müge Kiray ve Doç. Dr. Kazım Tuğyan'a, yardımlarından ötürü Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Zeynep Gülay ve Uzm. Dr. Hatice Şanlı Avcı'ya, bir arada çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm uzman ve asistan arkadaşlarıma, sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzm. Dr. Belde KASAP DEMİR

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hem Katabolizması ve Hem Oksijenaz.....	4
2.2. Hem Katabolizmasında Ortaya Çıkan Ara Ürünler.....	8
2.2.1. Demir.....	8
2.2.2. CO.....	9
2.2.3. Biliverdin.....	9
2.2.4. Bilirubin.....	9
2.3. Piyelonefrit ve Renal Skar Oluşumu.....	12
2.4. Piyelonefrit, Renal Skar ve Apoptoz İlişkisi.....	13
2.5. Renal Skar ve Fibrozis Belirleyicileri.....	14
2.6. Renal İnflamasyon ve İyileşme.....	14
2.7. Hiperbilirubinemi-İdrar Yolu Enfeksiyonu İlişkisi.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1. Deney Hayvanları.....	18
3.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. Coli</i>) Solüsyonu.....	18
3.3. Antibiyotik Uygulaması.....	18
3.4. Bilirubin Solüsyonlarının Hazırlanması.....	18
3.5. Çalışma Protokolü.....	18
3.5.1. Piyelonefrit Modelinin Oluşturulması.....	18
3.5.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi.....	19
3.5.3. Çalışmanın Uygulama Süreci.....	19
3.5.4. Sakrifikasyon ve Dokuların Dağılımı.....	19
3.5.5. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal, Apoptotik İncelemeler.....	20
3.5.5.1. Histopatolojik İncelemeler.....	20

3.5.5.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler	21
3.5.5.3. Apoptotik İncelemeler	22
3.5.5.3.1. TUNEL Tekniği ile Boyama.....	22
3.5.5.3.2. Caspase-3 için İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi	23
3.5.6. Oksidan/Anti-Oksidan Sistem Aktivitelerinin Değerlendirilmesi.....	23
3.5.7. Sonuçların İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçları	25
4.1.1 Erken Dönem Sonuçları	25
4.1.1.1. İnterstisyel İnflamatuar Hücre İnfiltrasyonu	25
4.1.1.2. Tübüler Dilatasyon.....	27
4.1.1.3. Hiyalen Silendir	27
4.1.1.4. İnterstisyel Fibrozis-Tübüler Atrofi	27
4.1.1.5. Doku Hasarı Yüzdesi	27
4.1.2 Geç Dönem Sonuçları.....	27
4.1.2.1. İnterstisyel İnflamatuar Hücre İnfiltrasyonu	27
4.1.2.2. Tübüler Dilatasyon.....	28
4.1.2.3. Hiyalen Silendir	29
4.1.2.4. İnterstisyel Fibrozis/Tübüler Atrofi	29
4.1.2.5. Doku hasarı yüzdesi	29
4.2. İmmunohistokimyasal İnceleme Sonuçları.....	29
4.2.1. Erken Dönem Sonuçları	30
4.2.2. Geç Dönem Sonuçları	30
4.3. Apoptotik İnceleme Sonuçları.....	32
4.3.1. TUNEL Tekniği ile Boyanma Sonuçları	32
4.3.2. Caspase-3 için İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile Değerlendirme Sonuçları	32
4.4. Oksidan/Antioksidan Sistem Aktivite Sonuçları	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇLAR.....	42
7. KAYNAKLAR	43

ŞEKİL LİSTESİ:

Şekil 1: Hem katabolizmasının şematik gösterimi	4
Şekil 2: Renal hasarın patogenezi ile ilişkili olarak ortaya çıkan ve HO-1 induksiyonu yapan etkenlerin şematik gösterimi.....	6
Şekil 3: HO-1 aracılı olası renal koruyucu mekanizmaların şematik görünümü.	7
Şekil 4: Akut piyelonefrit patogenezi	13
Şekil 5: Erken dönemde Grup 1 ve 4 arasında İA'nın karşılaştırılması	26
Şekil 6: Geç dönemde Grup 1 ve 3 arasında İHY'nin karşılaştırılması.....	28
Şekil 7: Geç dönemde Grup 2 ve 4 arasında İF/TA'nın karşılaştırılması.....	29
Şekil 8: Geç dönemde Grup 1'de MMP-9 ekspresyonu	31
Şekil 9: Geç dönemde Grup 2 ve 3 arasında TIMP-1 ekspresyonunun karşılaştırılması	31
Şekil 10: Gruplara ait TUNEL (+) hücrelerin dağılımı.	32
Şekil 11: Caspase-3 için immunohistokimya uygulanan böbrek kesitleri	33
Şekil 12: Gruplara ait Caspase-3 (+) hücrelerin yoğunluğu	34
Şekil 13: Gruplara ait MDA değerlerinin dağılımı.....	35
Şekil 14: Gruplara ait GPX aktivitelerinin dağılımı	35
Şekil 15: Gruplara ait SOD aktivitelerinin dağılımı	36

TABLO LİSTESİ:

Tablo 1: Asemptomatik ve afebril sarılıklı infantlarda yapılmış çalışmalar.	16
Tablo 2: Çalışmada oluşturulan gruplar ve uygulamalar.	19
Tablo 3: Erken dönemde histopatolojik değişiklikler.	25
Tablo 4: Erken dönemde inflamatuvar aktivitedeki anlamlı farklılığın gruplar arasında değerlendirilmesi	26
Tablo 5: Geç dönemde histopatolojik değişiklikler	27
Tablo 6: Geç dönemde inflamatuvar aktivite ve interstisyel tutulumda anlamlı farklılığa yol açan gruplar.	28
Tablo 7: Erken ve geç dönemde TIMP-1 ve MMP-9'un gruplar arasındaki dağılımı.....	30
Tablo 8: Geç dönemde glomerüler TIMP-1 antikoruna ile boyanma sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.....	30
Tablo 9: Erken dönemde Caspase-3 antikoruna ile boyanma sonuçları	33
Tablo 10: Erken dönemde Caspase-3 antikoruna ile boyanma sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.....	34

KISALTMALAR:**CO:** Karbon monoksit**COX:** Siklooksijenaz**DMSA:** Dimerkaptosüksinik asit**GPX:** Glutatyon peroksidaz**HCl:** Hidroklorür**H&E:** Hematoksilen ve eozin**HO:** Hem oksijenaz**HSP:** Heat shock protein**ICAM-1:** İntersellüler adezyon molekülü-1**IL:** İnterlökin**İA:** İnflamatuvar aktivite**İF/TA:** İnterstisyel fibrozis/tübüler atrofi**İHY:** inflamatuvar hücre yoğunluğu**İİHi:** İnterstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu**İRH:** İskemi-reperfüzyon hasarı**iNOS:** İndüklenebilir nitrik oksid sentaz**İYE:** İdrar yolu enfeksiyonu**MDA:** Malondialdehit**MMP:** Metalloproteinase**NaOH:** Sodyum hidroksit**NADP:** Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat**PMNL:** Polimorfonükleer lökosit**SOD:** Süperoksit dismutaz**SD:** Standard sapma**TBARS:** Tiobarbitürik asit reaktif maddeleri (tiobarbitüric acid reactive substance)**TGF:** Transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor)**TIMP:** Doku metalloproteinaz inhibitörü (Tissue inhibitor of metalloproteinase)**TNF:** Tümör nekroze edici faktör**TUNEL:** Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling

UDPGT: Uridin difosfat glukronil transferaz

VUR: Vezikoüreteral reflü

SİÇANLARDA OLUŞTURULAN DENEYSEL PİYELONEFRİT MODELİNDE BİLİRÜBİNİN RENAL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Güçlü bir anti-oksidan olduğu bilinen bilirübinin, patogenezinde hem toksik hem de iskemi-reperfüzyon hasarının rol oynadığı piyelonefritte, renal hasar üzerine etkilerini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Böbreklerine *E.coli* enjekte edilerek deneysel piyelonefrit oluşturulan Wistar türü 32 sıçan 4 gruba ayrıldı: Grup 1 (tedavisiz), Grup 2 (antibiyotik), Grup 3 (bilirubin), Grup 4 (antibiyotik + bilirubin). Antibiyotik tedavisi bakteri inokülasyonundan 3 gün sonra başlayıp 5 gün; bilirubin uygulaması ise bakteri inokülasyonu ile aynı gün başlayıp 8 gün sürdürüldü. Her gruptaki sıçanların yarısı 9. günde (erken dönem) sakrifiye edilerek, elde edilen böbrek dokuları histopatolojik parametreler, immunohistokimyasal renal fibrozis belirleyicileri (MMP-9, TIMP-1), apoptoz (TUNEL, kaspaz-3) ve oksidan/anti-oksidan sistem (MDA, SOD, GPX) aktiviteleri açısından değerlendirildi. Sıçanların geri kalan yarısı ise 6 hafta sonunda sakrifiye edilerek histopatolojik parametreler ve renal fibrozis belirleyicileri açısından incelendi. Elde edilen veriler 4 grup arasında karşılaştırıldı.

Bulgular: İnflamatuar aktivite (akut bileşen; PMNL yoğunluğu), erken ve geç dönemlerde Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı derecede düşük idi. Geç dönemde, inflammatuar hücre yoğunluğu (akut ve kronik; tüm inflammatuar hücreler) Grup 3'te Grup 1 ve 4'e göre anlamlı derecede düşük, interstisyel fibrozis/tübüler atrofi Grup 4'te Grup 1 ve 2'ye göre, Grup 3'te Grup 2'ye göre anlamlı derecede düşük bulundu. Geç dönemdeki TIMP-1 ekspresyonu da benzer şekilde Grup 3'te Grup 2'ye göre anlamlı derecede düşük saptandı. TUNEL (+) hücre sayısı Grup 3 ve 4'te Grup 1'e göre anlamlı derecede düşük bulundu. MDA miktarı Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı derecede düşük, SOD aktivitesi ise Grup 4'e ek olarak Grup 2'de de Grup 1'e göre anlamlı derecede yüksek saptandı.

Sonuç: Elde edilen veriler bir arada değerlendirildiğinde, bilirübinin antibiyotik ile birlikte uygulandığında piyelonefrit ilişkili inflamasyon, fibrozis ve apoptozis üzerine daha belirgin koruyucu etki sağladığı, tek başına kullanıldığında ise etkileri sadece geç dönemde inflamasyonun şiddetini ve apoptozu azaltmak ile sınırlı kaldığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: piyelonefrit, bilirubin, sıçan, renal skar, apoptoz, oksidan/anti-oksidan sistem

EVALUATION OF RENAL PROTECTIVE EFFECTS OF BILIRUBIN ON EXPERIMENTAL PYELONEPHRITIS MODEL IN RATS

SUMMARY

Aim: To investigate the effects of bilirubin in pyelonephritis associated renal damage in which both toxic and ischemia-reperfusion injury play role in pathogenesis.

Materials and Methods: Experimental pyelonephritis was induced in 32 Wistar rats by inoculating E.coli into their kidneys and 4 groups were formed: Group 1 (no treatment), Group 2 (antibiotic), Group 3 (bilirubin), Group 4 (antibiotic + bilirubin). Antibiotic treatment was performed for 5 days starting 3 days after bacterial inoculation, while bilirubin was administered for 8 days starting from the day of bacterial inoculation. The half of the rats in each group were sacrificed on the 9th day (early period) and the rest of them were sacrificed at the end of the 6 weeks. Histopathological parameters, immunohistochemical renal fibrosis markers (MMP-9, TIMP-1), apoptosis (TUNEL, caspase-3) and oxidant/anti-oxidant system (MDA, SOD, GPX) activities were evaluated. The rest of the rats were sacrificed at the end of the 6th week of the study and evaluated for histopathologic parameters and renal fibrosis markers. The data were compared between the 4 groups.

Results: Inflammatory activity (acute component; intensity of PMNL infiltration) was significantly lower in Group 4 vs. Group 1 both in the early and late periods. In the late period, inflammatory cell intensity (acute and chronic; all inflammatory cells) was lower in Group 3 vs. Groups 1 and 4, interstitial fibrosis/tubular atrophy was lower in Group 4 vs. Groups 1 and 2 and in Group 3 vs. Group 2. TIMP-1 expression in the late period was also lower in Group 3 vs. Group 2. TUNEL (+) cell counts were significantly lower in Group 3 and Group 4 vs. Group 1. MDA levels were significantly lower in Group 4 vs. Group 1 and SOD activity was significantly higher in Groups 2 and 4 vs. Group 1.

Conclusion: Taken together, bilirubin is found to have protective effects on pyelonephritis associated inflammation in both early and late periods in addition to fibrosis and apoptosis when applied with antibiotics, although its effects are limited to prevention of inflammation in the late period and apoptosis when used alone.

Keywords: pyelonephritis, bilirubin, rat, renal fibrosis, apoptosis, oxidant/antioxidant system

1. GİRİŞ VE AMAC

Bilirubin, *hem* molekülünün yıkımı sonucu vücutta endojen olarak ortaya çıkan ve özellikle yüksek düzeylerde beyin hücreleri üzerine toksik etki yaptığı ispatlanmış bir maddedir (1,2). Ancak son yıllarda, indirgen özellikte olması nedeniyle potansiyel olarak anti-oksidan özellikleri bulunan bilirubinün sitoprotektif özellikleri üzerinde durulmaktadır. Bilirubinün *in vitro* şartlarda bilinen en güçlü endojen anti-oksidan olduğu, serbest ya da albumine bağlı fizyolojik konsantrasyonlarının bir süperoksit tutucu ve peroksil radikal tuzağı olarak görev yapma kapasitesi bulunduğu gösterilmiştir (3-5). Ayrıca, *in vivo* çalışmalarda yenidoğan dönemindeki hiperbilirubinemik “*Gunn rat*” tipi sıçanlarda, kan tiobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) seviyelerinin serum bilirubin düzeyleri ile ters orantılı olduğu, yenidoğanlarda ölçülen plazma anti-oksidan kapasitenin plazma bilirubin düzeyi ile korele olduğu, erişkinlerde ise yüksek bilirubin düzeylerinin azalmış koroner hastalık ve kanser insidansı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (6-9).

Bilirubin, *hem* molekülünün indirgenmesi sonucu ortaya çıkan, iki adet dipirol halkası içeren, nötral pH’da albumine bağlı olarak bulunan, serbest formu membranları kolaylıkla geçebilen bir moleküldür (10). Bilirubinün kendisi kadar, *hem* metabolizasyonunu indükleyen *hemin* ya da reaksiyonlar esnasında ortaya çıkan karbon monoksit (CO) ve biliverdin gibi ara ürünlerin de anti-oksidan ve sitoprotektif özelliklerinin olabileceği gösterilmiştir (10-12). Biyolojik sistemlerde bilirubinün *hem* metabolizması dışında bir kaynağı bulunmamaktadır. Ancak, deneysel araştırmalarda eksojen yolla uygulanan bilirubinün de anti-oksidan ve sitoprotektif özellikler gösterebileceği izlenmiştir (10,13). Bilirubinün böbrek üzerine olan etkileri deneysel olarak daha çok iskemi-reperfüzyon hasarı (İRH) modellerinde gösterilmiş olup, patogenezinde İRH’ye ek olarak apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem uyarımı da bulunan piyelonefrit ile ilişkisi henüz gösterilmemiştir.

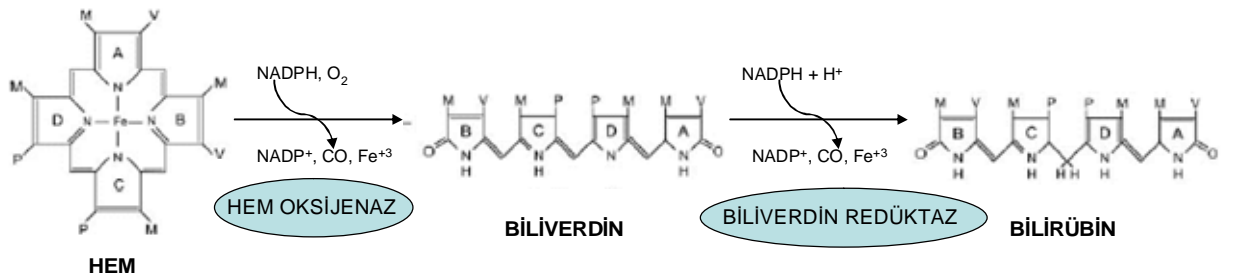
Yenidoğan döneminde uzamış sarılık ve idrar yolu enfeksiyonu (İYE) ilişkisi iyi tanımlanmış olmakla beraber (14-16), bilirubinün renal hasara duyarlı yenidoğan böbreği üzerine etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmada, hiperbilirubineminin piyelonefrit ilişkili renal hasarda olası renoprotektif etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, deneysel olarak piyelonefrit oluşturulmuş sıçanlara eksojen yol ile verilen bilirubinün renal histopatolojik bulgular, fibrozisin immunohistokimyasal belirleyicileri, apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem üzerine etkileri multidisipliner bir yaklaşım ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hem Katabolizması ve Hem Oksijenaz

Hem proteinlerinin oksijen transportu, mitokondriyal solunum ve sinyal iletimi gibi pek çok fizyolojik olayda önemli görev aldığı bilinmektedir (17). *Hem* molekülünün büyük bir kısmı hemoglobin içinde bulunur; diğer kaynaklar ise miyoglobin, mitokondriyal ve mikrosomal sitokromlar ve nitrik oksid sentaz, katalaz gibi bazı katalitik enzimlerdir (18). Serbest *hem* molekülü, lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikalleri yapımı üzerinden sitotoksik etki yaratmaktadır. Böbrek özellikle bu serbest *hem* moleküllerine duyarlı bir organdır ve *hemin* indüklediği hasar, rabdomiyoliz, nefrotoksin ya da İRH'nin neden olduğu akut böbrek yetmezliği modellerinde önemli bir komponent olarak karşımıza çıkmaktadır (10,13).

Hem molekülünün indirgenerek metabolitlerine ayrılması birbirini takip eden iki basamakta gerçekleşir. İlk ve hız-sınırlayıcı basamağı katalize eden “hem oksijenaz (HO)”, *hem* (Fe-protoporfirin IX) molekül halkasını açarak molar olarak eşit düzeyde demir, CO ve biliverdin açığa çıkarır. Lineer bir tetrapireol molekülü olan biliverdin, memelilerde ve bazı balıklarda evrim esnasında iyi korunmuş ve çözünebilir bir enzim olan “biliverdin redüktaz” ile bilirübine çevrilir (19). Böbrek, tüm organlar arasında en fazla biliverdin redüktaz enzimine sahip olan organdır (20). Sonuç olarak, biliverdinin bilirübine indirgenmesi sonucu bir metil köprüsü ile bağlanmış ve iki adet planar dipireol halkası içeren bilirubin ortaya çıkar (Şekil 1). III α , IX α ve XIII α şeklinde üç izomeri bulunan bilirubinün, *hem* katabolizması sonucu ortaya çıkan doğal formu IX α bilirübindir (21).



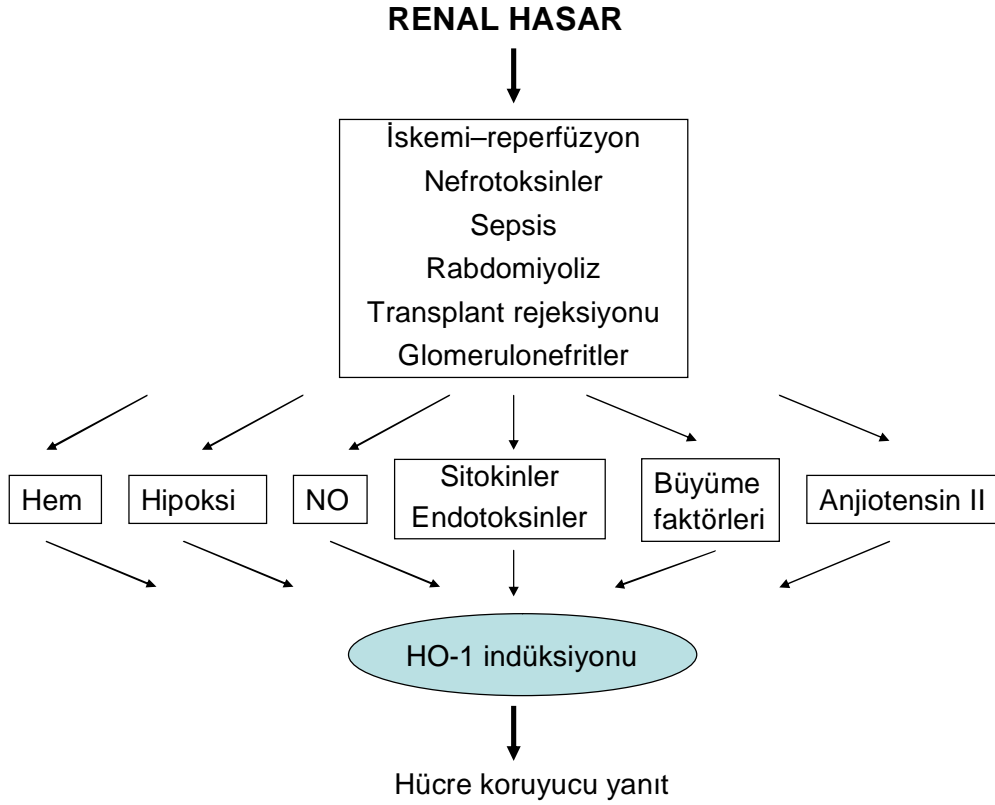
Şekil 1: Hem katabolizmasının şematik gösterimi.

Hemin indirgenmesinde ilk basamakta görev alan HO enziminin 3 tipi belirlenmiştir (19):

- **HO-1:** indüklenabilir izoform olup, 32 kDa'luk bir proteindir. Heat-shock proteinler (HSP) sınıfının bir üyesidir ve HSP-32 olarak da bilinir (11). Tüm dokulardaki endoplazmik retikulumlarda bulunur (22). Memelilerde sıklıkla sitokinler, bakteriyel endotoksinler, reaktif oksijen türevleri, iskemi/reperfüzyon ve hipoksi ile indüklenbilir (21,23,24). Patofizyolojik durumlarda dokunun hasara yanıtını düzenler ve sitoprotektif özellik gösterir.
- **HO-2:** Aminoasit içeriği %40 oranında HO-1 ile benzerdir. Asıl olarak beyin, testis, endotel, distal nefron segmentleri, karaciğer, barsakların miyenterik plexusunda bulunur. Hücre fonksiyonların fizyolojik düzenleyicisi olarak işlev görür (19, 25). Vazodilatasyon, nörotransmisyon ve oksijeni algılamada görev alır (26,27).
- **HO-3:** Aminoasit içeriği HO-2 ile %90 oranında benzerdir, ancak farklı bir enzim olduğu düşünülür. Aktivitesi yoktur ve memelilerde ekspresyona girmez (19).

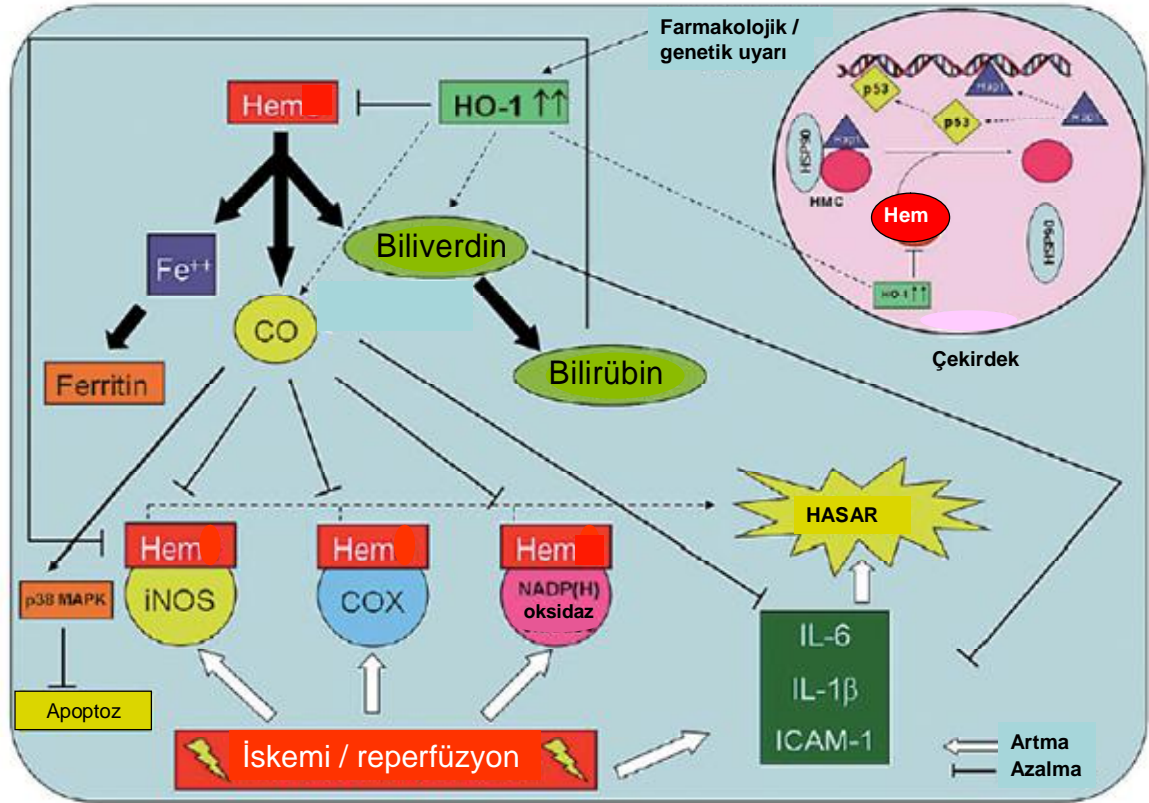
HO-1 izoformlarının böbrekteki lokalizasyonları belirlenmiştir. Normal şartlar altında korteks ve dış medüller alanın HO-1 için hafif olarak pozitif boyandığı, reperfüzyon ile indüklenme sonrası 3. saatte boyanmanın anlamlı derecede arttığı, 6. saatte maksimum düzeye ulaştığı, 9. saatte hızlıca azalmaya başladığı ve 12. saatte bazal değerlere geri döndüğü gösterilmiştir (28). HO-2 ile boyanmanın ise daha çok arteriolar homojenatlarda ve daha az oranda çıkan kalın kolda ve proksimal tübüllerde olduğu gözlenmiştir (29). Böbrek dokusundaki yaygınlığı ve indüklenbilir özellikte oluşu, böbrek hasarı ve koruyuculuk etkileri üzerindeki çalışmaların HO-1 üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur.

HO-1 enziminin en önemli özelliği, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu üzerinden pro-oksidan etkileri olan *hem* molekülünün indirgenmesini sağlamaktır (13). HO-1 enzim ekspresyonunun kalp, beyin, karaciğer ve barsak gibi pek çok dokunun İRH'de faydalı olduğu gösterilmiştir (3,30-34). Ek olarak HO-1 ekspresyonunun akut iskemik böbrek yetmezliği ve İRH'de böbreği koruduğu gösterilmiştir (10,33). HO-1'in, renal doku hasarına neden olan İRH, nefrotoksinler, sepsis, rabdomiyoliz, renal transplantasyon rejeksiyonu ve glomerulonefritler gibi akut böbrek hasarı durumlarında indüklenerek adaptif ve faydalı özellikler gösterdiği ve hücre koruyucu etki yarattığı bilinmektedir (Şekil 2). Bu enzimin uygun düzeyde indüksiyonu faydalı iken aşırı miktarda HO-1 indüksiyonu ciddi doku hasarına yol açabilir (19).



Şekil 2: Renal hasarın patogenezi ile ilişkili olarak ortaya çıkan ve HO-1 indüksiyonu yapan etkenlerin şematik gösterimi

HO-1 aracılı renal koruyucu etkilerin birkaç mekanizma üzerinden yürüdüğü bilinmektedir. *Hem* molekülü, nukleusta renal hasara yol açabilecek maddelerin gen transkripsiyonunu arttırmakta, renal hasarda kilit öneme sahip indüklenebilir nitrik oksid sentaz (iNOS), siklooksijenaz (COX) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) oksidaz gibi bazı enzimler için prostetik grup özelliği göstermektedir. HO-1 enzimi, direkt olarak *hem* molekülünü azaltarak ya da indirekt olarak sağladığı enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan CO üzerinden apoptozu, biliverdin ile renal hasarda etkin mediyatörlerden interlökin(IL)-6, IL-1 β ve intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) sentezini engelleyerek koruyuculuk sağlamaktadır (34, Şekil 3).



Şekil 3: HO-1 aracılı olası renal koruyucu mekanizmaların şematik görünümü.

HO-1 indüksiyonunun renal dokudaki koruyucu etkileri *in vivo* olarak ilk kez bir sıçan rabdomiyoliz modelinde gösterilmiştir (35). Bu enzimin asıl önemi, HO-1 (-/-) fareler üretildikten sonra yapılabilen çalışmalar ve HO-1 eksikliği olan bir hastadaki patolojiler tanımlandıktan sonra ortaya çıkmıştır (36). Fare ve insan HO-1 enzimleri arasında yapısal farklılıklar tanımlanmıştır. Fare HO-1 üzerine pek çok deney yapılmış olup özellikleri belirlenmiş olmakla beraber insan HO-1 enziminin özellikleri henüz tam olarak açığa kavuşturulamamıştır (21).

HO-1 (-/-) farelerde düşük doğum ağırlığı, büyüme gelişme geriliği, hipokrom mikrositer anemi, doku demir eksikliği, hepatosplenomegali, lenfadenopati, lökositöz ve glomerulonefrit gözlenmiş, bu patolojiler oksidan strese karşı savunmanın yetersiz olması ile ilişkilendirilmiştir (37). Sisplatinin indüklediği renal epitelyal hücre hasarında HO-1'in indüklenmesinin koruyucu olduğu, HO-1 (-/-) farelerde ise sisplatin uygulanmasını takiben gelişen renal hasar, apoptoz ve nekrozun HO-1 (+/+) ve HO-1 (+/-) farelere göre anlamlı derecede fazla olduğu ve bu gruplardaki HO-1 ekspresyonundaki artışın da renal hasarı

azaltmada rol oynadığı gösterilmiştir (38). HO-1'in gliserole bağlı akut böbrek hasarındaki koruyucu etkileri ise, HO-1 (-/-) farelerde geri dönüşsüz böbrek yetmezliği ve %100 mortalite görülürken, HO-1 (+/+) farelerde hafif renal hasar ve %0 ölüm bulunması bulguları ile gösterilmiştir (39). Ayrıca, HO-1 (-/-) olan 6 yaşındaki bir erkek hastada büyüme geriliği, anemi, demir birikimi, lökositoz, persistan proteinüri ve hematüri, koagülasyon defekti, hiperlipidemi ve hipobilirubinemi saptanmış, böbrek biyopsisinde mezangial hücre proliferasyonu, lenfosit infiltrasyonu, glomerüler kapiller endotelde ayrışma olduğu gözlenmiştir (37).

HO-1 indüksiyonunun sitoprotektif etkileri bahsi geçen deneysel çalışmalarda gösterilmiş, ancak mekanizması tam açıklanamamıştır. İRH ya da nefrotoksik böbrek hasarında HO-1 aktivitesinin koruyucu etkileri gösterilmişse de bunların bilirubin oluşumuna bağlı anti-oksidan etkilere mi, yoksa CO aracılı vazodilatasyona mı bağlı olduğu tam olarak açıklanamamıştır (15,40-42). Önceleri *hem* degradasyonu esnasında ortaya çıkan bu moleküllerin toksik metabolitler oldukları düşünülmekte idi. Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda bu maddelerin doza bağımlı vazodilatasyon, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve immunmodülatör özelliklerinin olduğu ve organlar ya da sistemler üzerine faydalı koruyucu etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (10,13,43)

HO-1 indüksiyonu yaptığı bilinen "*hemin*" 1970'li yıllardan itibaren insanlarda akut porfirilerde kullanıma girmiştir (44). Ancak sonraki çalışmalarda *heminin* ayrıca ortaya çıkan demir nedeniyle pro-oksidan özellikler de gösterdiğinin fark edilmesi kullanımını kısıtlamıştır (45). Bu nedenlerle de eksojen bilirubin daha güvenli olabileceği düşünülmüştür (13).

HO-1 sisteminin çalışma mekanizmalarını anlayabilmek için reaksiyonlar esnasında sırası ile ortaya çıkan demir, CO, biliverdin ve bilirubin etki mekanizmalarını değerlendirmekte fayda vardır.

2.2.Hem Katabolizmasında Ortaya Çıkan Ara Ürünler

2.2.1. Demir

Demir, *hem* yıkımı esnasında ortaya çıkan ve belirgin pro-oksidan etkileri olduğu net olarak tanımlanmış bir moleküldür. Bazı çalışmalarda HO-1 indüksiyonunun pro-oksitativ etkilerinin olduğu, bunun da ortaya çıkan demir ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (46, 47). Bu nedenle, *hem* yıkımında demirin ortaya çıktığı basamak atlanarak CO, bilirubin ya da biliverdin uygulamalarının daha güvenli ve daha pratik olabileceği ileri sürülmüştür (10).

2.2.2. CO

Toksik özellikleri bulunan, renksiz ve kokusuz bir gazdır. Toksik etkisi, oksijene göre hemoglobine 245 kat daha fazla afinitesi olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum doku hipoksisi ile sonuçlanmaktadır (12). Ancak CO'in belli dozlarda, özellikle transplante organlarda koruyucu etkisinin olduğu, vazodilatör, anti-apoptotik ve anti-inflamatuar etkilerinin bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (12). Neto ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, sıçan ortotopik renal transplantasyon modelinde, işlemden 1 saat önce ve 24 saat sonra uygulanan CO'in inflammatuar mediyatör miktarında azalma, renal kortikal kan akımında düzelme, glomerüler ve tübüler yapının korunması ve sürvide artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (48). Tüm bu özelliklerine karşın, bu toksik gazın kullanımı risklidir. İnsanlarda henüz kullanılmamıştır ve sağladığı koruyucu etkinin renal hasar gelişimi öncesi kullanımı halinde daha belirgin oluşu klinik kullanımını kısıtlamaktadır (12).

2.2.3. Biliverdin

Biliverdin, bilirübinin aksine çözünebilen ve toksik olmayan bir bileşendir. Yamashita ve ark. yaptıkları bir çalışmada biliverdin ile tedavi sonrası kalp allograftlarında sürvinin arttığı, Nakao ve ark.'nın çalışmasında biliverdin uygulanan ince barsak greftlerinde inflammatuar mediyatörlerde, lökosit infiltrasyonu ve organ hasarında azalma sağlandığı, Fondevilla ve ark.'nın çalışmasında ise *ex vivo* karaciğer transplantasyonunda perfüze biliverdin eklenmesi sonrası apoptoz, iNOS ekspresyonu, lökosit infiltrasyonu, proinflammatuar sitokin ekspresyonunda belirgin azalma ile birlikte hepatik fonksiyonlarda, anti-apoptotik genlerde ve sürvide belirgin artış olduğu gözlenmiştir (49-51). Bununla birlikte, sıçan böbrek ve kalp transplant modellerinde benzer etkinlik gözlenmemiştir (12). Nakao ve ark. tarafından renal transplant alıcılarında yapılan bir çalışmada ise, HO-1 enziminin ortaya çıkardığı ürünlerden olan biliverdinin ve gaz formundaki karbon monoksidin renal ve kardiyak transplant dokularına ayrı ayrı uygulanmasının etkili olmadığı, ancak beraber kullanımının kreatinin klirensi ve proteinüri üzerine anlamlı derecede olumlu etkiler gösterdiği izlenmiştir (52). Bilirübin kaynağı olarak güvenli ve etkin bir potansiyele sahip olmakla beraber, biliverdinin etkin doz ve uygulama zamanlaması ile ilgili net veriler henüz oluşmamıştır.

2.2.4. Bilirübin

Bilirübin, potansiyel olarak toksik bir ajan olup, yenidoğanlarda neden olduğu sarılığı takiben beyinde oluşan depozitlerin kernikterus ile ilişkili nörotoksisiteden sorumlu olduğu bilinmektedir (1,2). Ancak son zamanlarda bu pigmentin faydalı ve koruyucu etkileri üzerinde

durulmaya başlanmıştır. Günümüzde, HO-1'in katalize ettiği reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan fizyolojik konsantrasyonlardaki bilirübinin peroksil radikallerini tutan, lipid peroksidasyonunu engelleyen ve hücreleri hidrojen peroksid maruziyetinden koruyan bir madde olduğu bilinmektedir (53). Biyolojik sistemlerde, biliverdin redüktazın katalize ettiği enzimatik reaksiyon dışında bilirübin oluşumu ile sonuçlanan başka bir reaksiyon yoktur.

Nötral veya asidik pH'da çözünürlüğü düşük olan bilirübin, pH'nın artışı ile çözünürlüğü artarak suda çözünen bir sodyum tuzu haline gelir. İndirekt bilirübinin %99'u albumine bağlanır. Bağlanmamış non-iyonize bilirübin ise hücre membranlarını serbestçe geçer ve >50 µM düzeyinde mitokondriyal solunumu bozar. Albuminin bağlama kapasitesi aşıldığında (>200-300 µM) ve pH<7.4 düzeyinde iken miktarı artan serbest bilirübin, hücre ve mitokondri membranlarına bağlanarak hücre lizisi ve mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına yol açar (10,54,55). Albumine bağlı indirekt bilirübin normal şartlar altında karaciğere ulaşarak albuminden ayrılır, fosfolipid hücre bariyerlerini aşarak hepatositlerin içine diffüze olur. Hepatositler içinde glukuronik asit ile birleşerek suda çözünür hale gelir ve safraya atılarak vücuttan uzaklaştırılır (10).

İndirekt bilirübin de CO gibi önceleri toksik bir molekül olarak bilinmekte olup, yenidoğan sarılığı ve kernikterustan sorumlu olduğu ispatlanmıştır. Suda çözünebilir ve toksik olmayan biliverdinin neden bilirübine indirgendiği sorusu da yanıt bulamamıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda faydalı etkilerinin gösterilmesi, bilirübinin fizyolojik rolünü de ortaya çıkarmıştır. Bilirübinin sitoprotektif etkilerinin ortaya çıkışında primer mekanizmanın güçlü anti-oksidan etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir (5). Bilirübinin, bir dönem en güçlü serum anti-oksidanı olarak bilinen α-tokoferole göre peroksil radikallerinin tutulmasında daha etkin olduğu gösterilmiştir (10).

HO-1 enzim indüksiyonunun kalp, beyin, karaciğer, barsak ve böbrek gibi pek çok dokunun İRH'sinde koruyucu olduğu ve bu etkileri açığa çıkan bilirübin üzerinden sağladığı gösterilmiştir (3,30-32). Siklofosfamide bağlı sistitte, HO-1 ekspresyonunun ürotelyum ve subürotelyumda arttığı ve bu ekspresyonun "hemin" ile daha belirgin hale geldiği gösterilmiştir (56). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise HO-1 indüksiyonuna paralel olarak endojen bilirübin düzeylerinin de arttığı ve bilirübinin HO-1'e bağımlı anti-inflamatuar sistemin bir parçası olabileceği ifade edilmiştir (57). HO-1 indüksiyonunun yüksek CO düzeyleri ile de orantılı olması, bilirübinin bu protektif etkilerine CO'in de katkısı olabileceğini akla getirmiş, ancak ikinci çalışmada eksojen yolla verilen bilirübinin de aynı etkileri göstermesi, etkilerin demir ya da CO gibi ara ürünlerden bağımsız

olduğunu düşündürmüştür. Böbreklerde ise HO-1 enzim indüksiyonunun, renal iskemisi sonucu gözlenen oksidatif strese bilirubin aracılı bir azalma sağladığı gösterilmiştir (41).

HO-1 indüksiyonu esnasında ortaya çıkan demir ve CO gibi maddelerin olası toksik ve pro-oksidan etkilerinden çekinilmesi ve anti-oksidan ve sitoprotektif etkilerin bilirubin üzerinden sağlandığının gösterilmesi üzerine, çalışmalar daha çok asıl etkilerden sorumlu olan bilirubin üzerine yoğunlaştırılmıştır. Bununla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, karaciğer transplantasyon modelinde *hemin* ile indüklenen HO-1 enzim aktivitesi ile mikromolar dozlarda uygulanan bilirubin koruyucu etkileri karşılaştırılmış ve sonuçların benzer düzeyde olduğu gösterilmiştir (32). Ayrıca, eksojen bilirubin uygulamasının izole, perfüze sıçan kalp dokusu ve multipl sklerozlu sıçan modelinde spinal kord üzerindeki oksidatif hasarı azalttığı gösterilmiştir (31, 58).

Bilirubin böbrek dokusu üzerindeki etkilerini değerlendiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda eksojen yolla verilen, endojen olarak safra kanallarının ligasyonu ile sağlanan ya da genetik olarak uridin difosfat glukronil transferaz (UDPGT) enziminin fonksiyon kaybı ile oluşturulan hiperbilirubineminin böbrekler üzerine etkileri değerlendirilmiştir (6,13,59,60).

İRH modelinde eksojen bilirubin izole perfüze sıçan böbreği üzerine koruyucu etkileri gösterilmiştir. 10 µmol/L dozunda bilirubin ile perfüze edilen böbreklerde idrar çıkışı, glomerüler filtrasyon hızı, tübüler fonksiyonlar ve mitokondriyal bütünlük açısından anlamlı miktarda düzelme kaydedilmiştir (13). Aynı ekip tarafından yapılan diğer bir çalışmada, *in vivo* ortamda intravenöz olarak verilen bilirubin İRH'deki koruyuculuğunun benzer etkinlikte olmadığı gösterilmiş, ancak bunun böbrek dokularının çıkarılma zamanı ile ilgili teknik bir hatadan kaynaklandığı ifade edilmiştir (60).

Dennery ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada, UDPGT enziminin sentezlenememesi sonucu indirekt bilirubin direkt bilirubine çevirim yetenekleri kısıtlanan ve “*Gunn rat*” olarak tanımlanan hiperbilirubinemik sıçanlarda yenidoğan döneminde kan TBARS seviyelerinin serum bilirubin düzeyleri ile ters orantılı olduğu gösterilmiş ve hayvanlardaki serbest radikal direncinin bilirubin tarafından sağlandığı sonucuna varılmıştır (6). Yine *Gunn rat* tipi sıçanlarda oluşturulan sisplatin nefrotoksisite modelinde, bu sıçanların böbreklerinin Wistar tipi sıçanlara göre anlamlı olarak korunmuş oldukları, bilirubin fonksiyonel ve histolojik olarak renoprotektif özellikte olduğu gözlenmiştir (43). Ancak *Gunn rat* tipi sıçanlarda renal papillalarda bilirubin birikimi sonucu papillar nekroz ve konsantrasyon defekti geliştiği de izlenmiştir (61,62). Bu nedenle, hiperbilirubineminin tüm

renal hasar tiplerine karşı koruyucu olduğu düşünülmemelidir.

Ana safra kanalının ligasyonu ile kolestaz ve endojen hiperbilirubinemi oluşturulan sıçanlarda, gliserolün indüklediği akut böbrek yetmezliğinin önlendiği ve böylece bilirubin renal İRH üzerine koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (59). İnsan proksimal epitelyum hücreleri üzerinde *in vitro* olarak yapılan diğer bir çalışmada, konjuge bilirubin hücrelerin sisplatin duyarlılığını azalttığı ve sitoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (63)

Bilirubin, anti-oksidan özelliklerinin yanı sıra anti-inflamatuar özelliklere de sahiptir. Hayashi ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, mezenter dokusunda bölgesel oksidatif stres yaratılmasını takiben *hemin* enjeksiyonu ile HO-1 aktivasyonu sağlandığında, lökosit yuvarlanması ve yapışmasının inhibe olduğu, HO-1 ekspresyonunun çinko protoporfirin IX kullanılarak inhibe edilmesi sonucunda ise bu bulguların düzeldiği, CO değil ama bilirubin ve biliverdin uygulandığında ise yeniden lökosit yapışmasında inhibisyon sağlandığı gözlenmiştir (64).

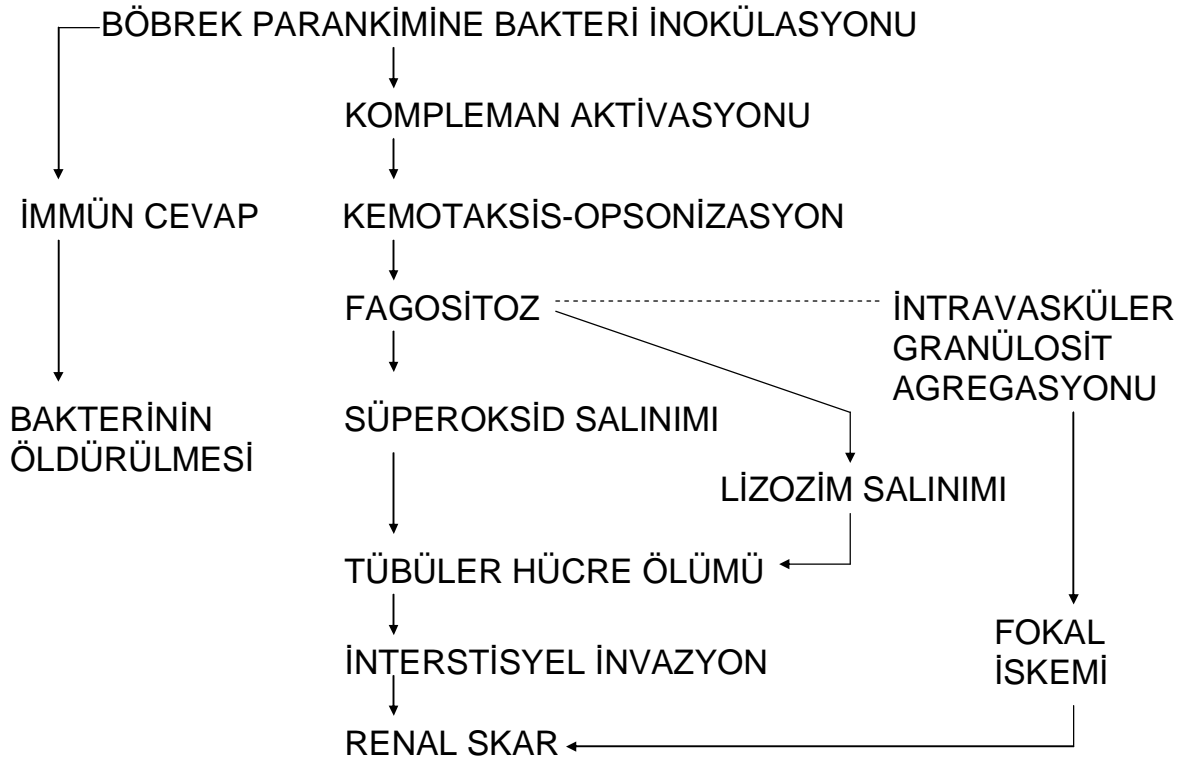
İnsanlar üzerindeki çalışmalarda ise hafif derecede artan bilirubin düzeylerinin azalmış koroner arter hastalığı ve ateroskleroz insidansı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (8). Devamlı indirekt bilirubin düzeyi yüksekliği ile seyreden Gilbert hastalığı bulunan bireylerde gözlenen iskemik kalp hastalığı prevalansının (%2) genel popülasyona (%12) göre azalmış olduğu bilinmektedir (65). Ayrıca yüksek bilirubin düzeylerinin azalmış kanser mortalitesi ve azalmış astım semptomları ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (9, 66).

Ancak tüm bu çalışmalar için etkin doz ve uygulamanın zamanlaması konusunda bir netlik yoktur. Aynı ekip tarafından gerçekleştirilen çalışmalardan ilkinde perfüze sıçan böbreklerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon modelinde dışarıdan verilen bilirubin koruyucu olduğu gözlenirken, *in vivo* çalışmada intravenöz verilen bilirubin etkili olmaması, bilirubin koruyucu etkilerinin modele özgü olduğunu düşündürmüştür (13,60). Ayrıca, CO'e benzer şekilde, bilirubin de hasardan önce uygulanması daha iyi sonuçlanmaktadır (31). Bu durum, bilirubin klinik kullanım olasılığını kısıtlamaktadır. Yine de organ nakilleri öncesi ya da nefrotoksik olduğu bilinen ajanların kullanımı ya da kontrast madde uygulanması öncesi bilirubin kullanımının faydalı olabileceği düşünülmektedir (10).

2.3. Piyelonefrit ve Renal Skar Oluşumu

Renal parankime bakteri inokülasyonu immunolojik ve inflammatuar yanıtı başlatır. Bakteriyel lipopolisakkaritlerin (endotoksinler) kompleman aktivasyonu yolu ile tetikledikleri inflammatuar yanıt, kalıcı renal hasar oluşumunda kritik rol oynar. İnflamatuar yanıt granülositlerin enfeksiyon bölgesine kemotaktik göçünü ve bakteri fagositozunu sağlar.

Ortama superoksit salınır ve hem bakterilere hem de granülositler ve çevresindeki renal tübül hücrelerine toksik olan oksijen radikalleri ortaya çıkar. Granülositler bakterileri öldürürken lizozomal toksik enzimleri aracılığı ile aynı zamanda renal tübül hücre hasarı da yapar. Ayrıca intravasküler granülosit agregasyonu ve ödemden kaynaklanan fokal parankimal iskemik oluşur. İskemik dokunun reperfüzyonu esnasında hücre reaksiyonu ile süperoksitler oluşturulur. Dolayısı ile piyelonefritteki interstisyel etkilenme hem İRH hem de toksik hasar kaynaklıdır. Bu durum renal skar oluşumu ile sonlanır (67,68) (Şekil 4).



Şekil 4: Akut piyelonefrit patogenezi

2.4. Piyelonefrit, Renal Skar ve Apoptoz İlişkisi

Piyelonefritte renal kortikal hücrelerde apoptoz geliştiği ve apoptozun renal skar oluşumunda önemli rol oynayabileceği bildirilmiştir (69,70).

Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda apoptoz ve modülatörlerinin renal tübül atrofisi, hücre hasarı ve renal skar oluşumuna katkı sağladığı görülmüştür (71). *In vivo* çalışmalarda deneysel *E.coli* piyelonefriti oluşumu sonrası renal hücre sayısında azalma olduğu ve apoptoz oranında artış olduğu gösterilmiştir (72).

İYE esnasında iNOS düzeyinde artış görülür. iNOS indüksiyonunun sitotoksik etkileri olduğu bilinmektedir. HO-1 indüksiyonunun *E.coli*'ye maruz kalan renal proksimal tübül

hücrelerde iNOS aracılı hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (73). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise HO-1 aktivasyonu sonucu oluşan CO'in renal hücrelerde sürviyi arttırdığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (12). Bu nedenle çalışmamızda yine aynı enzimin son ürünlerinden olan bilirübinin, apoptoz üzerine olan etkilerini değerlendirmenin uygun olacağı düşünülmüştür.

2.5. Renal Skar ve Fibrozis Belirleyicileri

Bilindiği gibi transforming growth factor beta (TGF- β), renal dokuda fibrozisi düzenlemede anahtar role sahip güçlü bir pro-inflamatuar ve fibrojenezi arttırıcı bir sitokindir. Tavşanlarda oluşturulan kresentrik nefrit modelinde, idrar TGF- β düzeylerinin renal skar düzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (74). Ayrıca insanlarda görülen glomerüler hastalıklarda da TGF- β 'nın önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir (75). Daha önce yapılan çalışmalarda TGF- β 'nın İYE'ye yatkınlıkta, reflü nefropati ve renal skar gelişiminde etkin olduğu, bu sitokine ait -509 TT ve Lue(10) α pro gen polimorfizmlerinin reflü nefropati riskini arttırdığı (76), -800 GA genotipinin ise koruyucu özellikte olduğu bildirilmiştir (77).

Metalloproteinaz-9 (MMP-9), TGF- β 'nın aksine fibrinogenezde azalmaya yol açar. Böbrekte matriks yıkımından sorumlu enzimlerdendir (78). MMP-9 aktivitesi doku metalloproteinazların inhibitörü olan (TIMP)-1 ile kontrol edilir. Fizyolojik koşullarda MMP ve TIMP aileleri arasındaki denge ekstrasellüler matriks yapım ve yıkımını belirler. Deneysel modellerde düşük MMP-9 seviyelerinin ve yüksek TIMP-1 düzeylerinin artmış kollajen birikimi ve renal skar gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (79,80).

2.6. Renal İnflamasyon ve İyileşme

Kemik iliğinden salınan hücrelerin inflamasyona bağlı renal hasarın iyileşmesinde aktif rol aldıkları, CD34(+) hücrelerin dolaşımında ve renal dokuda saptanması ile gösterilmiştir. Ayrıca renal skarın şiddeti, CD34(+) hücrelerin sayısı ile korele bulunmuştur (81,82). Çalışmamızda, oluşturulan renal hasar sonrasında ortaya çıkması beklenen CD34(+) hücrelerin bilirübinden etkilenme oranının değerlendirilmesi planlanmıştır.

2.7. Hiperbilirubinemi-İdrar Yolu Enfeksiyonu İlişkisi

Sarılık, yenidoğan dönemindeki bebeklerin %60'ında karşılaşılabilen bir sorun olup nadiren patolojiktir (15,83,84). Yenidoğanlarda açıklanamayan hiperbilirubineminin sepsis ya da İYE ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca İYE uzamış yenidoğan sarılığının nedenlerinden biri olarak suçlanmış ve bu bebeklerde rutin olarak İYE taraması yapılması önerilmiştir (14-16,85). Ancak, İYE ve hiperbilirubinemi arasındaki ilişki henüz açığa kavuşturulamamıştır (14,16).

İYE ilişkili indirekt hiperbilirbineminin nedeninin *E.coli* ve diğer Gram (-) mikroorganizmaların yol açtığı hemoliz olduğu, direkt hiperbilirbineminin ise kolestaza bağlı olabileceği düşünülmüştür (14). İYE'nin nasıl kolestaza yol açabildiği tam olarak bilinmemekle beraber, karaciğerde mikrosirkülatuvar düzeyde dolaşım bozukluklarının, direkt bakteriyel ürünlerin ya da endotoksin aracılı mediyatörlerin neden olabileceği ileri sürülmüştür (86,87). Yenidoğanlardaki immatür konjugasyon mekanizması nedeni ile hafif hemolizler bile serum bilirübin düzeylerini arttırabilmektedir (14). Böylece hiperbilirubineminin çok şiddetli olmayan İYE'de bile uyarıcı bir bulgu olacağı düşünülebilir.

Sekiz haftadan küçük ve febril infantlarda İYE oranı %5-11 olarak bildirilmiştir (88-90). Asemptomatik ve afebril sarılıklı infantlarda yapılan çalışmalar Tablo 1'de özetlenmiştir. İYE saptanma oranları, sekiz haftadan küçük 160 hastada % 7,5, iki haftadan küçük 102 yenidoğanda %8, 2-4 haftalık 100 yenidoğanda %6, ortalama yaşları 10 gün olan 400 hastada %5,8 olarak bulunmuştur (14-16,85). %68'i asemptomatik ve afebril olan, yaşları 3-25 gün arasında değişen sarılıklı 462 yenidoğanda İYE oranı %6,5 bulunmuştur (91). Garcia ve ark.'a ait çalışmada özellikle sarılığı postnatal sekizinci günden sonra ortaya çıkan yenidoğanlarda İYE insidansının daha yüksek olduğu gözlenmiştir (14). Bu serilerde İYE bulunan sarılıklı infantlarda %55'e varan oranlarda üriner sistem anomalilerine dikkat çekilmektedir. Üriner sistem anomalileri olan hastaların İYE yatkınlığının arttığı ve bu hastalarda İYE'nin sonucu olarak hiperbilirubineminin ortaya çıktığı düşünülmüştür (14).

Çocukluk çağında ilk febril İYE sonrası akut dönemde renal sintigrafik bulguların teknesyum-99m dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ile değerlendirilmesi sonucu pozitif bulgulara rastlama olasılığı Kotoula ve ark.'nın 57 çocuğu kapsayan çalışmasında %47,3, Doganis ve ark.'nın 278 infant üzerindeki çalışmasında %57, Fernandez-Menandez ve ark.'nın 158 çocuğu içeren serisinde %48,7 ve Hoberman ve ark.'nın 309 çocuğu kapsayan çalışmasında %61 oranında bildirilmiştir (92-95). Yenidoğan döneminde İYE sonrası akut bulguların değerlendirildiği Xiniş ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise, hastaların %46,7'sinde akut sintigrafik bulgulara rastlanmış olup, diğer çocukluk çağı değerleri ile benzerdir (91). Bu çalışmada İYE esnasında pozitif kortikal DMSA bulgusu olan yenidoğanların bilirübin düzeylerinin, DMSA bulgusu olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (91). Pashapour ve ark. tarafından yine yenidoğan döneminde İYE saptanan sarılıklı hastaları kapsayan diğer bir çalışmada, hastaların %33,3'ünde sintigrafik bulguya rastlanmış, ancak değerlendirmenin zamanlaması belirtilmemiştir (16). Bilgen ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise İYE saptanan sekiz ikterik yenidoğandan enfeksiyon

Tablo 1: Asemptomatik ve afebril sarılıklı infantlarda yapılmış çalışmalar

	Garcia ve ark. (Kaynak 14)	Bilgen ve ark. (Kaynak 15)	Pashapour ve ark. (Kaynak 16)	Ghaemi ve ark. (Kaynak 85)	Xinias ve ark.# (Kaynak 91)
Yaş grubu	<8 hafta	<2 hafta	2-4 hafta	Ort. 10 gün	3-25 gün
Toplam hasta sayısı	160	102	100	400	462
İYE (+) hasta sayısı	12 (%7,5)	8 (%7,8)	6 (%6)	23 (%5,8)	30 (%6,5)
İdrar alma yolu	Kateter	Kateter	Suprapubik aspirasyon	Suprapubik aspirasyon	Suprapubik aspirasyon
Üriner anomali (+) hasta	6 (%55)*	3 (%37,5)	1 (%16,6)	4 (%17,4)	5(%16,6)
Ultrasonografik anormallik	HN: 3 PE: 2 Taş: 1	HN: 1 PE: 2	HN: 0 PE: 0	HN: ? PE: ?	HN: 1 PE: 2
VUR	0**	1 (%12,5) 3-4.derece (U)	1 (%16,6) 3-4.derece (U)	1 ?	5 (%16,6) 2.derece (U): 2 3.derece (U): 2 4.derece (B): 1
Sintigrafik değişiklik	-	0***	1 (%16,6)	-	14 (%46,7)
DMSA çekim zamanı	-	3.ay	?	-	Akut dönem

İYE: idrar yolu enfeksiyonu, VUR: veziköüretal reflü, HN: hidronefroz, PE: pelviyektazi, U: unilateral, B: bilateral

#. Hastaların %32'sinde semptom vardı.

*: Ultrasonografi yapılabilen 11 hastaya göre oranlanmıştır.

** : 6 hastanın 4'üne VCUG yapılabilmiştir.

***: 8 hastanın 7'sine DMSA yapılabilmiştir.

sonrası üçüncü ayda sintigrafik çalışma yapılan yedisinin hiçbirinde patolojik bulguya rastlanmamıştır (15). Bu verilere bakılarak İYE’de bilirübinin koruyucu ya da renal hasarı artırıcı etkilerini hakkında net bir kanıya varmak mümkün görünmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, yenidoğanlarda İYE esnasında mevcut olan yüksek indirekt bilirübin düzeylerinin renal hasarı önlemede ya da hafifletmede bir rolü olup olmadığını araştırmaktır. Bu amaçla, piyelonefrit oluşturulan sıçanlara eksojen yolla indirekt bilirübin uygulayarak hiperbilirübineminin histopatolojik değişiklikler, fibrozisin immunohistokimyasal belirteçleri, apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem ve renal hasarın iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir.

3. GEREC VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Her biri 7 haftalık, ortalama ağırlıkları 200-300g olan, inbreeding yetiştirilmiş, yedinci jenerasyon (F7), 32 adet Wistar albino suşu dişi sıçan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanarak çalışmaya alındı. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve 12'şer saatlik gün ışığı/karanlık ortamında tutulup, standart pelet sıçan yemi ile beslendi ve suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı.

3.2. *Escherichia coli* (E. Coli) Solüsyonu

1mL'de 10^{10} P-pilili *Escherichia coli* suşu (ATCC 25922) içeren ve kullanılacağı gün logaritmik üreme fazında olan bakteri solüsyonu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'ndan temin edildi. Solüsyon, sıçanlara enjekte edileceği gün laboratuvardan taze olarak teslim alındı.

3.3. Antibiyotik Uygulaması

Sıçanlardan antibiyotik uygulanacak gruptakilere bakteri inokülasyonunun 3. gününden itibaren 5 gün süre ile 15mg/kg dozunda siprofloksasin günde iki kere intraperitoneal olarak uygulandı (96).

3.4. Bilirubin Solüsyonlarının Hazırlanması

0,1M NaOH ile 0,1M HCl solüsyonu kullanılarak pH 7,8 olacak şekilde hazırlanan ve 1mL'de 4 mg sentetik bilirubin içeren çözeltiler günlük olarak hazırlandı. Alüminyum folyo içinde muhafaza edilen çözeltiler, en kısa sürede 4mg/mL/100mg dozunda intraperitoneal olarak sıçanlara uygulandı (97).

Çalışma öncesi iki sıçana bu dozda bilirubin beş gün süre ile uygulandıktan sonra kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde total bilirubin düzeyleri 4,7mg/dL ve 5,1mg/dL saptandı. Bu sonuçlar, modelin alındığı kaynaktaki verilere (ortalama $6\pm 0,05\text{mg/dL}$) yakın bulundu (97).

3.5. Çalışma Protokolü

3.5.1. Piyelonefrit Modelinin Oluşturulması

İdrar analizleri yapılarak idrar kültürlerinde üremesi olmayan 32 sıçan çalışmaya alındı. Eter anestezisi altında iken tüm sıçanların karın ön duvarları önce %70'lik etanol, ardından batikon (BatticonTM) ile silinerek vertikal abdominal insizyon ile açıldı. Her iki böbrek parankimine günlük hazırlanan 10^{10} bakteri/mL *Escherichia coli* (ATCC 25922 suşu) içeren 0,1mL bakteri solüsyonu (1×10^9 kol) insülin enjektörü ile korteksten girilerek medullaya dek

parankimi zedelemekten yavaşça inoküle edildi. İnokülasyon sonrası 24. saatte tüm sıçanlardan idrar kültürleri alındı. Örneklerin tamamında *E. coli* ürediği için tüm sıçanlar çalışmaya alındı.

3.5.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Her birinde 8 sıçan bulunacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Gruplar aşağıdaki şekilde belirlendi ve özellikleri Tablo 2’de özetlendi.

Grup 1: Tedavisiz izlenecek grup

Grup 2: Sadece antibiyotik alan grup

Grup 3: Sadece bilirubin alan grup

Grup 4: Antibiyotik ve bilirubin alan grup

Tablo 2: Çalışmada oluşturulan gruplar ve uygulamalar.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
<i>E.coli</i>	+	+	+	+
Antibiyotik	-	+	-	+
Bilirubin	-	-	+	+

3.5.3. Çalışmanın Uygulama Süreci

Piyelonefrit oluşturulup tedavi verilmeyen sıçanlar (Grup 1) kontrol grubu olarak kabul edildi. Grup 2 ve Grup 4’teki sıçanlara belirlenen dozlarda antibiyotik bakteri inokülasyonunun 3. gününden itibaren 5 gün süre ile uygulandı. Grup 3 ve Grup 4’teki sıçanlara ise bakteri inokülasyonundan hemen önce başlamak üzere, toplam 8 gün (antibiyotik tedavi süresinin sonuna kadar) süre ile günde bir kere ve yukarıda belirtilen dozlarda intraperitoneal bilirubin uygulandı.

3.5.4. Sakrifikasyon ve Dokuların Dağılımı

Tüm gruplardaki sıçanların yarısı (n:4) çalışmanın 9. gününde (antibiyotik ve/veya bilirubin uygulamasının sonunda) sakrifiye edildi. Her iki böbrek çıkarıldı. Sol böbrekler sagittal olarak kesilip formaline konarak patolojik inceleme ve immunhistokimyasal çalışmalar için fikse edildi. Sağ böbrekler ise yine sagittal olarak kesilerek bir yarısını lipid peroksidasyonu ve anti-oksidan enzim düzeylerini çalışmak üzere -80°C’de dondurulurken,

diğer yarıları TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling) kiti ile apoptotik hücre sayılarını belirlemek üzere formalin ile fikse edildi. Gruplardaki sıçanların kalan yarısı ise 6 haftanın sonunda sakrifiye edildi. Çıkarılan böbrek dokuları sadece histopatolojik değerlendirme ve immunhistokimyasal çalışmalar için sagittal olarak kesilerek formalin ile fikse edildi. Dokular, çalışmayı yürütecek ilgili birimlere ulaştırıldı. Histopatolojik analiz ve immunohistokimyasal incelemeler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda, apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem ile ilgili değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.5.5. Histopatolojik, İmmunohistokimyasal, Apoptotik İncelemeler

Sakrifikasyon sonrası elde edilen böbrek dokuları, oda ısısında %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit sonrası rutin parafin takibine alındı. Parafine gömülerek bloklanan parçalardan Mikrotom (Leica RM2255) yardımıyla 4 µm kalınlığında seri kesitler alınarak örnekler lizini lamlara yerleştirildi. Kesitler, Hematoksilen-Eozin (H&E), Masson trikrom, Jones metenamin silver ile boyandı. İmmunohistokimyasal olarak ise TGF-β3, MMP-9, TIMP 1, CD34, TUNEL ve Caspase-3 antikoları ile boyama uygulandı. Hazırlanan preparatlar, histopatolojik analiz ve immunohistokimyasal incelemeler için Zeiss, Axioskop 2 model ışık mikroskopi ile incelendi. Apoptotik incelemeler ise Olympus BX-50 model ışık mikroskobu ve video kameradan (JVC TK-890E, Japan) oluşan görüntü analiz sistemi aracılığıyla bilgisayar ekranında kaydedilerek değerlendirildi.

3.5.5.1. Histopatolojik İncelemeler

Boyanan kesitlerde yapılan mikroskopik incelemelerde dört ana histopatolojik değişiklik tanımlandı:

- 1. İnterstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu (İİHİ):** İnterstisyel infiltrasyon gösteren hücre popülasyonu çeşitlilik göstermekteydi. Bunlar genellikle mononükleer hücrelerden oluşmakta iken, değişen oranlarda baskın hücre grubu olarak polimorfonükleer lökositlere (PMNL) de rastlanmaktaydı. Bu başlık altında inflamatuvar aktivite (İA: interstisyel alanda ve/veya tübüler lümende inflamasyonun akut bileşeninin de olduğunu gösteren PMNL miktarı) ve inflamatuvar hücre yoğunluğu (İHY: tüm inflamatuvar hücrelerin kesitlerdeki sayısal miktarına bağlı 'inflamasyon şiddeti') parametreleri değerlendirildi.
- 2. Tübüler dilatasyon** (non-spesifik tübüler hasarlanma bulgusu)

3. **Hiyalen silendir oluşumu** (non-spesifik tübüler hasarlanma bulgusu)

4. **İnterstisyel fibrozis-tübüler atrofi (İF/TA: skar gelişimi)**

İnterstisyel fibrozis değerlendirilirken Masson trikrom, tübüler atrofiyi değerlendirmede metenamin silver boyası kullanıldı. Diğer morfolojik değişiklikler ise en iyi H&E boyası ile değerlendirildi.

İA, İHY, tübüler dilatasyon ve hiyalen silendir oluşumu, oluşan hasarın derecesine göre 0-3 arasında semikantitatif olarak derecelendirildi:

0: hasar yok

1: hafif derecede hasar

2: orta derecede hasar

3: şiddetli hasar

İF/TA, parankimal dokunun tutulum oranına göre 0-3 arasında derecelendirildi:

0: hasar yok

1: parankimin %5'den az bir alanda tutulum

2: parankimin %5-10'luk bir kısmında tutulum

3: parankimin %10'undan fazlasında tutulum.

Ayrıca renal parankimde doku hasarını gösteren tüm bu bulguların (İİHİ, tübüler dilatasyon, hiyalen silendir, İF/TA) saptandığı alanlar her böbrek için yüzde alan olarak ifade edildi.

3.5.5.2. İmmunohistokimyasal İncelemeler

Kesitler, ksilen ile deparafinize edildikten sonra azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlandı. Ardından, MMP-9 antikorları için antijen açığa çıkarma amacı ile 10mM'lık sitrat tamponu içinde basınçlı yüksek ısıda ("düdüklü tencere") 3 dakika tutuldu. TIMP-1 boyaması için herhangi bir ön hazırlık yapılmasına gerek olmadı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacı ile 10 dakika %3 H₂O₂ solüsyonu (Merck, Germany) içinde bekletildi. Önce non-spesifik bağlanmayı engellemek için blokan antikorla 20 dakika, sonra primer antikorlarla 1,5 saat oda ısısında nemli bölmede inkübasyon uygulandı. Ön çalışmalarla optimal antikor konsantrasyonlarının MMP-9 (US Biological, Swampscott, MA) için 1/2500 ve TIMP-1 (Cell Application, Inc. San Diego, CA) için 1/500 olduğu görüldü. Primer antikorlar ile inkübasyon sonrasında biotin ile konjüge sekonder

antikor 30 dakika süre ile uygulandı. Üç kere PBS ile yıkandıktan sonra Histostain SP kit (Zymed, South San Francisco, CA, USA) kullanılarak avidin-biotin peroksidaz kompleksi ve ardından kromojen (3.3'-diamino-benzidine) tatbiki ile boyanmalar elde edildi. Tüm dokular için eşzamanlı olarak kontrol dokuları da boyandı. Kesitlerde pozitif olarak boyanan alanların yüzdesi belirlendi. Sonuçlar 0-3 arasında derecelendirildi:

0: boyanma yok,

1: fokal pozitiflik, %25'ten az alanda boyanma

2: orta derecede pozitiflik: %25-50 alanda boyanma

3: yaygın pozitiflik: %50'den fazla alanda boyanma

Üretici firma ile görüşmelere rağmen TGF- β 3 (Gene-tex, Inc. Irvine CA) ve CD 34 (Cell Applications, Inc San Diego, CA) kitleri ile boyama gerçekleştirilemedi

3.5.5.3. Apoptotik İncelemeler

3.5.5.3.1.TUNEL Tekniği ile Boyama

Bu teknik için *in situ* cell death detection TUNEL system peroksidaz kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Kesitler 15 dakika 20 μ g/mL proteinaz-K ile enkübe edildikten sonra, distile su ile 5 dakika yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ (Merck, Germany) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline Solution, DBS, Pleasanton, CA) ile yıkanan kesitler terminal deoksi transferaz enzimi ile 37°C de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dakika enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, Roche Diagnostics, Germany) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Harris hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk 3 değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL ile boyanan kesitlerde apoptotik hücre sayımı yapıldı. Her sıçan için üçer kesitte TUNEL-pozitif tübüler hücreler 40X büyütmede sayılarak alan başına düşen TUNEL-pozitif hücre oranı hesaplandı. TUNEL ile boyanma sadece erken dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda değerlendirildi.

3.5.5.3.2. Caspase-3 için İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Caspase-3 immunoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla sıçan için spesifik anti-caspase-3 (1:200; Neomarkers, Fremont, CA) antikoru kullanıldı. Kesitler, TUNEL yöntemi ile boyamadakine benzer şekilde sırası ile ksilol, alkol, Proteinaz K, H₂O₂ ve fosfat tamponu ile muamele edildikten sonra Caspase-3 antikoru ile bir gece +4°C'de enkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dk enkübe edildi. Sekonder antikor Vector Elite ABC kit (Vector Labs, Burlingame, CA) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi 0.02% diaminobenzidin kullanılarak görünür hale getirildi. Zemin boyaması Harris hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. Bu değerlendirme sadece erken dönemde sakrifiye edilen sıçanlarda yapıldı.

Sonuçlar anti-caspase-3 antikorları ile boyanma sonucuna göre skorlandı:

0: boyanma yok

1: hafif derecede boyanma

2: orta derecede boyanma

3: şiddetli boyanma

3.5.6. Oksidan/Anti-Oksidan Sistem Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

Erken dönemde sakrifiye edilen sıçanlardan alınan böbrek dokusu örnekleri oksidatif hasar göstergeleri olan malondialdehit (MDA) seviyeleri ile anti-oksidan enzimler olan glutatyon peroksidaz (GPX) ve süperoksit dismutazın (SOD) enzim aktivitelerinin ölçümü yapıldı. Doku MDA seviyeleri Bioxytech MDA-586 (OxisResearch, Portland, OR) kiti ile kolorimetrik yöntemle ölçüldü. GPX aktivitesi Bioxytech c-GPx 340 (OxisResearch, Portland, OR), SOD aktivitesi Bioxytech SOD-525 (OxisResearch, Portland, OR) kiti kullanılarak kolorimetrik yöntemle üretici firmanın yönergelerine göre ölçüldü.

3.5.7. Sonuçların İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tüm istatistiksel işlemler SPSS 11.0 for Windows istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edildi. Histopatolojik ya da immunhistoimyasal sonuçlar ki-kare testi ya da nonparametrik Kruskal-Wallis testini takiben Mann Whitney-U testi ile değerlendirildi. Bu değerlendirmeler yapılırken çalışmada 4 grup bulunduğundan $p < 0,0125$ ($p < 0,05 / 4$) değeri anlamlı kabul edildi. Doku hasarı yüzdeleri

karşılaştırmada ise one-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ düzeyi esas alındı.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Bu incelemeler yapılırken, hem erken hem de geç dönemde her bir gruba ait 4'er hayvan sakrifiye edilmiş, erken dönemde çıkarılan sol böbrekler sagittal planda kesilerek formaline konmuş, sağ böbrekler apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem çalışmaları için - 80°C'de dondurulmak üzere ilgili birime iletilmişti. Geç dönemde ise apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem çalışmaları planlanmadığı için her iki böbrek de sagittal planda kesilerek formalin ile sabitlenmişlerdi. Standardizasyon sağlamak amacı ile erken dönemde her bir böbreğin ayrılan her iki parçasından da kesitler alınarak sıçan başına 2 adet preparat değerlendirilirken; geç dönemde her iki böbreğin her iki parçasından da elde olunan sıçan başına 4 adet preparat değerlendirildi.

4.1.1 Erken Dönem Sonuçları

Bu döneme ait veriler ve bunların istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 3'te özetlenmiş olup, ilgili histopatolojik değişiklikler Şekil 5'te sunulmuştur.

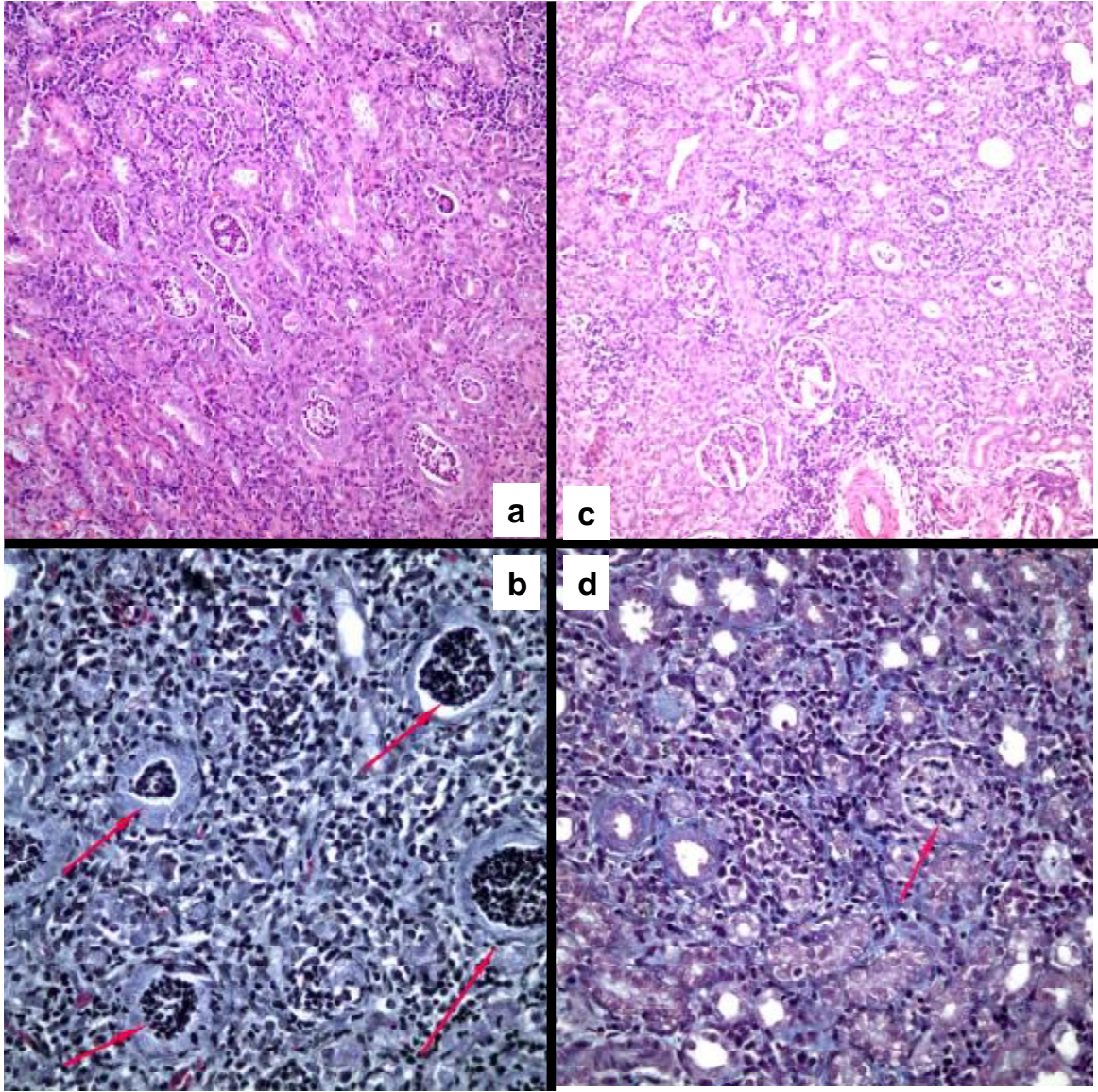
Tablo 3: Erken dönemde histopatolojik değişiklikler.

	İİHİ		Tübüler dilatasyon (0/1/2/3) ^a	Hyalen silendir (0/1/2/3) ^a	İF/TA (0/1/2/3) ^b	Doku hasarı yüzdesi (%)
	İA (0/1/2/3) ^a	İHY (0/1/2/3) ^a				
Gr 1	0/2/0/6	0/0/4/4	0/6/1/1	5/3/0/0	2/4/2/0	25,0±15,8
Gr 2	1/1/3/3	0/3/3/2	2/5/0/1	7/1/0/0	4/2/2/0	12,5±9,6
Gr 3	0/1/4/3	0/0/6/2	1/5/2/0	4/4/0/0	2/2/3/1	21,25±10,6
Gr 4	2/3/3/0	0/5/1/2	4/4/0/0	6/0/0/2	3/2/3/0	12,0±10,2
<i>p</i>	0,032*	0,113	0,078	0,520	0,633	0,090

*İİHİ: İnterstiyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu, İA: İnflamatuvar aktivite, İHY: İnflamatuvar hücre yoğunluğu, İF/TA: İnterstiyel fibrozis/ tübüler atrofi. Her bir sıçan için 2 kesit değerlendirildiğinden, her grupta toplam n:8 olarak izlenmektedir. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. ^a: Oluşan hasarın derecesine göre” 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli” şeklinde sınıflanan parametrelerin her grup başına değerlendirilen 8 kesitte sayı olarak karşılıkları. ^b: İF/TA parametresinin oluşan hasara göre”0: yok, 1: < %5 alanda tutulum, 2: %5-10'luk alanda tutulum, 3: > %10 alanda tutulum” şeklinde sınıflamasının her grup başına değerlendirilen 8 kesitte sayı olarak karşılıkları. *:p<0,05*

4.1.1.1. İnterstiyel İnflamatuvar Hücre İnfiltrasyonu

Bu başlık altında incelenen parametreler (İA ve İHY) değerlendirilirken Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Sadece inflamatuvar aktivitenin gruplar arasında anlamlı derecede farklı olduğu gözlemlendi (p: 0,032). Bu farklılığın hangi gruptan kaynaklandığına dair yapılan ileri testlerde, aktivitenin Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü (p:0,011, Tablo 4).



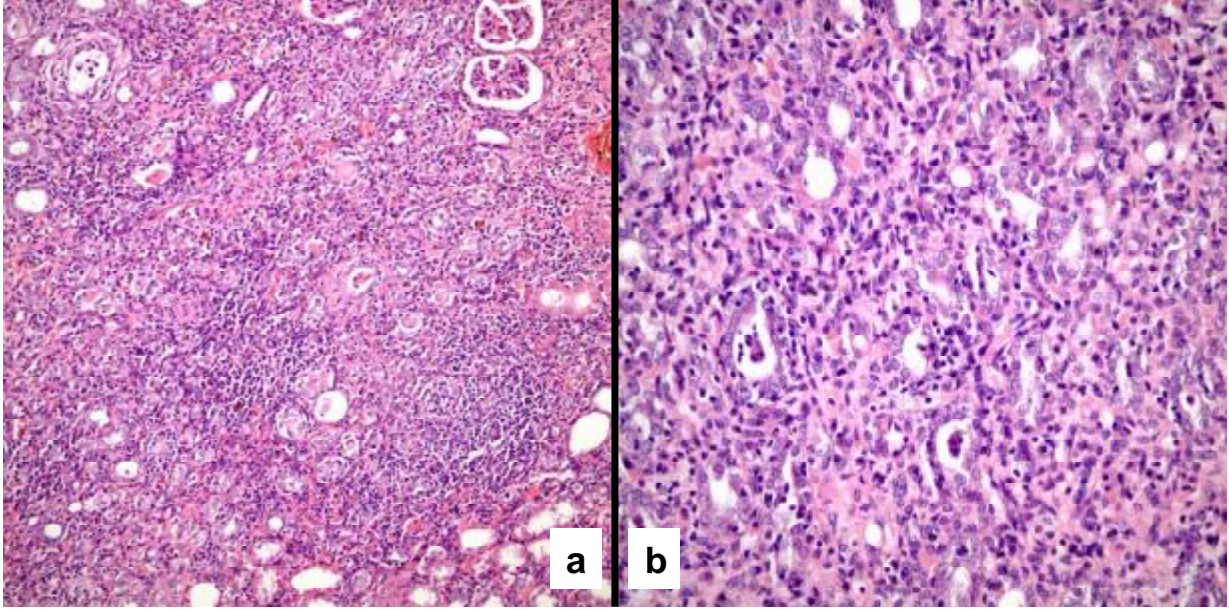
Şekil 5: Erken dönemde Grup 1 ve 4 arasında İA'nın karşılaştırılması. Grup 1'de kalabalık PMNL grupları ile dolu çok sayıda tübül izlenirken (a: H&E x 200; b: PAMS X 400), Grup 4'te inflamasyonun aktivitesi daha düşük olup az sayıda tübülde PMNL kümesine rastlanmaktadır (c: H&E x 200; d: PAMS X 400).

Tablo 4: Erken dönemde inflamatuvar aktivitedeki anlamlı farklılığın gruplar arasında değerlendirilmesi.

Karşılaştırılan Gruplar	İA <i>p</i>
1-2 à	0,244
1-3 à	0,384
1-4 à	0,011*
2-3 à	0,735
2-4 à	0,080
3-4 à	0,017

İA: İnflamatuvar aktivite, *: $p < 0,0125$.

Bu istatistiksel anlamlılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını bulmaya yönelik yapılan ileri testlerde İA'nın Grup 4'te grup 1'e göre anlamlı derecede azalmış olduğu, İHY'nin Grup 3'te Grup 1 ve Grup 4'e göre anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü (Tablo 6).



Şekil 6: Geç dönemde Grup 1 ve 3 arasında İHY'nin karşılaştırılması. Grup 3'te Grup 1'e göre belirgin düşük İHY izlenmektedir (a:Grup 1, H-E x 100; b: Grup 3, H-E X 200).

Tablo 6: Geç dönemde inflamatuvar aktivite ve interstisyel tutulumda anlamlı farklılığa yol açan gruplar.

Karşılaştırılan Gruplar	İA <i>p</i>	İHY <i>p</i>	İF/TA <i>p</i>
1-2 à	0,186	0,733	0,676
1-3 à	0,018	0,003*	0,052
1-4 à	0,003*	0,831	0,006*
2-3 à	0,151	0,013	0,012*
2-4 à	0,024	0,615	0,012*
3-4 à	0,373	0,006*	0,293

İA: İnflamatuvar aktivite, İHY: İnflamatuvar hücre yoğunluğu, İF/TA: İnterstisyel fibrozis/tübüler atrofi. *: $p < 0,0125$

4.1.2.2. Tübüler Dilatasyon

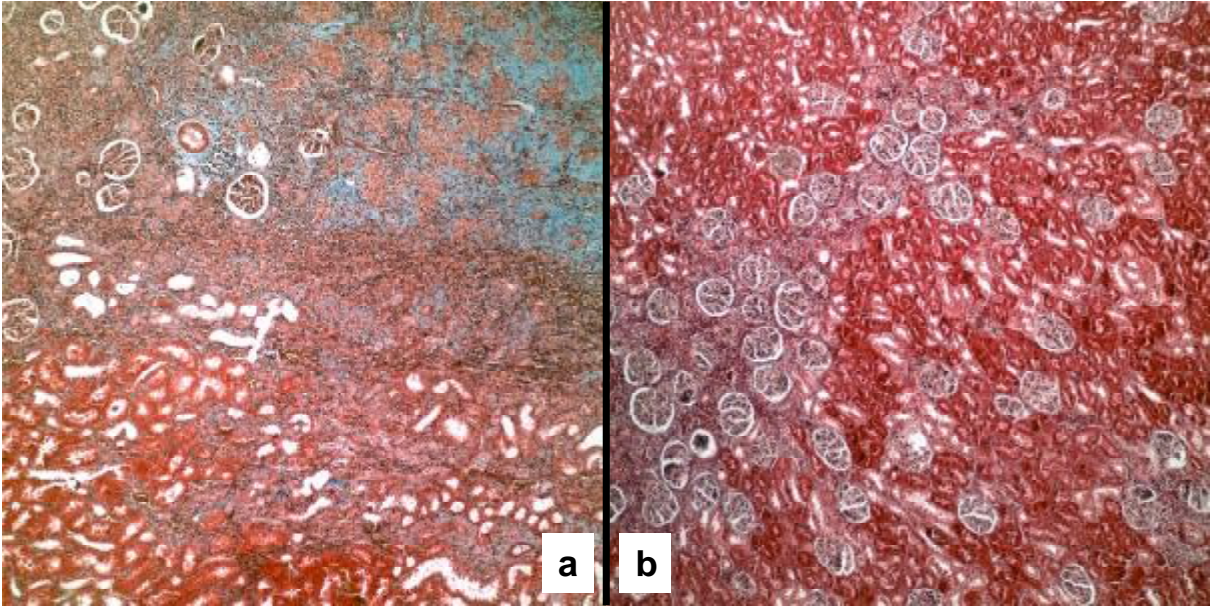
Gruplar arasında anlamlı farka rastlanmadı ($p: 0,156$).

4.1.2.3. Hyalen Silendir

Gruplar arasında anlamlı farka rastlanmadı (p: 0,907).

4.1.2.4. İnterstisyel Fibrozis/Tübüler Atrofi

İF/TA geç dönemde Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildiğine gruplar arasında anlamlı olarak farklı olduğu görüldü (p:0,002). Farkın hangi gruplar arasında olduğu ikili karşılaştırmalar ile değerlendirildiğinde İF/TA bulgusunun Grup 4'te grup 1 ve Grup 2'ye göre ve Grup 3'te Grup 2'ye göre anlamlı derecede azalmış olduğu görüldü (Tablo 6, Şekil 7).



Şekil 7: Geç dönemde Grup 2 ve 4 arasında İF/TA'nın karşılaştırılması. Grup 1'de Grup 4'e göre belirgin derecede düşük İF/TA izlenmektedir (a:Grup 1, MT x 100; b: Grup 4, MT x 100).

4.1.2.5. Doku hasarı yüzdesi

Gruplar arasında anlamlı farka rastlanmadı (p: 0,085).

4.2. İmmunohistokimyasal İnceleme Sonuçları

MMP-9 ve TIMP-1 düzey değerlendirmeleri ise hem erken hem de geç dönemler için yapıldı. MMP-9'un böbreklerde proksimal ve distal tübül epitel hücreleri ile endotel tarafından eksprese edildiği görüldü. En kuvvetli ekspresyon proksimal tübüllerin S3 segmentindeydi. İnflamasyon alanlarında boyanmanın şiddetinin düştüğü ve kaybolduğu gözlemlendi. TIMP-1 ekspresyonu ise zedelenme alanından uzaktaki peritübüler kapillerler,

glomerüller ve vaza rektadaki normal endotel hücrelerinde izlendi. TIMP-1 için immün reaksiyon inflamasyon alanlarında kaybolmakta veya azalmakta idi. Ek olarak plazma hücreleri ve akut inflamasyona yakın nadir proksimal ve distal tübüllerde de boyanma saptandı.

4.2.1. Erken Dönem Sonuçları

Gruplar arasında MMP-9 ve TIMP-1 ekspresyon skorları açısından anlamlı farka rastlanmadı (sırası ile p: 0,282, p: 0,244, Tablo 7).

4.2.2. Geç Dönem Sonuçları

Gruplar arasında MMP-9 ekspresyon dereceleri açısından anlamlı farka rastlanmadı (p: 0,471, Tablo 7, Şekil 8). TIMP-1 ekspresyonunun gruplar arasında farklı olduğu (0,007) ve bu farkın Grup 3'teki boyanmanın Grup 2'ye göre anlamlı derecede azalmış olmasından kaynaklandığı görüldü (Tablo 7 ve 8, Şekil 9).

Tablo 7: Erken ve geç dönemde TIMP-1 ve MMP-9'un gruplar arasındaki dağılımı.

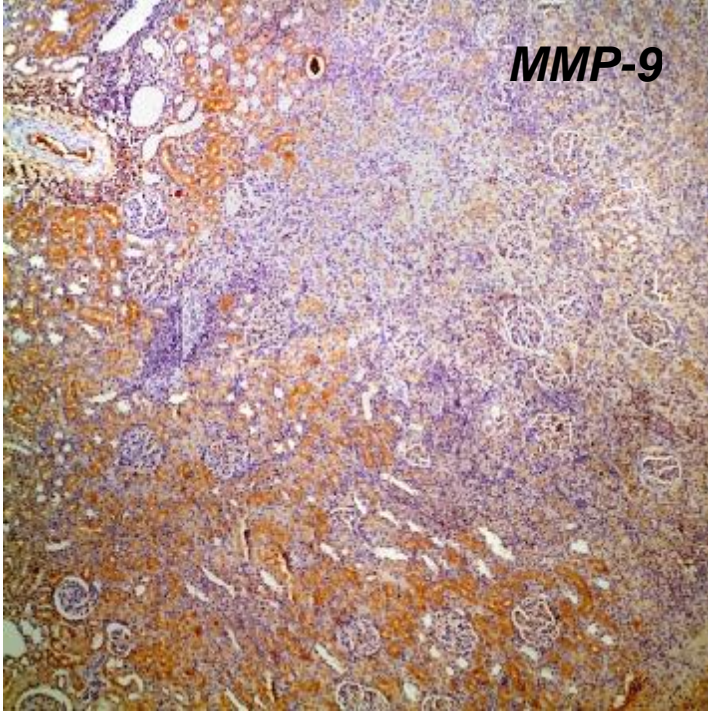
	Erken dönem		Geç dönem	
	MMP-9 (0/1/2/3) ^a	TIMP-1 (0/1/2/3) ^a	MMP-9 (0/1/2/3) ^a	TIMP-1 (0/1/2/3) ^a
Gr 1	0/3/2/3	1/2/3/2	4/5/5/2	7/4/5/0
Gr 2	1/3/4/0	1/3/4/0	1/9/5/1	4/6/6/0
Gr 3	0/1/6/1	1/6/1/0	3/10/3/0	13/3/0/0
Gr 4	0/2/3/3	0/4/4/0	5/6/5/0	6/7/2/1
<i>P</i>	0,282	0,244	0,471	0,007*

^a: Boyanma oranlarına göre " 0: yok, 1:<%25 alanda boyanma, 2:%25-50 alanda boyanma, 3:>%50 alanda boyanma" şeklinde sınıflanan parametrelerin, grup başına erken dönemde 8,geç dönemde ise 16 kesitte sayı olarak karşılıkları. *: p<0,05

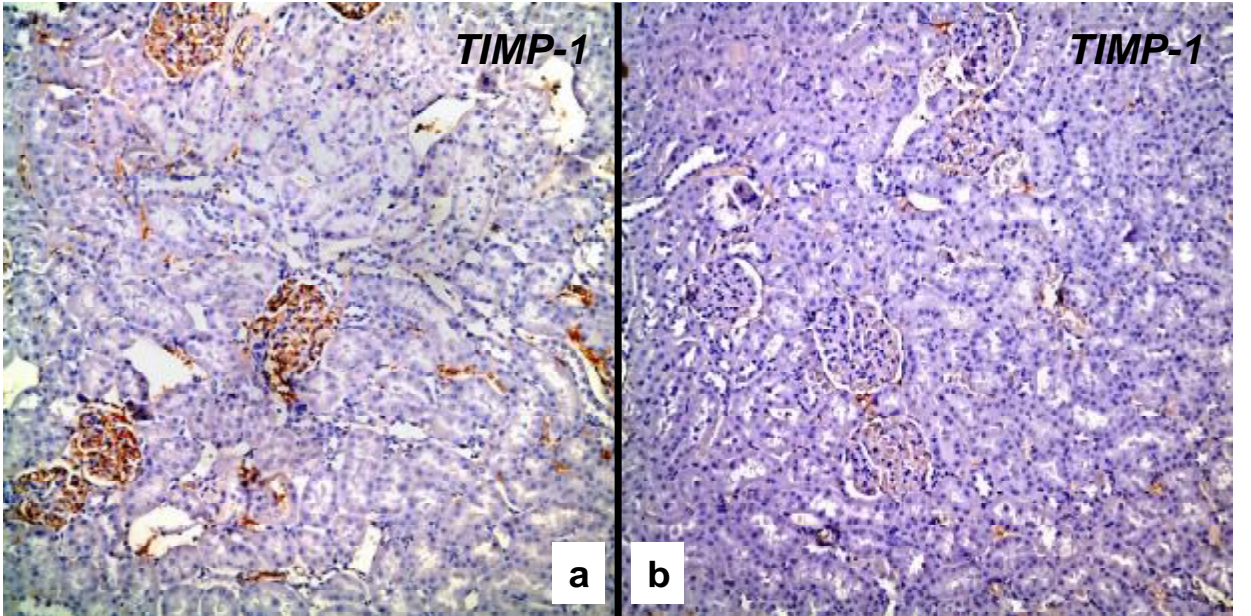
Tablo 8: Geç dönemde glomerüler TIMP-1 antikoru ile boyanma sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Gruplar	TIMP-1 antikoru ile boyanma	<i>p</i>
1-2 à		0,401
1-3 à		0,015
1-4 à		0,968
2-3 à		0,001*
2-4 à		0,317
3-4 à		0,021

*:p<0,0125



Şekil 8: Geç dönemde Grup 1'de MMP-9 ekspresyonu. İnflamasyon bölgesinde MMP-9 ekspresyonunun olduğu izlenmektedir (anti-MMP-9 Ab X 100).

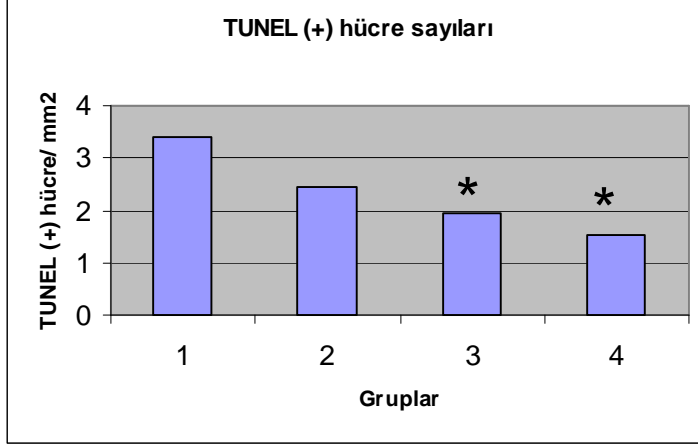


Şekil 9: Geç dönemde Grup 2 ve 3 arasında TIMP-1 ekspresyonunun karşılaştırılması. Grup 3'de Grup 2'ye göre daha zayıf bir TIMP-1 ekspresyonu izlenmektedir. (a: Grup 2, anti-TIMP-1 Ab x 100; b: Grup 3, anti-TIMP-1 Ab X 100).

4.3. Apoptotik İnceleme Sonuçları

4.3.1. TUNEL Tekniği ile Boyanma Sonuçları

TUNEL ile boyanan apoptotik hücre oranlarının Grup 3 ve Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı miktarda azalmış olduğu izlendi ($p < 0.01$) (Şekil 10).



Şekil 10: Gruplara ait TUNEL (+) hücrelerin dağılımı [*Grup 3 ve 4'e ait ortalama TUNEL (+) hücre sayıları Grup 1'e ait ortalama TUNEL (+) hücre sayılarına göre düşüktür ($p < 0.01$)].

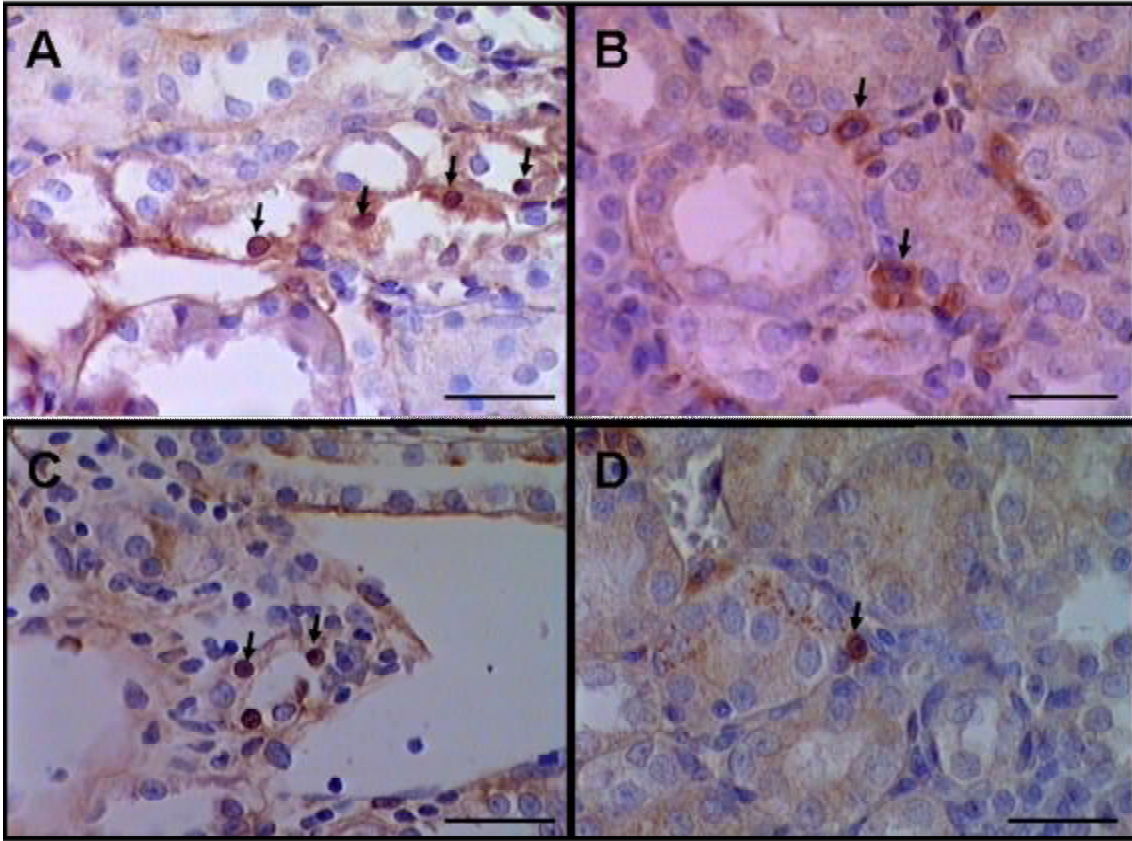
4.3.2. Caspase-3 için İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi ile Değerlendirme Sonuçları

Deneye alınan her sıçan başına birer kesit, immunohistokimyasal olarak anti-caspase-3 antikorları ile boyanarak değerlendirildi (Şekil 11). Gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p: 0,021$, Tablo 9). Ancak, takiben ikili gruplar arasındaki farklılık $p < 0,0125$ ($0,05/4$) değeri anlamlı kabul edilerek değerlendirildiğinde anlamlı bir farka rastlanmadı (Tablo 10). Sonuç olarak, anti-caspase-3 antikorları ile boyanma oranlarının Grup 1'den Grup 4'e doğru azalma gösterdiği, gruplar arası farka en belirgin Grup 1 ve Grup 4 arasında olduğu (Şekil 12), ancak p değerindeki düzeltme nedeni ile bu farkın istatistiksel olarak ispatlanamadığı düşünüldü.

Tablo 9: Erken dönemde Caspase-3 antikoru ile boyanma sonuçları

Caspase-3 antikoru ile boyanma (0/1/2/3) ^a	
Gr 1	0/0/1/3
Gr 2	0/0/2/2
Gr 3	0/2/2/0
Gr 4	0/3/1/0
<i>p</i>	0,021

^a: Oluşan hasarın derecesine göre” 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli” şeklinde sınıflanan parametrelerin her sıçan başına değerlendirilen tek kesitte sayı olarak karşılıkları *: $p < 0,05$

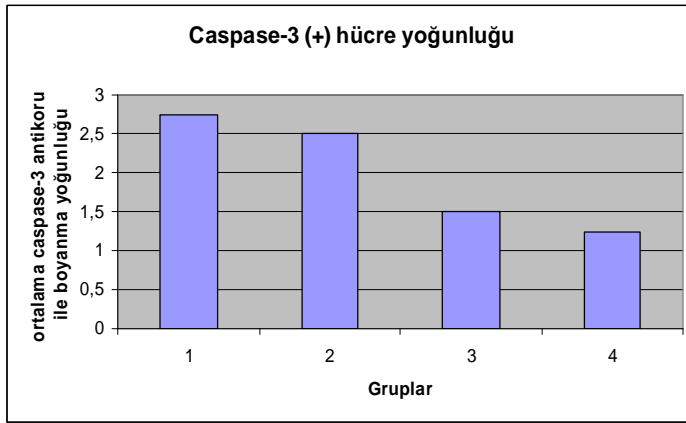


Şekil 11. Caspase-3 için immunohistokimya uygulanan böbrek kesitleri. Caspase-3 immunreaktivitesi 1. ve 2. gruplarda (A, B) yüksek, 3. ve 4. gruplarda (C, D) azalmış olarak izlenmektedir (Bar= 30 µm)

Tablo 10: Erken dönemde Caspase-3 antikoruna ile boyanma sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Gruplar	Caspase-3 ile boyanma
1-2	0,495
1-3	0,032
1-4	0,022
2-3	0,061
2-4	0,032
3-4	0,495

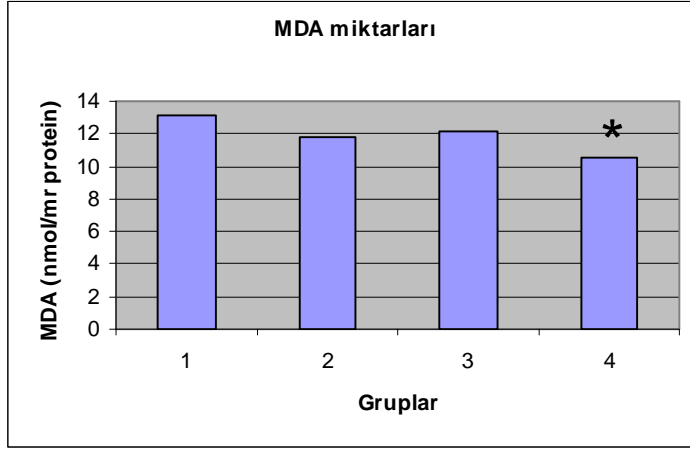
*: $p < 0,0125$ anlamlı kabul edildi.



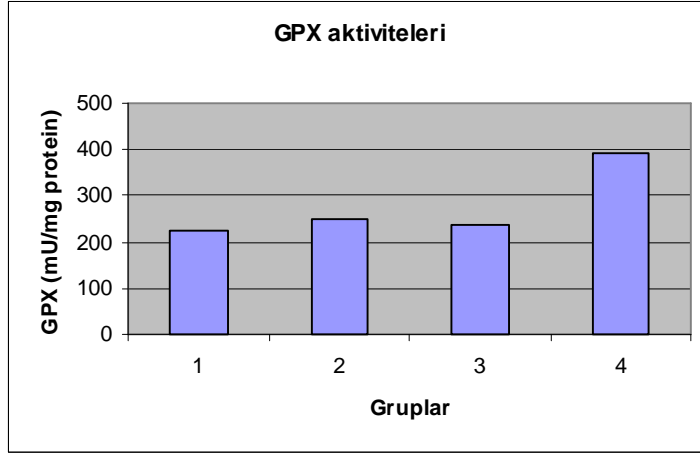
Şekil 12: Gruplara ait Caspase-3 (+) hücrelerin yoğunluğu

4.4. Oksidan/Antioksidan Sistem Aktivite Sonuçları

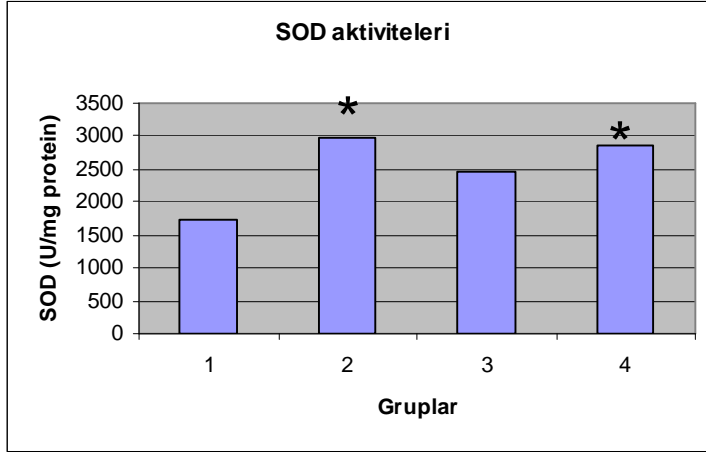
MDA seviyelerinin Sadece Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı olarak azalmış olduğu ($p < 0,05$), GPX düzeylerinin yine Grup 4 'te Grup 1'e göre yüksek izlendiği, ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p: 0,383$) ve SOD aktivitesinin Grup 2 ve Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi (her ikisi için de $p < 0,05$) (Şekil 13-15).



Şekil 13: Gruplara ait MDA değerlerinin dağılımı [*: Grup 4'e ait ortalama MDA düzeyleri Grup 1'e ait değerlere göre anlamlı derecede düşük ($p < 0,05$)].



Şekil 14: Gruplara ait GPX aktivitelerinin dağılımı. [Grup 4'te GPX aktivitesi belirgin olarak yüksek izlenmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$)].



Şekil 15: Gruplara ait SOD aktivitelerinin dağılımı [*: Grup 2 ve 4'e ait ortalama SOD aktiviteleri Grup 1'e göre anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,05$)].

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, sıçanlarda oluşturulan deneysel piyelonefit modelinde eksojen indirekt bilirubin uygulamasının renal doku üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Araştırma konusu olarak bilirubinun tercih edilme nedeni ise önceleri toksik etkileri üzerinde durulurken, son yıllarda anti-oksidan ve sitoprotektif özellikleri ön plana çıkan bir molekül olması, renoprotektif etkileri akut ve kronik böbrek hasarında pek çok kez gösterilmiş olan HO-1 enzim indüksiyonunun son ürünü olması ve insanlarda yenidoğan döneminde sıklıkla normalden yüksek düzeylerde bulunmasıdır (10,13,83,84).

Yenidoğanların %60'ında hayatlarının ilk haftasında klinik olarak sarılık gözlenmektedir (83,84). Bu bebeklerin çok azında altta yatan hemolitik hastalık, metabolik ya da endokrin bozukluk, karaciğerde enzim eksiklikleri ya da bakteriyemi/sepsis gibi önemli bir hastalığa rastlandığından bu dönemdeki sarılık "fizyolojik" olarak kabul edilmektedir (15,83,84). Günümüzde İYE'nin açıklanamayan ya da uzamış (miad bebeklerde ikinci haftadan, prematürelere üçünü haftadan sonra devam eden) sarılıklar ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir (14-16). Yenidoğan dönemindeki İYE'de klinik bulgular ateş, huzursuzluk, kusma, beslenmeyi reddetme, diyare, büyüme geriliği, letarji, oligüri ya da poliüri şeklinde anormal idrar paterni, kötü kokulu idrar ve sarılık gibi özgün olmayan bulgular içerdiğinden tanı koymak güçtür (91,98). Sarılık ilk bulgulardan biri olabileceği için de uzamış sarılığı olan hastaların rutin olarak İYE açısından araştırılmaları önerilmektedir (14-16,91).

Sekiz haftadan küçük ve febril infantlarda İYE oranı %5-11 (88-90) bulunurken, sekiz haftadan küçük asemptomatik ve afebril farklı yaş grubundaki sarılıklı infantlarda bu oran %6-8 bulunmuştur (14,15,91). Asemptomatik ve sarılığı olmayan yenidoğanlarda İYE insidansı %0,7-1,4 olarak bildirilmiştir (99,100). Sonuç olarak, hiperbilirubinemi olan yenidoğanlarda semptomsuz İYE oranı febril hastalardaki İYE oranı ile benzerdir ve bu veriler sarılıklı yenidoğanların İYE açısından değerlendirilmesinin gerekçesini oluşturur.

Birliktelikleri sık görülmekle beraber, İYE ve hiperbilirubinemi arasındaki ilişki halen tam olarak açıklanamamıştır. Xinias ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, pozitif kortikal DMSA bulgusu olan yenidoğanların bilirubin düzeylerinin, bulgusu olmayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum, kortikal değişiklikleri olan hastaların bakteriyemi miktarının daha yüksek olması ve şiddetli enfeksiyonun daha yoğun bir hemolize yol açması ile ilişkilendirilmiştir (91). Ayrıca, bilirubinun HO-1 enzim aktivitesi sonucu ortaya çıktığı ve enzim aktivitesinin enfeksiyon ile uyarıldığı göz önüne alındığında, yüksek bilirubin düzeyinin enfeksiyonun şiddetini yansıttığı düşünülebilir. Öte yandan, bilirubinun *in*

vitro koşullarda mesane ve üreter düz kaslarında dilatasyona yol açtığı gösterilmiş ve bu durumun üriner staza yol açarak İYE'ye yatkınlık yaratabileceği ileri sürülmüştür (101). Kısacası, İYE ile birlikte görülen hiperbilirübineminin sebep mi sonuç mu olduğu halen açığa kavuşturulamamıştır.

Hayatın ilk aylarında İYE'ye yatkınlığın arttığı bilinmektedir. Bunun nedeninin bağışıklık sistemindeki yetersizlik olduğu ileri sürülmüştür (102). Renal hasarlanma riskinin yaş ile ters orantılı olarak değiştiği ve daha küçük yaşlardaki hastaların böbreklerinin renal hasara daha yatkın olduğu bilinmektedir (102,103). İYE tanısı koymak, hastaların asemptomatik olması ya da huzursuzluk, kusma, beslenme bozukluğu ya da ateş gibi özgün olmayan belirtiler göstermesi, uygun idrar örneği elde etmek için suprapubik aspirasyon ya da kateter kullanımı gibi invazif işlemler gerektirmesi nedeni ile zordur (91). Ayrıca, bu yaş grubunda tübüler immatürite nedeni ile akut dönemde renal parankimal etkilenmenin DMSA ile doğrulanması da güçtür. Bu nedenlerle, hiperbilirübinemisi olan ve olmayan yenidoğanlarda İYE'nin böbrek dokusu üzerine etkilerini karşılaştıran bir çalışma planlanması güçtür ve literatürde henüz böyle bir çalışma bulunmamaktadır. Sonuç olarak, hiperbilirübineminin İYE ilişkili renal doku hasarı üzerine etkileri bilinmemektedir.

Bu çalışma, deneysel bir modelde hiperbilirübineminin İYE ilişkili renal hasar üzerine etkilerini incelemektedir. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda, daha çok bilirübinin transplantasyon esnasında böbreğin maruz kaldığı hasarı temsil eden İRH modellerindeki etkileri çalışılmıştır (10,11,13). Mevcut çalışma, İRH'nin piyelonefritin bilinen bir komponenti olması (67,68), önceki çalışmalarda bilirübinin İRH üzerine olumlu etkilerinin gösterilmiş olması (13), bilirubinin yenidoğanlardaki bilinen potansiyel anti-oksidan özellikleri (6) ve yenidoğanlardaki İYE ve hiperbilirübinemi birlikteliğinin sıklığı (14-16) göz önüne alınarak planlanmıştır. Çalışmamızın diğerlerinden farkı, bilirübinin piyelonefrite bağlı histopatolojik hasar, fibrozis belirleyicileri, apoptoz ve oksidan/anti-oksidan sistem üzerine etkilerinin de araştırılmış olmasıdır.

Bu amaçla, daha önceki çalışmalarımızda kullanılmış olan deneysel piyelonefrit modeli ve antibiyotik tedavi şeması kullanılmıştır (96,104). Bu metod ile oluşturulan piyelonefrit ve renal skarın, insanlardaki reflü nefropatiyi tamamiyle taklit ettiği ve assendan yol ile oluşan enfeksiyon ile aynı mikroskopik bulgulara sahip olduğu bildirilmiştir (105,106). Hiperbilirübinemi ise Vitek ve ark. tarafından oluşturulan modele uygun olarak intraperitoneal indirekt bilirubin enjeksiyonları ile oluşturulmuştur (97). Daha önce yapılan çalışmalarda, perfüzyon sıvısı ya da IV enjeksiyon için kullanılan bilirubin dozları geniş bir

aralığa yayılmış olup, uygun ve etkin net bir doz bildirilmemiştir. Çalışmaların çoğu kısa süreli İRH'yi değerlendiren çalışmalar olup tek seferlik perfüzyon ya da IV uygulamalardan ibarettir (10,11,13). Çalışmamızda akut piyelonefrit modeli geliştirilen sıçanlarda inflamasyon, oksidan etkiler, renal skar gibi daha uzun süreli etkiler değerlendirileceğinden intraperitoneal yol ile 8 gün bilirubin kullanılması tercih edilmiş ve bu amaçla eksojen indirekt bilirubin verilerek hiperbilirubinemik etkinin değerlendirilmesi planlanmıştır. Çalışmanın UDPGT enzimi defekti bulunan hiperbilirubinemik *Gunn* tipi sıçanlar üzerinde yapılması, özellikle hiperbilirubineminin yenidoğandaki İYE üzerindeki etkilerinin araştırılması için daha uygun bir seçenek idiyse de, bu tür sıçanlara ulaşılması mümkün olmadığından, uzun süreli intraperitoneal bilirubin uygulama metodu kullanılmıştır (97). Çalışmamızda yenidoğan ratlar yerine insanlardaki adolesan yaş grubuna uyan 6-8 haftalık ratların kullanılma nedeni ise, yenidoğan yaş grubuna uyan 1 haftalık ratlarda batının açılması işleminin teknik olarak güç olması ve uygun intrarenal bakteri inokülasyonu modelinin bulunamamasıdır.

Bu çalışmanın sonucunda, akut dönemdeki inflamasyonu baskılamada sadece antibiyotik ya da bilirubin kullanımının yeterli olmadığı, ancak antibiyotik+bilirubin uygulamasının inflamatuvar aktiviteyi kontrol (piyelonefrit) grubuna göre anlamlı derecede azalttığı izlenmiştir. Geç dönemde ise inflamatuvar aktivitenin yine antibiyotik+bilirubin uygulaması ile kontrol grubuna göre azaldığı, inflamatuvar hücre yoğunluğunun ise bilirubin alan grupta, kontrol grubu ve antibiyotik+bilirubin alan gruplara göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Özellikle geç dönemde skarı temsil eden İF/TA bulgusunun antibiyotik+bilirubin alan grupta kontrol grubu ve antibiyotik alan gruba göre anlamlı derecede azaldığı, bilirubin alan grupta ise antibiyotik grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Geç dönemdeki bulgulardan fibrozisin immunohistokimyasal boyanmalara yansımaları olan TIMP-1 ile boyanma ise sadece bilirubin alan grupta antibiyotik alan gruba göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda, sadece antibiyotik alan grup ile kontrol (piyelonefrit) grubu arasında erken ya da geç dönemlerde fark çıkmaması önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Haraoka ve ark. yaptıkları çalışmada, ancak bakteri maruziyeti sonrası 4. saatte verilen antibiyotiğin skar oluşumunu engellediği, 72. saatte verilen antibiyotiğin ise anlamlı fark yaratmadığı gösterilmiştir (107). Yağmurlu ve ark.'nın çalışmasında da antibiyotik alan grup ile piyelonefrit grubu arasında inflamasyon ve skar belirteçleri açısından anlamlı farka rastlanmamıştır (106). Antibiyotik etkisinin değerlendirildiği modellerde antibiyotiklerin 72.

saatte uygulanmaların nedeni, enfeksiyonun doğal seyri esnasında dokuda gözlenecek değişiklikler henüz ortaya çıkmadan bakteri eradikasyonunu önlemektir (96,106,108-110).

Böbrek dokusuna eksojen bilirubin uygulanarak gerçekleştirilen diğer çalışmalarda benzer akut inflamasyon parametreleri kullanılmamış olduğu için karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak, bilirubinün geç dönemde saptanan fibrozis üzerine koruyucu etkileri, renal tübüler hücrelerde TGF- β 1 aracılı fibronektin ekspresyonunu (fibrotik dokuda yüksek düzeyde saptanan bir ekstrasellüler matriks proteini) azaltarak fibrozisi önlediğini bildiren çalışma sonuçları ile örtüşmektedir (111).

Apoptozun değerlendirmesinde, bilirubin ve antibiyotik+bilirubin alan gruplarda kontrol grubuna göre TUNEL yöntemi ile apoptozda anlamlı azalma kaydedilmiş, caspase-3 antikoruna ile boyanmada ise gruplar arası farkın hangi gruptan kaynaklandığı değerlendirilememiştir. Bilirubin uygulaması esnasında apoptozun benzer yöntemlerle değerlendirildiği başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, apoptozun ışık mikroskopisinde yoğun eozinofilik, küçülmüş stoplazma ve nükleer periferik bölgede yoğun kromatin içeren çekirdeklerin varlığı ile tanımlandığı bir çalışmada, sisplatin toksisitesine maruz kalan hiperbilirubinemik homozigot *Gunn rat* tipi sıçanlarda apoptozun belirgin olarak azaldığı gözlenmiştir (41).

Oksidan/anti-oksidan sistem değerlendirmelerinde, oksidasyon son ürünlerini temsil eden MDA düzeylerinde antibiyotik+bilirubin alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı azalma, anti-oksidan sistemi temsil eden SOD düzeyinde antibiyotik ve antibiyotik+bilirubin alan gruplarda anlamlı artma olduğu gözlenmiştir. Aynı ekip tarafından yapılan farklı İRH modellerinde uygulanan intravenöz veya *in vitro* ortamda farklı konsantrasyonlarda uygulanan bilirubinün lipid peroksidasyonunu anlamlı derecede azaltmadığı gösterilmiştir (10,13). Ancak araştırmacılar yine de renal fonksiyonlar ve histolojik bulgular üzerinde buldukları olumlu etkilerin bilirubinün anti-oksidan etkileri ile ilişkili olduğunu savunmuşlardır. Çalışmalarında bu bulguların gösterilememiş olmalarını ise böbrek dokularının elde edilmesindeki gecikmeye bağlamışlar, bu gecikmenin tedavi ve kontrol grupları arasındaki farkın kaybolmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdir (13).

Tüm veriler bir arada değerlendirildiğinde, bilirubinün piyelonefrit esnasında ortaya çıkan erken ve geç inflamasyon aktivitesi, skar gelişimi, apoptoz, oksidan ve anti-oksidan sistem üzerine antibiyotiğin etkilerini potansiyelize edici özellik gösterdiği, geç dönemdeki inflamatuvar hücre yoğunluğu ve apoptoz üzerine ise tek başına da faydalı olabildiği anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, sıçanlarda oluşturulan piyelonefrit modelinde antibiyotiğe ek olarak uygulanan eksojen bilirubin renoprotektif etkiler sağlamaktadır. Bu durum, yenidoğan döneminde İYE ile birlikte saptanan hiperbilirubineminin, tanı için uyarıcı olup erken tedaviye olanak sağlamasının yanı sıra, İYE ve renal hasara daha yatkın olan yenidoğan böbreği için koruyucu bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUCLAR

Deneyssel olarak piyelonefrit oluşturulan sıçanlar 4 gruba ayrılarak ilk gruba tedavi verilmemiş (kontrol), ikinci gruba sadece antibiyotik verilmiş, üçüncü gruba yalnızca bilirübin uygulanmış, dördüncü gruba ise antibiyotik+bilirübin uygulanmıştır. Sonrasında 4 grup belirlenen parametrelere göre karşılaştırıldığında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Piyelonefrit sonrası antibiyotiğe ek olarak uygulanan bilirübin, kontrol grubuna göre erken ve geç dönemde inflamatuvar aktiviteyi, geç dönemde skar gelişimini ve apoptozu azaltır ve anlamlı anti-oksidan etki sağlar.
2. Tek başına bilirübin uygulaması ise geç dönemde inflamatuvar hücre yoğunluğunu kontrol ve antibiyotik+bilirübin gruplarına göre azaltır. Geç dönemde skar gelişimi ve TIMP-1 ile boyanmayı antibiyotik grubuna göre azaltır. Kontrol grubuna göre apoptozu azaltırken anti-oksidan enzim (SOD) aktivitesini arttırır.

Sonuç olarak bilirübin, antibiyotik ile birlikte uygulandığında piyelonefrit ilişkili renal hasar üzerine daha belirgin koruyucu etkiler sağlamakta, tek başına kullanıldığında ise etkileri sadece inflamasyon şiddeti (geç dönem) ve apoptozu azaltmak ile sınırlı kalmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Cashore WJ. The neurotoxicity of bilirubin. *Clin Perinatol* 1990;17:437-47.
2. Hansen TWR, Bratlid D. Bilirubin and brain toxicity. *Acta Paediatr Scand* 1986;75:513-22.
3. Doré S, Takahashi M, Ferris CD, Zakhary R ve ark. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2445-50.
4. Marilena G. New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. *Biochem Mol Med* 1997;61:136-42.
5. Stocker R, Yamato Y, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an anti-oxidant of possible physiologic importance. *Science* 1987;235:1043-6.
6. Dennery PA, Mc Donagh AF, Spitz DR, Rodgers PA ve ark. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* 1995;19:395-404.
7. Belanger S, Lavoie JC, Chessex P. Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants. *Biol Neonate* 1997;71:233-8.
8. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC ve ark. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:250-5.
9. Temme EH, Zhang J, Schouten EG, Kesteloot H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes Control* 2001;12:887-94.
10. Kirkby KA, Adin CA. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F563-71.
11. Demirogullari B, Ekingen G, Guz G, Bukan N ve ark. A comparative study of the effects of hemin and bilirubin on bilateral renal ischemia reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2006;103:e1-5.
12. Chen M, Tofighi R, Bao W, Aspevall O ve ark. Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins. *Pediatr Nephrol* 2006;21:382-9.
13. Adin CA, Croker BP, Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F778-84.
14. Garcia FJ, Nager AL. Jaundice as an early diagnostic sign of urinary tract infection in infancy. *Pediatrics* 2002;109:846-51.

15. Bilgen H, Ozek E, Unver T, Biyikli N ve ark. Urinary tract infection and hyperbilirubinemia. *Turk J Pediatr* 2006;48:51-5.
16. Pashapour N, Nikibakhsh AA, Golmohammadolou S. Urinary tract infection in term neonates with prolonged jaundice. *Urol J* 2007;4:91-4.
17. Ponka P. Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 1999;318:241-56.
18. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA Cell Biol* 2002;21:307-21.
19. Sikorski EM, Hock T, Hill-Kapturczak N, Agarwal A. The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F425-41.
20. Mc Coubrey WK, Cooklis MA, Maines MD. The structure, organization and differential expression of the rat gene encoding biliverdin reductase. *Gene* 1995;160:235-40.
21. Ostrow JD, Mukerjee P, Tiribelli C. Structure and binding of unconjugated bilirubin: relevance for physiological and pathophysiological function. *Lipid Res* 1994;35:1715-37.
22. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517-54.
23. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000;28:289-309.
24. Taille C, El-Banna J, Lanone S, Dang MC ve ark. Induction of heme oxygenase-1 inhibits NAD(P)H oxidase activity by down-regulating cytochrome b588 expression via the reduction of heme availability. *J Biol Chem* 2004;279:28681-8.
25. Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 gene ablation and expression. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1990-7.
26. Zhang Y, Furuyama K, Adachi T, Ishikawa K ve ark. Hypoxemia and attenuated hypoxic ventilatory responses in mice lacking heme oxygenase-2: evidence for a novel role of heme oxygenase-2 as an oxygen sensor. *Adv Exp Med Biol* 2006;580:161-6.
27. Abraham NG, Lin JH, Schwartzman ML, Levere RD ve ark. The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 1988;20:543-58.

28. Toda N, Takahashi T, Mizobuchi S, Fujii H ve ark. Tin chloride pretreatment prevents renal injury in rats with ischemic acute renal failure. *Crit Care Med* 2002;30:1512-22.
29. da Silva JL, Zand BA, Yang LM, Sabaawy HE ve ark. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney. *Kidney Int* 2001;59:1448-57.
30. Ceran C, Sönmez K, Türkyılmaz Z, Demiroğulları B ve ark. Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. *J Pediatr Surg* 2001;36:1764-7.
31. Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H ve ark. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H643-51.
32. Kato Y, Shimazu M, Kondo M, Uchida K ve ark. Bilirubin rinse: a simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* 2003;38:364-73.
33. Tullius SG, Nieminen-Kelhä M, Buelow R, Reutzel-Selke A ve ark. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 2002;74:591-8.
34. Li Volti G, Rodella LF, Di Giacomo C ve ark. Role of carbon monoxide and biliverdin in renal ischemia/reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol* 2006;104:e135-9.
35. Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J ve ark. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 1992;90:267-70.
36. Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N ve ark. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 1999;103:129-35.
37. Kawashima A, Oda Y, Yachie A, Koizumi S ve ark. Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case. *Hum Pathol* 2002;33:125-30.
38. Shiraishi F, Curtis LM, Truong L, Poss K ve ark. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced renal tubular apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;278:F726-36.
39. Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP ve ark. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 2000;156:1527-35.

40. Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ ve ark. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int* 1995;48:1298-307.
41. Maines MD, Raju VS, Panahian N. Spin trap (N-t-butyl-alpha-phenylnitron)-mediated supra-induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: role of the oxygenase in protection against oxidative injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:911-9.
42. Maines MD, Mayer RD, Ewing JF, McCoubrey WK Jr. Induction of kidney heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA and protein by ischemia/reperfusion: possible role of heme as both promotor of tissue damage and regulator of HSP32. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:457-62.
43. Barabas K, Milner R, Farese J, Baylis C ve ark. Hyperbilirubinemia's protective effect against cisplatin nephrotoxicity in the Gunn rat. *Anticancer Drugs* 2008;19:495-502.
44. Siegert SW, Holt RJ. Physicochemical properties, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of intravenous hematin: a literature review. *Adv Ther* 2008;25:842-57.
45. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G ve ark. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood* 2000;95:3442-50.
46. Chen S, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. Pro-oxidant role of heme oxygenase in mediating glucose-induced endothelial cell damage. *Free Radic Res* 2004;38:1301-10.
47. Khan ZA, Barbin YP, Cukiernik M, Adams PC ve ark. Heme-oxygenase-mediated iron accumulation in the liver. *Can J Physiol Pharmacol* 2004;82:448-56.
48. Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, Romanosky AJ ve ark. Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Free Radic Biol Med* 2000;28:289-309.
49. Yamashita K, McDaid J, Ollinger R, Tsui TY ve ark. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. *FASEB J* 2004;18:765-7.
50. Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK ve ark. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 2004;127:595-606.
51. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K ve ark. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology* 2004;40:1333-41.

52. Nakao A, Neto JS, Kanno S, Stolz DB ve ark. Protection against ischemia/reperfusion injury in cardiac and renal transplantation with carbon monoxide, biliverdin and both. *Am J Transplant* 2005;5:282-91.
53. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16093-8.
54. Mustafa MG, Cowger ML, King TE. Effects of bilirubin on mitochondrial reactions. *J Biol Chem* 1969;244:6403-14.
55. Bratlid D. The effect of antimicrobial agents on bilirubin binding by human erythrocytes. *Scand J Clin Lab Invest* 1972;30:331-7.
56. Matsuoka Y, Masuda H, Yokoyama M, Kihara K. Protective effects of heme oxygenase-1 against cyclophosphamide-induced haemorrhagic cystitis in rats. *BJU Int* 2007;100:1402-8.
57. Matsuoka Y, Masuda H, Yokoyama M, Kihara K. Protective effects of bilirubin against cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Urol* 2008;179:1160-6.
58. Liu Y, Zhu B, Wang X, Luo L ve ark. Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003;139:27-35.
59. Leung N, Croatt AJ, Haggard JJ, Grande JP ve ark. Acute cholestatic liver disease protects against glycerol-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 2001;60:1047-57.
60. Kirkby K, Baylis C, Agarwal A, Croker B ve ark. Intravenous bilirubin provides incomplete protection against renal ischemia-reperfusion injury in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F888-94.
61. Axelsen RA, Burry AF. Bilirubin-associated renal papillary necrosis in the homozygous Gunn rat: light-and electron-microscopic observations. *J Pathol* 1976;120:165-75.
62. Call NB, Tisher CC. The urinary concentrating defect in the Gunn strain of rat. Role of bilirubin. *J Clin Invest* 1975;55:319-29.
63. Nomura M, Matsunami T, Kobayashi K, Uchibayashi T ve ark. Involvement of ABC transporters in chemosensitivity of human renal cell carcinoma, and regulation of MRP2 expression by conjugated bilirubin. *Anticancer Res* 2005;25:2729-35.

64. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K ve ark. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res* 1999;85:663-71.
65. Víték L, Jirsa M, Brodanová M, Kalab M ve ark. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002;160:449-56.
66. Ohrui T, Yasuda H, Yamaya M, Matsui T ve ark. Transient relief of asthma symptoms during jaundice: a possible beneficial role of bilirubin. *Tohoku J Exp Med* 2003;199:193-6.
67. Rushton HG. Urinary tract infections in children: Epidemiology, evaluation, and management. *Pediatr Clin North Am* 1997;44:1133-69.
68. Rushton HG. *Pediatric Nephrology*, eds: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004, p:1027-48.
69. Serlachius E, Sundelin B, Eklof AC, Jahnke M ve ark. Pyelonephritis provokes growth retardation and apoptosis in infant rat renal cortex. *Kidney Int* 1997;51:1855-62.
70. Savill J, Mooney A, Hughes J. Apoptosis and renal scarring. *Kidney Int* 1996;54:S14-7.
71. Yang B, Johnson TS, Thomas GL, Watson PF ve ark. Expression of apoptosis-related genes and proteins in experimental chronic renal scarring. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:275-88.
72. Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalán MP ve ark. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. *J Cell Mol Med* 2001;5:18-32.
73. Chen M, Bao W, Aizman R, Huang P ve ark. Activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis induced by uropathogenic *Escherichia coli* toxins via nitric oxide synthase: protective role of heme oxygenase-1. *J Infect Dis* 2004;190:127-35.
74. Noh JW, Wiggins R, Phan SH. Urine transforming growth factor-beta activity is related to the degree of scarring in crescentic nephritis in the rabbit. *Nephron* 1993;63:73-8.
75. Goumenos DS, Tsamandas AC, Oldroyd S, Sotsiou F ve ark. Transforming growth factor-beta(1) and myofibroblasts: a potential pathway towards renal scarring in human glomerular disease. *Nephron* 2001;87:240-8.

76. Solari V, Owen D, Puri P. Association of transforming growth factor-beta1 gene polymorphism with reflux nephropathy. *J Urol* 2005;174:1609-11.
77. Cotton SA, Gbadegesin RA, Williams S, Brenchley PE ve ark. Role of TGF-beta1 in renal parenchymal scarring following childhood urinary tract infection. *Kidney Int* 2002;61:61-7.
78. Qin YH, Lei FY, Hu P, Pei J ve ark. Effect of all-trans retinoic acid on renal expressions of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in rats with glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1477-86.
79. Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, Fisher M ve ark. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol* 2002;10:182-95.
80. González-Avila G, Iturria C, Vadillo-Ortega F, Ovalle C ve ark. Changes in matrix metalloproteinases during the evolution of interstitial renal fibrosis in a rat experimental model. *Pathobiology* 1998;66:196-204.
81. Togel F, Isaac J, Westenfelder C. Hematopoietic stem cell mobilization-associated granulocytosis severely worsens acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1261-7.
82. Labib S, Kılıçarslan-Akkaya B, Fahmy HK, EL Sherief A ve ark. Stem cell factor and CD34+ cells in recovery following experimental obstructive nephropathy. (abstract) 21. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi, Antalya, (2004) pp:45.
83. American Academy of Pediatrics. Provisional Committee for Quality Improvement and Subcommittee on Hyperbilirubinemia. Practice parameter: management of hyperbilirubinemia in the healthy term newborn. *Pediatrics* 1994;94:558-65.
84. Littlewood JM, Kite P, Kite BA. Incidence of neonatal urinary tract infection. *Arch Dis Child* 1969;44:617-20.
85. Ghaemi S, Fesharaki RJ, Kelishadi R. Late onset jaundice and urinary tract infection in neonates. *Indian J Pediatr* 2007;74:139-41.
86. Roelofsen H, Schoemaker B, Bakker C, Ottenhoff R ve ark. Impaired hepatocanalicular organic anion transport in endotoxemic rats. *Am J Physiol* 1995;269:G427-34.

87. Roelofsen H, van der Veere CN, Ottenhoff R, Schoemaker B ve ark. Decreased bilirubin transport in the perfused liver of endotoxemic rats. *Gastroenterology* 1994;107:1075-84.
88. Crain EF, Gershel JC. Urinary tract infections in febrile infants younger than 8 weeks of age. *Pediatrics* 1990;86:363-7.
89. Hoberman A, Chao HP, Keller DM, Hickey R ve ark. Prevalence of urinary tract infection in febrile infants. *J Pediatr* 1993;123:17-23.
90. Hoberman A, Wald ER. Urinary tract infections in young febrile children. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:11-7.
91. Xinias I, Demertzidou V, Mavroudi A, Kollios K ve ark. Bilirubin levels predict renal cortical changes in jaundiced neonates with urinary tract infection. *World J Pediatr* 2009;5:42-5.
92. Kotoula A, Gardikis S, Tsalkidis A, Mantadakis E ve ark. Comparative efficacies of procalcitonin and conventional inflammatory markers for prediction of renal parenchymal inflammation in pediatric first urinary tract infection. *Urology* 2009;73:782-6.
93. Doganis D, Siafas K, Mavrikou M, Issaris G ve ark. Does early treatment of urinary tract infection prevent renal damage? *Pediatrics* 2007;120:e922-8.
94. Fernández-Menéndez JM, Málaga S, Matesanz JL, Solís G ve ark. Risk factors in the development of early technetium-99m dimercaptosuccinic acid renal scintigraphy lesions during first urinary tract infection in children. *Acta Paediatr* 2003;92:21-6.
95. Hoberman A, Charron M, Hickey RW, Baskin M ve ark. Imaging studies after a first febrile urinary tract infection in young children. *N Engl J Med* 2003;348:195-202.
96. Kavukcu S, Soylu A, Türkmen M, Sarioglu S ve ark. The role of vitamin A in preventing renal scarring secondary to pyelonephritis. *BJU Int* 1999;83:1055-9.
97. Vitek L, Muchova L, Zelenka J, Zadinova M ve ark. The effect of zinc salts on serum bilirubin levels in hyperbilirubinemic rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;40:135-40.
98. Littlewood JM. 66 infants with urinary tract infection in first month of life. *Arch Dis Child* 1972;47:218-26.
99. Edelmann CM Jr, Ogwo JE, Fine BP, Martinez AB. The prevalence of bacteriuria in full-term and premature newborn infants. *J Pediatr* 1973;82:125-32.

100. Wettergren B, Jodal U, Jonasson G. Epidemiology of bacteriuria during the first year of life. *Acta Paediatr Scand* 1985;74:925-33.
101. Murat N, Kasap B, Kavukcu S, Soylu A ve ark. In vitro analysis of the effect of hyperbilirubinemia on rabbit ureter and bladder. *Pediatr Nephrol* 2006;21:328-32.
102. Chang SL, Shortliffe LD. Pediatric urinary tract infections. *Pediatr Clin North Am* 2006;53:379-400.
103. Smellie JM, Prescod NP, Shaw PJ, Risdon RA ve ark. Childhood reflux and urinary infection: a follow-up of 10-41 years in 226 adults. *Pediatr Nephrol* 1998;12:727-36.
104. Güneş D, Kavukcu S, Yilmaz O, Sarioglu S ve ark. What is the risk of pyelonephritis due to desmopressin in rats with cystitis? *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006;28:703-6.
105. Matsumoto T, Haraoka M, Mizunoe Y, Takahashi K ve ark. Preventive effect of ulinastatin on renal scarring in rat model of pyelonephritis induced by direct or ascending infection with *Serratia marcescens* or *Escherichia coli*. *Nephron* 1995;69:65-70.
106. Yagmurlu A, Boleken ME, Ertoy D, Ozsan M ve ark. Preventive effect of pentoxifylline on renal scarring in rat model of pyelonephritis. *Urology* 2003;61:1037-41.
107. Haraoka M, Matsumoto T, Takahashi K, Kubo S ve ark. Suppression of renal scarring by prednisolone combined with ciprofloxacin in ascending pyelonephritis in rats. *J Urol* 1994;151:1078-80.
108. Sadeghi Z, Kajbafzadeh AM, Tajik P, Monajemzadeh M ve ark. Vitamin E administration at the onset of fever prevents renal scarring in acute pyelonephritis. *Pediatr Nephrol* 2008;23:1503-10.
109. Aksu B, Inan M, Kanter M, Oz Puyan F ve ark. The effects of methylene blue on renal scarring due to pyelonephritis in rats. *Pediatr Nephrol* 2007;22:992-1001.
110. Huang A, Palmer LS, Hom D, Anderson AE ve ark. Ibuprofen combined with antibiotics suppresses renal scarring due to ascending pyelonephritis in rats. *J Urol* 1999;162:1396-8.
111. Mark A, Hock T, Kapturczak MH, Agarwal A ve ark. Induction of heme oxygenase-1 modulates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta in human renal tubular epithelial cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2005;51:357-62.