

## Köpeklerde deneysel nefrotoksikoziste eritropoietin seviyesi ve bazı hematolojik parametreler üzerinde araştırmalar

Ebubekir Ceylan Zahid T. Ağaoğlu

Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE

**Özet:** Bu çalışmada, köpeklerde deneysel oluşturulan nefrotoksikoziste Epo seviyesi ve bazı kan parametreleri değerlendirilerek nefritislerdeki etkinliği araştırıldı. Bu çalışmanın materyalini 18 adet sağlıklı köpek oluşturdu. Gentamisin enjeksiyonları 10 gün süreyle günde 3 kez (saat: 8.00, 12.00, 24.00) olmak üzere A grubuna (n=6) 7 mg/kg, B grubuna (n=6) 10 mg/kg, C grubuna (n=6) ise 15 mg/kg dozda, intramüsküler yolla yapıldı. Köpekler, uygulama öncesi ve uygulama süresince her gün klinik, 2, 5, 7 ve 12. günlerde hematolojik ve biyokimyasal muayenelerden geçirildi.

A grubunda lökosit ve idrar GGT'indeki artış ( $p<0.05$ ) hariç, diğer hematolojik ve biyokimyasal parametrelerde deneme süresince istatistik olarak önemli bir değişiklik gözlenmedi ( $p>0.05$ ). B grubundaki hematolojik parametrelerden lökositlerdeki artış ve MCV değerlerinde azalma; biyokimyasal parametrelerden Epo, potasyum, fosfor, kan üre nitrojen ve idrar GGT'indeki artış; sodyum, kalsiyum, albumin ve protein değerlerindeki düşüş istatistik olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). C grubundaki hematolojik parametrelerden eritrosit, hemoglobin, hematokrit, MCH, MCHC, MCV değerlerindeki azalma, lökosit değerlerindeki artış; biyokimyasal parametrelerden Epo, sodyum, albumin, kalsiyum ve protein değerlerindeki azalma ve potasyum, fosfor, kan üre nitrojen, kreatinin ve idrar GGT'indeki artış istatistik olarak önemli bulundu ( $p<0.001$ )

Böbreklerin histopatolojik incelenmesinde A grubunda önemli bir değişiklik tespit edilemezken, B ve C grubundaki köpeklerin böbrek proksimal tubuluslarında hücre nükleusları ve stoplazma sınırları kaybolmuş görünümde, epitel hücrelerinde vakuoler, diğer tubulus epitel hücrelerinde granüler dejenerasyon tespit edildi. Akut tubular nekroz belirgindi. Jukstaglomerüler hücrelerde granüler ve vakuoler dejenerasyon, siyah-kahverenkli granüler madde birikimi ve interstisyel ödem tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, Eritropoietin, Böbrek, Nefrotoksikozis, Gentamisin.

### Investigation on erythropoietin level and some blood parameters in experimental nephrotoxicosis in dogs

**Abstract:** In this study, it was investigated Erythropoietin levels and some hematologic parameters in experimental nephrotoxicosis in dogs. Eighteen healthy dogs were used as a material in this study. Gentamicin sulphate was given to induce nephrotoxicity at the dose of 7 mg/kg body weight to group A, 10 mg/kg body weight to group B and 15 mg/kg body weight to group C for 10 consecutive days. Dogs were examined before the experiment and during the experiment every day clinically, 2, 5, 7 and 12. days hematologic and biochemical examinations.

In group A, except increase in leukocyte and urine GGT values ( $p<0.05$ ), it was not observed an important changes statistically at hematologic and biochemical parameters during the experiment ( $p>0.05$ ). From hematologic parameters in group B, increase in leukocyte, decrease in MCV values; from the biochemical parameters increase in Epo, potassium, phosphorus, blood urea nitrogen and urine GGT values; decrease in sodium, calcium, albumin and protein values were found statistically significant ( $p<0.001$ ). Decrease in erythrocyte, hemoglobin, hematocrit, MCH, MCHC, MCV and increase in leukocyte values from hematologic parameters in group C; decrease in Epo, sodium, albumin, calcium and protein values; increase in potassium, phosphorus, blood urea nitrogen, creatinin and urine GGT from biochemical parameters were found significant statistically ( $p<0.001$ ).

While it was not found an important changes at histologic examination of kidney in group A, in group B and C the disappearance of the nuclei and borders of cytoplasm at the proximal tubules, vacuoler degeneration on epithelial cells and granuler degeneration on the other epithelial cells were found. Acute tubular necrosis was evident. It was found granuler and vacuoler degeneration, black-brown granuler accumulation and interstitial oedema at the juxtaglomerular cells.

**Key Words:** Dog, Erythropoietin, Kidney, Nephrotoxicosis, Gentamicin sulphate.

## GİRİŞ

Böbrekler ekskresyonun yanısıra renin, prostoglandinler, kininler, 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> ve eritropoetin üreten ve salgılayan önemli bir endokrin organdır. Renin, Na<sup>+</sup> ve K<sup>+</sup> dengesini sağlayarak kan basıncının düzenlenmesinde önemli rol oynayan renin - angiotensin - aldosteron sistemini aktive etmektedir. Protoglandinler ve kininler (bradikinin) vazoaaktiförler ve renal kan akımının düzenlenmesi ile modulasyonunda önemlidir. 1, 25-Dihidroksivitamin D<sub>3</sub>, Ca<sup>++</sup>'un gastrointestinal kanaldan normal reabsorbsiyonu ve kemikte depolanması için gereklidir. Eritropoetin kemik iliğinde eritrosit oluşumunu stimüle eder (1).

Eritropoetin (Epo), temel olarak böbreklerden salgılanan, glikoprotein yapısında bir hormondur (1). Eritroid seri ön hücrelerin proliferasyonunu uyaran, yaşamlarını sürdürmelerini sağlayan Epo'nun, başlıca renal peritubuler intersitisyel hücrelerde, hepatositlerde ve kupfer hücrelerinde üretildiği bildirilmektedir (2). Yetişkin karaciğerinin total Epo üretimine katkısı %10-15'tir. Epo üretimi fetal dönemde karaciğerde gerçekleşirken, doğumdan hemen sonra böbrekler tarafından yapılmaktadır (3). Epo hipoksiye cevap olarak sentezlenir ve hormonun birikimi olmaması nedeniyle gerekli miktarı plazmada ve sadece biyolojik olarak aktif formda bulunur. Dolaşımdaki Epo seviyesinin artmasının, bu hormonun üretimi üzerine herhangi negatif bir etkisi yoktur (4).

Epo'nun metabolizma ve eliminasyonu, esas olarak karaciğer ve böbreklerde yapılır. Epo metabolizmasında esas fonksiyonu karaciğer üstlenmesine rağmen, nefrektomi yapılan, anefrik ya da ureterleri bağlanan köpeklerde Epo'nun yarı ömrünün uzaması, böbreğin Epo metabolizmasında görev aldığını düşündürmektedir (5).

Epo düzeyinin belirlenmesinde serum, plazma, idrar ve tümörlü doku kullanılmaktadır (6). Endojen Epo (dolaşıma böbreklerden karışan)' nun sadece 6-9 saatlik bir plazma yarı ömrü olduğu için, Epo üretimindeki değişiklikler, kan konsantrasyonundaki değişiklikleri yansıtmaktadır. Bu yüzden serum Epo konsantrasyonunun tesbiti, polisitemi ve anemilerin sebep ve kontrolü hakkında önemli bilgi sağlamaktadır (7). Epo'nun serum, idrar ve diğer vücut sıvılarındaki varlığı biyoassay (in vivo ve in vitro) ya da immunokimyasal metot (Hemaglutinasyon inhibisyon, radioimmunoassay) ile tesbit edilebilir (7, 8, 9, 10).

Plazma Epo seviyesinin, bir veya iki böbrekte ortaya çıkan in vivo anoksi sonucu yükseldiği bildirilmiştir. Böbreklerin alınması ya da böbreklerde şiddetli hasar oluştuğunda, renal glomerular filtrasyon oranında ve plazma Epo seviyesinde düşme, kemik iliğindeki eritroid hücrelerde azalma ortaya çıkmaktadır. Epo, O<sub>2</sub> teminindeki küçük değişikliklere oldukça fazla duyarlıdır. İdrarda da bulunan Epo,

hematokrit konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olarak farklılık gösterir. (11).

Akut renal yetersizliğin oluşmasında meydana gelen anemi çoğunlukla renal yetersizliğin kendinden daha ziyade, renal yetersizliğe sebep olan bozuklukların bir sonucudur (12). Akut renal yetersizlikle ilgili olarak şekillenen aneminin en önemli işareti, intravasküler hemolizin varlığıdır. Bu yüzden, aneminin etiyojisi değişebilmesine rağmen, morfolojik ve biyokimyasal anormallikler genelde aynıdır. Eritrositlerde membran hasarı görülmektedir.

Akut hemolitik transfüzyon reaksiyonunda sferositlerin varlığı, hücre içeriğinin fazlalığında membran bölgesini kaybeden eritrositler, G6PD (glikoz 6 fosfat dehidrogenaz) yetersizliğinde sferositlerle birlikte blister benzeri deformiteli eritrositlerin varlığı morfolojik anormallikler olarak tanımlanmışlardır. Akut hemolizde ortaya çıkan indirekt bilirubin artışı, LDH ve retikulosit sayısında artış, serum haptoglobulininde azalma, hemoglobinemi ve hemoglobininuri görülür. G6PD yetersizliğinde eritrositler, hemoglobin molekülünü oksidasyondan koruyamaz. (12).

Akut renal yetersizlikteki hasarın mekanizması sebebe bağlı olarak değişmektedir. İnamusküler hemoliz sonucu oluşan hemoglobinemi, renal fonksiyonda sadece küçük bozukluklar meydana gelirken immun kompleksle kaplı eritrosit membranlarının böbreklerde birikmesi ya da fibrin birikimi önemli renal hasarı meydana getirmektedir. Akut renal yetersizliği esnasında Epo üretimi ile ilgili detaylı çalışmalar yapılmamıştır (4).

KBY'de serum Epo seviyesinin düşmesi, böbreklerde Epo üreten kısmın hasara uğraması sonucu meydana gelmektedir. Epo seviyesi renal hasarın ilerlemesiyle düşerek, anemiye neden olur (13). Böbrek yetersizliğinden kaynaklanan anemi, eritrositlerin yaşam süresinin kısalması, hemoliz, eritropoezi baskılayan inhibitörler, toksik metabolitler ve kanama sonucu görülmektedir (4, 12).

Böbrekler, kan akışının fazla olması, konsantrasyon, metabolik aktivasyon ve aktif transport gerçekleştirildiğinden dolayı toksisite için hedef organ durumundadır. Aminoglikozid antibiyotikler, Veteriner Hekimlikte G (-) aerobik enfeksiyonların tedavi ve kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak potansiyel nefrotoksik etkilerinden dolayı kullanımları sınırlandırılmıştır. (14-16).Nefrotoksisite, klinik muayene, kan ve serum biyokimyasal analizler, idrar analizleri ve histopatolojik muayeneler sonucu tespit edilebilir (17-19).

Araştırmada bilinen tanı yöntemlerine ilaveten deneysel nefritis oluşturulan köpeklerde Epo seviyesindeki değişiklikler araştırılarak hematolojik, biyokimyasal değerler ile böbrek hasarının, bu seviye ile arasındaki ilişki incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### *Materyal*

Bu araştırmada Van yöresinden toplanan her iki cinsten 6-21 kg canlı ağırlıkta, 2-7 yaş arası toplam 18 adet sağlıklı melez köpek kullanıldı. Y. Y. . Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesinde, hematolojik muayene için Coulter MAXM kan sayım cihazı, biyokimyasal muayene için Technicon RA-TX otoanalizör kullanıldı. Epo limleri için Veteriner Fakültesi, Obstetrik ve Jinekoloji Anabilim Dalında bulunan Gama Counter cihazı (İzotop) kullanıldı. Nefrotoksizite oluşturmak amacıyla Gentamisin sülfat kullanıldı.

### *Metot*

Araştırma ncesi ve süresince (12 gün) her  gruptaki köpekler sistemik olarak muayene edildi. Deneme ncesi hazırlıkları tamamlanan köpekler, her biri 6 köpekten oluşan  gruba ayrıldı (A, B ve C grubu). A grubuna 7 mg/kg, B grubuna 10 mg/kg, C grubuna 15 mg/kg dozunda 8 saat aralıklarla günde 3 kez (8.00, 12.00, 24.00) olmak üzere, kas içi yolla, 10 gün süre ile Gentamisin sülfat enjeksiyonu yapıldı.

Köpeklerin kan örnekleri, uygulama öncesi 2 defa (0 gün) ve uygulama süresince 2., 5., 7. ve 12. günlerde alındı. Na, K, Ca, P, Albumin, Protein, re, Kreatinin ve Epo lim için, uslne uygun olarak 10 ml'lik antikoagulantsız tüplere alınan kanların serumları çıkarıldı. Hematolojik muayene için 5 ml'lik antikoagulantlı (EDTA) tüplere 2 ml kan alındı. Biyokimyasal ve makroskopik muayenesi için idrar örnekleri, uygulama öncesi ve süresince kateter kullanılarak alındı. Biyokimyasal parametreler için kan örneklerinin limleri Technicon RA-XT otoanalizör ile yapıldı. Epo limleri için alınan kanların serumları, soğutmalı santrifij kullanılarak çıkarıldı ve topluca lilmek üzere -21°C'de derin dondurucuda saklandı. Gentamisinin  ayrı grupta hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini karşılaştırmak ve bu etkilerin grup içindeki günlere göre değişimini belirlemek için Student'in t-testi, gruplar arası değişimi belirlemek için ise oneway ANOVA testi uygulanmıştır.

## BULGULAR

Birinci gruptaki köpeklerden 2 tanesi, ikinci gruptakilerde 4 tanesi ve nc gruptaki köpeklerden ise üremik komaya giren köpekler uyutularak otopsisleri yapıldı

### *Laboratuvar Bulguları*

Çalışmanın 7. günü birinci gruptaki köpeklerin idrar sedimentinin mikroskobisinde nadir eritrosit, lökosit ve epitel hücreleri gözlendi. İkinci gruptaki

köpeklerde ise 7. gün idrar sedimentinin mikroskopik bakısında silindirri, nadir eritrosit, lökosit kümeleri, protein ve renal tubuler hücreler gözlendi. nc grubun idrar mikroskobisinde ise 5. gün silindirri, eritrosit, lökosit, protein ve renal tubuler hücreler görüldü.

### *Hematolojik Bulgular*

Deneme ncesi ve sonrası her  grup köpeklerdeki eritrosit, lökosit, hematokrit, hemogloblin, MCV, MCH ve MCHC düzeyleri Tablo 2'de verildi.

### *Biyokimyasal bulgular*

Köpeklerdeki (A, B ve C grubu) deneme öncesi ve süresince (12 gün) belirlenen serum Epo, sodyum, potasyum, kalsiyum, fosfor, albumin, protein, kan üre nitrojen ve kreatinin konsantrasyonları ile idrar GGT değerleri Tablo 1'de gösterildi.

### *Otopsi Bulguları*

Çalışmanın sonunda A grubundaki köpeklerden 2 tanesi uyutularak otopsisleri yapıldı. Enjeksiyon bölgesindeki nekroz hariç, her iki köpeğin genel görünümü normal bulundu. B grubundan 3, C grubundan 6 adet köpeğin otopsisleri yapıldı. Otopsis yapılan bütün köpeklerin böbreklerinde şişkinlik, renginde solma, böbrek çevresindeki yağ dokusunda erime ve ödem, medullasında hiperemik odaklar tespit edildi. Mide mukozaları hiperemik olup peteşiyel kanama odakları, karaciğerde özellikle C grubunda büyüme tespit edildi. Midedeki hemorajik odaklara (remik gastritis) ince barsaklarda da rastlandı. C grubundaki köpeklerin böbrek kapsulularının çok kolay soyulabildiği tespit edildi. Ayrıca son iki gruptaki (B ve C) köpeklerin idrar keselerinde kalınlaşma, duvarlarında nekroz odakları saptandı. Enjeksiyon bölgelerinde kanama ve nekroz odakları, sınırlı ödem tespit edildi.

### *Histopatolojik Bulgular*

Otopsisleri yapılan köpeklerin histopatolojik incelemesinde A grubunda önemli bir değişiklik tespit edilmezken, B ve C grubundaki köpeklerde kapsül altında tubulus, glomerul ve interstisyumu kapsayan nekroz tespit edildi. Proksimal tubuluslarda hücre nükleusları ve stoplazma sınırları kaybolmuş görünümde, epitel hücrelerinde vakuoler dejenerasyon ve diğer tubulus epitel hücrelerinde granüler dejenerasyon saptandı. Proksimal ve toplayıcı tubullerde yaygın tubuler nekroz ve nekrobiyoz, yer yer siyah granüler madde, tubuluslarda asidofilik yada bazofilik boyalı silindirlerin varlığı tespit edildi. Akut tubular nekroz belirgin olup, tubulusun bazal membranları seçilebilmekteydi. Geniş bir alanda subkortikal nekroz ve fokal parankimal nekroz görüldü.

Jukstaglomerüler hücrelerde granüler ve vakuoler madde birikimi ve interstisyel ödem tespit edildi. dejenerasyon, eser miktarda siyah-kahverenkli granüler

**Tablo 1.** Köpeklerde (A, B ve C grubu) deneme öncesi ve sonrası biyokimyasal parametreler.

Günler	Grup	n	Eritropoietin mIU/ml x±Sx	Na mEq/L x±Sx	K mEq/L X±Sx	Ca Mg/dl x±Sx	P mg/dl x±Sx	Albumin g/dl x±Sx	Protein g/dl x±Sx	BUN mg/dl x±Sx	Kreatinin mg/dl x±Sx	İ-GGT IU/L x±Sx
Den. Öncesi	A	6	81.20±3.64	147.56±0.32	4.71±0.10	10.15±0.18	4.83±0.18	2.96±0.10	6.25±0.17	13.35±0.41	0.65±0.43	72.65±8.25
	B	6	85.12±2.89	147.98±0.88	4.34±0.26	10.02±0.26	5.10±0.16	2.83±0.10	6.26±0.13	13.37±0.67	0.83±0.09	69.85±7.88
	C	6	81.28±4.40	148.80±0.28	4.83±0.28	10.11±0.35	5.13±0.26	2.65±0.09	5.81±0.24	13.05±1.03	0.77±0.57	69.94±6.40
2. Gün	A	6	81.23±3.62	147.10±0.22	4.61±0.14	10.15±0.17	4.78±0.17	*2.92±0.09	6.25±0.16	13.33±0.42	0.65±0.43	73.56±8.24
	B	6	85.14±2.88	*145.44±0.60	4.33±0.32	10.10±0.26	5.44±0.27	*2.78±0.10	6.16±0.17	*14.50±0.87	*1.15±0.43	100.71±4.54
	C	6	81.0±4.46	*145.96±0.83	*5.47±0.33	9.96±0.28	*5.48±0.21	2.62±0.08	5.70±0.25	*19.38±0.91	*1.06±0.07	**137.0±16.31
5. Gün	A	6	81.24±3.62	*146.83±0.20	*5.10±0.10	*9.93±0.17	4.95±0.17	*2.79±0.10	*6.06±0.15	14.81±20.80	*0.85±0.44	*75.16±8.25
	B	6	85.12±2.88	*145.83±0.74	*4.69±0.30	*9.56±0.22	*5.80±0.26	2.75±0.16	*5.94±0.18	*19.30±1.64	*2.11±0.22	**207.58±30.90
	C	6	61.75±11.58	*141.10±0.55	*6.27±0.29	*9.49±0.31	*6.97±0.24	*2.24±0.09	5.15±0.20	*52.50±3.56	*3.81±0.37	**269.83±22.36
7. Gün	A	6	81.24±3.62	*146.50±0.22	*5.28±0.08	*9.71±0.15	*5.10±0.16	*2.68±0.13	*5.94±0.13	*14.36±0.41	*1.00±0.04	*75.16±8.25
	B	6	62.36±12.59	*144.22±0.61	*4.96±0.26	*9.37±0.26	*7.33±0.40	*2.49±0.11	*5.72±0.22	*35.22±5.47	*3.64±0.22	**432.51±15.36
	C	6	**64.48±4.41	*137.55±1.03	*6.97±0.34	*9.15±0.23	*7.67±0.23	*1.99±0.10	*4.21±0.21	*91.50±2.14	*6.91±0.57	**532.66±20.66
12. Gün	A	6	81.20±3.62	*145.66±0.47	5.50±0.07	*9.50±0.13	*5.12±0.15	*2.60±0.13	*5.82±0.11	*14.85±0.38	*1.15±0.03	*76.53±8.01
	B	6	**83.12±2.68	*142.31±0.65	5.58±0.24	*9.10±0.22	*9.39±0.43	*2.25±0.15	*5.22±0.16	*85.69±7.20	*11.40±0.9	**242.40±22.12
	C	6	**49.62±218	*136.13±0.69	*7.40±0.40	*8.72±0.12	*8.35±0.27	*1.74±0.06	*3.64±0.13	*128.83±4.44	*12.60±0.60	**570.83±39.53

P>0.05, \*p<0.05, \*\*p<0.001

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Böbrekler, homeostazisin düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Başlıca sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesinin düzenlenmesi, vücuttaki fazla inorganik maddelerin ve metabolik son ürünlerin eliminasyonu, vücutun ihtiyacı olan maddelerin (hormonlar, aminoasitler, vitaminler, glikoz, plazma proteinleri) yapılması ve vücutta tutulması, toksik maddelerin eliminasyonu gibi bir çok fizyolojik göreve sahiptir. Vücutta oluşan ve dışarıdan alınan pek çok madde için atılım organı olduğu için bu tür maddelerin zararlı etkilerine maruz kalmaktadır (20, 21).

Köpeklerde böbrek hastalıkları sıklıkla görülmektedir. Böbrek hasarının tespitinde kullanılan başlıca tanısal yaklaşımlar; fizik muayene, rutin kan ve idrar tetkikleri, böbrek fonksiyon testleri, biyopsi, ultrasonografi ve radyografidir (22)

Böbrek hastalıklarında klinik semptomlar spesifik olmayıp, ancak nefronların %75-80'inin haraplandığı durumlarda gözlenmektedir (22). Bu çalışmanın her üç grubunda, deneme süresince belirlenen klinik semptomların (ödem, hassasiyet durgunluk, iştahsızlık, enjeksiyona karşı reaksiyon, abdominal palpasyonda ve enjeksiyon bölgesinde ağrı ile hassasiyet, nadiren

ısırmaya teşebbüs, ağrı, ödem, kusma, ishal, dehidrasyon, kanlı işeme), bu konuda yapılan benzer araştırmalar (17, 23-25) ile aynı doğrultuda olduğu gözlemlendi.

İdrar muayenelerinde, gentamisin uygulamalarını takiben A ve B grubunda 7. günden, C grubunda ise 5. günden başlayarak anormal bulguların varlığı tespit edildi. A grubunda nadir eritrosit, lökosit ve epitel hücreleri saptanırken, B ve C gruplarında silindürü, hematuri, glukozuri, proteinuri ve renal tubuler hücrelerin varlığı saptandı. Maden (17), Greco ve ark. (26) yaptıkları çalışmalarda, gentamisin uygulamasının 8. gününde nefrotoksikoz oluşturulan köpeklerde hematuri, proteinuri, glukozuri ile granüler kastların varlığını, Grauer ve ark. (25) ise ilaç uygulamasının 6. ve 8. gününde anormal bulguları tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, elde edilen sonuçlar Maden (17), Greco ve ark. (26) ile Grauer ve ark. (25)'nin bulgularıyla uyum içerisinde.

Hematolojik parametreler incelendiğinde (Tablo 4) istatistiki açıdan A grubunda lökosit değerlerindeki 7. ve 12. günlerdeki artış hariç diğer parametrelerdeki değişiklikler önemli değildir. Ancak B grubunda 2. ve 12. günlerdeki hematokrit, 5., 7. ve 12. günlerdeki

MCV, 12. gündeki MCH değerlerindeki azalma ve 12. gündeki lökosit değerlerindeki artış istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

Yapılan bu çalışmanın, lökositlerdeki artışın uygulamalar sırasında hayvanlarda oluşan strese kaynaklanabileceği bildiren Lamb ve ark. (26) ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Diğer kan parametrelerindeki değişimlerin gruplara göre ilacın farklı dozlarda uygulanması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Bu durum, üremenin hemoliz meydana getirmesi ve kemik iliğini baskılaması sonucu anemi oluşturabileceğini bildiren araştırmacıların çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir (17, 19, 23).

Gamma glutamil transferaz (GGT), proksimal tubüllerde tubuler epitelyumun fırçamsı kenarlarından kaynaklanan bir enzimdir. İdrar GGT'si yalnızca böbrekten köken alır ve en yüksek oranda böbreklerde bulunur. Serum GGT'sinin molekül ağırlığı büyük olduğu için glomeruluslardan filtre edilemezler. Bundan dolayı serum ve idrar GGT'si arasında bir ilişki yoktur. Bu yüzden idrar enzim aktivitesi, renal tubuler fonksiyondaki bir bozukluğun ve nekrozun bir belirleyicisidir (26). Köpeklerle yapılan çalışmalarda idrar enzimlerinin ağır metallerden (25) ve aminoglikozidlerden (17, 25, 26) oluşan erken renal tubuler hasarın tespitinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Maden (17), yapmış olduğu çalışmada 10 mg/kg dozda gentamisinle oluşturulan nefrotoksikoziste meydana gelen tubuler hasarın belirlenmesinde en duyarlı indikatörün GGT olduğunu bildirmiştir. Greco ve ark. (26), 10 mg/kg dozda günde 3 defa 10 gün süreyle gentamisin uygulayarak oluşturduğu toksik nefritiste, Uechi ve ark. (27) ise 22 köpek üzerinde yapmış olduğu çalışmada GGT'nin renal tubuler hasarı belirlemede duyarlı ve non-invaziv bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Maden (17), idrar GGT aktivitesinin çalışmanın 3. gününde, Greco ve ark. (26) çalışmanın 2. gününde artış gösterdiğini; en yüksek seviyeye 7. ve 8. günlerde ulaştığını saptamışlardır.

Yapılan bu çalışmada da çalışmada kullanılan köpeklerde idrar GGT değerleri A grubunda 5. günden itibaren istatistik olarak önemli bir artış gösterdi. B grubunda 2. günden itibaren artış gösteren GGT, 7. gün maksimum seviyeye ulaştı. C grubunda ise 2. gün artış gösteren enzimin, deneyin sonuna kadar arttığı görüldü. Elde edilen bu sonuçlar Maden, Greco ve ark. ile Uechi ve ark.'larının çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

Bir çok araştırmacı (17, 26, 27, 28) serum kreatinin ve BUN (kan üre nitrojen) konsantrasyonlarının renal fonksiyonun değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametreler olduğunu bildirmişlerdir. Ancak serum kreatinin ve BUN konsantrasyonlarındaki değişiklik renal fonksiyonun %75 kadarı kaybolduğunda ortaya

çıkılmaktadır. Bu çalışmada serum kreatinin ve BUN değerlerinde A grubunda önemli bir değişiklik gözlenmezken, B ve C gruplarında 5. gününde önemli artışlar gösterdi. Serum kreatinin değerindeki bu artışlar azotemi için bildirilen değerden (2 mg/dl) daha yüksek olup B grubunda 2.11 mg/dl (5. gün), 3.64 mg/dl (7. gün), 11.40 mg/dl (12. gün), C grubunda 3.81 mg/dl (5. gün), 6.91 mg/dl (7. gün) ve 12.60 mg/dl (12. gün) olarak tespit edildi.

Maden (17), yapmış olduğu çalışmada BUN ve kreatinin konsantrasyonlarını sırasıyla denemenin 3 ve 9.'u günlerinde çok önemli artışlar ( $p<0.001$ ) gösterdiğini bildirmiştir. Greco ve ark. (26)'da çalışmasında serum kreatinin konsantrasyonunun 9. günden başlayarak 2 mg/dl'yi aştığını bildirmektedir. Maden (17), BUN konsantrasyonunun denemenin 3. gününde artış gösterdiğini ancak bu değer azotemi için bildirilen değer (35-45 mg/dl) altında olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda da BUN değerleri B grubunda 7. gün artış göstermeye başlamasına rağmen, azotemi için bildirilen değeri ancak 12. gün aşabilmiştir (85.69 mg/dl). C grubunda ise çalışmanın 5. günü 52.50 mg/dl'ye ulaşarak azotemi için bildirilen değeri aşmıştır. Bütün bu bulgular, Maden ile Greco ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmalarda (17, 26) elde ettikleri sonuçlarla uyum içerisinde.

Çalışmada,  $K^+$ 'ın B grubunda 12., C grubunda ise 5. gün önemli artışlar gösterdiği ( $p<0.05$ ), yapılan diğer çalışmalara benzer sonuçlar elde edildiği ve bu çalışmalara paralellik gösterdiği tespit edildi. Maden yapmış olduğu çalışmada serum albumin konsantrasyonunda denemenin 7. gününde,  $Na^+$ 'da ise 9. günde azalmanın olduğunu bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada da her üç grupta (A, B ve C) Na, Ca, albumin ve protein konsantrasyonlarında azalmalar tespit edildi. Yapılan bir araştırmada (17) gentamisin uygulanan köpeklerde denemenin 7. gününde serum albumin, 9. gününde ise Na konsantrasyonunda azalmanın olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda elde edilen veriler yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Eritropoietin, köpeklerde yalnızca böbreklerden salgılanan, glikoprotein yapısında bir hormondur (24). Epo'nun, renal peritubuler intersitisyel hücrelerden, hepatositlerden ve kupfer hücrelerinden salgılandığı bildirilmektedir (2, 29). Bilateral nefrektomide, anemi gelişmesine ya da kobalt uygulamasına cevap olarak Epo'nun üretilmediği bildirilmektedir (29). Dalak, beyin, kas ve akciğerlerde Epo üretiminin gerçekleşmediği tespit edilmiştir.

Renal parankimada Epo üreten özel hücrelerin var olduğu ve bunların, renal parankimada intersitisyumunda, tubuler bazal membranın dışında, çoğunlukla korteksin iç kısmında ve medullanın dış kısmında bulunduğu bildirilmektedir (2, 30). Bazı araştırmacılar (31), Epo üretiminin proksimal tubul

fonksiyonu ile ilişkili olduğunu, Epo üreten intersitisyal hücrelerin çoğunlukla proksimal tubullere bitişik bölgelerde gruplandıklarını bildirmiştir. Proksimal tubul hücrelerinde yıkıma neden olan civa klorür gibi maddeler, Epo üretiminin azalmasına neden olur .

Yapılan bu çalışmada üç değişik dozda gentamisin uygulaması sonucu elde edilen verilere göre; A grubundaki köpeklerde meydana gelen böbrek hasarının Epo üreten yerleri etkilemediği için Epo seviyesinin değişmediği, B grubunda 7. gün bir düşme gösterip daha sonra tekrar yükselmesi böbreğin kompenzasyon yeteneğinin geliştiğini akla getirmektedir. C grubunda ise, yüksek dozdan kaynaklanan ve histopatolojik olarak ta tespit edilen proksimal tubullerin hasara uğrası sonucu, köpeklerdeki Epo seviyesinin düştüğü kanaatine varıldı. Ayrıca, böbreklerde şiddetli hasar oluşturan maddelerin akut vakalarda Epo seviyesini düşürebileceği de düşünülmektedir.

Epo'nun serum, idrar ve diğer vücut sıvılarındaki varlığı biyoassay (in vivo ve in vitro) ya da radioassay ile tespit edilebilmektedir (32). Epo düzeyini tespit etmek için kullanılan ilk yöntem *in vivo* bioassaydir (32). Bu metodun toksik maddelerden, androjenlerden, prostaglandinlerden, siklik nükleotidlerden etkilendiği bildirilmektedir (33, 34, 35). Ayrıca bu metotta çok uzun zamana, fazla sayıda hayvana ihtiyaç duyar ve pahalı bir yöntemdir.

In vitro metotta ana problem, serumlarındaki inhibitörlerin varlığı olup, geniş uygulama alanı bulmamıştır (33).

Miyake ve ark. (10) tarafından insan Epo'su başarılı bir şekilde saflaştırılmasından sonra duyarlı ve spesifik RIA metodu geliştirilmiştir. Bu metotta, radyoaktif olarak işaretlenmiş saf Epo'ya karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılmaktadır (7, 8).

RIA hızlı, duyarlı, spesifik ve oldukça ucuz bir metot olup Epo yapımını artıran ve inhibe eden faktörlerden etkilenmediği bildirilmektedir (8). In vivo ve in vitro metotlarla tespit edilemeyen Epo konsantrasyonlarının RIA ile tespit edilebildiği bildirilmektedir. Renal yetersizlikte serum Epo konsantrasyonlarının, in vivo metotla tespit edilemediği ancak RIA ile tespit edilebildiği bildirilmektedir (13).

Yapılan çalışmada, in vivo ve in vitro tekniklerdeki olumsuzluklardan dolayı, ayrıca böbrek yetersizliklerinde in vivo metotla Epo seviyesi tespit edilemediği için RIA metodu kullanıldı. Yine RIA metodu Epo yapımını artıran ve inhibe eden faktörlerden etkilenmediği için kullanıldı.

Japonya'da yapılan bir çalışmada araştırmacılar, serum Epo seviyesini in vitro metot olan Mouse Spleen Cell Metodu ile tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, yetişkin 25 köpekte serum Epo konsantrasyonları ortalama  $88.2 \pm 30.7$  mU/ml olarak tespit edilmiştir. Dişi ve erkeklerde serum Epo seviyesi arasında farklılığın

olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, yaşları 8-13 arasında değişen 4 yaşlı köpekte ortalama serum Epo seviyesi ( $56.5 \pm 11.6$  mU/ml), yaşları 1 ile 7 arasında değişen 21 köpekteki ortalama serum Epo seviyesinden ( $94.9 \pm 28.7$  mU/ml) önemli derecede düşük olduğu ( $p < 0.05$ ); 9 yavrudaki değerlerin (1-2 aylık), 1-7 yaşındaki yetişkin 21 köpeğin değerlerinden önemli derecede yüksek seviyede olduğu ( $182.7 \pm 56.2$  mU/ml,  $p < 0.01$ ) bildirilmiştir (36).

Her iki cinsten, toplam 18 köpekten oluşturulan çalışmamızda RIA ile yapılan ölçümlerde Epo konsantrasyonu deneme öncesi A grubunda ortalama  $81.20 \pm 3.64$  mU/ml; B grubunda  $85.12 \pm 2.89$  mU/ml; C grubunda ise  $81.28 \pm 4.40$  olarak tespit edildi. Sağlıklı kontrollerden elde edilen bu değerlerdeki farklılıklar muhtemelen ölçüm metotlarının farklılığından kaynaklanmaktadır.

Caro ve ark. (37), Plazma Konsantrasyon Tekniği ile serum Epo seviyesini böbrek yetersizliği olan hastalarda  $3.4-53.1$  mU/ml olarak, böbrek yetersizliği olmayanlarda ise  $2.8-5.5$  mU/ml olarak tespit etmişlerdir. Lange ve ark. (38), Hemaglutinasyon-inhibisyon Tekniği ile üremili 10 hastada serum Epo seviyesini  $50-700$  mU/ml arasında bulmuştur. Fisher ve ark. (39) biri normal renal fonksiyonluk, diğeri renal fonksiyonu tespit edilemeyen bakır toksikasyonu olan 2 hastada serum Epo konsantrasyonlarını  $420$  mU/ml olarak tespit etmiştir. Testosteron tedavisi gören 13 anefrik hemodiyaliz hastasında serum Epo seviyesi  $104$  mU/ml olarak tespit edilmiştir (11).

Gentamisin ile toksik nefrit oluşturulan köpeklerde çalışmanın sonunda Epo konsantrasyonunun A grubunda ortalama  $81.20 \pm 3.62$  mU/ml; B grubunda  $83.12 \pm 2.68$  mU/ml ( $P < 0.001$ ); C grubunda  $49.62 \pm 2.18$  mU/ml ( $P < 0.001$ ) olduğu tespit edildi. Ancak böbrek yetersizliği dahil diğer bozukluklar sonucu tespit edilen Epo seviyelerindeki farklılık ölçüm metotlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Glomerular hasar oluşturan diyabet, amiloidoz ve radyasyon; tubuler hasar oluşturan akut tubuler nekroz, pyelonefritis, myeloma protein, hiperkalsemi, medullar kistik hastalıklar ve interstiel nefritis gibi bir çok nedenin hipoproliferatif anemiye neden olduğu bildirilmektedir (12, 32). Yapılan çalışmada C grubunda aneminin oluşması, böbreklerde meydana gelen şiddetli hasar sonucu Epo üretiminin düşmesine bağlanmakta olup yukarıdaki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Renal paranzimada biriken gentamisin, tubulus, glomerul ve interstisyumda nekroz, tubulus epitel hücrelerinde granüler dejenerasyon, proksimal ve toplayıcı tubullerde yaygın tubuler nekroz ve nekrobiyoz, yer yer siyah granüler madde, tubuluslarda asidofilik ya da bazofilik boyalı silindirler, akut tubuler nekroz, jukstaglomerüler hücrelerde granüler ve

vakuoler dejenerasyon gibi histopatolojik bozukluklara neden olur (17, 26, 27, 40).

Bu çalışmanın 13. gününde uyutularak otopsi yapılan köpeklerin böbreklerinin histopatolojik bakışında her iki grupta (B ve C) belirlenen bulgular bir çok araştırmacının (17, 26, 28) bulgularıyla benzerlik göstermektedir. A grubundaki böbreklerin histopatolojik bakışında önemli bir değişiklik tespit edilemedi. B ve C grubundaki köpeklerin histopatolojik bakışında proksimal tubuluslarda hücre nükleusları ve stoplazma sınırları kaybolmuş görünümde, epitel hücrelerinde vakuoler, diğer tubulus epitel hücrelerinde granüler dejenerasyon tespit edildi. Proksimal ve toplayıcı tubullerde yaygın tubuler nekroz ve nekrobiyoz, yer yer siyah granüler madde, tubuluslarda asidofilik yada bazofilik boyalı silindirlerin varlığı tespit edildi. Akut tubuler nekroz belirgin olup, tubulusun bazal membranları seçilebilmektedir. Geniş bir alanda subkortikal nekroz, fokal parankimal nekroz görüldü.

Jukstaklomerüler hücrelerde granüler ve vakuoler dejenerasyon ve interstisyel ödem tespit edildi. Ancak C grubundaki lezyonların daha yaygın ve şiddetli olduğu tespit edildi. Bu durum muhtemelen C grubuna uygulanan gentamisin dozunun yüksek (15 mg/kg) olmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak; bu denemede hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular yönünden her üç grup karşılaştırıldığında; eritropoietinin şiddetli renal hasarın tespitinde kullanılabileceği, ancak şiddetli hasar olmayan hastalarda klinik olarak tek başına tanıda faydalı olamayacağı, diğer biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgularla birlikte yorumlandığında daha önemli bir tanı yöntemi olabileceği kanısına varıldı:

#### KAYNAKLAR

- Woodman DD: Erythropoietin, Comparative Haematology International, 2: 1-7, (1992).
- Fried W, Barone-Varelas J, Morley C: Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. Blood Cells 10: 287, (1984).
- Sawyer ST: Receptors for erythropoietin. Distribution, structure, and role in receptor-mediated endocytosis in erythroid cells, in Harris JR (ed): Blood Cell Biochemistry, vol I. New York, NY, Plenum, p365, (1990).
- Spivak JL: Recombinant human erythropoietin and the anemia of cancer. Blood 84 (4): 997-1004, (1994).
- Goldwasser E. et al.: The effect of interleukin-3 on hemopoietic precursor cells. In: Normal and neoplastic hematopoiesis. pp. 301-309. Alan R. Liss, New York, (1983).
- Eckardt KU, Kurtz A, Hirth P, Scigalla P, Wiczorek L, Brauer C: Evaluation of the stability of human erythropoietin in samples for radioimmunoassay. Klin. Wochenschr., 66: 241-245, (1989).
- Caro J, Erslev AJ: Erythropoietin assays and their use in the study of anemias. Contrib. Nephrol. 66: 54, (1988).
- Garcia J, Sherwood J, Goldwasser E: Radioimmunoassay of erythropoietin. Blood Cells. 5: 405-419, (1979).
- Dunn CDR, Lange RD: Erythropoietin: assay and characterization; in Roaths, Topical reviews in hematology, pp:1-32 (Wright, Bristol), (1979).
- Miyake T, Kung CKH, Goldwasser E: Purification of human erythropoietin. J. Biol. Chem. 252: 5558-5564, (1977).
- Radtke HW, Erbes PM, Schippers E, Koch KM: Serum erythropoietin concentration in anephric patients Nephron. 22: 361-365, (1978).
- Spivak JL, Watson AJ: Hematopoiesis and the Kidney The Kidney: Physiology and Pathophysiology. Second Ed. Raven Press, Ltd., New York, Chapter 42: 1553-1593, (1992).
- Fisher JW: Mechanism of the anemia of chronic renal failure, Nephron, 25: 106-111, (1980).
- Burrows GE: Aminocyclitol antibiotics. JAVMA, 176: 1280-1281, (1980).
- Porter GA, Bennett WM: Nephrotoxic acute renal failure due to common drugs. Am. J. Physiol., 241: F1-F8, (1981).
- Bennett WM, Luft F, Porter GA: Pathogenesis of renal failure due to aminoglycosides and contrast media used in roentgenography. Am. J. Med., 69: 767-774, (1980).
- Maden M: Deneysel gentamisin nefrotoksitesinde ürener enzim aktivitelerinin önemi. TC S.Ü. Sağ. Bil. Enst., Doktora tezi, Konya, (1994).
- Fadel AA, Larkın HA: Gentamicin-induced nephrotoxicosis in lambs. Research in veterinary science 61: 187-192, (1996).
- Haddad LM, Winchester JF: Clinical management of poisoning and drug overdose. 2<sup>nd</sup> ed. WB Saunders company. pp. 167-184, (1990).
- Conzelman GM: Pharmacotherapeutics of aminoglycoside antibiotics. JAVMA, 176 (10): 1078-1080, (1980).
- Berne RM, Levy MN: Physiology, 3. ed. Mosby Year Book. pp.719-784, (1993).
- Canine Medicine and Therapeutics. 3. ed. In: Chandler E.A., Thompson D.J., Sutton J.B., Pricce C.J., Blackwell-Science pp. 601-658, (1995).
- Hinchliff KW, Shaftoe S, Dubielzing RR: Gentamicin-induced nephrotoksikozis in a cow. JAVMA 192(7): 923-925, (1988).
- Coles EH: Veterinary Clinical Pathology 4<sup>th</sup> ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, (1986).
- Grauer GF, Greco DS, Behrend EN, Fettmen MJ, Jaenke RS, Allen TA: Effects of dietary protein conditioning on gentamicin-induced nephrotoxicosis in healthy male dogs. Am. J. Vet. Res., 55(1): 90-97, (1994).
- Greco DS, Turnwald GH, Adams R, Gossett KA, Kearney M, Casey H: Urinary  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. Am. J. Res. 46(11): 2332-2335, (1985).
- Uechi M, Terui H, Nakayama T, Mishina M, Wakao Y, Takahashi M: Circadian variation of urinary enzymes in the dog. J. Vet. Med. Sci., 56(5): 849-854, (1994).
- Davis LE: Gentamicin JAVMA, 175(3): 301-302, (1979).
- Naughton BA, Birmbach DL, Liu P et al.: Erythropoietin production and kupffer cell alterations following nephrectomy, hypoxia, or combined nephrectomy and hypoxia. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160: 170-174, (1979).
- Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casdevall N, Camilleri JP, Bariety J, Varet B, Tambourin P: Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney J Clin. Invest. 81:620-623, (1988).

31. Eckardt KU, Kurtz A, Bauer C: Regulation of erythropoietin formation is related to proximal tubular function. *Am J Physiol.* 256: F942, (1989).
32. Giger U: Erythropoietin and its Clinical Use, *Comp. Continuing Education Article*, 14(1): 25-34, (1992).
33. Golde DW, Hocking WG, Koeffler HP, Adamson JW: Polycythemia: Mechanisms and Management. *Ann. Inter. Med.*, 95: 71-87, (1981).
34. Cotes PM, Bangham DR: Bio-assay of erythropoietin in mice made polycythemic by exposure to air at a reduced pressure. *Nature*, 191: 1065-1067, (1961).
35. Dunn CD, Jarvis JH, Greenman JM: A quantitative bioassay for erythropoietin using mouse fetal liver cells. *Exp. Hematol.* 3: 65-78, (1975).
36. Ikeda T, Inaba M, Maede Y: Serum Erythropoietin Level in Normal Dogs, *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(4): 877-878, (1990).
37. Caro J, Erslev AJ, Silver R, Miller O, Birgegard G: Erythropoietin Production in Respons to Anemia or Hypoxia in the Newborn Rat, *Blood*, 60(4): 984-988, (1982).
38. Lange RD: In "Methods in investigative and diagnostic endocrinology, part III. Non-pituitary hormones" p. 1124 (S.A. Berson and R.S. Yalow, ed.). North Holland Pub. Co., Amsterdam, (1973).
39. Fisher JW, Stuckey WJ, Lindholm DD, Abshire S: Extrarenal erythropoietin production. *Isr. J. Med. Sci.* 7: 991-992, (1971).
40. Davis ME, Berndt WO: Renal methods for toxicology. In: *principales and methods of toxicolog*, 3<sup>rd</sup> ed., Ed. By Hayes WA., Raven press, Ltd., New York, (1994).

**Yazışma Adresi:**

Zahit Ağaoğlu  
Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı  
VAN / TÜRKİYE

**Not:** Bu araştırma aynı isimli Doktora Tezinden özetlenmiştir.