

T. C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK ALKOL VE SİGARA KULLANIMINA MARUZ BIRAKILAN
ERKEK RATLARIN BÖBREK DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK VE
MALONDİALDEHİT (MDA), NİTRİK OKSİT (NO), KSANTİN OKSİDAZ
(XO), KSANTİN DEHİDROGENAZ (XDH), MİYELOPEROKSİDAZ (MPO),
GLUTATYON (GSH) YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

131183

YILMAZ ÇİĞREMİŞ

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
Şubat, 2003

131183
F. C. İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLJİ ANABİLİM DALI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

T. C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK ALKOL VE SİGARA KULLANIMINA MARUZ BIRAKILAN ERKEK
RATLARIN BÖBREK DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK VE MALONDİALDEHİT
(MDA), NİTRİK OKSİT (NO), KSANTİN OKSİDAZ (XO), KSANTİN DEHİDROGENAZ
(XDH), MİYELOPEROKSİDAZ (MPO), GLUTATYON (GSH) YÖNÜNDEN
İNCELENMESİ

YILMAZ ÇİĞREMİŞ

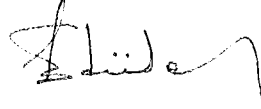
DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
Şubat, 2003

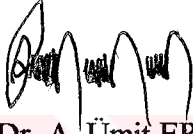
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLJİ ANABİLİM DALI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
Y. Ç. YILMAZ ÇİĞREMİŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

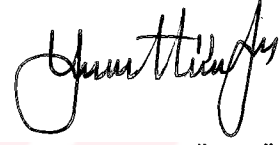
Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.



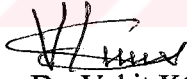
Prof. Dr. Eşref YÜKSEL
(Başkan)



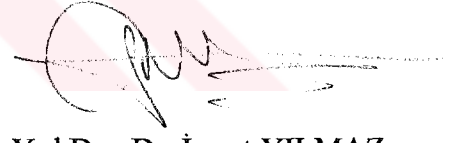
Prof. Dr. A. Ümit ERDEMLİ
(Üye)



Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
(Üye)



Yrd. Doç. Dr. Vahit KONAR
(Üye)

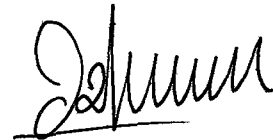


Yrd. Doç. Dr. İsmet YILMAZ
(Üye)

Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen Öğretim Üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

07.03.2003



(imza)

Doç. Dr. Özfer YEŞİLADA
Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

KRONİK ALKOL VE SİGARA KULLANIMINA MARUZ BIRAKILAN ERKEK RATLARIN BÖBREK DOKULARININ HİSTOPATOLOJİK VE MALONDİALDEHİT (MDA), NİTRİK OKSİT (NO), KSANTİN OKSİDAZ (XO), KSANTİN DEHİDROGENAZ (XDH), MİYELOPEROKSİDAZ (MPO), GLUTATYON (GSH) YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Yılmaz ÇİĞREMİŞ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

89 + viii sayfa

2003

I. Danışman: Prof. Dr. Eşref YÜKSEL
II. Danışman: Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Bu tezde kronik sigara içimi ve alkol alımının, erkek Wistar rat böbrek dokularına etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 6 ay boyunca bu maddelere maruz bırakılan hayvanlar, çalışma süresince her birinde 7 rat bulunan 4 gruba; kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol gruplarına ayrıldılar. Alkol grubu hayvanlar inek sütü, vitamin A (5000 İÜ) ve şükrozdan oluşan bir diyeti %7,2'lik alkolle birlikte ağız yoluyla alırlarken, sigara grubundaki hayvanlar bir plastik kafes (0,75x1x0,85 m, 0,64 m³) içinde çalışma süresince sigara dumanına maruz bırakıldılar. 4 grupta bulunan hayvanlar son uygulama sonrası sakrifiye edildiler ve böbrek dokularının GSH, MDA, NO, MPO ve XO seviyeleri analiz edildi.

Gram yaş doku başına GSH seviyesi, kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grupları için sırasıyla; 1,579±0,06 µmol, 0,910±0,06 µmol, 1,141±0,06 µmol ve 0,818±0,04 µmol olarak belirlendi. Uygulama yapılan grupların değeri kontrol grubundaki hayvanların değerinden anlamlı olarak düşüktü (p<0,05). Gram yaş doku başına MDA seviyesi kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grupları için sırasıyla; 40,14±3,4 nmol, 71,4±2,8 nmol, 64±3,6 nmol ve 76,5±4,3 nmol'dü. Kontrole göre, diğer grupların MDA seviyeleri anlamlı şekilde artmıştı (P<0,05). Total nitrit seviyeleri kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol gruplarında sırasıyla; gram yaş doku başına 347,73±8,1 nmol, 261,09±4,8 nmol, 329,76±5,6 nmol ve 254,15±3,8 nmol olarak tespit edildi. Kontrole göre alkol ve sigara+alkol gruplarının total nitrit seviyeleri anlamlı olarak azalmıştı (P<0,05). Kontrol ve sigara grubunun total nitrit seviyeleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. MPO aktivitesi kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol gruplarında sırasıyla; 13,5±0,6 U/gr, 16,16±1,1 U/gr, 14,71±1,1 U/gr ve 23,75±0,9 U/gr protein olarak bulundu. Kontrolle karşılaştırıldığında alkol, sigara+alkol gruplarında MPO aktivitesinin anlamlı olarak arttığı (p<0,05) görülürken, sigara grubundaki hayvanlarda fark tespit edilmedi. XO aktivitesi sırasıyla; kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol gruplarında 2,77±0,3 U/gr, 5,19±0,3 U/gr, 3,22±0,1 U/gr ve 7,59±0,9 U/gr protein idi. Kontrole göre alkol ve sigara+alkol gruplarının XO aktiviteleri anlamlı bir artış gösterirken (P<0,05), sigara grubunda anlamlı bir fark belirlenemedi.

Bütün grupların histopatolojik verileri incelendiğinde, alkol ve sigara+alkol gruplarına göre sigara grubunun böbrek tübüllerinde daha az bir dejenerasyon gözlendi. Özellikle alkol grubunda, glomerulusta vakuolleşme ve tübüllerde bozulma mevcuttu. Sigara+alkol grubunda ise, alkol ve sigara grubuna göre tübüllerin aşırı derecede bozulduğu ve glomerulus bazal membranında erime meydana geldiği görüldü.

Sonuç olarak, kronik sigara içimi ve alkol kullanımının böbrek dokusunda oksidatif patlamaya yol açabileceği ve bunun sonucunda ise serbest radikal kaynaklı doku hasarlanmaları görülebileceği kanaatine varıldı.

ANAHTAR KELİMELER:Sigara İçimi, Alkol, Rat, Böbrek, GSH, MDA, MPO, NO, XO, Histopatoloji

SUMMARY

Ph.D.Thesis

AN INVESTIGATION OF HISTOPATHOLOGIC CHANGES AND LEVELS OF MALONDIALDEHYDE (MDA), NITRIC OXIDE (NO), XANTHINE OXIDASE (XO), XANTHINE DEHYDROGENASE (XDH), MYELOPEROXIDASE (MPO), GLUTATHIONE (GSH) ON THE KIDNEY TISSUES OF MALE RATS TREATED WITH CHRONIC ALCOHOL AND CIGARETTE SMOKE

Yılmaz ÇİĞREMİŞ

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

89 + viii pages

2003

Supervisor I: Prof. Dr. Eşref YÜKSEL

Supervisor II: Assoc. Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

The aim of the study carried out in this thesis was to investigate the effects of chronic cigarette smoke and alcohol exposure on the kidney tissue in male Wistar rats. Animals, treated with these substances for a period of six months were divided into four experimental groups which were i) a control group ii) alcohol group iii) cigarette smoke group iv) smoke+alcohol group. All groups were consisted of 7 rats. Specimens in alcohol group animals were orally fed on a diet containing cow milk, 5000 IU vitamin A and sucrose together with 7.2% alcohol. Cigarette smoke group, on the other hand were kept in closed plastic cage (0.75x1x0.85 m., 0.64 m³) which exposed to cigarette smoke for the whole experimental period. At the end of the experimental period, the specimens in four groups were sacrificed and then their kidney tissues were analyzed for GSH, MDA, NO, XO, and MPO levels.

The level of GSH per gram of wet tissue was determined as $1.579 \pm 0.06 \mu\text{mol}$, $0.910 \pm 0.06 \mu\text{mol}$, $1.141 \pm 0.06 \mu\text{mol}$, and $0.818 \pm 0.04 \mu\text{mol}$ for control, alcohol, smoke, and smoke+alcohol groups respectively. The values were significantly lower ($p < 0.05$) than that of control group animals. The MDA levels per gram of wet tissue were $40.14 \pm 3.4 \text{ nmol}$, $71.4 \pm 2.8 \text{ nmol}$, $64 \pm 3.6 \text{ nmol}$, and $76.5 \pm 4.3 \text{ nmol}$, for control, alcohol, and smoke+alcohol groups, respectively. These values were found to be significantly higher ($p < 0.05$) than that of control group. The total nitrite levels were determined as $347.73 \pm 8.1 \text{ nmol}$, $261.09 \pm 4.8 \text{ nmol}$, $329.76 \pm 5.6 \text{ nmol}$, and $254.15 \pm 3.8 \text{ nmol}$ per gram wet tissue in control, alcohol, smoke, and smoke+alcohol groups, respectively. A significant decrease ($p < 0.05$) in total nitrite were observed in alcohol and smoke+alcohol group when compared to control group animals, however, no significant differences in total nitrite levels between smoke and control groups were detected. The activity of MPO was determined as $13.5 \pm 0.6 \text{ U/g}$, $16.16 \pm 1.1 \text{ U/g}$, $14.71 \pm 1.1 \text{ U/g}$, and $23.75 \pm 0.9 \text{ U/g}$ protein, for control, alcohol, smoke, and smoke+alcohol groups, respectively. These figures correspond to a significant increase ($p < 0.05$) in MPO activity in alcohol, smoke+alcohol groups compared to control. The difference was determined not to be significant for smoke group animals compared to control. The XO activity were $2.77 \pm 0.3 \text{ U/g}$, $5.19 \pm 0.3 \text{ U/g}$, $3.22 \pm 0.1 \text{ U/g}$, and $7.59 \pm 0.9 \text{ U/g}$ protein in control, alcohol, smoke, and smoke+alcohol groups, respectively. This values also correspond to a significant increase ($p < 0.05$) in XO activity in alcohol and smoke+alcohol group animals compared to control. The difference in XO was determined not to be significant between smoke and control group.

When the histopathological values of all groups were considered together, the degeneration of kidney tubules was determined to be lesser extent in smoke group animals than in alcohol and smoke+alcohol group animals. Especially in alcohol group animals there was an intense vacuolization in glomerulus and deformation of kidney tubules. In smoke+alcohol group animals, however, the degeneration of tubules was determined to be more severe and basal membrane of glomerulus to be dissolved compared to alcohol and smoke groups.

Results shows that the chronic cigarette smoke and alcohol exposure may cause an oxidative burst in kidney, resulting in tissue damage through the generation of free radical formation.

KEY WORDS: Cigarette smoke, Alcohol, Kidney, Rat, GSH, MDA, MPO, NO, XO, Histopathology

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeden beni yönlendiren danışman hocalarım Sayın Prof. Dr. Eşref YÜKSEL ve Doç. Dr. Yusuf TÜRKÖZ'e;

Tezin deneysel aşamalarında yardımını gördüğüm Arş. Grv. Muhammet GAFFAROĞLU ve Arş. Grv. Kenan ERDOĞAN'a;

Bu tezi, 2002/15 nolu proje ile destekleyen İnönü Üniversitesi BAP Kurulu Başkanlığına;

Tezin İngilizce özetinin hazırlanmasında değerli katkılarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL'e;

Ayrıca doktora çalışmam boyunca benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Aysel'e

Teşekkür ederim



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Böbreğin Yapı ve Fonksiyonları	4
2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem	7
2.3. Böbrekte Serbest Radikal Oluşturabilecek Muhtemel Mekanizmalar	10
2.4. Alkolün Genel Etkileri	13
2.5. Alkolün Böbrekteki Etkileri	18
2.6. Sigaranın Genel Etkileri	21
2.7. Sigaranın Böbrekteki Etkileri	26
2.8. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi	28
2.8.1. Glutatyon (GSH)	28
2.8.2. Malondialdehit (MDA)	30
2.8.3. Nitrik Oksit (NO)	33
2.8.4. Miyeloperoksidaz (MPO)	38
2.8.5. Ksantin Oksidaz (XO)	42
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER	47
3.1. Materyal	47
3.1.1. Kimyasal malzemeler	47
3.1.2. Kullanılan aletler	47
3.1.3. Ratların temini ve bakımları	48
3.2. Yöntemler	48
3.2.1. Kronik alkol ve pasif sigara rat modellerinin oluşturulması	48
3.2.2. Numune alınması ve hazırlık işlemleri	49
3.2.3. GSH analizi	49
3.2.3.1. Numune hazırlanması	49
3.2.3.2. Kullanılan reaktifler	49
3.2.3.3. GSH seviyesinin tayini	50
3.2.4. MDA analizi	50
3.2.4.1. Numune hazırlanması	50
3.2.4.2. Kullanılan reaktifler	50
3.2.4.3. MDA düzeyinin tayini	51
3.2.5. Total nitrit analizi	51
3.2.5.1. Numune hazırlanması	51
3.2.5.2. Kullanılan reaktifler	52
3.2.5.3. Total nitrit konsantrasyonunun analizi	52
3.2.6. MPO analizi	52
3.2.6.1. Numune hazırlanması	52
3.2.6.2. Kullanılan reaktifler	53
3.2.6.3. MPO aktivite tayini	53
3.2.7. XO analizi	53

3.2.7.1. Numune hazırlanması	53
3.2.7.2. Kullanılan reaktifler	53
3.2.7.3. XO aktivite tayini	54
3.2.8. XDH analizi	54
3.2.9. Böbrek dokusunun histopatolojik yönden incelenmesi	54
3.2.10. İstatistiki analizler	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen GSH Düzeyleri	55
4.2. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri	56
4.3. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen Total Nitrit Düzeyleri	57
4.4. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MPO Aktiviteleri	58
4.5. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen XO Aktiviteleri	59
4.6. Böbrek Dokularının Histopatolojik Sonuçları	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
6. KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	89



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Böbreğin histolojik görünümü	5
Şekil 2.2. Böbrekte nefronun yapısı	6
Şekil 2.3. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler	8
Şekil 2.4. Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması	10
Şekil 2.5. Böbrekte ROT'un muhtemel oluşum mekanizmaları	12
Şekil 2.6. Böbrekte hasar meydana getirebilecek biyokimyasal yollar	14
Şekil 2.7. Sigara içimi ile tetiklenen muhtemel mekanizmalar	25
Şekil 2.8. NO'nun başlıca biyolojik etkileri	36
Şekil 2.9. NO'nun dolaylı etkilerinin kimyası	37
Şekil 2.10. HOCl oluşum mekanizması	40
Şekil 2.11. Polimorf nükleer lökosit mevcudiyetinde NO kaynaklı oksidanların oluşumu için muhtemel bir yol	41
Şekil 2.12. İskemi/reperfüzyonda XD'nin, XO'ya dönüşerek radikal türleri oluşturma mekanizması	44
Şekil 2.13. Böbrekte alkolün XOR yoluyla muhtemel etkisi	45
Şekil 2.14. Alkol ve sigara kullanımının böbrek dokusundaki tüm muhtemel etkilerinin özeti	46
Şekil 4.1. Kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol grubu böbrek GSH düzeyleri	55
Şekil 4.2. Kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol grubu böbrek MDA düzeyleri	56
Şekil 4.3. Kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol grubu böbrek total nitrit düzeyleri	57
Şekil 4.4. Kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol grubu böbrek MPO aktiviteleri	58
Şekil 4.5. Kontrol, alkol, sigara ve sigara + alkol grubu böbrek XO aktiviteleri	59
Şekil 4.6. Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü	60
Şekil 4.7. Alkol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü	60
Şekil 4.8. Sigara grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü	61
Şekil 4.9. Sigara+alkol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Serbest Radikallerin Hücredeki Zararlı Etkileri	9
Çizelge 2.2. Sigara Kaynaklı Böbrek Hasarı Oluşturan Mekanizmalar	27
Çizelge 4.1. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen GSH Düzeyleri	55
Çizelge 4.2. Grupların GSH Düzeylerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi	55
Çizelge 4.3. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri	56
Çizelge 4.4. Grupların MDA Düzeylerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi	56
Çizelge 4.5. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen Total Nitrit Düzeyleri	57
Çizelge 4.6. Grupların Total Nitrit Düzeylerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi	57
Çizelge 4.7. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MPO Aktiviteleri	58
Çizelge 4.8. Grupların MPO Aktivitelerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi	58
Çizelge 4.9. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen XO Aktiviteleri	59
Çizelge 4.10. Grupların XO Aktivitelerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi	59

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	Alkol Dehidrogenaz
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CO	Karbonmonoksit
DTNB	Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
g.y.d.	Gram yaş doku
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HOCl	Hipokloröz Asit
HTAB	Heksadesiltrimetilamonyumbromid
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LH	Lütein Hormon
L-NAME	N ^w -nitro-l-arjinin metil ester
MDA	Malondialdehit
MPO	Miyeloperoksidaz
N ₂ O ₃	Diazottrioksit
NADPH	Nikotin Amid Adenin Dinükleotid Fosfat
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	Nitrik Oksit
NO ₂	Nitrit
NO ₂ Cl	Nitril Klorür
NO ₃	Nitrat
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
¹ O ₂	Singlet Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali
OH [·]	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
RNH ₂ -Cl	Klor Aminler
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARM	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri
XDH	Ksantin Dehidrogenaz
XO	Ksantin Oksidaz
XOR	Ksantin Oksido Redüktaz

1. GİRİŞ

Dünyanın en yaygın alışkanlıklarından olan alkol ve sigara kullanımı kanser, ateroskleroz, diyabet, böbrek hastalıkları gibi birçok hastalığa zemin hazırlamaktadır. Bu hastalıkların temelinde, kronik alkol ve sigara kullanımının hücresel düzeyde oksidatif hasara neden olması yatmaktadır. Dünya genelinde son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda, sigara, alkol ve uyuşturucu madde kullanımlarında belirgin bir artış olduğu gözlenmektedir. Sigara, Avrupa'da her yıl 500,000 ve Amerika'da ise 400,000 kişinin ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verileri, 1996'da dünyada 3 milyon kişinin sigaradan dolayı öldüğünü göstermektedir. Bu sayının 2020'de 10 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir [1]. Beyin, akciğer, karaciğer, kalp ve damarlar gibi hayati organlarda meydana getirdikleri ölümcül tahribatlar nedeniyle, halk sağlığını tehdit eden olumsuz faktörler arasında ilk sıralarda yer alan alkol ve sigara, insan vücudunda birçok sistemde hasarlara neden olabilmektedir.

Alkolün, sigarayla birlikte kullanımı oldukça yaygındır. Yapılan araştırmalarda, tütün ve alkolün birlikte kronik olarak kullanımının, kullanıcılar arasında kanser riskini artırdığı bildirilmiştir [2]. Öyleki, sigara ve alkolün birlikte kullanımı, tümör oluşum riskini 7 kat artırmaktadır [3]. Ağız ve özofagus kanserleri, alkol alan sigara tiryakilerinde, alkolün dozuyla doğru orantılı olarak artmaktadır [4]. Alkol ve sigaranın birlikte kullanıldığında ortaya çıkan zararlı etkileri, bu etkenlerin tek başına yapmış oldukları etkilerden daha fazla olduğunun görülmesi, bu iki zararlı madde arasında biyolojik bir etkileşimin olduğunu düşündürmektedir.

Alkolün vücutta en süratli etki gösterdiği yer merkezi sinir sistemidir. Alkolün karaciğer, solunum, dolaşım, görme ve işitme sistemlerine ilaveten diğer sistemler üzerine de zarar verici etkisi vardır. Ayrıca alkol, hemoglobinin yapısını etkileyerek eritrositlerin oksijen taşıma kapasitesini azaltmaktadır. Bu nedenle, vücudun oksijenlenmesindeki azalmaya bağlı olarak patolojiler ortaya çıkmaktadır. Vücuda alınan alkolün %90'ı karaciğerde detoksifiye edilerek, %10'u da hiç değişmeksizin böbrek yoluyla vücut dışına atılır. Alkol ve metabolitlerinin böbreklerden atılımı sırasında, böbrek dokusunda hasarlara yol açacağı açıktır. Alkolün hem kendisi, hem de metabolitleri organizmada oksidatif stresin oluşumuna neden olabilmektedir. Alkol toksisitesi, böbreklerde iltihaplara ve fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır.

Bilindiği gibi böbrekler vücut homeostasisinin sağlanmasında önemli organlardan biridir. Böbrek dokusunda oluşacak bir bozulma bütün vücudu etkileyecektir.

Sigara içimiyle 4700'ün üstünde tanımlanan madde karışımı vücuda alınmaktadır. Sigarada, katran ve gaz fazı olmak üzere iki faz belirlenmiştir. Her iki faz, radikal olmayan oksidanlar kadar, oksijen merkezli, karbon merkezli ve nitrojen merkezli serbest radikallerce de zengindir. Yapılan analizlerde, katran fazının her bir iç çekimde 10^{14} , gaz fazının ise 10^{15} adet serbest radikal içerdiği tespit edilmiştir. Katran fazı radikalleri, aşırı reaktif olmayan bir çok bileşikten oluşmaktadır. Bununla birlikte, bu radikaller havada saatlerce veya belki de günlerce kalabilen uzun ömürlü moleküllerdir. Katran fazı radikalleri DNA'da kırıklar veya çentikler oluşturarak kansere yol açabilmektedirler [5]. Sigaranın neden olduğu serbest radikal kaynaklı oksidatif durum, organizmanın antioksidan kapasitesinde değişikliklere neden olabilmekte ve savunma sistemlerinde yetersizliklere yol açmaktadır [6-9].

Oksidatif hasar, hücresel düzeyde hücre membran lipidlerinin peroksidasyonu ile sonuçlanır. Bu peroksidasyon sonucunda, hücre membran geçirgenliği, akışkanlığı, elastikiyeti ve yapısal özellikleri bozulur. Bir doku ya da vücut sıvısında malondialdehit'in (MDA) artışı, lipid peroksidasyonunun arttığını gösteren önemli bir indekstir. Yine glutatyon (GSH), hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan önemli bir hücre içi antioksidandır. GSH seviyesinin tespiti, organizmadaki oksidatif hasarın düzeyini ortaya koymaya yardımcı olmaktadır. Ksantin oksidoredüktazlar da (XOR) antioksidan sistemde önemli bir yere sahiptir. Radikalik hasarın arttığı her durumda, normalde ksantin dehidrogenaz (XDH) aktivitesi gösteren bu protein, ksantin oksidaz'a (XO) dönüşerek oksidatif patlamaya katkıda bulunmaktadır. Organizmada süperoksit radikalinin (O_2^-) başlıca kaynaklarından biri XO'dur. Dokuda XO aktivitesinin belirlenmesi, hasarın tespitinde önemli bir indekstir.

Nitrik oksit (NO) renksiz bir gazdır. Havadaki NO kısa sürede, oksijen ile oksitlenerek, NO_2 (nitrit) ve daha sonra NO_3 'e (nitrat) dönüşür. NO, çiftlenmemiş elektron bulundurması ve hücrelere kolayca girebilmesi nedeni ile ideal bir haberci molekülü ve serbest radikal özelliği taşır. Aşırı ve kontrolsüz NO üretimi, hücreler için zararlı olmaktadır. Çünkü NO, O_2^- ile birleşerek peroksinitrit ($ONOO^-$) haline dönüşmektedir ve sonuçta $ONOO^-$ 'lar patolojik tabloların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dokudaki total nitrit düzeylerinin ölçülmesi, NO metabolizması ile ilgili çok önemli veriler sunabilmektedir.

Miyeloperoksidaz (MPO), immün sistemde oldukça önemli bir enzimdir. Özellikle MPO'nun oluşturduğu hipokloröz asit (HOCl), fagosite edilen bakterilerin parçalamasında önemli bir yer tutar. Oksidatif hasarın olduğu bölgeye nötrofillerin yığılması, doku MPO aktivitesinde bir artışı da beraberinde getirebilmektedir. Bundan dolayı doku MPO aktivitesinin tespiti, dokuya nötrofil yığılmasının bir delili olarak karşımıza çıkmaktadır.

Böbrek dokularının histopatolojik yönden incelenmesi ise oluşacak hasarın mikroskopik düzeyde ortaya konmasını sağlamaktadır.

Alkol ve sigaranın vücuttaki zararlı etkilerini incelemek amacıyla yapılan araştırmalar daha çok akciğer, mide, beyin, karaciğer ve üreme sistemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu konuyla ilgili böbrekler üzerinde çok az sayıda araştırma yapılmış ve konu tam olarak açıklanamamıştır.

Bu nedenle bu araştırmada; deneysel olarak oluşturulan kronik alkol ve sigara rat modelinde, böbrek dokusu MDA, MPO, NO, GSH, XOR düzeyleri analiz edilerek, alkol ve sigaranın böbrek dokusunda meydana getireceği oksidatif hasarın biyokimyasal olarak ortaya konulması ve histopatolojik verilerle de desteklenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Böbreğin Yapı ve Fonksiyonları

Bir hücrenin yaşamsal fonksiyonunu sürdürebilmesi, yalnızca alınan besinlerin metabolize edilmesi veya metabolik atıkların temizlenmesiyle değil, aynı zamanda hücre dışı sıvıda fiziksel ve kimyasal şartların devamlılığının sağlanmasına da bağlıdır. Bu şartların oluşmasına yardımcı en önemli maddeler arasında su, sodyum, potasyum, kalsiyum ve fosfat yer alır. Bu maddelerin herhangi birinin kaybı veya ortamda birikimi, diğerlerinin organizmadaki durumunu etkileyebilir. Böbrekler, hücre dışı sıvıda bu maddelerin miktarının ve konsantrasyonunun düzenlenmesinden sorumlu olan başlıca organlardır. Böbrekler vücut sıvısını, elektrolit dengesini korur ve metabolik atıkları canlıdan uzaklaştırır. Vücudun sıvı kompozisyonunun sürdürülmesi, fizyolojik işlevleri etkileyen hormonların üretimi, kan basıncının düzenlenmesi (renin sentezi ve salgılanması yoluyla), alyuvarların üretimi (eritropoietin sentezi ve salınımı yoluyla) ve kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi de böbreğin diğer görevleri arasındadır. Böbrekler kanın ultrafiltrasyonu ile idrar üretirler. İdrar; üre, ürik asit, kreatinin ve çeşitli maddelerin yıkım ürünleri gibi atık ürünlere ilaveten, su ve elektrolitleri de içerir. İdrar son haline gelinceye kadar seçici geri emilim mekanizmaları ve özel salgılama mekanizmaları ile şekillendirilir. Organizmada böbreklerin bu kadar önemli işlevleri olması nedeniyle, böbrek fonksiyonlarındaki herhangi bir bozulma, beraberinde canlıyı ölüme götürebilen sonuçları doğurabilmektedir [10].

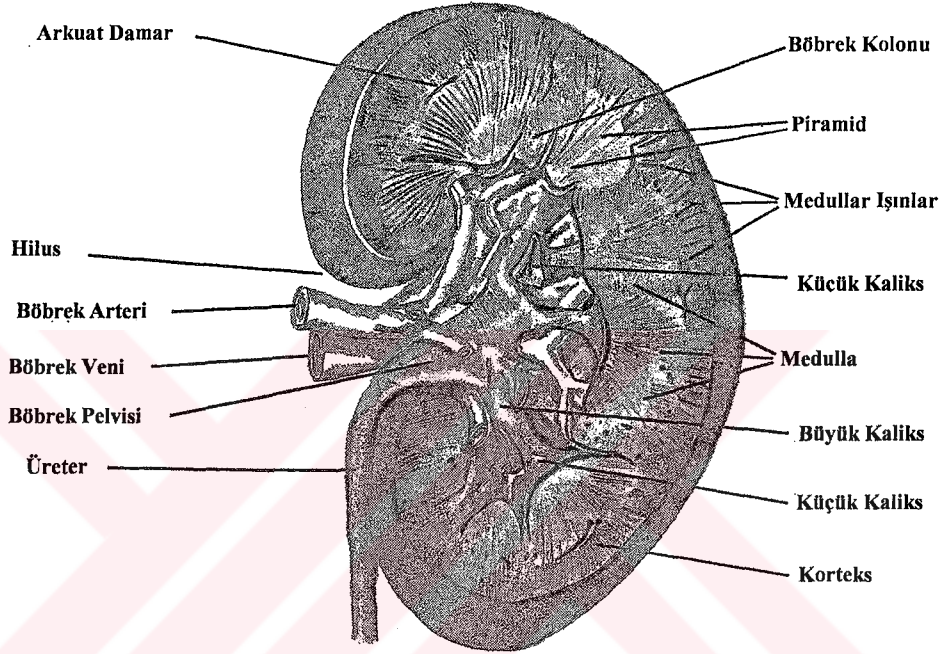
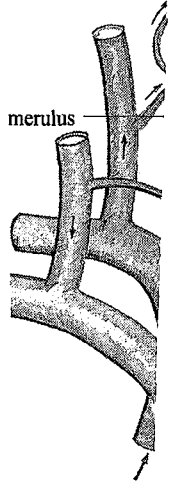
Böbrekler; karın boşluğunun arka tarafında retroperitoneal dokuda, spinal kolonun her iki yanında bulunan, erişkin insanda 120-160 gr ağırlığında, 10 cm uzunluğunda, 6,5 cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığında olan kırmızımtırak renkte organlardır. Organın ağırlık ve hacmi, fonksiyonel yüklenme durumuna göre oldukça değişkenlik gösterir [11].

Vücutta iç ortamın değişmez tutulması akciğer ve böbrekler tarafından sağlanmaktadır. Böbrekler bu görevi filtrasyon (süzme), rezorpsiyon (geri emme) ve sekresyon (boşaltma) işlevleriyle gerçekleştirmektedirler. Filtrasyon; kan plazması suyunun bir kısmının, içinde erimiş maddeleriyle birlikte süzülme yoluyla çıkarma işlemidir. Rezorpsiyon ise süzme ile kandan ayrılan, fakat iç dengenin sağlanmasında lüzumlu olan maddelerin geri emilimidir. Sekresyon; vücut için yararlı veya zararlı olan artık ve yabancı maddelerin kandan alınıp tübül sıvısına verilmesidir. Böbreğin histolojik yapısı incelendiğinde, dış yüzü capsula renalis adı verilen bir zarla örtülü

tarafından vüc
ksimal tübül,
ndan bu madde
umludur. Dist
arın asitleştiri

olup, korteks ve medulladan oluşan iki bölgeye ayrılmaktadır. Böbrek dokusu piramidlerden oluşmuştur ve piramidlerin sivri uçları böbrek boşluğu da denilen hilus renalis'e bakmaktadır. Kanın süzülmesi için böbreklere kanı getiren artere böbrek arteri adı verilir. Böbrek arteri, böbrekte 7 ile 9 parçaya ayrılır ve bunlara interlobular arterler adı verilir. Bu arterlerde ikiye ayrılır, iki uç karşı karşıya gelir ve arklar yapar (arkuat arter) (Şekil 2.1.).

Proksimal tübül



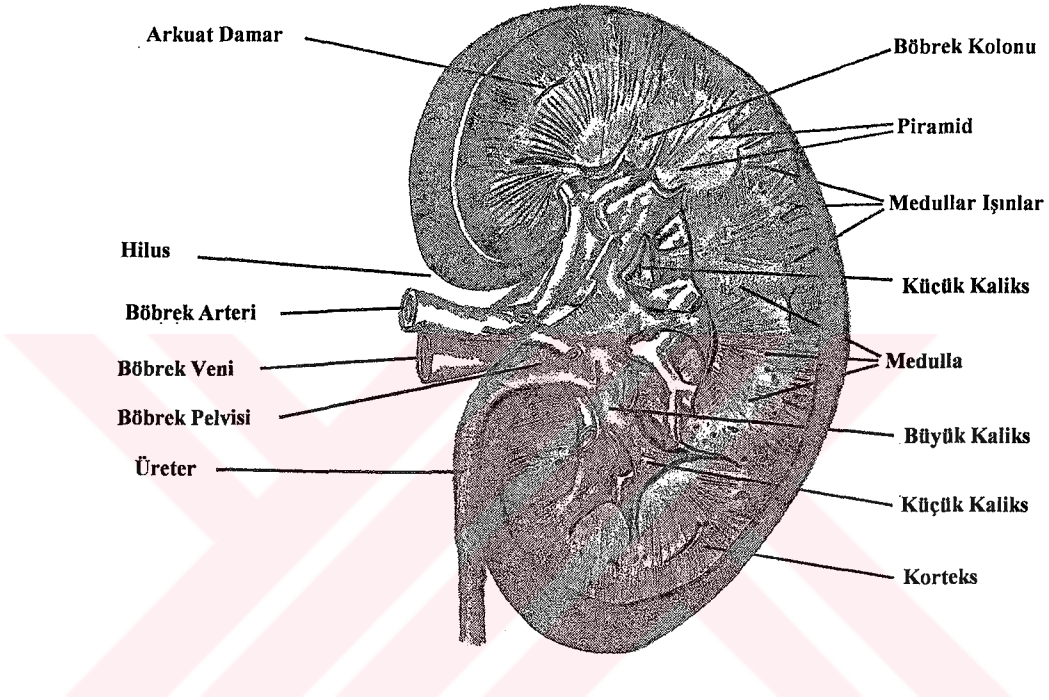
Şekil 2.1. Böbreğin histolojik görünümü [12].

İnterlobular arterden ayrılan kısa kan damarları glomerulus'a girer. Glomerulus'tan bahsetmeden önce, böbreğin iş gören ünitesi olan nefron'u izah etmek faydalı olacaktır. Nefron; glomerulus ve bowman kapsülü, bunu izleyen proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve idrar toplama kanallarından oluşmuştur. İnsanda nefron'un uzunluğu 5 santimetre kadardır ve tahminen insan böbreğinde 1 milyon kadar nefron bulunmaktadır. Glomerulus; afferent arterin böbrekte birçok kılcal damara ayrılması ve kılcal damarların birleşerek efferent arteri meydana getirmesi ile oluşan, afferent ve efferent arter arasında kalan kılcal kan damarı yumağıdır. Glomerulus'lar vücudun süzgeçleridirler, kan damarları ve bol miktarda por (gözenek) taşırlar ve sistemik kılcal damarlardan 100 kat daha geçirgendirler. Glomerular süzüntü kimyasal yapısı bakımından kan plazmasına benzerdir ve protein ve proteine bağlı maddeleri

Şekil

da çok ön
ktedirler.
kilenebild
aktif mole
ydana ge
ak radika
a bilgi ve

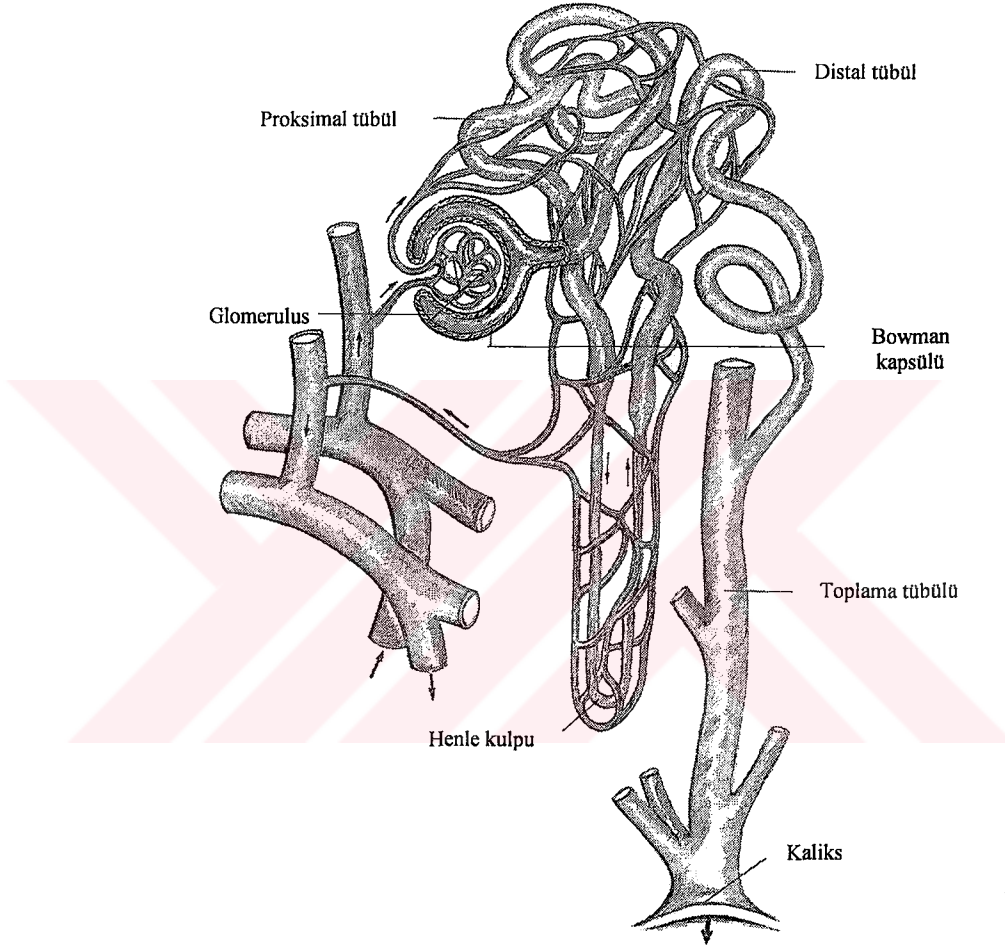
olup, korteks ve medulladan oluşan iki bölgeye ayrılmaktadır. Böbrek dokusu piramidlerden oluşmuştur ve piramidlerin sivri uçları böbrek boşluğu da denilen hilus renalis'e bakmaktadır. Kanın süzülmesi için böbreklere kanı getiren artere böbrek arteri adı verilir. Böbrek arteri, böbrekte 7 ile 9 parçaya ayrılır ve bunlara interlobular arterler adı verilir. Bu arterlerde ikiye ayrılır, iki uç karşı karşıya gelir ve arklar yapar (arkuat arter) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Böbreğin histolojik görünümü [12].

İnterlobular arterden ayrılan kısa kan damarları glomerulus'a girer. Glomerulus'tan bahsetmeden önce, böbreğin iş gören ünitesi olan nefron'u izah etmek faydalı olacaktır. Nefron; glomerulus ve bowman kapsülü, bunu izleyen proksimal tübül, henle kulpu, distal tübül ve idrar toplama kanallarından oluşmuştur. İnsanda nefron'un uzunluğu 5 santimetre kadardır ve tahminen insan böbreğinde 1 milyon kadar nefron bulunmaktadır. Glomerulus; afferent arterin böbrekte birçok kılcal damara ayrılması ve kılcal damarların birleşerek efferent arteri meydana getirmesi ile oluşan, afferent ve efferent arter arasında kalan kılcal kan damarı yumağıdır. Glomerulus'lar vücudun süzgeçleridirler, kan damarları ve bol miktarda por (gözenek) taşırlar ve sistemik kılcal damarlardan 100 kat daha geçirgendirler. Glomerular süzüntü kimyasal yapısı bakımından kan plazmasına benzerdir ve protein ve proteine bağlı maddeleri

taşımaz. Böbrek tarafından vücut için lüzumlu olan maddeler tekrar kana emilir. Böbrek tübüllerinden proksimal tübül, glukozun, elektrolitlerin ve suyun geri emilimini yapar, yani tübül sıvısından bu maddeleri geri kana aktarır. Henle kulpu, idrarın konsantre edilmesinden sorumludur. Distal tübül ise, su geri emilimi, sodyum geri emilimi, klor geri emilimi, idrarın asitleştirilmesi ve bikarbonat geri emiliminden sorumludur (Şekil 2.2.) [13].



Şekil 2.2. Böbrekte nefronun yapısı [14].

Organizmada çok önemli işlevlere sahip olan böbrekler, çeşitli dış ve iç etkiler ile hasarlanabilmektedirler. Husain ve ark. [4], böbreklerin etanol ve nikotin kaynaklı metabolitlerden etkilenebildiğini bildirmişlerdir. Alkol ve sigara, serbest radikaller adı verilen aşırı reaktif moleküller oluşturarak böbrek dokusunda radikal kaynaklı hasarlanmalar meydana getirebilmektedir. Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle kısa olarak radikaller, oluşum mekanizmaları ve bu radikallere karşı savunma sistemleri hakkında bilgi vermek faydalı olacaktır. Çünkü radikal bileşikler, sigara ve

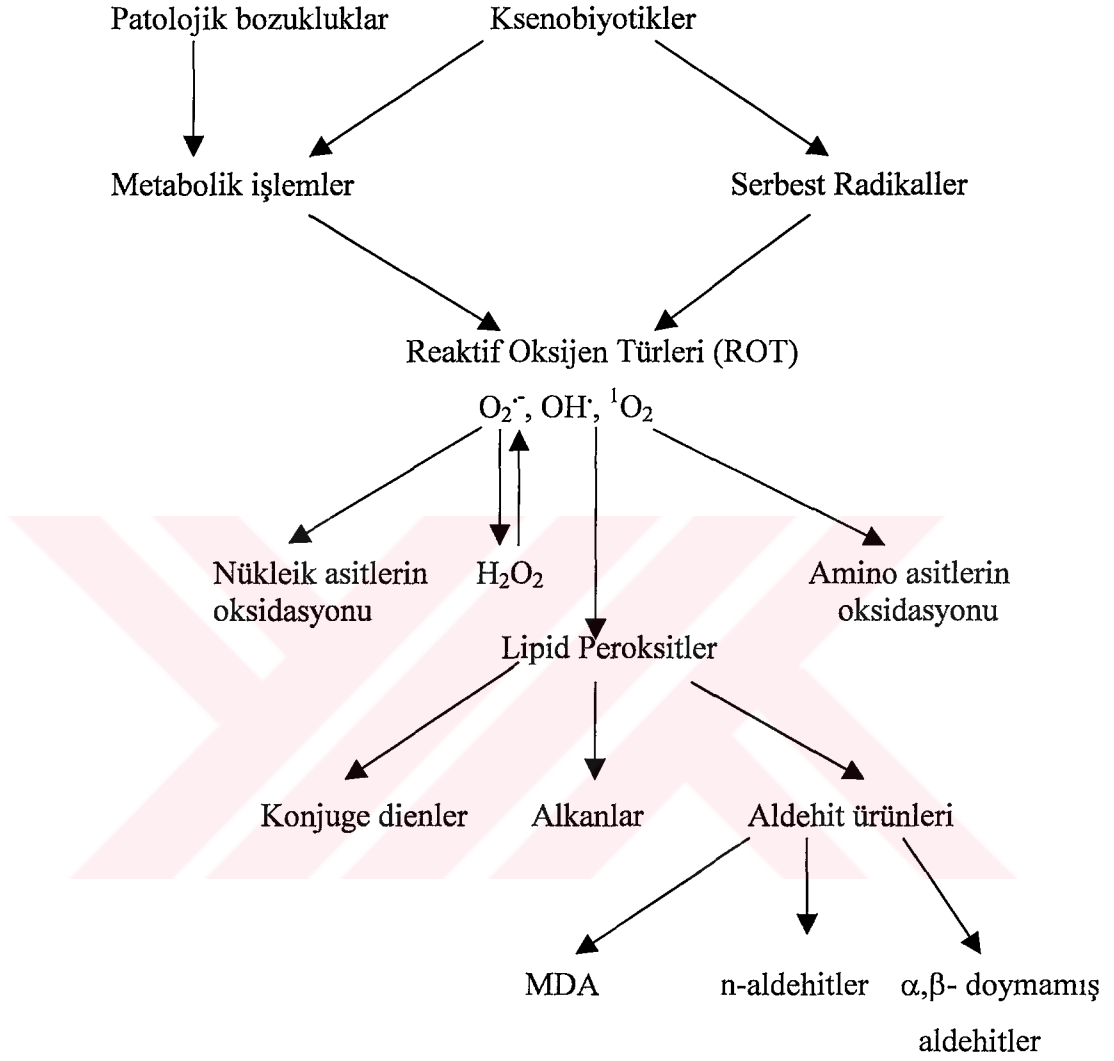
alkol gibi dış kaynaklı etkilere bağlı olarak aşırı miktarda üretilmekte ve dokulara zarar verebilmektedirler.

2.2. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistem

Serbest radikaller; hücre metabolizmasında biyokimyasal redoks tepkimeleri ile ortaya çıkan, dış yörüngelerinde çok az bir süre için bile olsa bir çiftlenmemiş elektron bulunduran atom ya da moleküllerdir. Bu tek elektron, çiftlenmek eğiliminde olduğundan, serbest radikaller aşırı derecede reaktiftirler ve bu nedenle diğer moleküller ile hızla reaksiyona girebilirler [15]. Bu radikaller hücre içinde, aerobik metabolizma sırasında sürekli oluşurlar ve belli patolojik durumlarda üretimleri artar. Serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^\cdot), singlet (tekil) oksijen (1O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'dir. H_2O_2 ve 1O_2 tanımlamada bir serbest radikal olarak sayılmazlar, fakat serbest radikal özelliği gösterirler. Biyolojik açıdan diğer önemli serbest radikaller veya onların eşitleri ise, lipid hidroperoksit (ROOH), lipid peroksi radikal (ROO^\cdot), lipid alkoksi radikal (RO^\cdot), nitrik oksit (NO^\cdot) gibi radikal türleridir [16,17].

Serbest radikaller, canlılarda iç ve dış kaynaklı olarak üretilebilirler. İç kaynak olarak, mitokondrial elektron taşıma sistemi, oksidan enzimler (XO, monoamin oksidaz vb.), fagositik hücreler (nötrofil, eozinofil vb.), otooksidasyon reaksiyonları, yaşlanma gibi kaynaklar ile ortaya çıkarlar [15,18,19].

İlaçlar, sigara, alkol, uyuşturucular, ksenobiyotikler, kirli hava, nitrojen dioksit, benzen, kükürt dioksit, karbon monoksit gibi maddeler önemli dış radikal kaynaklarıdır. Serbest radikaller, aşırı reaktiviteleri nedeniyle canlılarda bulunan her çeşit biyomoleküle hasar verebilirler. Serbest radikallerin hasar verdiği biyomoleküller arasında nükleik asitler, lipidler, proteinler, serbest amino asitler, lipoproteinler, karbohidratlar ve bunlardan türeyen kompleks moleküller sayılabilir (Şekil 2.3.) [20-22].



Şekil 2.3. Serbest radikal kaynaklı hasar ve oluşan ürünler [23].

İç veya dış kaynakların etkisiyle aşırı miktarda üretilen bu radikaller, **Çizelge 2.1.**'de özetlenen hasarlara neden olabilirler.

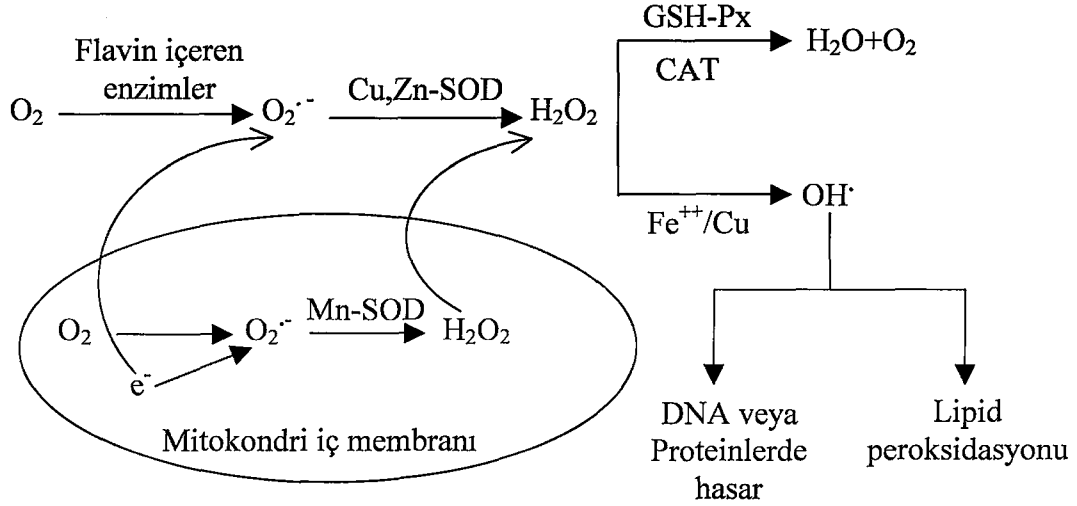
Çizelge 2.1. Serbest Radikallerin Hücredeki Zararlı Etkileri

-
- Proteinlere zarar verirler,
 - Enzimleri inaktive ederler,
 - Membran ve serum lipidlerinde peroksidasyon yaparlar,
 - DNA'da hasar yaparlar,
 - Mitokondride aerobik solunumu bozarlar,
 - Litik enzimleri aktive ederler,
 - Hücre yüzeyindeki reseptörlerde değişiklikler yaparlar,
 - Hücrenin K^+ kaybını artırır,
 - Na-K-ATPaz, Ca-ATPaz gibi hücre iyon taşıma proteinlerini tahrip ederler,
 - Bağ dokusunda harabiyet oluştururlar,
 - Trombosit birikimini arttırırlar,
 - Dokularda fagosit artışına sebep olurlar,
 - Karbohidratlara etki ederler,
 - Hücre dışı kollajen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar,
 - Kılcal damarların geçirgenliğini bozarlar,
 - Hücre dışı yapıları etkilerler.
-

Normal fizyolojik şartlarda oksijenin %2-5'i reaktif oksijen türleri'ne (ROT) dönüşmekte ve antioksidan sistem ile ortadan kaldırılmaktadır. ROT, eğer antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılmazsa, lipid peroksidasyonu hücre hasarına neden olabilmektedir. O_2^- , H_2O_2 , OH^* gibi ROT'lar, insan hastalıklarının bir çoğunun patogenezinde işin içine karışmaktadır. Bununla birlikte fizyolojik şartlarda oluşan ROT, antioksidan savunma sistemi ile ortadan kaldırılmaktadır. Antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ve glutatyon (GSH), vitamin A, C ve E gibi enzim olmayan antioksidanları içine almaktadır. O_2^- radikalleri SOD ile H_2O_2 'ye, oluşan bu H_2O_2 ise, GSH-Px ve CAT ile su ve oksijene dönüştürülerek detoksifiye edilmektedir (**Şekil 2.4.**) [24].

Dokularda antioksidan sistemlerce kaldırılamayacak kadar aşırı serbest radikal üretiminin olduğu her patolojik durumda, oksidatif stres meydana gelir [17].

Dış faktörlerin etkisiyle oluşan ROT, hücrenin oksidan/antioksidan dengesini daha da bozar. Etanol ve nikotin, ROT oluşturan çok önemli dış kaynaklardır. Serbest radikaller veya ROT, etanol ve sigara kaynaklı oksidatif hücre hasarında işe karışmaktadır [4].



Şekil 2.4. Hücrede oksidatif ve antioksidan sistemin basit bir şeması. Süperoksit (O₂^{•-}) başlıca, solunum zincirinden elektron kaçaklarından dolayı sitozolde flavin içeren enzimler ile, mitokondride ise hücre içi olarak anlamlı miktarda üretilmektedir. Süperoksit, ya süperoksit dismutaz (SOD) ile ya da kendiliğinden, hidrojen peroksit (H₂O₂) oluşturur. Hidrojen peroksit, değişik enzimler ile (GSH-Px= Glutatyon peroksidaz, CAT=Katalaz) su ve dioksijene enzimatik olarak metabolize olabilir veya transisyon metal iyonlarıyla, bir kimyasal reaksiyonla (Haber-Weiss reaksiyonu) çok aşırı reaktif olan hidroksil radikaline (OH[•]) dönüşebilir. OH[•] radikali de, lipid peroksidasyonuna, DNA’da veya proteinlerde hasara neden olur [25].

2.3. Böbrekte Serbest Radikal Oluşturabilecek Muhtemel Mekanizmalar

Deneysel modellerle yapılan çalışmalarda iskemik, toksik ve immünolojik olarak oluşan böbrek hasarının patogeneğinde birinci neden olarak ROT gösterilmiştir. Böbrek dokusunda çeşitli etkenler ile oksidatif stresin oluşması, ciddi böbrek bozukluklarına yol açmaktadır. Örneğin, tedavi amacıyla içilen bazı ilaçlar (gentamisin, sisplatin ve siklosporin A) ROT oluşumunu artırarak, böbrek dokusunda hasarlanmalar meydana getirebilmektedir [26-29]. Ayrıca günümüzün temel problemlerinden olan sigara ve alkol, organizmada ROT oluşturan dış kaynakların başında gelmektedir. İleride de değineceğimiz gibi sigara ve alkol hem ayrı ayrı hem de birlikte kullanımlarıyla vücutta oldukça fazla miktarda radikal oluşumuna neden olabilmektedirler. Burada, böbrek dokusunda oluşan radikallerin hangi mekanizmalardan kaynaklandığına değinilecektir.

ROT’un aşırı üretimi antioksidan kapasitede bir azalmayı da beraberinde getirerek toksisiteye neden olmaktadır. Bu durum; sigara ve alkol kullanımında, hipoksi/tekrar oksijenlenme (iskemi/reperfüzyon) indüklü böbrek hasarında, immün-

aracılı glomerular hasarda veya başka etkenlerle meydana gelebilecek böbrek hasarlanmalarında, in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir [30,31].

Dokularda ROT oluşumu; neden oldukları lipid peroksidasyonuna, dokudaki XDH/XO dönüşüm oranına, dokunun GSH içeriğine, NO düzeyine ve MPO gibi enzimlerin aktivitelerine etkileri ile belirlenebilmektedir. Normal şartlar altında, proksimal tübül hücreleri O_2^- , H_2O_2 , OH^- radikali üretebilmektedir. İskemi/reperfüzyon durumunda veya herhangi bir iç veya dış etki ile bu üretimin artması, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasıyla sonuçlanmaktadır. İskemi ile oluşan akut böbrek bozukluğu; böbrek kasılımı, aşırı tübüler hasar, tübüler nekrozis, glomerular süzmede bozulma ve glomerular hasarı kapsayan kompleks bir olay olarak karşımıza çıkmaktadır.

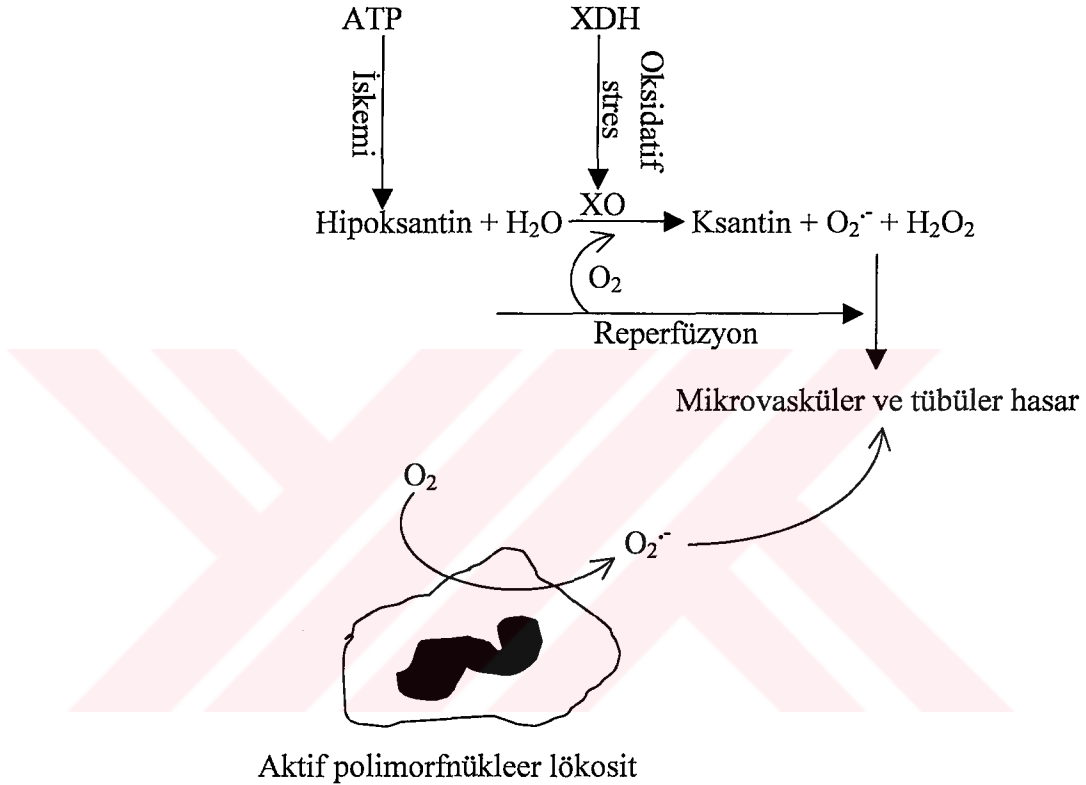
O_2^- radikali, hipertansiyon oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Arterial kan basıncındaki akut bir yükselme, arterlerde O_2^- radikali üretimini oldukça artırmakta ve artan O_2^- radikali ise endotel fonksiyonunu bozabilmektedir. Angiotensin-II indüklü hipertansiyonda, patolojik şartlar altında oksijen tüketimi için birincil kaynaklardan olan NADH/NADPH oksidaz sistemi arter duvarlarında aktive olmakta ve O_2^- radikali üretmektedir. Artan O_2^- radikali üretimi, vasküler duvarların şeklini değiştirerek hipertansiyonla sonuçlanan periferel dirençte bir artışa neden olabilmektedir. Renal korteksteki NADH oksidaz aktivitesi dış medullaya benzerken, böbrek papillasından daha yüksektir. O_2^- radikali üretiminin diğer önemli bir kaynağı olan mitokondri solunum zinciri enzimleri, böbreğin 3 bölgesi arasında en çok dış medullada aktiftir. Fiziyojik şartlar altında böbrekteki O_2^- radikali başlıca NADH oksidaz ve mitokondrial enzim sistemi ile üretilmektedir. O_2^- radikali, NO ile birleşerek, NO'nun neden olduğu gevşemede bir azalmaya neden olmakta ve bunun sonucunda damar kasılması meydana gelmektedir. Aynı zamanda bu radikal, doğrudan vasküler düz kas hücrelerinin, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırarak da kasılmaya neden olabilmektedir [32].

Anoksiyayı içeren böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında, reperfüzyon boyunca serbest oksijen radikallerinin salınımı, nötrofil birikimini meydana getirebilmektedir. İskemi/reperfüzyon sırasında oluşan serbest oksijen radikalleri, hücresel hasarın patogenezinde rol oynayan en önemli faktördür (**Şekil 2.5.**).

Rhoden ve arkadaşlarının [33], ratlarda deneysel böbrek iskemi/reperfüzyonu oluşturarak yaptıkları araştırmada, böbrek MDA düzeyinin, iskemi/reperfüzyon grubunda arttığını tespit etmişlerdir. Yine bu araştırmada L-arjinin uygulanan

iskemi/reperfüzyon gruplarında, MDA düzeyinde oldukça bir artma meydana geldiğini, bu durumun ise ONOO⁻ üretimindeki artıştan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan diğer çalışmalarda; böbrek iskemisinde ATP oranında azalma ve adenzin, inozin ve hipoksantin gibi ATP yıkılım ürünlerinde artmanın, XO'yu aktive ederek O₂⁻ radikal oluşumunu artırabileceği ve buna bağlı olarak ONOO⁻ kaynaklı böbrek doku hasarlanmaları meydana gelebileceği bildirilmiştir [33,34].



Şekil 2.5. Böbrekte ROT'un muhtemel oluşum mekanizmaları.

Agustin ve ark. [35], yaptıkları bir iskemi/reperfüzyon araştırmasında, iskemik rat böbreklerinin lipid peroksidasyonunun arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun iskemi boyunca XDH'nin, XO'ya dönüşümüyle birlikte üretilen ROT'tan kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir.

Hücre hasarı; adenin metabolitlerinin akışı ve ATP seviyesindeki azalma ile karakterizedir ve daha sonra hücre ayrılması ve hücre parçalanması meydana gelir. İskemi sonrası böbrek hasarında, ROT'un etkilerini gösterebilmek için oksidan/antioksidan sistemler üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin iskemi öncesi ve reperfüzyon sırasında ortama SOD ilavesinin yapılması, böbrek fonksiyon bozukluklarını (glomerular süzme oranının azalması) ve histopatolojik (hücresel nekroz

ve tübül tıkanması) böbrek hasarlarını önlemektedir. Bu sonuçlar, böbrek patogeneğinde O_2^- radikalinin rolünü ortaya koymaktadır. Böbrek hasarının mekanizması, ortamda aşırı O_2^- radikalinin birikimi, SOD aktivitesinde bir azalma ve XO aktivitesinde bir artma ile açıklanmaktadır. Böbrekte XDH'nin, XO'ya dönüşmesi için yaklaşık olarak 30 dakikalık bir iskemi yeterli olmaktadır. Böbrek iskemisi boyunca O_2^- radikalinin en önemli kaynağının XO olduğu görülmektedir [36].

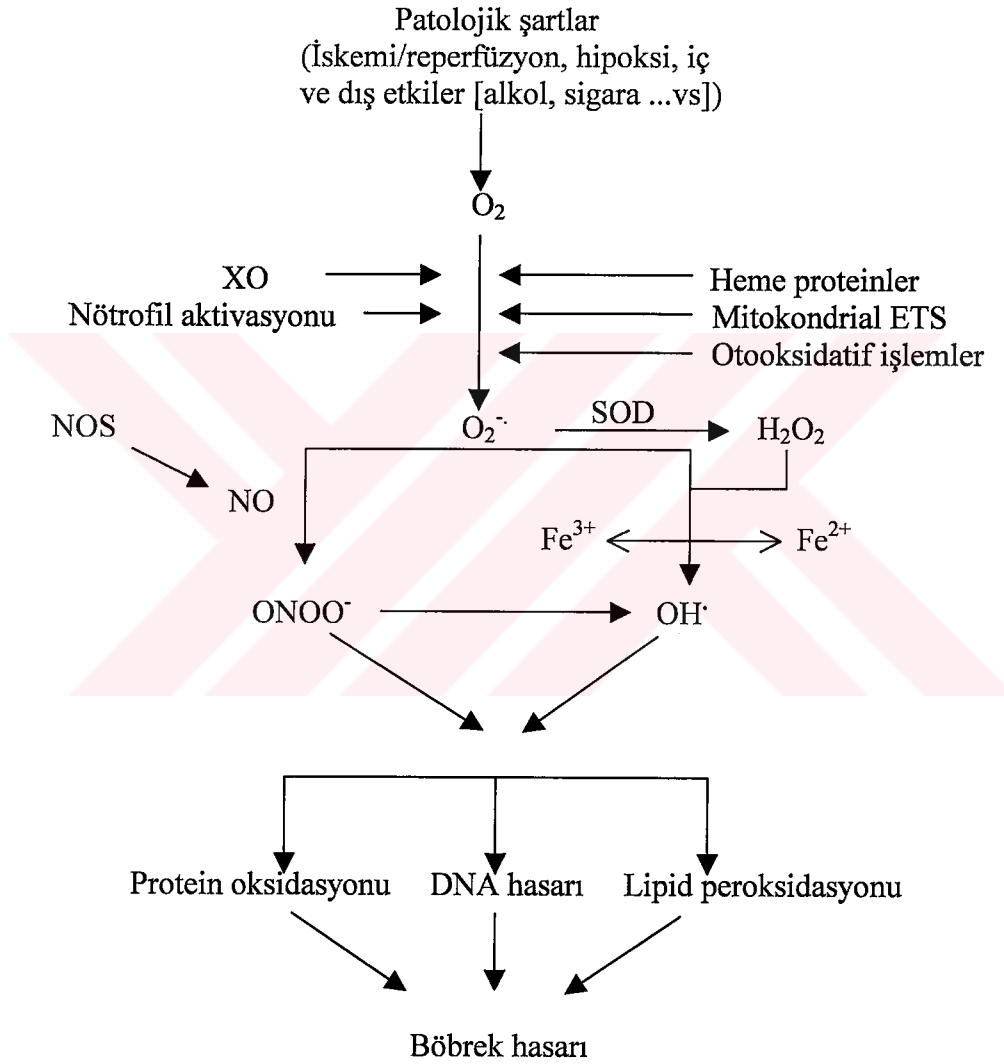
Polimorf nükleer lökositler, iskemik böbrekte O_2^- radikallerinin diğer bir kaynağıdır. Polimorf nükleer lökositler ve glomerüler mezenseyal hücre kaynaklı serbest oksijen radikalleri, glomerüler zedelenmede rol oynamaktadırlar [37]. Renal arterlerde ROT'un oluşumu, glomerulus'larda bozulmalara, endotel ve mesangial hücrelerde hasarlanmalara, glomerular süzmede azalmaya ve proteinlere karşı glomerular geçirgenliğin değişimine neden olur. Polimorf nükleer lökositler ve monositler/makrofajlar, glomerulus'ta ROT'un güçlü birer kaynaklarıdır. Tübül epitel hücrelerini de içine alan birçok hücre, oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır. ROT kaynaklı lipid peroksidasyonu, lipid tabakalarının yapısal bütünlüğünü bozar ve bu nedenle artan membran geçirgenliği, bozulan iyon taşınması, mitokondride oksidatif fosforilasyonun bozulmasına ve hidrolitik enzimlere karşı lizozomal geçirgenlikte artmaya neden olur. Ayrıca ROT, DNA hasarlanmalarına yol açmakta ve sülfhidril gruplarını etkileyerek, kritik bazı hücresel enzimleri ve taşıma proteinlerini inhibe etmekte, glomerular bazal membranın bariyer fonksiyonlarını bozmaktadır (**Şekil 2.6.**) [36].

2.4. Alkolün Genel Etkileri

Alkol; çeşitli meyveler, tahıllar ve sebzelerin içinde bulunan şekerlerin maya mantarları tarafından fermente edilmesiyle elde edilmektedir. Doğada bulunan en önemli alkoller arasında metil alkol (diğer adıyla metanol) ve etil alkol (veya etanol) ilk sıralarda yer almaktadır. Etanolün alkollü içecekler şeklinde fazla miktarda tüketilmesi insan sağlığı açısından etanolü diğer alkol türlerinden ayırmaktadır.

Alkol tüketimi, dünyanın birçok ülkesinde en önemli toplumsal sorunlardan birini oluşturmaktadır. Alkol bağımlılığı birçok doku hasarı ve ikincil bozukluklar ile birlikte. Alkolün kendisi direkt toksik özelliklere sahiptir, ayrıca önemli metabolik fonksiyonları değiştirme ve koruyucu mekanizmaları baskılamasıyla birçok hücresel yolları da etkiler. Kronik alkol alımı, membran akışkanlığı, sinyal geçişi, sitokrom P450 indüksiyonu, asetaldehit metabolizması, eikosanoid metabolizması, sitoskeletal

fonksiyonu, enerji metabolizması, oksijen tüketimi, mikro dolaşım, immün hasar ve gen ifadesini etkileyebilmektedir. Başlıca karaciğerde bulunan ve detoksifikasyon mekanizmasında işe karışan sitokrom P450'nin böbrek gibi birçok karaciğer dışı dokuda da bulunduğu ve kronik etanol tüketimiyle böbrek sitokrom P450 aktivitesinin oldukça artmış olduğu bildirilmiştir [38,39]. Sitokrom P450 aktivitesindeki artış beraberinde oksidatif stresi de getirebilmektedir.



Şekil 2.6. Böbrekte hasar meydana getirebilecek biyokimyasal yollar.

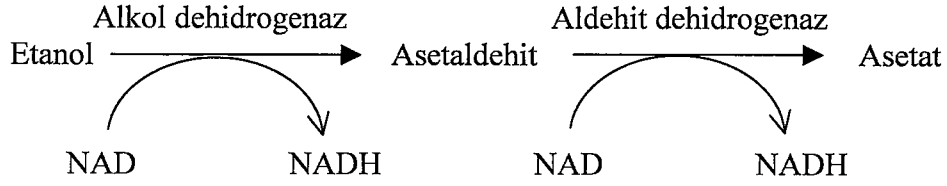
Alkol bağımlılarında, tüm dokuları içine alan bir oksidatif stres meydana gelmektedir. Alkol bağımlılığı, beslenme statüsündeki bozulmayla (vitaminler, eser elementler), E vitamini seviyesinde azalma ve antioksidan kapasitede bir indirgenme ile birliktedir. Serbest radikal üretimindeki artıştan ve/veya antioksidan savunmadaki azalmadan kaynaklanan oksidatif stres yalnızca karaciğerle sınırlı değildir, ayrıca

böbrek, merkezi sinir sistemi, kalp ve testisler gibi karaciğer dışı dokularda da meydana gelir. Etanol metabolizması boyunca oluşan serbest radikal ürünleri, alkoliklerdeki oksidatif hasarın nedeni olmakta ve bu durum alkol kaynaklı böbrek, beyin hasarında, karaciğer toksisitesinde ve tümör oluşumunda işe karışmaktadır. Etanole kronik olarak maruz kalma, oksidatif strese hücrel uyumu baskılayabilmekte ve oksidatif hasarı artırabilmektedir [40]. Serbest radikal türleri, alkol kullanımına bağlı olarak karaciğer patolojilerinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır [41].

Vücuda alınan toksik maddelerin metabolizması büyük çoğunlukla karaciğerde gerçekleşir. Alkol bu toksik maddeler arasındadır ve kolayca elimine edilmek için basit son ürüne yıkılır. Alkol metabolizması boyunca oluşan yan ürünler, alkolün kendisinden çok daha toksik olabilirler ve alkolik karaciğer hastalıklarının gelişiminden sorumlu tutulabilirler.

Wright ve ark. [42], organizmada aşırı alkol tüketiminin, alkolün metaboliti olan asetaldehit üretimini artırdığını ve böylece oluşan asetaldehitinde XOR tarafından bir substrat olarak kullanılarak ROT oluşturulabileceğini, ayrıca bu mekanizma ile oluşan ROT'un karsinojenik mutasyonları indükleyebileceğini bildirmişlerdir.

Alkolün oksidasyonu gibi bazı metabolik işlemler oksidatif strese neden olabilen güçlü oksidanlar üretebilirler. Üç enzimatik yol etanol oksidasyonundan sorumludur; alkol dehidrogenaz (ADH), katalaz ve mikrozomal oksitleyici sistem. Alkol, böbrek, mide, ince bağırsak ve beyini de içine alan çeşitli organlarda da metabolize olabilir. Bununla birlikte alkol metabolizmasının çoğu karaciğerde gerçekleşir. Alkolün metabolize olması, ADH enzimi ile oksitlenmeyle başlar. Bu enzim her bir alkol molekülünden iki hidrojen atomu çıkarır ve alkolü asetaldehite dönüştürür [43,44]. Etanolün ilk metaboliti olan asetaldehit, proteinlere kovalent bağlanarak, proteinlerin biyolojik aktive ve fonksiyonlarını bozar ve hasara neden olabilir. Asetaldehit oluşumundaki bir artma, enzim inaktivasyonuna, tamir mekanizmalarında azalmaya, GSH eksikliğine, serbest radikal kaynaklı toksisiteye ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Bu değişimler etanolden ziyade, asetaldehitin toksisitesiyle ilişkili görülmektedir [41,44]. Aldehit dehidrogenaz ise asetaldehiti, asetata çevirerek detoksifiye eder. Bu reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Alkol metabolizmasında ikinci bir yol, sitokrom P450 olarak bilinen detoksifiye edici enzimlerin bir grubunu kapsayan enzim sistemidir (mikrozomal etanol oksitleyici sistem). Bu enzimler ADH'la karşılaştırıldığında, alkol metabolizmasındaki rolleri çok küçüktür, fakat uzun süreli alkol kullanımı bu sistemi oldukça aktif hale geçirebilmektedir. Alkol ile sitümüle edilebilen P450 komponentine, CYP2E1 ismi verilmektedir. ADH gibi CYP2E1'de alkol oksidasyonunun sonunda asetaldehit oluşturmaktadır. Bu reaksiyonda hidrojen alıcısı, NAD'ye benzer bir koenzimdir. Uzun süreli alkol kullanımı, sitokromlardan kaynaklanan ROT oluşumunu artırır ve hücre membranlarında lipid peroksidasyonuyla hasarlanmaya yol açabilir. CYP2E1'in indüklenmesinin bir sonucu olarak O_2^- radikal oluşumu ve hidroksietil serbest radikal oluşumunda da bir artış görülür [43,45].

Alkolün organizmaya olan birçok etkisi vardır. Alkol alımı beraberinde iki tip asidozu ortaya çıkarabilir; laktik asidoz ve ketoasidoz. Asetaldehit birikimi, NADH oksidasyonunu inhibe eder. Bu durum alkolik ketoasidoz'u ortaya çıkarır. Artan kortizol, büyüme hormonu ve düşük insülin seviyesi alkolik ketoasidoz'u tanımlayan parametrelerdir. Kortizol, lipolizisi ve serbest yağ asit seviyesini artırır ve serbest yağ asitlerinin ketonlara dönüşümünü hızlandırır. İnsülin, ketogenez'i önleyen belli başlı hormondur ve alkolik ketoasidoz'da düşüktür [46].

Kronik etanol tüketimi, spesifik bir iskelet kası miyopatisine neden olur. Kas miyopatisi; kas dayanıklılığı ve kas kitlesinin (üriner kreatinin oluşumu ile belirlenmektedir) her ikisinde de meydana gelen bir azalma ile karakterizedir. Alkoliklerin kas kütlelerinin %30'undan fazlasını kaybettikleri bildirilmiştir [47].

Preedy ve ark. [48], altı hafta boyunca alkol diyeti verilerek beslenen ratların vücut ağırlıklarının ve kas kitlelerinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Kronik alkol tüketimi, bütün yaşlarda kemik gelişimi ve onarımı üzerinde oldukça zararlı etkilere sahiptir. Alkol, gençlerde kemik ucu bölgesinde azalmaya neden olarak kemik büyümesini baskılmaktadır. İnsan ve hayvan çalışmaları alkolün doğrudan kemik yapıcı hücrelerin aktivitesini inhibe ettiğini göstermiştir [49].

Alkol tüketimi, vücudun infeksiyonlara ve toksinlerin birçoğuna karşı hassasiyetini artırarak savunma mekanizmalarında değişiklikler yapmaktadır [50].

Etanol, çeşitli kimyasalların kanserojen, mutajen ve hepatoksik etkisini artırmaktadır. Alkolikler, kurşunun toksik etkisine çok daha fazla duyarlıdırlar. Alkol aynı zamanda vücutta kurşun absorpsiyonunu artırmaktadır.

Flora ve ark. [51], etanol ile birlikte ratlara oral yoldan kurşun uygulaması yaptıklarında, etanol ve kurşuna maruz bırakılan grupta, kurşunun sistemik toksisitesinin, nörolojik ve hepatoksik etkilerinin oldukça artmış olduğunu tespit etmişlerdir.

Etanolün, kronik ve aşırı tüketimi vücudun değişik dokularında toksik etkiler meydana getirir. Uzun süreli alkol tüketenlerde, doku veya organlarda hasarlanmalara bağlı fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Alkol alımı, alkolik hepatoksisiteye bağlı olarak serum transaminazlarının seviyelerini yükseltmektedir [52]. Alkolikler genelde karaciğer hasarına maruz kalırlar ve ksenobiotiklerin zıt etkilerine duyarlıdırlar. Bu duyarlılık kısmen alkolün uzun süreli tüketimi sonucu hepatik mikrozomal enzimlerin aktivitesindeki artıştan kaynaklanır [53].

Kronik alkolik annelerden doğan çocukların yaklaşık %40'ında alkol embriyopati görülmektedir. Bu sendrom, büyüme ve zeka geriliği, kraniofasial dismorfizm ve diğer malformasyonlar ile karakterizedir. Memeli embriyolarında, alkolün direkt teratojenik etkisinin varlığı bilinmektedir [54]. Hamilelerde aşırı alkol kullanımının, yavrunun immün fonksiyonlarında bozulmaya yol açabileceği bildirilmiştir [55].

Kronik alkol kullananlarda, intraserebral ve subarahnoid hemorajik felç riski artmaktadır. Alkol kullanımının artması, yüksek kan basıncını da beraberinde getirmektedir. Alkol tüketenlerde safra taşı oluşumu normal kişilere göre %10 ile %50 oranında artmaktadır [3]. Kronik alkol tüketimi kardiomyopati, sistemik hipertansiyon, kardiak aritmiler ve hemorajik ve iskemik felcde içine alan birçok kardivasküler hastalıkların patogenezinde işe karışır [56]. Kronik alkolizm kalpte, kardiak miyofibrillerin mimarisini bozmakta ve kasılmayla ilgili diğer birimleri de etkilemektedir [57]. Alkol, beyni de içine alan bütün sinir sistemi için toksiktir. Bunun sonucunda alkolikler ve kronik ağır içiciler zihinsel fonksiyon anormalliklerine ve davranış bozukluklarına maruz kalabilirler. Alkolün sinir sistemi üzerindeki toksik etkisi, doğrudan olabilir veya diğer organlarda hasarlanmalar meydana getirerek dolaylı olabilir. Bazı alkoliklerde, beyinde yara ve küçülmenin meydana geldiği tespit

edilmiştir. Ayrıca alkol ısı düzenlenmesi, uyku ve koordinasyon gibi sinirsel işlevleri negatif yönde etkilemektedir [58].

Alkol kaynaklı hormonal bozukluklar, kardiovasküler anormallikler, erkek ve dişilerde üreme fonksiyonunun baskılanmasıyla sonuçlanabilir. Erkeklerde üreme sistemi; hipotalamus, ön hipofiz bezi ve testislerden meydana gelmektedir. Alkol, bu bileşenlerin herbirinin fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir [59]. Kronik alkolik rat modellerinde alkol, ratların üreme sistemlerinde oldukça ciddi hasarlanmalar ortaya çıkarmaktadır [60]. Bu hasarlar sonucu, impotans (cinsel açıdan güçsüzlük), kısırlık ve ikincil seksüel özelliklerde azalma ortaya çıkmaktadır. Alkol kortizol, testesteron, büyüme hormonu ve prolaktinin sentez ve salınımında da bozulmalara yol açabilir. Ratlara uygulanan akut alkol, doza bağlı olarak ACTH ve kortikosteron sentezini artırmaktadır. Alkol alanlarda düşük serum testesteron seviyesi gözlenmiştir. Alkol, testislerde testesteron üreten Leydig hücrelerini direkt olarak etkiler. Alkol aynı zamanda, spermin olgunlaşmasında önemli bir rol oynamakta olan ve testislerde bulunan sertoli hücrelerinin fonksiyonunu da bozmaktadır. Aşırı alkol kullanımı, kadınlarda düzensiz menstural siklus oluşumuna neden olmaktadır [61,62]. Ergenlik safhasında tüketilen alkol, dişilerin cinsel olgunluğunu geciktirmektedir [63]. Alkol insanlarda, maymunlarda ve küçük rodentlerde lüteinize edici hormonun (LH) salınımını bozarak üremeyi baskılar [61,62].

Alkol kullanma alışkanlığı, kanser vakalarını arttıran önemli risk faktörlerinden biridir [64]. Alkol alışkanlığı mide kanseri oluşumunda en önemli risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir [65]. Alkolün üst sindirim yollarında (orofarenks ve özefagus) kanser gelişimine yol açan güçlü bir risk faktörü olduğu, ayrıca tüketilen alkollü içeceklerin türüne bağlı olarak bu etkilerin değişiklikler gösterebileceği ifade edilmiştir [66]. Yapılan araştırmalar; fazla miktarlarda alkol kullanımının, kolon ve rektum kanseri gelişiminde risk artırıcı bir faktör olduğunu göstermektedir [67]. Yine alkol kullanımı, meme kanseri oluşumunu artıran önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır [42].

2.5. Alkolün Böbrekteki Etkileri

Aşırı miktarda serbest oksijen radikalinin oluşması ve antioksidan sistemlerin yetersiz kalmasıyla, böbrekteki patolojik durumların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir [68]. Alkol kullanımı, böbrekte tübül ve glomerular hasara neden olmaktadır [68,69].

Rat böbrek doku ADH aktivitesi, karaciğerdeki ADH'a benzer bir yolla alkolü okside eder. Burada da alkolün oksidasyonu ile asetaldehit oluşur.

Orellana ve ark. [44], 10 hafta boyunca alkol uyguladıkları ratların böbrek ADH aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, ADH ile böbrekte meydana gelen etanol oksidasyonunun diğer karaciğer dışı dokulara nazaran daha yüksek seviyede gerçekleştiğini ve bu durumun böbrekte hasarlanmalara yol açabileceğini bildirmişlerdir.

Krisztina ve ark. [41], etanol alımı sonrası oluşan asetaldehitin, XDH'nin serbest sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek XDH'yi, XO'ya çevirdiğini ve oluşan XO'nun ise asetaldehiti bir substrat olarak kullanıp O_2^- radikalleri meydana getirerek alkolün böbrekte hasar oluşturabilecek bir başka mekanizmasına dikkat çekmişlerdir.

Alkolün hücre membranının fosfotidilinozitol içeriğini yapısal bir değişime uğratarak membranda bozulma yaptığı, böbrek hücrelerinde kalsiyum metabolizmasını değiştirdiği, farklı organlarda hücre içi enerji depolarını azaltarak hücrelerde geri dönüşümsüz hasarlanmalara neden olduğu, membrana bağlı enzim aktiviteleri (plazma membranında Na^+/K^+ -ATPaz ve mitokondri iç membran enzimlerinde ATPaz) ve karaciğer, trombosit, pankreatik asini ve alveolar makrofajı içine alan birçok hücrelerde Ca^{2+} mobilizasyonu etkilediği bildirilmiştir [70]. Bu veriler alkolün, böbrek fonksiyonlarını ve yapısını direkt olarak etkilediğini göstermektedir. Alkol verilen ratların böbreklerinde şişme ve böbrek fonksiyonlarında azalma tespit edilmiştir. Klinik incelemeler, alkoliklerde böbrek genişlemesinin (nefromegali) oluştuğunu ve bunun sebebinin ise, hücresel genişleme ve hücrelerin sayıca çoğalmasından kaynaklanabileceğini ortaya koymaktadır. Alkol ratlarda, dokular arası ödem oluşturarak su içeriğini artırmakta ve böylece böbrek hacminde bir artış meydana getirmektedir [10,46]. Alkol verilen köpeklerin böbreklerinde glomerulus hipertrofisi ve sklerozisi oluşmaktadır. Kronik alkol tüketimiyle böbrek papilla yaralanmaları şekillenebilmektedir [10].

Ratlarda yapılan kronik alkol çalışmalarında, alkolün nefrotoksik etkileri gösterilmiştir. İzokalorik yemlemeyle alkol verilen grupların kontrolle karşılaştırılmalarında; alkol grubunda, glomerüler süzme hızının bozulduğu, renal hipertrofi meydana geldiği ve böbreğin protein, yağ ve su içeriğinde bir artma olduğu bulunmuştur [54].

Etanol, antidiüretik hormonun salınımındaki bir azalmayla birlikte diüresisin meydana gelişini indükler. Antidiüretik hormonun baskılanması, etanolün kan seviyesinde artışı ile sonuçlanmaktadır [54,70].

Böbreklerin en önemli fonksiyonlarından birisi sodyum, potasyum, klor gibi iyonik partikülleri içeren vücut sıvısının miktarını ve yapısını düzenlemektir. Alkolün idrar miktarını artırma yeteneği vücut sıvı seviyesini değiştirir ve elektrolit içeriğinde bozulmaya neden olur [10].

Alkol, hipofosfatemiye, hipomagnezemiye, hipokalsemiye, metabolik asidozis ve solunumsal alkolozis gibi asit-baz bozukluklarına yol açabilir. Potasyumun serum seviyesindeki azalma, alkoliklerde sık görülen bir durumdur. Hipofosfatemiye alkolik hastaların %30-50'sinde rastlanmaktadır. İskelet kasının fosfat içeriği, bir çok alkolikte anormal şekilde düşüktür. Alkol kullanımının kalsiyum, magnezyum ve fosfatın idrarla aşırı miktarda atılımını indükleyebileceği bildirilmiştir [46,54]. Magnezyum eksikliği alkolizmin en sık rastlanılan komplikasyonlarındanıdır. Etanol, böbreklerden aşırı miktarda magnezyumun atılımını sağlayarak hipomagnezemiye yol açar. Gönüllülerde, etanol kullanımı sonrası idrarla normalin %260 oranında magnezyum atılımı görülmüştür. Hipermagnesiüreyi indükleyen etanol, hormonal değişimleri de beraberinde getirmektedir. Etanol, hayvanlarda ve alkoliklerde kortizol seviyesini artırır. Kortikosteroid artışı, magnezyum atılımında artışla seyretmektedir. Akut etanol alımı sonrası idrarla kalsiyum atılımında %90 artış olmaktadır. Alkolün akut etkisi sonucu böbrekte bir kalsiüresis meydana gelmektedir [10,46]. Yüksek miktarda etanol tüketimi sıklıkla çinko, magnezyum ve mangan gibi eser elementlerin statüsünde azalma yapar. Sirozlu alkoliklerde, normal insanlara göre çinkonun idrarla atılımı iki kat daha fazla olmaktadır. Yine sirozlu olmayan alkoliklerin yarısında, idrarla çinko atılımında artış tespit edilmiştir. Uzun süreli çinko eksikliğinde ise büyüme geriliği görülmektedir [46,71].

Aşırı alkol tüketimi, vitamin eksikliklerinin ortaya çıkmasına neden olur. Kronik alkol kullanımı, sıklıkla B vitaminlerinin eksikliğine yol açar. Etanol, tiamin absorpsiyonunu ve metabolizmasını inhibe etmektedir. Alkol kullanımı ile folatın ağız yoluyla veya bağırsaklardan emilimi azalmaktadır ve bu durum hücrel metabolizmayı ve böbrek boşaltımını etkilemektedir [72]. Etanolün düşük dozları bile, ratlarda idrarla kolin atılımını artırmaktadır. Kolin; asetilkolin, lesitin ve sifingomiyelinden oluşan kompleks bir amindir. Kolin eksikliği ratlarda, siroz ve nefrosklerozis oluşumuna yol açmaktadır [46].

Kronik alkol kullanımı, kronik karaciğer hastalığı, pankreas iltihabı gibi hastalıklardan bağımsız olarak böbrek tübüler anormalliklerine neden olmaktadır. Bu anormalliklerin, proksimal tübüler hücrelerin geri emme yeteneğinin bozulmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir [44,73].

2.6. Sigaranın Genel Etkileri

Tütün bitkisi, Amerika'nın keşfinden sonra 16. yy başlarında Avrupa'ya götürülerek orada ekilmeye başlandı. Ülkemize ise tütün 17. yy başlarında gelmiş ve kısa sürede yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Dünyanın hemen her yerinde üretimi çok kolay olan tütün bitkisi birçok değişik şekilde kullanılabilir. Tütünün değişik kullanım biçimleri arasında enfiye, tütün çiğneme, nargile, pipo, puro ve sigara bulunmaktadır. Ancak, günümüzde tütünün en yaygın tüketim biçimi sigaradır. Sigaranın insan sağlığına kötü etkileri, yol açtığı hastalık ve ölümler ile ilgili veriler 1950'lerin sonlarından başlayarak sağlık kurumları tarafından ciddi şekilde takip edildi. Gün geçtikçe sigaranın zararlarına ilişkin yeni bilgiler sağlandı. Zamanla dünyanın belli başlı sağlık örgütlerince örneğin, Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Kanser Araştırma Örgütü gibi kuruluşlar, sigaranın insanlar için kanserojen bir madde olduğunu kabul etmişlerdir [74].

Sigara kullanımı 20. yy sonuna kadar toplumda kabul edilebilir, normal bir davranış olarak görülmekteydi. Son zamanlarda ise, sigaranın sağlığa ve ekonomiye olan zararlı etkilerinin görülmesi halka açık birçok yerde, devlet dairelerinde yasaklanmasına neden olmuştur. Sigara içimi, dünyada ölümün ve sakat kalmanın önlenemez bir nedeni olarak tanımlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre dünyada 1,1 milyar insan sigara kullanmaktadır. Sigara, Avrupa'da her yıl 500,000 ve Amerika'da ise 400,000 kişinin ölümünden sorumlu tutulmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verileri bize 1996'da dünyada 3 milyon kişinin sigaradan dolayı öldüğünü göstermektedir. Bu sayının 2020'de 10 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir [1].

Sigaranın tüm kanser türlerinin %30'uyla direkt ilişkili olduğu belirtilmektedir. Sigara başlıca akciğer, ağız, larinks, farinks, özofagus kanserlerine neden olabilirken, mesane, böbrek ve pankreas kanserlerine katkıda bulunmaktadır. Mide ve serviks kanseri ile de ilişkisi vardır. Sigara içimi insanlarda ve hayvanlarda gastrik ülser oluşumunda da etkilidir. Pasif sigara içimi, etanol kaynaklı gastrik mukozal lezyonların oluşumunu oldukça artırmaktadır [73]. Sigaranın günlük tüketim miktarı, içme süresi ve sigaradaki katran miktarı ile akciğer kanseri oluşması arasında doğru bir orantı vardır.

Sigara tiryakilerinin kimi başka etkenlerle de karşılaşması durumunda sigaranın kanserojen etkisi artmaktadır. Bunların başında ise alkol gelmektedir. Ağız ve özofagus kanserleri alkol alan sigara tiryakilerinde alkolün dozuyla artmaktadır.

Sigara alışkanlığı hem kadınlar, hem de erkekler arasında kalp damar hastalıklarının ana etkenlerinden biridir. Sigara içimi, kardiovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olarak görülmektedir [75]. Sigara, koroner kalp hastalıkları oluşum riskini oldukça artırmaktadır. Aterosklerozisin ilk işareti olan endotelial bozulmanın, kronik sigara içenlerde meydana geldiği gibi, akut sigara içimi sonrası bile oluşabildiği gözlenmiştir [9,76].

Nikotinin oksidatif strese bir artma yoluyla endotel hücrelerinde bozulmaya neden olduğu görüşü; in vivo ve in vitro şartlarda nikotine maruz bırakılan endotel hücrelerinde, O_2^- radikali üretiminin ve monositlerin endotele yapışmasının arttığını gösteren çalışmalarla desteklenmiş ve kronik sigara içenlerde nikotinin bronşial arterlerde endotelial fonksiyon bozukluklarına yol açabileceği ortaya konmuştur [77].

Yapılan bir başka araştırmada, sigaranın insan serumunda çinko eksikliğine neden olarak böbrek, özofagus ve testis dokusu gibi dokularda çinkoya bağlı olan enzimlerin aktivitelerinde azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir [78].

Öte yandan son yıllarda sigara dumanının, yalnızca sigara içen bireyi değil, aynı zamanda o ortamı paylaşan başka insanları da benzer biçimde etkilediği kesin verilerle kanıtlanmıştır. Öyle ki pasif ya da istemsiz sigara içme denen bu durumun, sigara ve alkol alışkanlığını izleyen üçüncü önlenebilir ölüm nedeni olduğu ortaya konmuştur. Yine pasif sigara içicilerin sigara dumanına maruz kalmalarıyla akciğer kanser oluşum riski %30-70 ve kalp damar hastalığına yakalanma riski ise %30-50 oranında artmaktadır. Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda bronşit görülme sıklığı, sigara dumanına maruz kalmayanlara göre %28 oranında daha fazladır. Gebelikte sigara içimi düşüğe, erken doğuma, ölü doğuma, düşük doğum ağırlığına sahip bebeklere neden olabilmektedir. Sigara içme, insanların somatik hücrelerinde genetik değişikliklere yol açmaktadır. Sigara tiryakilerinde kromozomal defektler çok daha sık görülmektedir [74].

Sigara içenlerde, sıklıkla sigara içimine bağlı beslenme bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Bu durum belki de sigaraya bağlı olan negatif etkilerin ortaya çıkmasını da körüklemektedir [79]. Ayrıca sigara kullanımı, kanda glikozile hemoglobin seviyesini artırmaktadır [80].

Nikotin ve katran, mekanizmaları henüz tam olarak bilinmese de tiamin, riboflavin, Vitamin B₆ ve eritrositlerde ve tükürükte folat seviyesini azaltarak vitamin B metabolizmasını bozmaktadır. Tiamin, riboflavin, vitamin B₆ ve folat eksiklikleri kişide ruhsal bozukluklar, hafıza oluşumunun bozulması ve kişilik bölünmesi gibi beyin fonksiyonlarında aksamalara neden olmaktadır [72].

Tütün, ortalama %1-3 oranında nikotin içermektedir. Nikotin yüksek derecede toksik bir maddedir. Bir sigarada bulunan yaklaşık 20 mg nikotin'in önemli bölümü yanarak başka maddelere dönüşür ve her bir sigara ile insan vücuduna 1-2,5 mg nikotin girer. Nikotin, insanda güçlü fiziksel bağımlılığa yol açar. Ayrıca nikotin'in düşük dozları uyarıcı, yüksek dozları depresyon yapıcı ve felç edici etki gösterir. Nikotin'in etkisiyle salgılanan değişik kimyasal maddeler, kalp atımını, kan basıncını, kanın pıhtılaşmasını, oksijen tüketimini ve kasılmayı artırır. Nikotin, uzun bir yarı ömre sahip olan kotinin'e oksitlenir ve vasküler hastalıkların etiopatolojisinde önemli bir rol oynar. Araştırmacılar sigaranın metaboliti olan kotinin'in karaciğerde oluştuğunu ve oksidatif doku hasarını indüklediğini bildirmişlerdir [81].

Yapılan bir araştırmada, ratlara nikotin'in kronik olarak uygulanmasının, rat dokularında serbest radikal oluşumunu artırdığı ve oksidatif stres meydana getirdiği bildirilmiştir [4].

Sigaradaki bileşiklerden bazıları N-nitrözamin, asetaldehit, fenoller, akrolein, amonyak gibi piridin alkaloidler; benzopirin gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlar, karbon monoksit, nitrojen oksitler, hidrojen siyanid gibi yanıcı gazlar; polonyum, radyum ve toryum gibi alfa-yayılım yapan radyoaktif elementlerdir. Bu bileşiklerin çoğu, sıcaklığın 950°C'ye ulaşabildiği sigaranın yanan ucunun hemen gerisindeki bölgede distilasyon ve erime ile üretilmektedirler.

Tütün ayrıca Al, As, Ba, Br, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, Ca, Mg, Mn, Na, Ni, Rb, Sb, Sc, Se, Sr, Th, V, Zn eser elementlerini içermektedir. Bu elementlerden bazıları toksik, radyoaktif ve kuvvetli kanserojendir (K, Pb, As, Cd, Hg, Th, U, Po gibi). Arsenik dermatolojik bozukluklara, deri kanseri, mide kanseri ve bağırsak problemlerine neden olurken civa, beyin ve sinir sisteminde hasar meydana getirmektedir. Sigarada bulunan polonyum, uranyum ve toryum ise radyoaktif toksisite oluşturmaktadır [82].

Sigarada iki faz tespit edilmiştir. Gaz ve katran fazı. Sigaranın gaz ve katran fazı, 4700'den fazla farklı kimyasal maddeyi içeren kompleks bir karışımdır [75]. Her iki faz radikal olmayan oksidanlar kadar, oksijen merkezli, karbon merkezli ve nitrojen

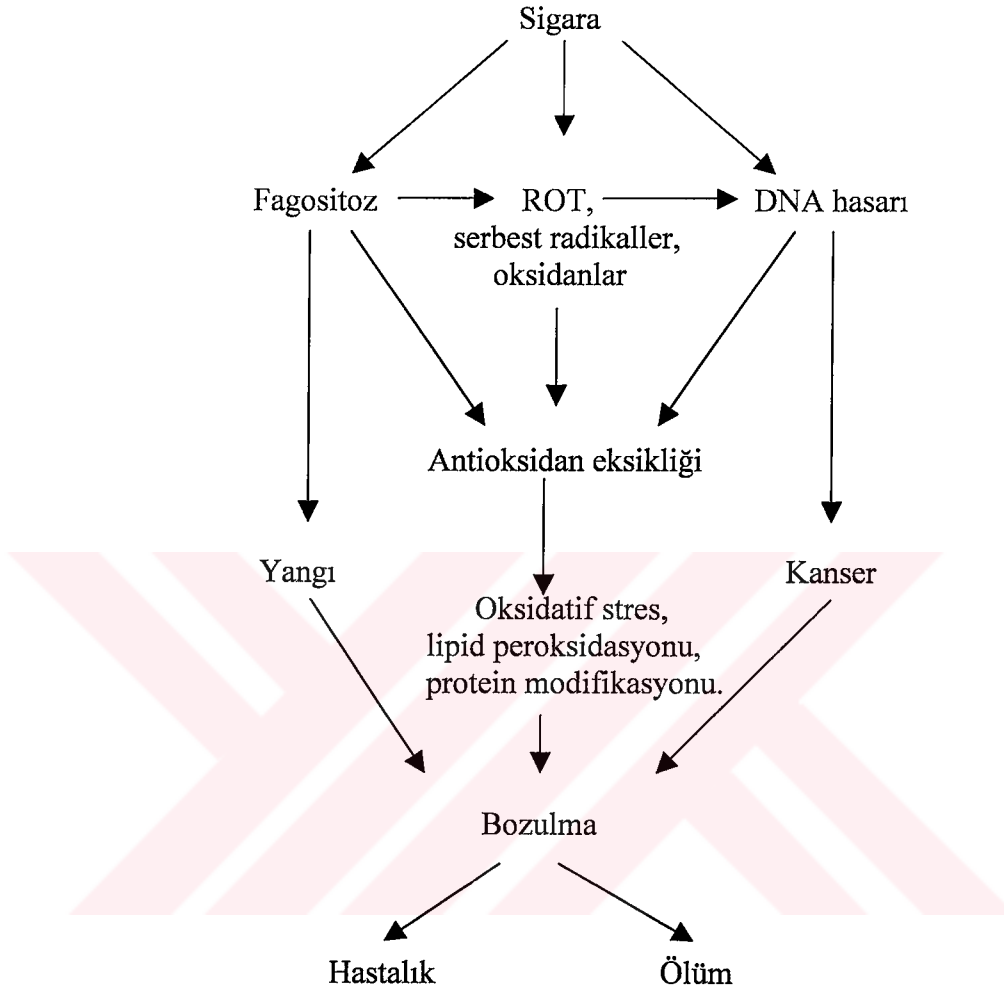
merkezli serbest radikallerce zengindir. Her bir fazın analizi sonucunda katran fazınının her bir ie çekimde 10^{14} adet, gaz fazının ise 10^{15} adet serbest radikal içerdiği tespit edilmiştir. Katran fazı radikalleri fazlaca reaktif olmayan birçok kinon-hidrokinon bileşikleridir. Bununla birlikte, onlar havada saatlerce veya belki de günlerce stabil kalan uzun ömürlü radikallerdir ve sigara içmeyenlerde gözlenen çevresel sigara kaynaklı hasarın (yan-akım veya pasif sigara içiciliği) güçlü bir nedeni olabilirler [5,75]. Ayrıca sigaranın katran fazı radikalleri DNA'ya saldırarak, DNA'da kırıklar veya çentikler oluşturmakta ve böylece kanser oluşumuna yol açabilmektedirler. Gaz fazı radikalleri genelde daha fazla reaktifirler, fakat ömürleri kısadır. Bununla birlikte, gaz fazı radikalleri, sigaranın neden olduğu fagositik yangısal cevap sonucunda ortaya çıkan oksidatif patlamayla oluşan doğal i oksidanlar ile etkileşerek yeterince uzun ömürlü de olabilirler [5].

Sigara içenler, sigarayı ağız yoluyla kullandıklarından, biyolojik savunmanın birinci yolu olan burun devre dışı bırakılmakta ve sigara kaynaklı radikallerin etkisini bastırarak antioksidanlardan yoksun olan akciğer dokusu direkt olarak sigaraya maruz kalmaktadır. Bunun sonucu olarak kronik bronşit veya kronik yetişkin bronşolitisi, emfizem veya akciğer kanserinin oluşumuna zemin hazırlanmış olmaktadır. Sigara içimi ve hastalık oluşumu ve ölümler arasında günümüzde güçlü ilişkiler bulunmuş olsa da, sigaraya bağlı hastalıkların moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Bununla birlikte son zamanlardaki bulgular, solunum bozukluğu ile sonuçlanan akciğer hasarı ve özellikle akciğerdeki karsinogenezisin indüksiyonunda, sigara içimiyle oluşan serbest radikallerin önemli rolü olduğunu göstermektedir. Serbest radikal kaynaklı oksidatif stres, dokuda hasar ve sonrasında da hastalık oluşumunu başlatabilir. Sigara içimi, oksidan oluşumunda bir artış ve antioksidan kapasitede bir azalmaya yol açarak oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur. Sigarayla alınan çok sayıda serbest radikal türü oksidatif hasarın ve bunun sonucunda ortaya çıkan çok sayıda hastalığın nedeni olarak görülmektedir [83].

Sigara dumanının nedeni olduğu oksidatif etkilerin, katalaz aktivitesini inhibe etmek suretiyle serbest radikal üretimini arttırma yeteneğine bağlı olarak oluşabileceği ve böylece hücre hasarının meydana çıkabileceği ileri srlmştir [84].

Sigara içimi, serbest radikaller ile lipid peroksidasyonuna, protein tiyollerinin oksidasyonuna ve plazma proteinlerinin karbonil gruplarında değişmeye neden olmaktadır. Yapılan araştırmalar, sigara içenlerde lipid peroksidasyonunun önemli bir

göstergesi olan MDA'nın serum düzeylerinin önemli oranda arttığını göstermektedir. (Şekil 2.7.) [85,86].



Şekil 2.7. Sigara içimi ile tetiklenen muhtemel mekanizmalar [1].

Sigara içimiyle özellikle alt solunum yollarında ROT oluşumunda bir artma meydana gelir. Tütünün kendisi de aynı zamanda bir ROT kaynağıdır [87]. Sigara içenlerde genellikle alveolar makrofaj ve nötrofil sayısında bir artış görülür ve bu durum H_2O_2 'nin veya H_2O_2 kaynaklı ürünlerin artan miktarda serbest bırakılmasına neden olur [88].

Sigara içimi sırasında serbest radikallere ilaveten çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilen ve çok daha fazla radikal oluşturabilen yanıcı toksik gazlarda meydana gelir. Sigara, 500-1000 ppm nitrik oksit ve 250 ppm'e kadar nitrojen dioksit içermektedir. Ozon ve nitrojen oksitler, insan sağlığı için zararlı olan ve büyük metropolitan bölgelerin havasını kirleten çok hasar verici reaktif oksidan gazlardır [75]. NO, hemoglobin ile reaksiyona girerek methemoglobin oluşturur. Sigara içimiyle vücuda

alınan NO, O₂⁻ ile ONOO⁻ ve organik peroksil radikalleri ile alkil peroksinitritleri (ONOO⁻) oluşturarak vücuda zarar verir.

Wever ve ark. [89], sigara içenlerde azalan plazma NO seviyesine dikkat çekerek, bu durumun aşırı miktarda peroksinitrit oluşumundan kaynaklanabileceğini ve NO azalmasının da böbrek vasküler tonusunda artışa neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Karbonmonoksit (CO) sigara dumanının gaz fazında %1,5-4,5 oranında bulunmakta ve sigara içenlerin kanında içmeyenlere göre 2-15 kat daha fazla seviyeye ulaşabilmektedir [90]. CO, sigara içenlerde periferik vasküler ve koroner kalp hastalıkları için başlıca risk faktörü olarak gösterilmekte ve CO'nun nikotin ile etkileşimi koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıklara ortam hazırlamaktadır [91]. CO toksisitesinde başlıca hedef merkezi sinir sistemidir. Ayrıca CO, immün sistem aktivitesinde değişmelere yol açmaktadır [92]. CO, kolaylıkla hemoglobine bağlanarak karboksi hemoglobin oluşturur ve dokulara yeterli miktarda oksijen taşınmasını engeller.

2.7. Sigaranın Böbrekteki Etkileri

Son yıllarda sigaranın kardiovasküler hastalıklar, kanser ve diğer sağlık problemlerinin yanında böbrek hastalıklarının oluşması içinde başlıca risk faktörü olduğu tespit edilmiştir. Ne yazık ki, sigara kaynaklı renal risk, nefrologlar tarafından hala büyük oranda dikkate alınmamaktadır.

Üriner albumin, glomerular hasarın hassas bir belirleyicisidir. Proteinüri böbrek hasarının bir göstergesidir ve sigara içenlerde oldukça sık görülmektedir. Diyabeti, hipertansiyonu, hiperkolesterolemisi, şişmanlığı, böbrek, koroner ve periferik arter hastalığı olmayan kişilerde bile içilen sigara miktarına bağlı bir proteinüri tespit edilmiştir. Sigara içimi, tip II diyabetin ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır. Tip II diyabetli hastalarda sigara alışkanlığı daha yüksek düzeyde proteinüri'ye neden olmaktadır. Sigara içen diyabetlilerde, içmeyenlere göre diyabetik nefropati oluşma oranları oldukça fazladır. Tip I ve tip II diyabetin her ikisinde de sigara kullanımı, diyabetik nefropatinin gelişmesinde ve renal yetmezlik oluşumunda oldukça önemli olan bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir [93].

Sigara akut hemodinamik etkilerini simpatetik aktivasyon ve vazopressin salınımı yoluyla gerçekleştirmektedir. Nikotin, postgangliyonik simpatik sinir uçlarının

doğrudan uyarılması yoluyla simpatik aktiviteyi artırmaktadır. Tek bir sigara içimi bile, nörepinefrin ve epinefrinin plazma konsantrasyonunu oldukça artırır, buna karşın postgangliotik kas simpatik sinir gidiş gelişi azalır. Nikotin, periferik simpatik sinir uçlarından ve adrenal medulladan, katekolamin salınımını doğrudan uyarır. Artan simpatik aktivite, kronik böbrek yetmezliğinin göstergesidir. İster aktif, ister pasif olsun sigaraya maruz kalma, sağlıklı insanlarda endotel hücrelerini hasarlandırarak vasodilatasyon mekanizmasını bozar. Bu etki doza bağlıdır. Endotel hücre hasarı ateroskleroz'un ilk basamağıdır. Bu patofizyoloji glomerular hasarda da rol oynar. Sigaranın böbrekler üzerindeki aterojenik etkileri, lipoprotein ve glikozaminoglikan metabolizmasında meydana getirdiği değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Sigara kaynaklı oksidatif stres vasküler böbrek hasarında önemli rolü olan bir araçtır. Özellikle böbrek yetmezliği olan hastalar, sigara kaynaklı oksidatif strese daha da duyarlıdır. Sigara kaynaklı oksidatif stresin sebep olduğu başlıca bozukluklar arasında proksimal tübül fonksiyonunda değişimler, proksimal tübüler hasar ve tübülointerstisyal hasar sayılabilir. Sigara, böbrekteki bu etkilerini oksidatif hasar meydana getirerek göstermektedir [93].

Çizelge 2.2. Sigara Kaynaklı Böbrek Hasarı Oluşturan Mekanizmalar

-
- Günlük kan basıncı ritminde değişim,
 - Simpatik sinir aktivitesinde artış,
 - Glomerular süzme oranında azalmaya yol açan böbrek vasküler direncinde artma,
 - Böbrek arterleri, intraböbrek arterleri ve arterlerin ateroskleroza,
 - Tübülotoksisite,
 - Böbrek endotel hücrelerinde direkt toksik etkiler,
 - ROT oluşumuyla meydana gelen oksidatif stres
 - NO azalması
 - Endotel bağımlı vasküler gevşemenin bozulması
 - Endotele monositlerin yapışmasındaki artış
 - CO kaynaklı hipoksi.
-

Anand ve ark. [94], 3 ay süreyle pasif sigara dumanına maruz bıraktıkları ratların böbrek GSH seviyesinin düştüğünü ve MDA seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bu durumu; sigaranın böbrek dokusu oksidan/antioksidan dengesi, oksidanlar yönünde bozmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Sağlıklı insanlarda, akut sigara içiminden sonra böbrek vasküler direncindeki artma ile birlikte, böbrek kan akışı ve glomerular süzme hızında akut bir azalma görülmektedir [76,93,95]. Sigaranın böbreklere olan etkileri **Çizelge 2.2.**'de özetlenmiştir.

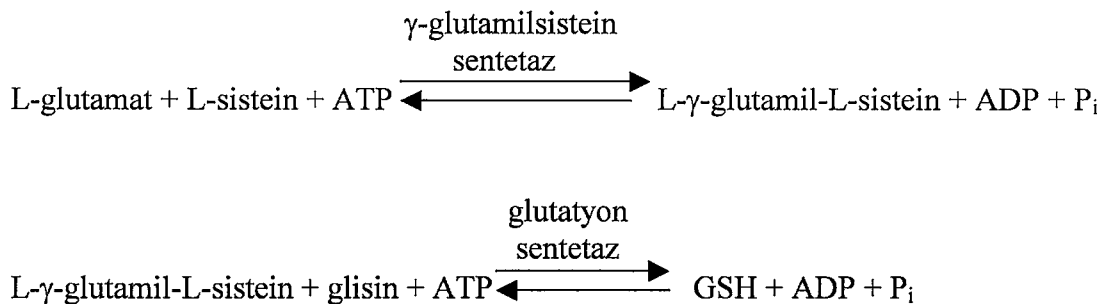
2.8. Tez Çalışmasına Dahil Edilen Parametreler Hakkında Genel Bilgi

2.8.1. Glutatyon (GSH)

Bütün hücreler oksidan maddelere karşı, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan maddelerden oluşan bir mekanizmaya sahiptir. Enzimatik olmayan maddelerden en önemlisi GSH'tır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücrel savunma sisteminde önemli bir rol oynar. Ksenobiotiklerin ve ROT'un detoksifikasyonunda hücre içi GSH'ın rolü çok önemlidir. Ayrıca GSH, GSH-Px gibi çeşitli enzimler için bir koenzimdir. Bir hücrede, okside glutatyonun (GSSG) miktarının artmış olması, oksidasyonun muhtemel bir indeksi olarak kabul edilmektedir [96]. GSH, özellikle dış toksinlere şiddetli şekilde maruz kalan karaciğer gibi organlarda önemlidir. Karaciğer, GSH sentezinin yapıldığı başlıca organdır [97,98].

GSH, karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında sentez edilir ve daha sonra farklı organlar ve subsellüler kompartmanlara dolaşım/taşıma sistemi ile dağıtılır. Karaciğerdeki yüksek GSH seviyesi, hücrelerin sigortasıdır. Hücre içi bir antioksidan olan GSH'ın azlığı, hücrel sistemlerin bir çoğunun serbest radikal hasarına karşı hassasiyetini artırır [25,99].

Tripeptit tiyol olan glutatyon; metabolizma, taşıma, oksijen ve diğer bileşiklerin toksik etkilerine karşı hücrelerin korunmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. GSH, γ -glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz'ın etkileşimleri ile hücre içinde sentez edilmektedir. Organizmadaki GSH sentezi, aşağıdaki şekilde gerçekleşir.



GSH sentezinde 1. basamağı katalizleyen γ -glutamilsistein sentetaz'ın aktivitesi, GSH'nin feedback inhibisyonu yoluyla kontrol edilmektedir [58,100].

GSH, iki farklı mekanizmayla hücrenin antioksidan aktivitesine katılır. Birincisi, GSH bir enzimin aracılığı olmaksızın oksidanlara doğrudan hidrojenleri transfer ederek antioksidan etki gösterir. İkincisi GSH, GSH-Px katalizine enzimin koenzimi olarak katılır ve H_2O_2 'nin, suya ve oksijene dönüşümünü sağlar [43]. GSH, sitotoksik fenton reaksiyonu ürünü olan $OH\cdot$ radikali, sitotoksik ürün diazot trioksit (N_2O_3) ve $ONOO^-$ ile hızlıca ve enzimatik olmayan biçimde reaksiyona girer ve onları detoksifiye edebilir. Ayrıca GSH, H_2O_2 'in ve lipid peroksitlerin redüktif detoksifikasyonunda işe karışır. Bu reaksiyonların her birinin sonucunda GSH, GSSG'ye dönüşür. GSH sentezi organizmada en azından üç faktör ile düzenlenmektedir: 1) hücrede γ -glutamilsistein sentetaz'ın varlığı 2) substratların özellikle L-sisteinin mevcudiyeti 3) γ -glutamilsistein sentetaz üzerine GSH'nin feedback inhibisyonu. Ayrıca son zamanlarda γ -glutamilsistein sentetaz aktivitesinin fosforilasyon ve nitrozasyon ile düzenlendiği de tespit edilmiştir [101].

GSH'nin hücre içi seviyesinin herhangi bir şekilde azalması, lipid peroksidasyonuna veya diğer hücrel hasarlara yol açabilmektedir.

Louercio ve Federico [102], kronik alkol kullananların, alkol kullanmayanlara göre eritrosit ve plazma GSH seviyelerinin düştüğünü, MDA ve lipid peroksit seviyelerinin ise artmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun ise alkol kullanımıyla birlikte meydana gelen oksidatif stresin bir sonucu olarak karşımıza çıkabileceğini rapor etmişlerdir.

Endojen GSH, proteinlerdeki tiyol gruplarını oksidasyondan korur, ROT ile direkt reaksiyona girerek onları detoksifiye eder. GSH, DNA ve protein sentezi, enzim aktivitesinin düzenlenmesi gibi diğer hücrel işlevlerde de koruyucu rol alır. Radikal türlerinin ve ksenobiotiklerin detoksifikasyonu ile GSH, GSSG'ye dönüşür. GSSG ise tekrar GR ile NADPH varlığında GSH'a rejenere edilir [103]. Böyle önemli role sahip olan bir maddenin organizmada yokluğu çeşitli patolojileri de beraberinde getirmektedir. Alkolün kendisinin ve metabolitlerinin toksik etkisi, antioksidanların seviyesini düşürmektedir. GSH'nin, kronik alkol kullanımıyla plazmadaki seviyesinin oldukça düştüğü ve böylece hücrelerin oksidatif strese olan duyarlılığının oldukça arttığı bildirilmiştir [104].

Speisky ve ark. [105], akut etanol uygulaması ile ilgili olarak yaptıkları deneysel bir çalışmada, etanolün akut olarak uygulanmasının, hepatositlerde GSH sentezini azalttığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, azalan GSH üretiminin, hücrel savunma sisteminde oksidanlara karşı bir zaafiyet getireceğini bildirmişlerdir.

Yapılan benzer bir araştırmada, kronik etanol uygulamasıyla karaciğer mitokondri GSH depolarının %40-50 oranında azaldığı ve bu gibi bir azalmanın elektron taşıma zinciri enzimlerinde hasar meydana getirebileceği rapor edilmiştir [106].

Etanolün ve nikotin'in kronik olarak uygulanması, ratların spesifik dokularında lipid peroksidasyonu oluşmasında ortak etkiye neden olabilmektedir. Bu etkinin karaciğer, akciğer ve testislerde GSH içeriğini anlamlı bir şekilde azaltabildiği ortaya konmuştur [4].

Güngör ve ark. [107], dişi Wistar albino ratları, 60 gün boyunca etanol alımına maruz bırakmışlar ve sonuçta alkolik grubun karaciğer doku GSH seviyesinin kontrole göre anlamlı şekilde düştüğünü, MDA seviyesinin ise oldukça artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yapılan histopatolojik incelemede, alkol grubu karaciğer dokusunda dejenerasyon olduğu ortaya konulmuştur. Araştırmacılar bu durumun, etanol kaynaklı aşırı serbest radikal oluşumu ve antioksidan kapasitedeki azalma nedeniyle meydana gelebileceğini bildirmişlerdir.

2.8.2. Malondialdehit (MDA)

MDA, hücre lipidlerinin okside edilerek yapılarının bozulması sonucu oluşan ana metabolittir ve lipid peroksidasyonu ürünlerinin %40'ını ifade eder. Bu nedenle lipid peroksidasyonunu ifade etmede genellikle MDA yerine tiyobarbutirik asit reaktif maddeleri (TBARM) ifadesinin kullanılması daha doğrudur. Ancak yine de, MDA lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmektedir.

ROT'un hücre bileşenlerine oksidatif saldırısıyla, ateroskleroz, kardiovasküler hastalıklar, diyabet, çeşitli karaciğer bozuklukları ve romatizmal hastalıklar gibi bir çok insan hastalığının patogeneğinde işe karıştığı rapor edilmiştir [108]. Oksidatif stresin çeşitli biyolojik indikatörlerindeki artış ve modifikasyonlar, bazen patolojik durumların ortaya konulmasında belirteç olarak kullanılabilir [109].

Hastalıkların organ ve/veya dokuda oluşturduğu membran hasarı, lipid peroksidasyonunu uyarır. Membranların yapı ve fonksiyonları bozulur. Hasarlı

dokularda lipid peroksidasyonu, sağlıklı dokulardan daha hızlı ilerler. Bu dokularda peroksidasyona yatkınlıktaki artış, antioksidanların inaktivasyonunun ve metal iyonlarının (Fe ve Cu) hücre içinden serbestleşmesinin bir neticesidir [110]. $^1\text{O}_2$ ve OH^\cdot radikali, lipid peroksidasyonuna neden olan en önemli radikallerdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, özellikle doymamış yağ asitlerinin çift bağlarının oksidasyonu, membran akışkanlığında azalma, membran salınım fonksiyonlarında düzensizliğe, membran geçirgenliğinde bozulmaya neden olur [15]. OH^\cdot radikalının doymamış yağ asitlerinden hidrojen çıkarma ile başlattığı tepkimelerin aksine, $^1\text{O}_2$ doğrudan doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna neden olur. Birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin zarlardaki bolluğu nedeniyle, lipid peroksidasyonu zarsal değişimlerin en önemli sebebidir [111].

Peroksidatif yol boyunca reaktif ara ürünler yoluyla aldehitler (MDA ve 4-hidroksinonenal), pentan ve etan, 2,3 trans konjuge dienler, isoprostanlar ve kolesteroloksidler gibi son ürünler şekillenmektedir. Aldehitler, lipid hidroperoksitlerinin yıkımı sırasında daima oluşurlar ve pek çoğu biyolojik olarak aktiftir. Bunlardan en iyi bilinenleri MDA ve 4-hidroksinonenal'dir [112]. Bu maddeler oluşum yerlerinden kolayca difüze olur ve hücrenin diğer bölümlerinde hasara yol açarlar. Oluşan bu aldehidlerden MDA, membran doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun işareti olup, lipid peroksidasyonunun en önemli göstergesi olarak kabul edilir [111]. MDA ve 4-hidroksinonenal gibi aldehitlerin biyolojik aktiviteleri, DNA ve proteinlere çapraz bağlanarak bu moleküllerin fonksiyon ve aktivitesini değiştirebilmeleridir. Örneğin MDA, amino ve tiyol gruplarıyla reaksiyona girebilmektedir. Aldehitler oluşturdukları yerden daha uzak bölgelere gitmede serbest radikallerden çok daha fazla difüze olarak [113] böylece hücre ödemine, damar geçirgenliğinin bozulmasına, fosfolipaz aktivitesinde değişikliklere neden olabilmekte, araşidonik asitin değişik endoperoksitlerinin ve prostoglandinlerin oluşumunu ve salınımını indükleyebilmektedirler [15]. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da deformasyon, iyon transformu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin birikimi gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Peroksidasyon ürünleri aterosklerozda ve iskemik veya travmatik beyin hasarının neden olduğu doku hasarının başlamasında önemlidirler. LDL'deki trigliseritler ve membranların fosfolipidleri serbest radikal ataklarına en duyarlı olan makromoleküllerdir [113].

Serbest radikaller tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunun; diyabetes mellitus, hipertansiyon, ateroskleroz, yaşlanma, kanser, her tür dokunun post iskemik reperfüzyon hasarı, ksenobiyotik toksisitesi, kollagen doku hastalıkları, senil katarakt, vitiligo ve çeşitli cilt hastalıkları, senil demans, çeşitli beyin hastalıkları gibi daha birçok doku ve organı ilgilendiren patolojilerde rol oynadığı saptanmıştır [114]. Böbrek karsinogenezis modellerinde doku hasarında ROT'un işe karıştığı lipid peroksidasyonundaki artmayla desteklenmiştir.

Yapılan bir araştırmada, alkolün kronik olarak uygulanmasının rat beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu aşırı arttırdığı, bununla beraber Cu,Zn-SOD aktivitesinin önemli derecede düşürüldüğü ortaya konmuştur. Araştırmacılar bu durumun dokuda alkol kaynaklı oksidatif stres oluşumu nedeniyle meydana gelmiş olabileceğini bildirmişlerdir [115].

Serbest radikal kaynaklı lipid peroksidasyonundaki artış, iskemi reperfüzyon hasarı ve doku travması, yangı, ilaç toksisitesi gibi patofizyolojik olayların bir sonucudur. Kronik alkol tüketimi peroksidatif işlemler ile membran lipidlerinin yapısını ve bütünlüğünü bozmaktadır [16].

Ignazio ve ark. [104], alkolik hastaların kan dokusunda, alkol ve alkol metabolitlerinin XO aktivitesini artırarak ve doğrudan serbest radikal oluşturarak, membran lipidlerinin ve kan plazma proteinlerinin oksidasyonuna neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca aynı araştırmacılar alkolün ana metaboliti olan asetaldehitin, MDA ile reaksiyona girerek, MDA'nın etkisini kuvvetlendirebileceğini tespit etmişlerdir.

Lipid peroksidasyonu, alkol indüklü karaciğer hasarının gelişiminde muhtemel bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Alkolün hayvanlarda MDA seviyesini, konjuge dienleri ve lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan etan üretimini artırdığı bildirilmiştir [98].

Nordman ve ark. [116], kronik etanol tüketiminin, karaciğer, böbrek, kalp, testisler, merkezi sinir sisteminde oksidan/antioksidan dengesi bozduğunu ve bu nedenle oksidatif stres oluşturarak lipid peroksidasyonunu artırdığını ve sonuçta organ hasarı oluşumunun gözlemlendiğini rapor etmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar, alkolün neden olduğu testisküler bozulma, mitokondrial lipid peroksidasyonundaki artışla beraber, GSH seviyesindeki azalmadan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Worral ve ark. [57], alkolün kalp kası üzerindeki hasarını tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, alkol alımıyla dolaşımdaki MDA ve asetaldehit seviyelerinin

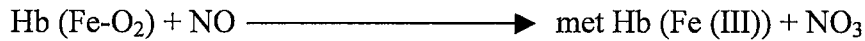
arttığını, aynı zamanda MDA-asetaldehit etkileşimi sonucu, kalp kasında hasarlanmalar meydana gelebileceğini bildirmişlerdir.

Bir başka çalışmada araştırmacılar, ratlara kronik olarak etanol ve nikotin uygulanmasının, ratların değişik dokularında oksidan/antioksidan dengeyi bozarak lipid peroksidasyonu meydana getirdiğini ortaya koymuşlardır [4].

2.8.3. Nitrik Oksit (NO)

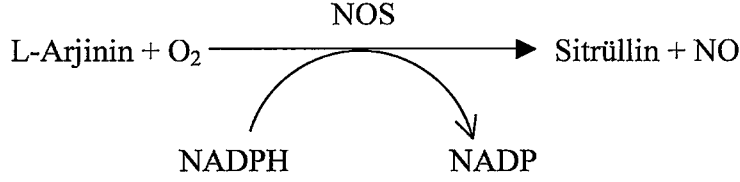
1980 yılında ABD’de “endothelium-derived relaxing factor” (EDRF); endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak tespit edilen bu ajanın, 1986’da nitrik oksit (NO) olabileceği düşünülmüş ve daha sonraki çalışmalarda EDRF’nin NO olduğu gösterilmiştir. 1988’de NO’nun damar endotel hücrelerinde L-arjinin’den sentezlendiği tespit edilmiştir [117].

NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde görev almaktadır. NO, kardiovasküler, sinir ve immün sistemlerde çok sayıda fonksiyonu düzenleyen bir moleküldür. Havayla alınan NO, oksijen ile reaksiyona girer ve nitrojen dioksit dönüşür (NO₂), ki bu form dokulara hasar verir ve daha sonra daha stabil bir yapı olan nitrat (NO₃) oksitlenir. NO, 4-50 saniyelik çok kısa yarılanma süresine sahiptir ve daha stabil yapılar olan NO₂ ve NO₃’e dönüşür [25]. Düşük konsantrasyonlarda NO, ROT kaynaklı hasara karşı koruyucu olabilirken, yüksek konsantrasyonlarda ise hasarlayıcı olmaktadır. Düşük konsantrasyondaki NO, oksijene nazaran hemoglobine 3000 katlık bir affiniteyle bağlanır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO’i kısa sürede NO₃’e oksitleyerek etkisizleştirir. NO’nun önemli bir diğer etkisi de oksijen hemoglobinle reaksiyona girerek methemoglobine ve NO₃’e dönüşümüdür [118], bu tepkime aşağıdaki gibidir.



Bu reaksiyon, NO biyoaktivitesinin ve konsantrasyonunun in vivo olarak kontrol edildiği başlıca mekanizmadır [119].

NO, L-arjinin-NO yolu olarak isimlendirilen bir mekanizmayla, üç farklı izoformu bulunan nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) tarafından, L-arjinin’den üretilir [120]. Aşağıdaki reaksiyonda L-arjinin-NO yolu gösterilmiştir.



NOS'un fizikokimyasal ve kinetik özellikleri vücudun çok değişik dokularından (damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem dokuları vb) izole edilerek incelenmiştir [121,122]. NOS enziminin üç izoformu vardır. Tip I (nöronal NOS, nNOS), tip II (indüklenebilir NOS, iNOS) ve tip III (endotel NOS, eNOS). Tip I ve III, konstitüf NOS (cNOS) olarak sınıflandırılır. Konstitüf NOS (nNOS veya eNOS), özellikle damar endoteli, idrar yolu dokuları, periferik ve merkezi sinir sistemi gibi dokularda lokalize olmuştur. nNOS ve eNOS, bu dokularda her zaman mevcuttur ancak aktif değildir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu arttığı zaman, kalsiyum kalmodulinle birleşerek konstitüf NOS'u aktive eder ve L-arjinin'den, NO sentezi gerçekleşir. İkinci enzim indüklenebilir izoformdur (iNOS). Bu tip NOS, konstitüf tipin aksine hücre içinde bulunmaz. Özellikle makrofaj (monosit, nötrofil, kupfer hücreleri ve diğerleri) ve damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir. Lipopolisakkarit, sitokinler, interferon, hipoksi gibi etkenler bu hücrelerde iNOS proteininin transkripsiyonunu ve sonrasında da sentezini artırır. Sentezlendiği an aktif olan iNOS, kalsiyum konsantrasyonuna bağlı olmaksızın yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli bir NO sentezine yol açar. Özellikle bakteri lipopolisakkaridleri ve interferon- γ ile uyarılan makrofajlar çok miktarda NO üreterek yabancı hücrelerde (bakteri parazit, tümör hücresi) sitostatik veya sitotoksik etki meydana getirirler [117,121].

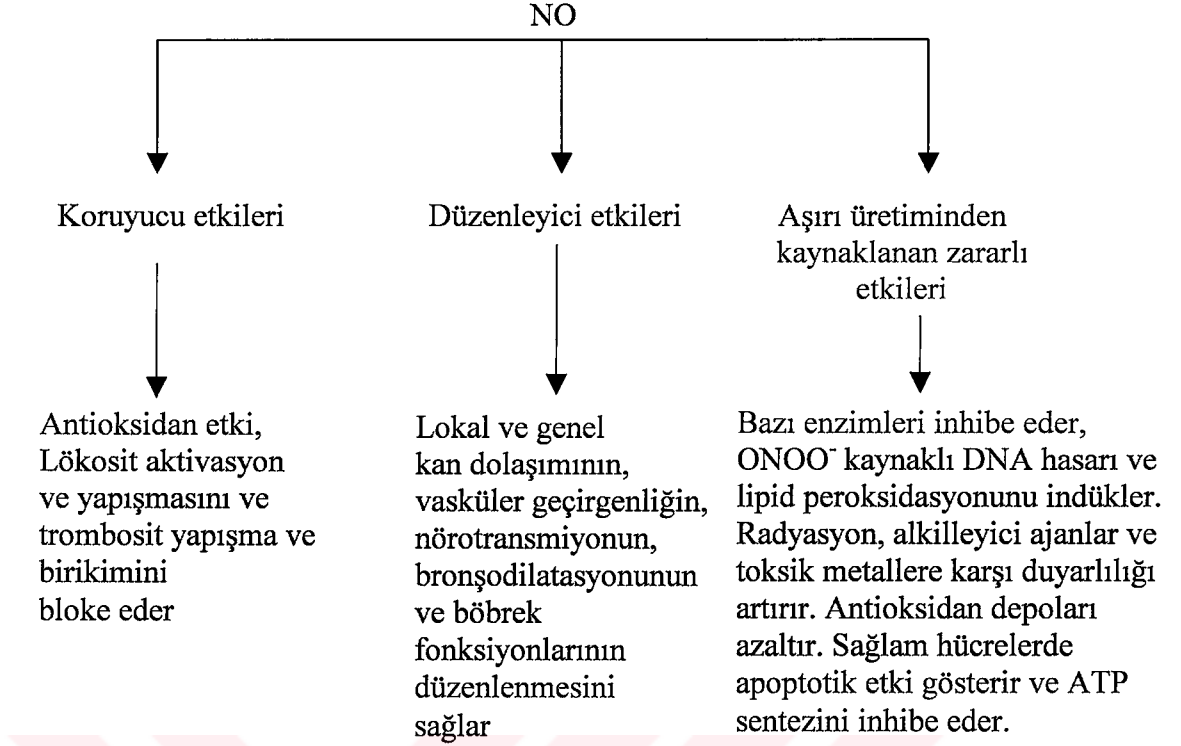
Makrofajlardaki NOS izoformu iNOS'tur ve aktivasyon olmadığı durumlarda makrofajlarda NOS proteini bulunmaz. İndüksiyondan sonra enzim sentezi ve dolayısıyla NO sentezi meydana gelmektedir. L-arjinin-NO yolunun indüklenmesi, saatlerce hatta günlerce devam eden NO sentezine neden olmaktadır. Ancak, aşırı NO sentezi, hücreler için oldukça zararlı etkiler meydana getirmektedir. Makrofaj kaynaklı NO; bakteri, parazit ve tümör hücreleri üzerinde sitotoksik etki yapmaktadır. Bu etki hücre içi patojenlere karşı da başlıca savunma mekanizmasıdır [50]. Makrofajlardaki NO, tümör hücresi ve mikroorganizmalardaki Fe-S taşıyan enzimleri nitrozile ederek antimikrobal, antitümöral sitotoksik etki gösterir. NO, ferritinle reaksiyona girerek serbest demir salınımına yol açar, bu serbest demirde lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Makrofaj kökenli NO tümör hücresinin DNA sentezini engeller. Bunu ribonükleotid redüktazı inhibe ederek yapar. Ayrıca, hedef hücrede mitokondri elektron

taşıma zinciri enzimlerini inhibe ederek ATP sentezini sınırlar ve sitotoksik etki meydana getirir [123].

Endotel, vasküler düz kas, adrenal bezler, makrofajlar, nötrofiller ve beyin sitozolleri NO üretir. NO, hücrelerde guanilat siklazı aktive ederek cGMP'yi artırır. Artan cGMP vasküler düz kasları gevşetir, makrofaj aktivasyonunu, trombosit yapışması ve birikimini inhibe eder [121,122].

Endotel kaynaklı NO, damar düz kaslarının gevşemesini sağlayarak kan akımını ve kan basıncını düzenlemektedir. Bu etki sistemik dolaşımda meydana geldiği gibi lokal olarak kalp, beyin, karaciğer, gastrointestinal sistemlerde de gözlenmektedir. Nonadrenerjik ve nonkolinerjik terminallerden salgılanan NO, kan akımının ve basıncının düzenlenmesinde yardımcıdır [118,122]. Lipoliziste adipositler, endojen olarak NO üretebilmektedirler. Endojen NO, yağ hücrelerinde lipolizisin kontrolünde düzenleyici bir sinyal olarak görev yapar [124]. Sinirsel iletimde NO'nun bir nörotransmitter olduğu tam olarak ispat edilmiştir. İn vitro spesifik reseptör sitümülyasyonundan sonra NO, postsinaptik bir kaynaktan salınarak, presinaptik olarak bir veya daha fazla nörona etki yapar. Bu etki glutamat salınımını artırarak sinaptik geçişte artışa neden olmaktadır. L-arjinin-NO yolu, peniste korpus kavernosumun gevşemesinden sorumlu olan çok önemli bir mekanizmadır ve bu yolla insanda penis ereksiyonunu sağlar [118]. **Şekil 2.8.**'de NO'nun başlıca etkileri özet olarak verilmiştir.

NO, stabil olmayan bir yapı özelliği gösterir ve biyolojik sistemlerde hemoglobin, oksijen, süperoksit ve transisyon metal iyonları ile reaksiyona girer. NO'nun hücreler üzerinde çok sayıda doğrudan ve dolaylı toksik etkileri bilinmektedir. NO, moleküler oksijenle reaksiyona girerek, DNA deaminasyonuna neden olan diazot trioksit (N_2O_3) şekline dönüşür. O_2^- radikali ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olan ONOO⁻'ya dönüşür. NO'nun mutajenik etkileri de vardır. NO ve ROT, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, çeşitli enzim sistemlerinin aktive/inaktive edilmesine neden olan tiyollerin oksidasyonu, prostetik iyon gruplu enzimlerin inhibisyonu, ATP ve NADPH sentezinin baskılanması, kalsiyum ve diğer iyon taşıma sistemlerinin bloke edilmesi gibi birçok patolojik olaya neden olabilir [103]. NO ve O_2^- radikali arasındaki etkileşim sonucunda oluşan ONOO⁻, NO'nun biyoaktivitesinin ortadan kaldırılmasında rol oynayan önemli mekanizmalardan birisidir [125]. ONOO⁻'nin ileri katabolik reaksiyonları yoluyla, OH⁻ ve NO₂ oluşabilir ve bu yapılar oldukça toksiktir ve kuvvetli birer oksidandır. Özellikle yağ asitlerinin oksidasyonuna ve aromatik asitlerin nitrosilasyonuna neden olurlar [126].



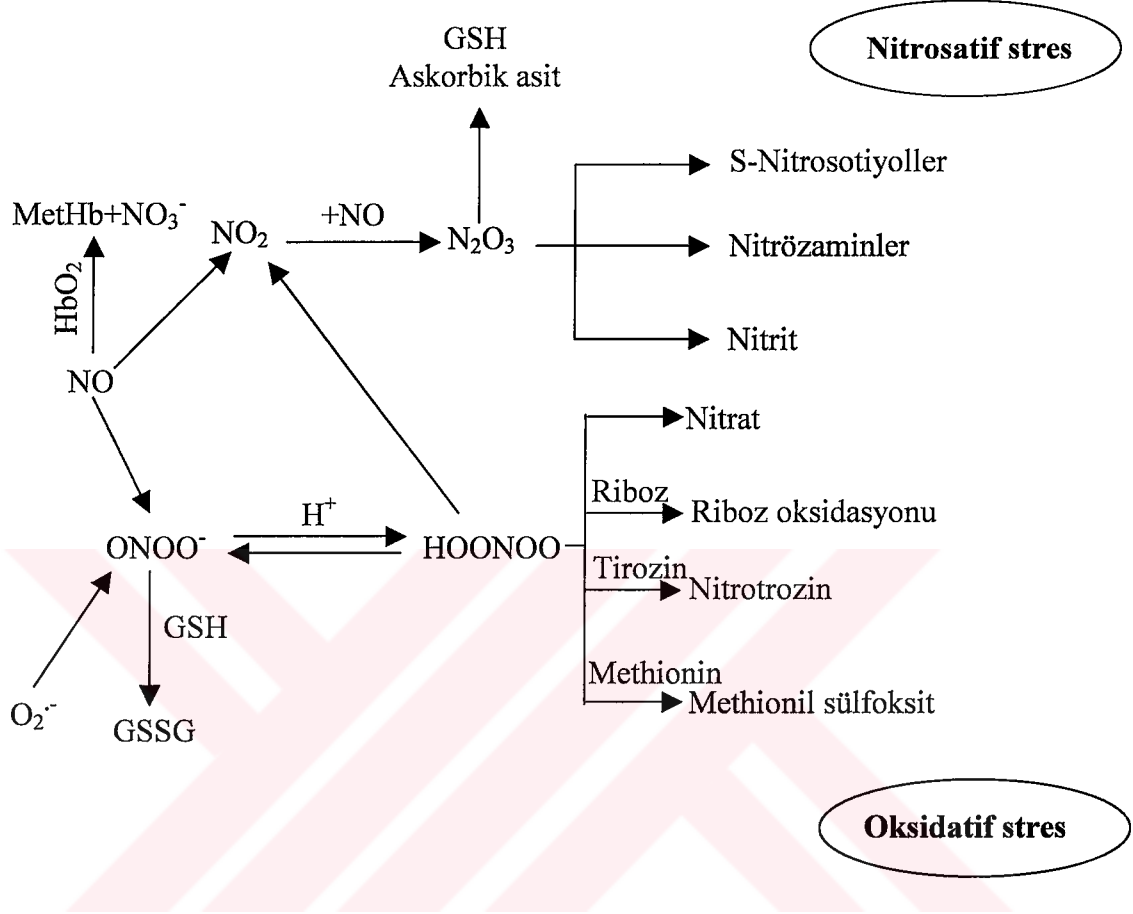
Şekil 2.8. NO'nun başlıca biyolojik etkileri.

NO fazlalığında, ONOO⁻'nin prooksidan etkisi, NO'nun antioksidan etkisi ile baskılanır. O₂⁻ fazlalığında ise ONOO⁻'ya bağlı olarak patojenik etki meydana gelir [127].

Metaller ile NO etkileşimi başlıca 3 yolla gerçekleşir: 1) metal merkezleri ile NO'nun direkt reaksiyonu, 2) dioksijen metal kompleksleri ile NO redoks reaksiyonu, 3) yüksek valentli oxo-komplekslerin meydana gelmesi şeklindedir [119]. NO'nun diğer bir direkt etkisi ise başka radikal türleri ile reaksiyonudur. Karbon merkezli radikaller, iyonize radyasyon etkileşimi sonucunda DNA'da hasarlanmalarla şekillenirler. Bu gibi radikal türler, C-nitrozo bileşikleri oluşturmada NO ile hızlıca reaksiyona girebilirler. Karsinogenik nitrozaminler, N₂O₃ yoluyla bazı ikincil aminlerden oluşabilir ve zararlı etkilere sahip olabilirler. Proteinlerdeki tiyol gruplarının nitrozasyonu, S-nitrozotiyol bileşiklerinin oluşmasına bağlı enzim inhibisyonu meydana getirebilirler [128]. NO'nun dolaylı şekilde organizmaya olan bütün etkileri **Şekil 2.9.**'da özetlenmiştir.

Böbreğin adrenal bezlerinde de NO sentez edilmektedir. Adrenal bezin korteks ve medullasındaki soluble guanilat siklaz, L-arjinin varlığında sitümlü olmaktadır ve bu sitümlasyon Hb ile inhibe edilmektedir. Buradaki NO, konstitüf NOS tarafından sentez edilmektedir. L-arjinin-NO yolunun, adrenal korteks ve medulladaki fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır. cGMP, katekolamin salınımı ve steroidogenezinin her

ikisinde de işe karışmaktadır. L-arjinin-NO yolu, adrenal bezden hormonların sentezi ve salınımında muhtemelen rol oynamaktadır [117].



Şekil 2.9. NO'nun dolaylı etkilerinin kimyası.

cNOS izoformlarının (eNOS, nNOS) böbreğin makula densa, toplayıcı kanallar, iç medullasında ve glomerulus'taki varlığı immünohistokimyasal boyama ve PCR yöntemleriyle analiz edilerek tam olarak gösterilmiştir. Ayrıca iNOS, böbreğin vasküler düz kaslarında ve jukstaglomerular aparatusta tespit edilmiştir. Vasküler ve tübüler segmentlerde, interlobüler arterlerde, glomerulus'ta, proksimal tübüllerde ve toplayıcı kanallarda iNOS mRNA'sı izole edilmiştir, ancak iNOS'un böbrekteki fonksiyonunun ne olduğu açık değildir. iNOS'un böbrek fonksiyonlarının veya arterial basıncın düzenlenmesinde rol aldığı ileri sürülmüştür [129].

eNOS tarafından üretilen NO, böbreğin affarent arter ve mesangial hücrelerin kasılığını etkileyerek glomerular mikro dolaşımı düzenler. NO, glomerular kılcal damar kan basıncı, glomerular kan akışı ve glomerular süzme hızının düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Böbrekte meydana gelebilecek kronik NO eksikliği, hipertansiyon ve

glomerular hasara neden olmaktadır [130]. NOS'un inhibe olması, böbrek vasküler direncini artırmakta ve böylece hipertansiyon oluşmaktadır [131].

Freischlag ve ark. [132], tavşanları 8 hafta boyunca sigaraya maruz bırakmışlar ve tavşanların yüzey femoral venlerinin asetil kolin aracılı endotel-bağlı gevşemesinin oldukça azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumun; sigara içimiyle ortaya çıkabilecek NO üretimindeki azalmadan veya sigara kaynaklı oluşan ROT ile NO yıkılımının artmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Qiu ve ark. [133], bir NOS inhibitörü olan N^w-nitro-l-arjinin metil ester'i (L-NAME) ratlara deri altı yolla akut olarak uygulamışlar ve ratlarda gastrik ülserin şiddetlendiği tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, iskemiyi takiben reperfüzyon anında aşırı miktarda serbest radikal oluşumuna bağlamışlardır.

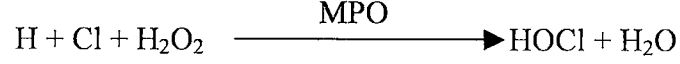
Sigaradan kaynaklanan NO sentezindeki azalma, endotel hücrelerinde hasarlanma meydana getirerek, peptik ülser oluşum riskini artırmaktadır. İskemik doku reperfüzyonu, akut yangı ve sepsis gibi birçok patofizyoloji, NO üretimini sitümüle eden olayları başlatabilmektedir [126].

2.8.4. Miyeloperoksidaz (MPO)

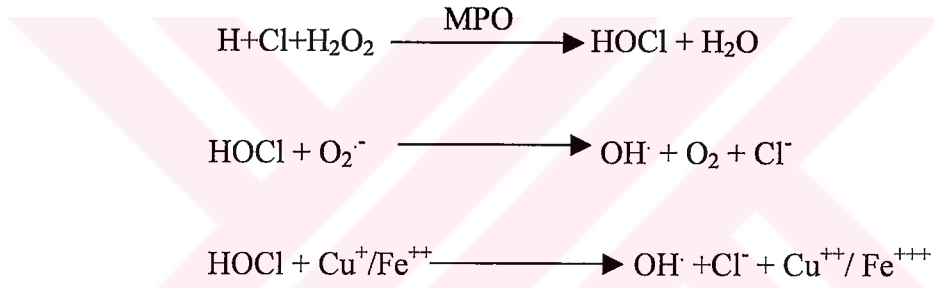
Miyeloperoksidaz (MPO, EC 1.11.1.7), memeli nötrofillerinin azurofilik granüllerinde bulunan bir enzimdir, ayrıca bu enzim insan monositlerinde de tanımlanmıştır. Bu hücreler tarafından fagosite edilen bakteriler, bu enzimin etkisiyle yok edilirler [134]. Bu enzim, fagozom içerisine bırakılır. Fagositoz solunum patlamasıyla devam eder ve çok daha fazla oksijen tüketilerek oksidatif patlama meydana gelir. Bu olayların sonucunda H₂O₂; OH[·] ve HOCl'ye dönüştürülerek antibakteriyel aktivite meydana getirilir [135].

Fagositoz, oksijenin toksik ürünlerinin önemli ölçüde katkıda bulunduğu bir olaydır. Bu mekanizmada kullanılan oksijenin tamamı, NADPH oksidaz tarafından enzimatik olarak O₂^{·-} radikale ve daha sonra O₂^{·-} radikali ise SOD tarafından H₂O₂'ye dönüştürülür. Fagozomda O₂^{·-} ve H₂O₂ birikimi yalnız başına fagositik fonksiyon için yetersizdir. H₂O₂, peroksidazlar tarafından kullanıldığı zaman fagositoza katkıda bulunur. Peroksidazlar, H₂O₂ ve bir halojen ile birleştikleri zaman mikroorganizma ve tümörlere karşı vücudun en önemli hücrel savunma sistemlerinden birini oluştururlar. Bu amaçla nötrofil ve monositler MPO içerirler. Bu peroksidazlar fagositik lokositlerin sitoplazmalarında granüller halinde depolanırlar ve fagositoz sırasında fagozom içine

boşaltılırlar. Peroksidazlar, H₂O₂ ile birlikte halojenleri aktive ederek toksik ara ürünlere çevirirler. Çoğunlukla toksik ara ürün HOCl'dir. H₂O₂, bir halojenle birlikte (Cl⁻, Br⁻, I⁻) nötrofil fagozomlarında bulunan bir enzim olan MPO tarafından HOCl'ye çevrilir [19]. Bu reaksiyon aşağıda verilmiş ve fagositoz biyokimyası Şekil 2.10.'da özetlenmiştir.



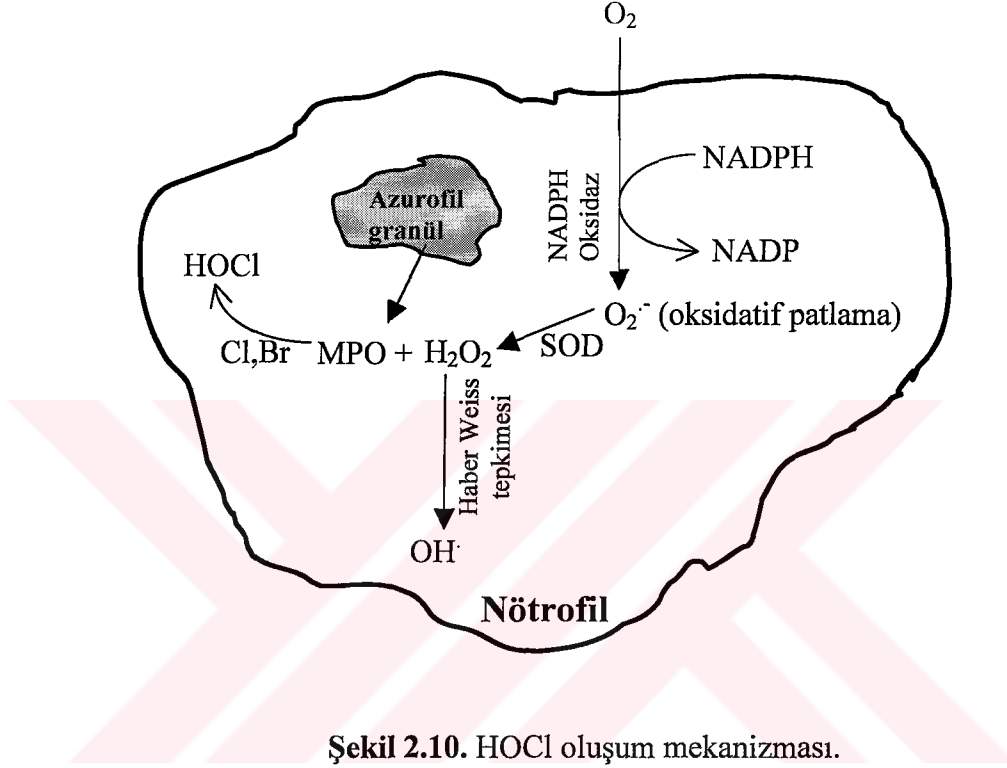
Fagositler aktive olduğunda, bakterileri öldürmek için yeterli miktarda ROT üretirler. İleri metabolizma gereği H₂O₂, MPO tarafından HOCl'ye ve Fe⁺⁺ varlığında ise OH⁻ radikaline dönüşür. HOCl'de ileri reaksiyonlarla OH⁻'e dönüşebilir. Bu reaksiyonlar aşağıda özetlenmiştir.



HOCl çok toksiktir ve fagositik hücrelerde spesifik olarak üretilerek sitostatik ve sitotoksik etki meydana getirir. Membran proteinleri ve onların tiyol gruplarını hedef alır. HOCl ile nükleotidlerin, hücre içi enzimlerin ve sitokromların oksidasyonu, solunum zinciri gibi temel yaşamsal işlemlerde inhibisyona yol açar. HOCl uzun ömürlü oksidanlar olarak isimlendirilen kloraminlerin (RNH-Cl) oluşmasında, iç aminler (R-NHI) ile reaksiyona girebilir. HOCl bakteri membranına bağlanarak, DNA replikasyonunu durdurur [25].

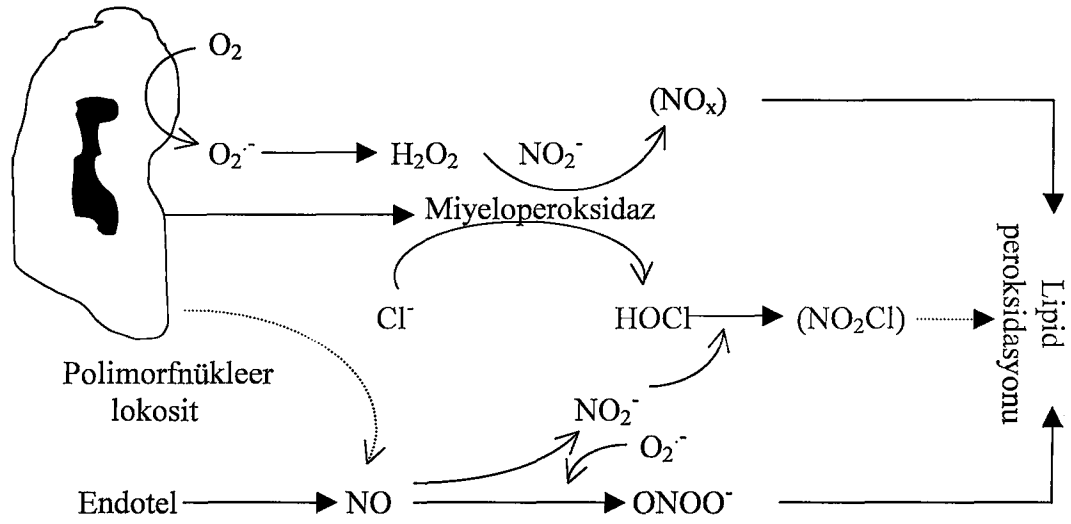
Nötrofiller, metal katalizli Haber Weiss reaksiyonu ile OH⁻ radikali üretirler [136]. Fagozom içinde başta ¹O₂ ve OH⁻ olmak üzere oksijenin bütün reaktif türleri kolaylıkla üretilir. Bu nedenle fagosite edilen partikülün lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitlerinin yapıları kısa sürede bozulur ve fagozom içine salınan lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar. Özellikle radikallerin oluşumuna neden olan toksik aldehitler, organik radikaller ve kloroaminler fagozom ortamında birikirler. Böylece, fagosite edilmiş olan mikroorganizmalar, civar dokulara minimal risk teşkil edecek

şekilde yok edilirler. Eğer nötrofil sindirebileceğinden daha fazla hedef ile karşılaşırsa fagazomda oluşan yıkıcı bileşikler ve oksijen metabolitleri hücre dışı kısma taşar, bu durum fagositozda görülen nötrofil kaynaklı doku hasarını meydana getirir. MPO tarafından katalizlenen oksidasyonla oldukça yüksek reaktivitede ürünler oluşur ve hücreler ve moleküllerin birçoğu ile etkileşir [137].



Şekil 2.10. HOCl oluşum mekanizması.

Dokular yangıyla karşılaştıklarında nötrofiller tam aktive olarak O_2^- oluştururlar. Oluşan O_2^- makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi dokular ve damar dışına sızan nötrofiller ile oluşturulan NO ile reaksiyona girerek sitotoksik $ONOO^-$ oluşturur. Ayrıca O_2^- , H_2O_2 'ye dönüşebilmektedir. Bu bileşik kolaylıkla yangılı dokuya difüze olabilir ve nötrofillerde bulunan MPO, H_2O_2 'yi substrat olarak kullanıp HOCl oluşturur [136,138].



Şekil 2.11. Polimorf nükleer lökosit mevcudiyetinde NO kaynaklı oksidanların oluşumu için muhtemel bir yol [138].

Makrofajlar ve endotel hücrelerini de içine alan birçok hücre, güçlü biyolojik aktiviteye sahip olan NO radikalini üretebilmektedirler. NO'dan oluşan reaktif nitrojen türleri güçlü oksidandırılar ve oksidatif hasara neden olabilmektedirler. Monositler, çeşitli sitokinler ve vazoaktif maddeler tarafından sitümüle edilerek bol miktarda NO üretirler. Ayrıca $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 'de üretebilmektedir. Monositin aynı anda $O_2^{\cdot-}$ ve NO ürettiği olması, güçlü bir oksidan olan $ONOO^{\cdot}$ oluşturabileceğini de göstermektedir. Nötrofil ve monositlerde bulunan MPO, reaktif nitrojen türlerinin oluşumunda da rol almaktadır. Son zamanlarda MPO'nun, NO metabolizmasının başlıca son ürünü olan nitriti kullanabildiği ve lipid peroksidasyonunu başlatabildiği tespit edilmiştir. MPO, HOCl ile nitriti reaksiyona dahil ederek, dolaylı bir yolla nitril klorit (NO_2Cl) formu oluşturabilmektedir. Aktive olan polimorf nükleer lökositler hücre dışına MPO salarlar ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna yol açarak lipid peroksidasyonu başlatırlar (Şekil 2.11.) [138,139].

MPO aktivitesi özellikle doku hasarlanmasının olduğu yerlerde çok yüksek seviyelere ulaşır. Örneğin aterosklerotik lezyonlarda çok yüksek MPO aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [138,140].

Çift taraflı böbrek iskemi/reperfüzyonu yapılan bir araştırmada, iskemi sonrası 6. saatte böbrek MPO aktivitesinin oldukça yükselmiş olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu durumun, böbreğin hasarlanmasını takiben ilk saatlerde o bölgeye aşırı bir nötrofil birikiminden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir [141].

Yine bir başka böbrek iskemi/reperfüzyon çalışmasında, iskemi sonrası böbrek MPO aktivitesinin oldukça artmış olduğu tespit edilmiştir [142].

Ludwig ve ark. [143], sigara içiminin alt solunum yollarında nötrofil birikimini artırdığını bildirmişlerdir.

Serebral iskemi çalışması yapılan ratlarda, beyin korteks ve stratumunda iskemi sonrası 48. saatte artan MPO aktivitesi tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, ayrıca beyin GSH miktarının da düştüğü rapor edilmiştir. Araştırmacılar beyin hasarında, hasar oluşum sonrası nötrofillerin bölgeye yığıldığını ve oksidatif stresin ilk safhalarında ortaya çıkan GSH azalmasının, hasarlanmada önemli bir yer teşkil ettiğini bildirmişlerdir [144].

2.8.5. Ksantin Oksidaz (XO)

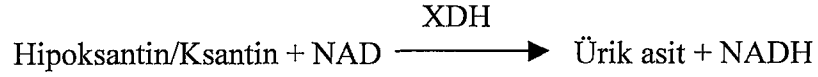
Ksantin oksidoredüktaz (XOR), son ürün olarak ürik asitin oluştuğu pürin yıkılımının son iki basamağını katalizler. Memelilerde enzim iki formda bulunur: 1. formu ksantin dehidrogenaz'dır (XDH) (EC 1.1.1.204), elektron alıcısı olarak NAD'yi kullanır ve sonuçta herhangi bir serbest radikal oluşumu söz konusu değildir. 2. formu ksantin oksidaz'dır (XO) (EC 1.1.3.22), elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır, H₂O₂ ve O₂⁻ radikali gibi ROT oluşumuna neden olur [145,146].

XO ve XDH, molibdenyum hidroksilaz flavoprotein ailesinin birer üyeleridirler ve aynı gen ürününün farklı formlarında bulunurlar. XDH ve XO'nun başlıca katalizlediği ana reaksiyonlar hipoksantin ksantine, ksantin de ürik asite dönüşümün reaksiyonlarıdır. XO, bakterilerden insanlara kadar çok değişik türlerde geniş bir dağılım gösteren ve birçok dokuda bulunan bir enzimdir [147].

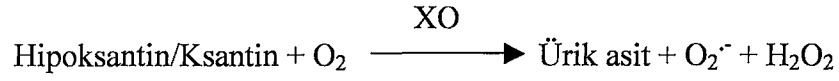
XOR aktivitesi memelilerde en fazla karaciğer ve ince bağırsakta lokalizedir. Literatürde, insanda XOR aktivitesinin dokulara göre dağılımı tartışmalıdır. İnsan karaciğer ve barsağı, parankima hücrelerince zengin dokular olmaları sebebiyle diğer dokulardan daha yüksek XOR aktivitesine sahiptir [148].

İnsanda XOR'un; karaciğerin periportal hepatositlerinde, kuppfer hücrelerinde, iskelet kasında, böbrek ve kalp damarlarının endotel hücrelerinde, trake bağ dokusunda, ince bağırsakta bulunduğu tespit edilmiştir [146].

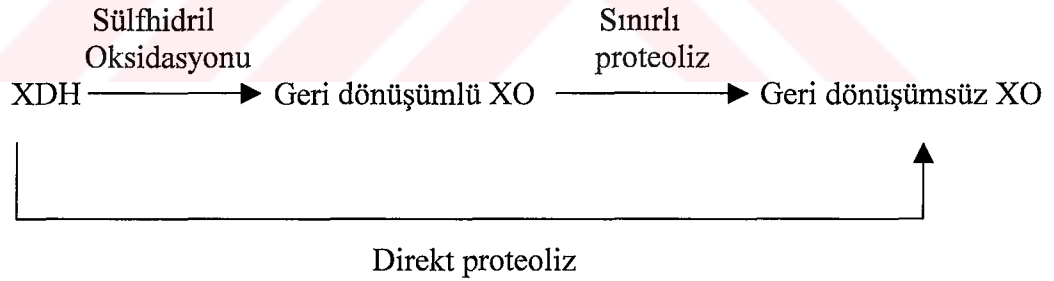
XDH, sağlıklı dokuda total ksantin dehidrogenaz/oksidaz aktivitesinin %90'nını içerir ve elektron alıcısı olarak NAD⁺'yi kullanır. Bu reaksiyon aşağıda verilmiştir.



Buna karşın XO, elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır ve sonuçta O_2^- radikali ve H_2O_2 oluşturur. Bu tepkime aşağıdaki gibidir.



XDH enzimi, yaklaşık olarak 150 kDa molekül ağırlığında tek bir subuniteden oluşan bir homodimer yapıdır. Bu homodimer 1 FAD, 1 molibdopterin ve 2 demir/2 sülfür merkezi içerir [149]. XDH'nin XO'ya dönüşümü ya proteolitik ayrılma ya da protein molekülünün sülfhidril gruplarının oksidasyonu ile oluşmaktadır. XDH'nin, XO'ya çevrim işlemi, bu enzimin yapısındaki tiyol gruplarının oksidasyonu sonucu gerçekleşir. Bu reaksiyon geri dönüşümlü bir olaydır. Kalsiyum bağımlı bir proteaz ile subunitelerin her birinden 20 kDa molekül ağırlığında bir protein parçacığının ayrılması sonucunda XDH, XO'ya geri dönüşümsüz olarak çevrilebilir. XDH'nin XO'ya dönüşüm mekanizmaları aşağıda verilmiştir.



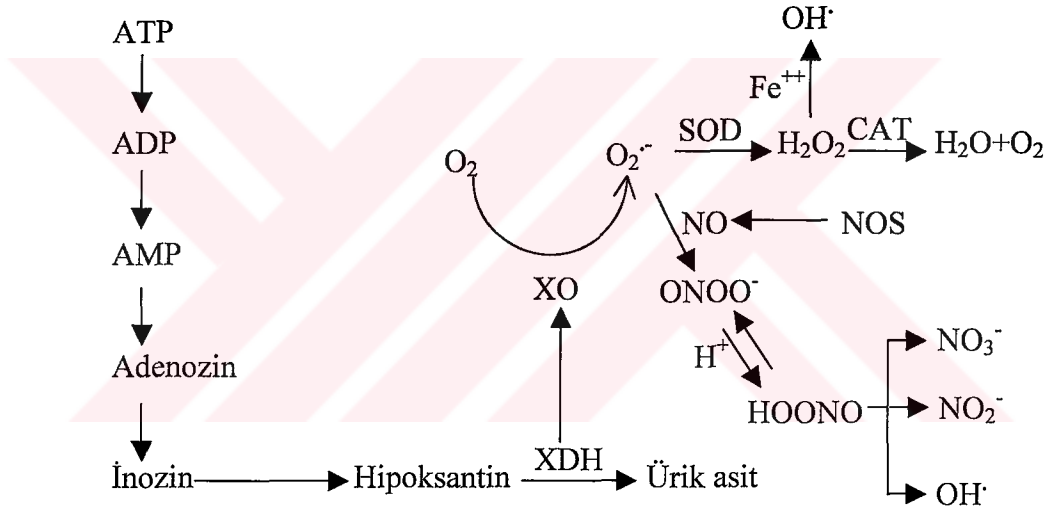
Tripsin ile memeli XOR'unun sınırlı proteolizi ile enzim, üç fragmente ayrılır (20, 40 ve 85 kDa) ve böylece enzim XO aktivitesi gösterir. XO'nun, 20 kDa'lık bölgesi iki demir-sülfür, 40 kDa'lık bölgesi FAD ve 85 kDa'lık bölgesi ise molibdopterin içerir [150]. Fizyolojik şartlarda enzim sisteminin baskın olan aktivitesi XDH'dir [151]. Memeli XDH'si, İskemi/reperfüzyon, hipoksi, sülfhidril gruplarının oksidasyonu, proteoliz, 37 derecede inkübasyon, -20°C 'de depolama, organik solventlerle XO'ya dönüşebilir ve böylece serbest oksijen radikalleri oluşturur [152].

XO, birçok dokuda ROT'un başlıca kaynaklarından sayılmakta ve hücrel hasarın oluşumunda anahtar bir enzim olduğu düşünülmektedir [153].

İskemi/reperfüzyonu gibi hipoksik durumlarda, reperfüzyonu takiben doku hasarının meydana gelme mekanizmasının, XDH'nin, XO'ya dönüşümüyle olduğu rapor edilmiştir (**Şekil 2.12.**) [154]. Özellikle bu dönüşümün hipoksik şartlarda hızlandığı bildirilmiştir [155].

Sultatos [156], etanolün neden olduğu hipoksik durumun, karaciğer ve kalp gibi dokularda hücre içi ATP yapımı için mevcut oksijendeki azalmayı da beraberinde getirdiğini, oluşan bu hipoksik durumun sitozolik kalsiyumu artırarak bir proteazı aktive ettiğini ve böylece XDH'nin, XO'ya dönüşümünü bildirmiştir.

XO'nun iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolü çok dikkat çekicidir. XO ile üretilen O_2^- ve H_2O_2 bir taraftan XDH'nin XO'ya dönüşümünü hızlandırmakta ve böylece devamlı ROT üreten kör bir döngü meydana gelmektedir [31].



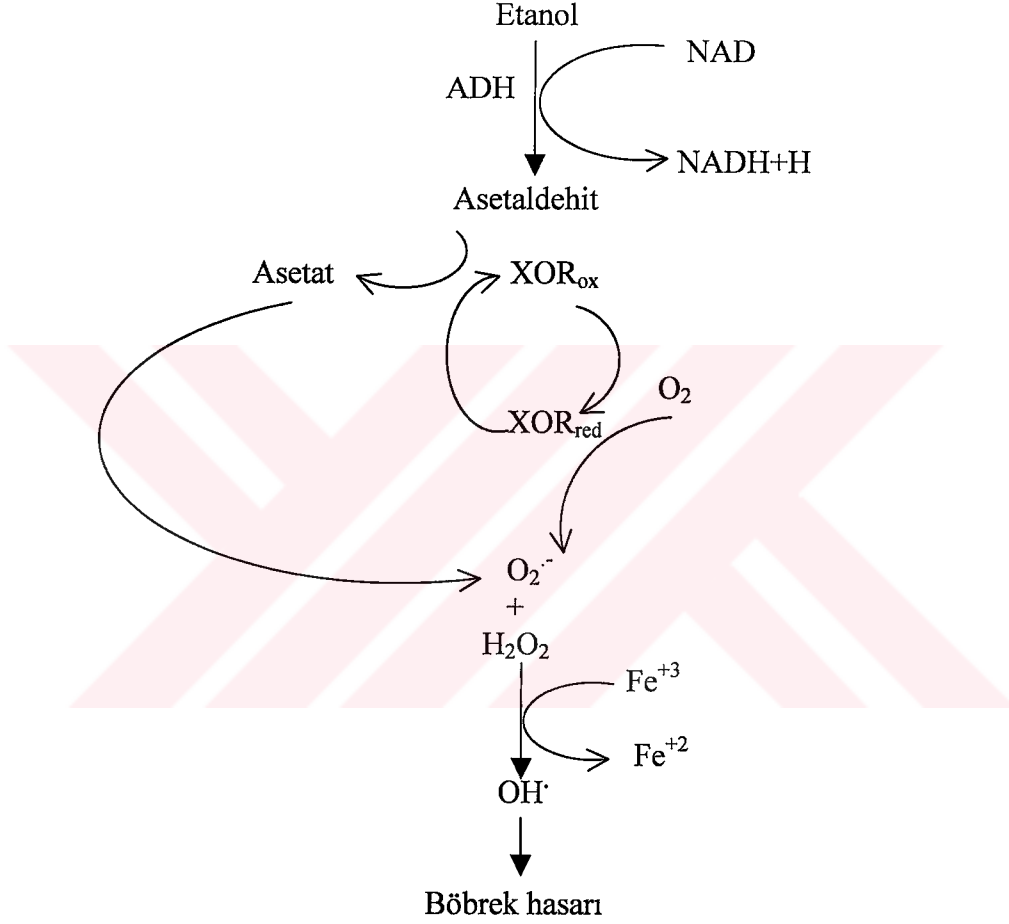
Şekil 2.12. İskemi/reperfüzyonda XDH'nin, XO'ya dönüşerek radikal türleri oluşturma mekanizması.

Doku reperfüzyonu sırasında oluşan O_2^- barsak, deri, iskelet kası, beyin, kalp, akciğer, böbrek ve karaciğeri içine alan çeşitli dokularda iskemi sonrası hasarın kritik bir parçası olarak işe karışmaktadır. XO inhibitörleri ve antioksidan enzimler, iskemi sonrası hasarın alanını önemli derecede sınırlarlar. XO kaynaklı radikaller, doku hasarlarında başlıca sorumlu olarak görülmektedirler.

Wang ve ark. [157], sigaraya maruz bıraktıkları ratların gastrik mukozasında, sigaranın doz ve uygulama süresine göre gastrik mukozal hücrelerde artan apoptosis ve XO aktivitesi tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak, sigaraya maruz kalmanın,

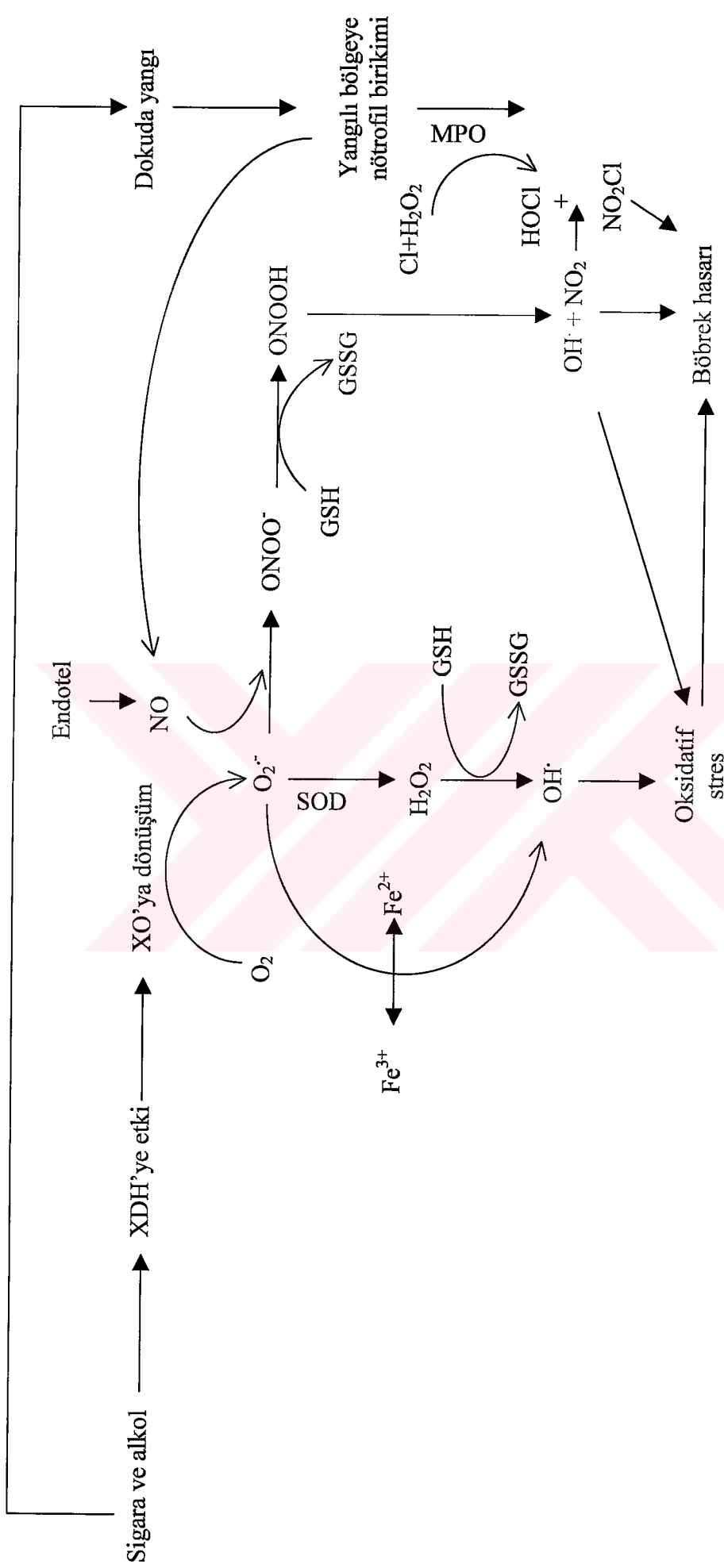
artan XO aktivitesini beraberinde getireceği ve bunun sonucunda aşırı ROT oluşumuyla gastrik mukozal hücrelerde apoptosisi artırabileceğine kanaat getirmişlerdir.

Alkolün böbrekte, XO aktivitesinin artışına yol açarak aşırı miktarda ROT oluşumuna neden olduğu ve böylece doku hasarlanmalarının meydana geldiği ileri sürülmüştür [42]. Bu hasarlanmanın muhtemel mekanizması Şekil 2.13'de özetlenmiştir.



Şekil 2.13. Böbrekte alkolün XOR yoluyla muhtemel etkisi.

Kaynak özetlerinde sigara ve alkolün organizmaya olan etkileri tek tek açıklanmıştır ancak anlama kolaylığı olması açısından tüm bu etkiler Şekil 2.14.'de topluca özetlenmiştir.



Şekil 2.14. Alkol ve sigara kullanımının böbrek dokusundaki tüm muhtemel etkilerinin özeti.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Araştırmada, analitik saflıkta olan Sigma marka; glutatyon (GSH), 5,5'-ditiyobis-2 nitrobenzoik asit (DTNB), 2-tiyobarbutirik asit (TBA), potasyum klorür (KCl), çinko sülfat, 1,1,3,3, tetramethoksiopropan, n-butanol, triklor asetik asit (TCA), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum hidroksit (NaOH), tri sodyum sitrat, glisin, sodyum nitrit (NaNO_2), sülfürik asit (H_2SO_4), hidroklorik asit (HCl), P-aminobenzen sülfamid, N-naftil etilen diamin, fosforik asit (H_3PO_4 , %85'lik), potasyum nitrat (KNO_3), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4), nikotin amid adenin dinukleotid (NAD), ksantin, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), ürik asit, hidrojen peroksit (H_2O_2), heksadesiltrimetil amonyum bromid (HTAB), fenol, 4 amino antipirin, Na-K-tartarat, bakır sülfat (CuSO_4), sodyum tetraborat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), paraformaldehit, BSA kimyasal maddeleri kullanıldı. Etil alkol Malatya Şeker Fabrikası'ndan temin edildi. Ratlar filtreli Samsun sigarasına maruz bırakıldılar (180 paket). Ayrıca 540 litre, kalorisi belirli olan pastörize süt ve 25 kilo toz şeker harcandı. Total nitrit analizinde kadmiyum granülleri kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan aletler

Numune hazırlanması ve enzim analizlerinde Hierschman marka (10 μl , 100 μl , 1000 μl 'lik) otomatik pipetler, cenco whirlmix vortex, Libror-AEG 320 model 0.0001 g'a duyarlı hassas terazi, Hermle Z 383 K santrifüj, LKB Biochrom Ultrospec Plus 4054 model UV/visible spektrofotometre, Clifton manyetik karıştırıcı, Hanna marka dijital pH metre, Labortechnic marka homojenizatör kullanıldı. Ratların kronik olarak sigara dumanına maruz bırakılmaları esnasında kullanılmak üzere; 0,75x1x0,85 m, 0,64 m³ ebatlı ve hacimli plastik bir kabin yaptırıldı. Ratların muhafazası ve bakımı için 28 adet tel kafes ve beslenmelerinde kullanılmak üzere 28 adet ağzı bilyeli şişe temin edildi.

3.1.3. Ratların temini ve bakımları

Araştırmada kullanılan, ağırlıkları 180-220 gram arasında değişen, 1 aylık, 28 tane Wistar albino tipi erkek rat, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Araştırma Merkezinden temin edildi. Ratlar; her grupta 7 rat olmak üzere kontrol, alkol, sigara, sigara + alkol olmak üzere 4 gruba ayrıldıktan sonra, sessiz, sıcaklığın 22 °C ve nemin % 60-65 arasında kontrol altında tutulduğu, ayrıca 12 saat ışık, 12 saat karanlık siklusunun temin edildiği (08:00-20:00 saatleri arası ışık) bir odada bakıma alındılar.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kronik alkol ve pasif sigara rat modellerinin oluşturulması

Kronik alkolik rat modeli, Uzbay ve ark. [158]'na göre oluşturuldu. Bu metoda göre; başlangıçta ratların tamamı 7 gün süreyle sığır sütü, vitamin A (5000 İU) ve şükrozdandan oluşan 1000 kcal/L' lik sıvı bir diyetle beslendiler. 7. günün sonunda, kontrol ve sigara grubundaki ratlara etanol içermeyen diyet profili uygulanırken, alkol ve sigara + alkol grubundaki ratlara; önce 3 gün süreyle % 2,4'lük etanol içeren sıvı diyet (v/v) verilmeye başlandı. 3. günün sonunda etanol konsantrasyonu % 4,8'e yükselttilerek 14. güne kadar aynı dozda verilmeye devam edildi. 14. günün sonunda ise etanol konsantrasyonu % 7,2'ye yükseltildi ve 6. ay'ın sonuna kadar içerisinde % 7,2 etanol içeren sıvı diyet uygulamasına devam edildi. Deney sonuna kadar diyet'in kalori ve vitamin değeri sürekli olarak sabit tutuldu. Aynı süre zarfında, kontrol grubu ve sigara grubundaki ratlara etanol içermeyen, kalorisi 1000 kcal/L'ye ayarlanmış sıvı diyet verildi. Gruplara uygulanan sıvı diyet günlük olarak hazırlandı ve her hayvanın günlük diyet alım miktarları araştırma süresince kaydedildi.

Sigara ve sigara + alkol gruplarını oluşturan ratlar 6 aylık süre boyunca her gün , Zhu ve ark. [159] tarafından tanımlanmış (model H 5500, Bioclean, Duo Flo, Lab products Inc., Maywood, N.J.) model esas alınarak pasif tarzda sigara dumanına maruz bırakıldılar. Bu amaçla rat başına 0,045m³ hacimde hava düşecek şekilde plastik bir kabinin (0,75x1x0,85 m., 0,64 m³ ebatlı ve hacimli) hazırlanmasından sonra, tarafımızca modifiye edilmiş bir sigara içme makinası ile bu kabin arasında gerekli bağlantılar gerçekleştirildi. Bu düzenek yardımıyla hem filtre kısmından, hem de sigaranın yanan ucundan çıkan sigara dumanının kabin içersine toplanması sağlandı. Sigara grubunu oluşturan ratlar bu kabin içersine yerleştirilerek, her 5 dakikada 1 sigara içirmek ve

arada 5 dakika ara vermek suretiyle, 6 ay süresince, her gün toplam 20 sigaranın dumanına maruz bırakıldılar.

3.2.2. Numune alınması ve hazırlık işlemleri

6 aylık sürenin sonunda intraperitoneal yolla ketalar rampun enjekte edilerek uyutulan ratların böbrek dokuları, laparotomi yapıldıktan ve daha sonra heparin içeren fosfat buffer salina (PBS) ile perfüze edildikten sonra alındı. Böbrek dokularının bir kısmı biyokimyasal analizler yapılincaya kadar -85°C 'ye kaldırıldı. Dokunun geri kalan kısmı ise %4'lük paraformaldehide alınarak fikse edildikten sonra, histopatolojik çalışma için parafinize edildi.

3.2.3. GSH analizi

GSH, Ellman [160] metoduna göre tayin edildi. Metodun temel prensibi, ortamdaki glutatyonun, 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi şeklindedir. Oluşan bu rengin ışık şiddeti, 410 nm'de spektrofotometrede okunarak glutatyon miktarı tayin edilmektedir.

3.2.3.1. Numune hazırlanması

Rat böbrek numunesi, 1-2 dakika 12000 devir/dakikada, %10'luk homojenat oluşturacak şekilde, distile su ilave edilerek buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra, homojenat 3000 rpm'de, +4 derecede, 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatanta TCA çözeltisi ilave edildi, karıştırıldı ve tekrar santrifüj edilerek numune GSH analizine hazır hale getirildi.

3.2.3.2. Kullanılan reaktifler

GSH, Na_2HPO_4 , 5,5'-Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi.

3.2.3.3. GSH seviyesinin tayini

	Numune	Kör
%10'luk homojenat	500 µl	---
Na ₂ HPO ₄ (0,3 M)	4 ml	4 ml
DTNB	500 µl	500 µl
Distile su	-----	500 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve 5 dakika sonra oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede 410 nm'de okundu, sonuçlar glutatyon standart grafiğinden değerlendirildi.

3.2.4. MDA analizi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA, Ohkawa ve ark. [161]' nın metoduna göre çalışıldı. Metodun prensibinde ortamda bulunan MDA'nın, tiyobarbutirik asit ile reaksiyona girerek renkli bir kromojen oluşturması yatmaktadır. Oluşan kromojenin 532 nm'de absorbanısı okunarak MDA konsantrasyonu tespit edilmektedir.

3.2.4.1. Numune hazırlanması

Rat böbrek numunesi, %1,15'lik KCl çözeltisi içinde, %10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Bu homojenat direkt olarak MDA analizinde kullanıldı.

3.2.4.2. Kullanılan reaktifler

SDS, asetik asit, 2-tiyobarbutirik asit (%0,8), 1,1',3,3' tetrametoksipropan çözeltisi.

3.2.4.3. MDA düzeyinin tayini

	Numune	Kör
Homojenat	100 µl	----
%8,1 SDS	200 µl	200 µl
%20'lik asetik asit	1500 µl	1500 µl
%0,8'lik TBA	1500 µl	1500 µl
Distile su	700 µl	800 µl

Hazırlanan çözeltiler deney tüplerine eklendi, vortekslendi ve tüpler kaynar suda (en az 95 derecede) 1 saat bekletildi. Çeşme suyunda soğutulan tüpler ve 3000xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantın absorbansı 532 nm'de okunarak, numunelerin MDA konsantrasyonları 1,1',3,3' tetrametoksiopropan ile hazırlanan standart grafikten değerlendirildi.

3.2.5. Total nitrit analizi

NO üretildiği bölgede hızla önce nitrite daha sonrada nitrata dönüşür. Bu sebeple dokudaki total nitrit analizi doğrudan NO'nun göstergesi olacaktır. Total nitrit tayini Cortas ve ark. [162] ve Navarro ark. [163]'nün metoduna göre yapıldı. Metodun temel prensibi; aktive edilen kadmiyum granüllerinin ortamdaki nitratı, nitrite indirgemesi ve oluşan nitritin greiss reaktifi ile kırmızımsı bir renk oluşturması ve bu renginde 548 nm'de okunması esasına dayanmaktadır.

3.2.5.1. Numune hazırlanması

Rat böbrek numunesi, distile su içinde, %10'luk homojenat oluşturacak şekilde, 15000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat, sırasıyla 82 mmol/L'lik ZnSO₄ ve 55 mM/L'lik NaOH ilavesi ile deproteinize edildi ve elde edilen süpernatant total nitrit analizinde kullanıldı.

3.2.5.2. Kullanılan reaktifler

Kadmiyum granülleri, Glisin-NaOH tamponu (0,25 M, pH:9,7) %1'lik Sulfanilamid, %1'lik N-naftiletildiamin, 5 mmol/L bakır sülfat, sodyum nitrit, sülfürik asit (0,1 mol/L) çözeltileri.

3.2.5.3. Total nitrit konsantrasyonunun analizi

Kadmiyum granüllerine 5 mmol/L'lik bakır sülfattan 1 ml eklendi, 2 dakika vortekslendi ve kadmiyumlar aktive edildi. Kadmiyumlar üzerine 0,5 ml süpernatant, 0,5 ml Glisin-NaOH tamponu eklendi ve 2 saat boyunca çalkalandı. Böylece dokudaki nitratın kadmiyumla nitrite indirgenmesi sağlandı. 2 saat sonra, 0,5 ml redüklenmiş sıvı alındı, üzerine 0,5 ml Greiss reaktifi eklendi (sulfanilamid+N-naftiletildiamin) ve 30 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda spektrofotometre 548 nm'de distile su ile sıfırlandı ve numunelerin absorpsanları okundu. Numunelerin nitrit konsantrasyonları, hazırlanan sodyum nitrit grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.2.6. MPO analizi

MPO enziminin analizi Wei ve ark. [164]'nın metoduna göre yapıldı. Metodun temel prensibinde;

MPO

$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fenol} + 4 \text{ amino antipirin} \longrightarrow \text{Renkli kromojen (quinoneimin)}$$

oluşumu vardır. Araştırmada MPO aktivitesi, 1 M kromojen= $\Delta A_{510} = 1/6580 \text{ mol l}^{-1}$ faktörü üzerinden hesaplandı. Enzim aktivitesi U/gr protein olarak verildi. Dokudaki protein miktarı BSA'nın standart olarak kullanıldığı biüret metoduna göre tayin edildi [165].

3.2.6.1. Numune hazırlanması

Rat böbrek numunesi, %0,5'lik heksadesiltrimetil amonyum bromid (HTAB) içinde, 16000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle, buz üzerinde homojenize edildi. Homojenat 10000xg'de, + 4°C'de, 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant enzim analizinde kullanıldı.

3.2.6.2. Kullanılan reaktifler

4 aminoantipirin/fenol çözeltisi (4-aminoantipirin (25 mM) + %2 fenol), HTAB, 1,7 mM H₂O₂ çözeltileri.

3.2.6.3. MPO aktivite tayini

	Kör	Numune
Distile su	1,8 ml	-----
4-aminoantipirin/fenol çöz.	1,2 ml	1,3 ml
Hidrojen peroksit	-----	1,5 ml
Numune	-----	200 µl

Spektrofotometre 510 nm'de körle sıfırlandı. Daha sonra numune tüpüne örnek konur konmaz karıştırıldı ve 510 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı kaydedildi. Numunelerin MPO aktiviteleri, kromojenin ekstinction sabitesi kullanılarak absorbans değerleri üzerinden hesaplandı.

3.2.7. XO analizi

Ksantin oksidaz aktivitesi, Prajda ve ark. [166]'nın metoduna göre çalışıldı. Metodun temel prensibinde, ortamda bulunan XO'nun ksantini kullanarak ürik asit oluşturması esası vardır. Oluşan ürik asit, %100'lük TCA eklenmesi ile ortamda sabitlenir ve 30 dakika boyunca oluşan ürik asit miktarı belirlenir. Enzim aktivitesi U/gr protein cinsinden ifade edildi. Numunelerdeki protein miktarları BSA'nın standart olarak kullanıldığı biüret metoduyla belirlendi [165].

3.2.7.1. Numune hazırlanması

Böbrek doku numunesi, 12000 devir/dakikada, 1 dakika süreyle distile su ile buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra homojenat 3500 rpm'de, 25 dakika santrifüj edildi ve süpernatant enzim analizinde kullanıldı.

3.2.7.2. Kullanılan reaktifler

Ksantin (4mM/L), TCA(%100), fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5) çözeltileri.

3.2.7.3. XO aktivite tayini

	Kör	Numune
Ksantin (4mM/L)	37,5 µl	37,5 µl
Fosfat Tamponu	2100 µl	2100 µl
Numune	-----	37,5 µl

37 derecede 30 dakika inkübasyon

TCA (%100)	100 µl	100 µl
Numune	37,5 µl	----

Hazırlanan çözeltiler yukarıdaki çalışma prosedüründe verilen sıraya göre deney tüplerine eklendi, vortekslenildi ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. 293 nm'de süpernatantın absorbanansı okundu. Numunelerin ürik asit konsantrasyonları, ürik asitle hazırlanan standart grafikten değerlendirildi.

3.2.8. XDH analizi

XDH metodu standardize edilemediği için çalışılmamıştır.

3.2.9. Böbrek dokusunun histopatolojik yönden incelenmesi

Rat böbrek dokuları, %4'lük paraformaldehitte 1 gün boyunca bekletilerek tespit edildi. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldüler. Parafinize edilen dokular, mikrotom ile 5-10 mikrometre kalınlığında kesilerek lama yapıştırıldılar. Hematoksilen-eozin boyama yöntemiyle boyanan doku preparatları, entellan ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelenerek, histopatolojik açıdan değerlendirildi.

3.2.10. İstatistiksel analizler

Araştırma sonuçları students's t testi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama \pm standart hata olarak verildi. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen GSH Düzeyleri

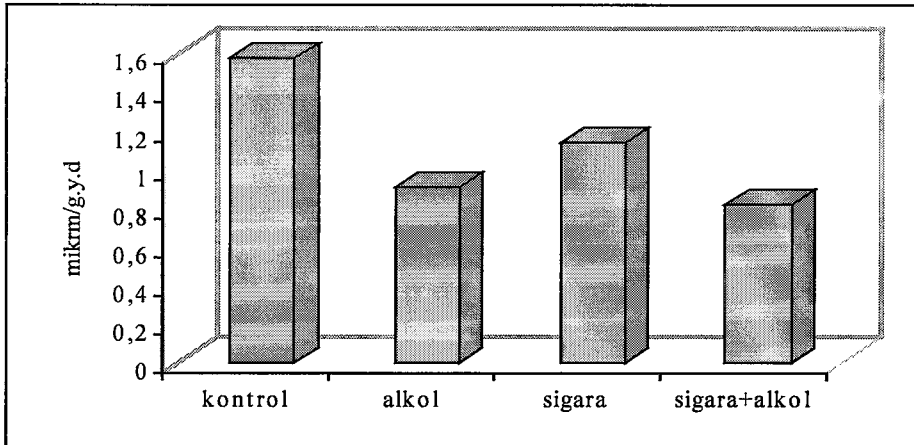
Böbrek GSH seviyesi kontrole göre, alkol, sigara, sigara+alkol gruplarında anlamlı şekilde düşmüştü ($P < 0,05$). Alkol ve sigara+alkol grupları karşılaştırıldığında GSH'daki düşüş anlamlı değildi (**Çizelge 4.1. ve 4.2.**).

Çizelge 4.1. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen GSH Düzeyleri

Gruplar	GSH ($\mu\text{mol/gr}$ yaş doku)
I. Grup /Alkol (n=7)	0,910 \pm 0,06
II. Grup /Sigara (n=7)	1,141 \pm 0,06
III. Grup /Sigara+Alkol (n=7)	0,818 \pm 0,04
IV. Grup /Kontrol (n=7)	1,579 \pm 0,06

Çizelge 4.2. Grupların GSH Düzeylerinin İstatistiki Açından Değerlendirilmesi

Gruplar	P Değeri
I. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
II. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
III. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / II. Grup	$P < 0,05$
II Grup / III. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / III. Grup	$P > 0,05$



Şekil 4.1. Kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grubu böbrek GSH düzeyleri.

4.2. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri

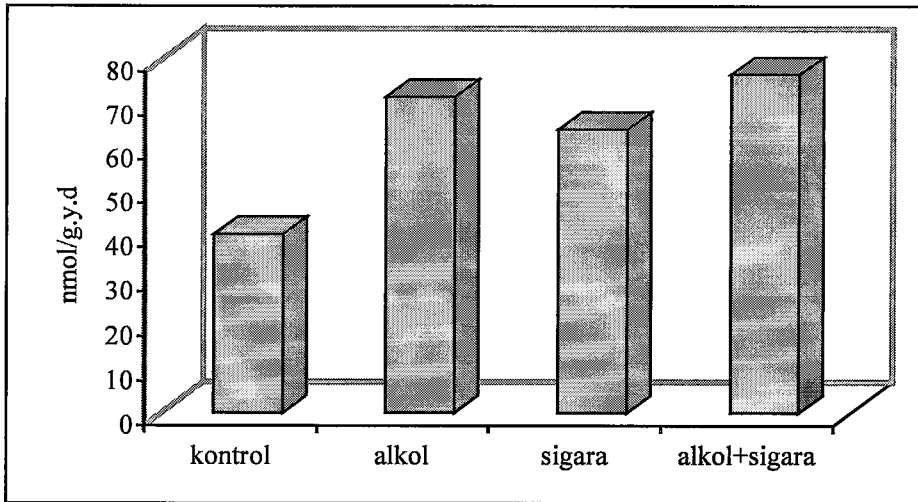
Böbrek MDA düzeyi kontrole göre, alkol, sigara, sigara+alkol gruplarında anlamlı şekilde artmıştı ($P < 0,05$). Alkol ve sigara+alkol, alkol ve sigara grupları arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı değildi (Çizelge 4.3. ve 4.4.).

Çizelge 4.3. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MDA Düzeyleri

Gruplar	MDA (nmol/gr yaş doku)
I.Grup /Alkol (n=7)	71,4±2,8
II.Grup /Sigara (n=7)	64±3,6
III.Grup / Sigara+Alkol (n=7)	76,5±4,3
IV.Grup /Kontrol (n=7)	40,14±3,4

Çizelge 4.4. Grupların MDA Düzeylerinin İstatistiki Açından Değerlendirilmesi

Gruplar	P Değeri
I. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
II. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
III. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / II. Grup	$P > 0,05$
II Grup / III. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / III. Grup	$P > 0,05$



Şekil 4.2. Kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grubu böbrek MDA düzeyleri.

4.3. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen Total Nitrit Düzeyleri

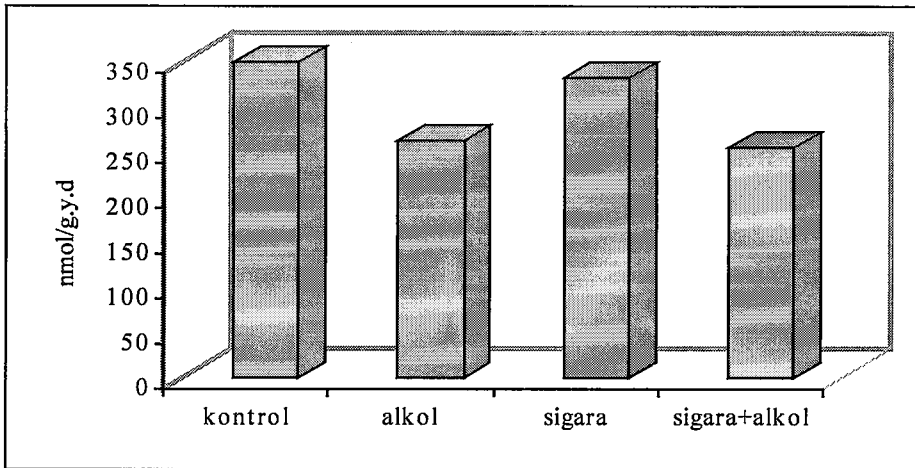
Böbrek total nitrit düzeyi kontrole göre, alkol, sigara+alkol gruplarında anlamlı şekilde düşüktü ($P < 0,05$). Kontrol ve sigara, alkol ve sigara+alkol, gruplarındaki fark istatistiki açıdan anlamlı değildi (Çizelge 4.5. ve 4.6.).

Çizelge 4.5. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen Total Nitrit Düzeyleri

Gruplar	Total nitrit (nmol/gr yaş doku)
I.Grup /Alkol (n=7)	261,09±4,8
II.Grup /Sigara (n=7)	329,76±5,6
III.Grup / Sigara+Alkol (n=7)	254,15±3,8
IV.Grup /Kontrol (n=7)	347,73±8,1

Çizelge 4.6. Grupların Total Nitrit Düzeylerinin İstatistiki Açıdan Değerlendirilmesi

Gruplar	P Değeri
I. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
II. Grup / IV. Grup	$P > 0,05$
III. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / II. Grup	$P < 0,05$
II Grup / III. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / III. Grup	$P > 0,05$



Şekil 4.3. Kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grubu böbrek total nitrit düzeyleri.

4.4. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MPO Aktiviteleri

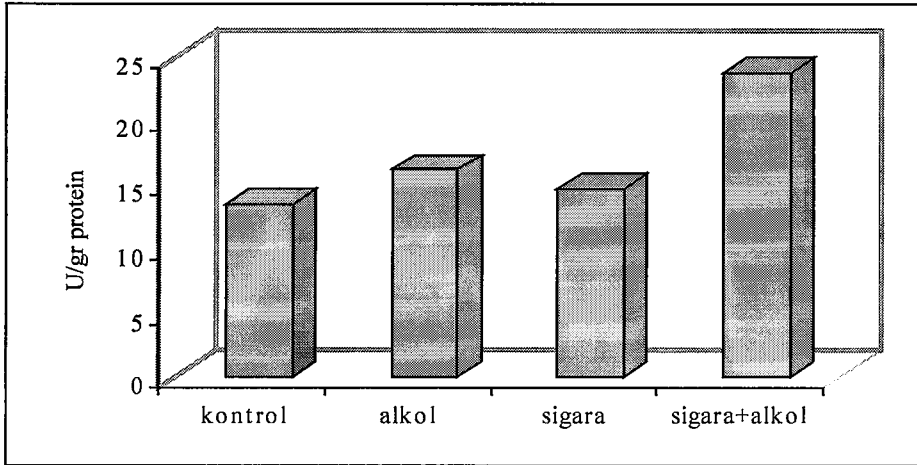
Böbrek MPO aktivitesi kontrole göre, alkol ve sigara+alkol gruplarında anlamlı şekilde yüksekti ($P < 0,05$). Alkol ve sigara, kontrol ve sigara grupları arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulunamadı (**Çizelge 4.7. ve 4.8.**).

Çizelge 4.7. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen MPO Aktivitesi

Gruplar	MPO (U/gr protein)
I.Grup /Alkol (n=7)	16,16±1,1
II.Grup /Sigara (n=7)	14,71±1,1
III.Grup / Sigara+Alkol (n=7)	23,75±0,9
IV.Grup /Kontrol (n=7)	13,5±0,6

Çizelge 4.8. Grupların MPO Aktivitelerinin İstatistiki Açından Değerlendirilmesi

Gruplar	P Değeri
I. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
II. Grup / IV. Grup	$P > 0,05$
III. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / II. Grup	$P > 0,05$
II Grup / III. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / III. Grup	$P < 0,05$



Şekil 4.4. Kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grubu böbrek MPO aktiviteleri.

4.5. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen XO Aktiviteleri

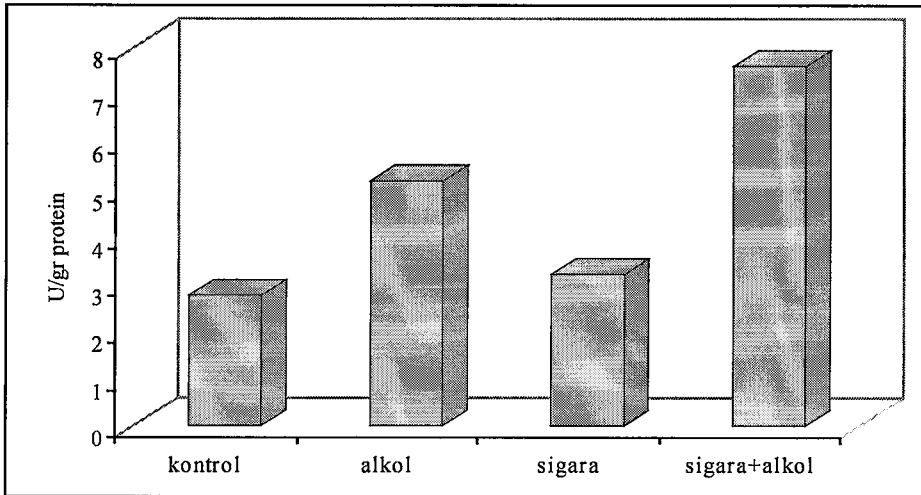
Böbrek XO aktivitesi kontrole göre, alkol, sigara+alkol gruplarında anlamlı şekilde yüksekti ($P < 0,05$). Kontrol ve sigara grupları arasındaki artış istatistiki açıdan anlamlı değildi (**Çizelge 4.9. ve 4.10.**).

Çizelge 4.9. Grupların Böbrek Dokusunda Ölçülen XO Aktiviteleri

Gruplar	XO (U/gr protein)
I.Grup /Alkol (n=7)	5,19±0,3
II.Grup /Sigara (n=7)	3,22±0,1
III.Grup /Sigara+Alkol (n=7)	7,59±0,9
IV.Grup /Kontrol (n=7)	2,77±0,3

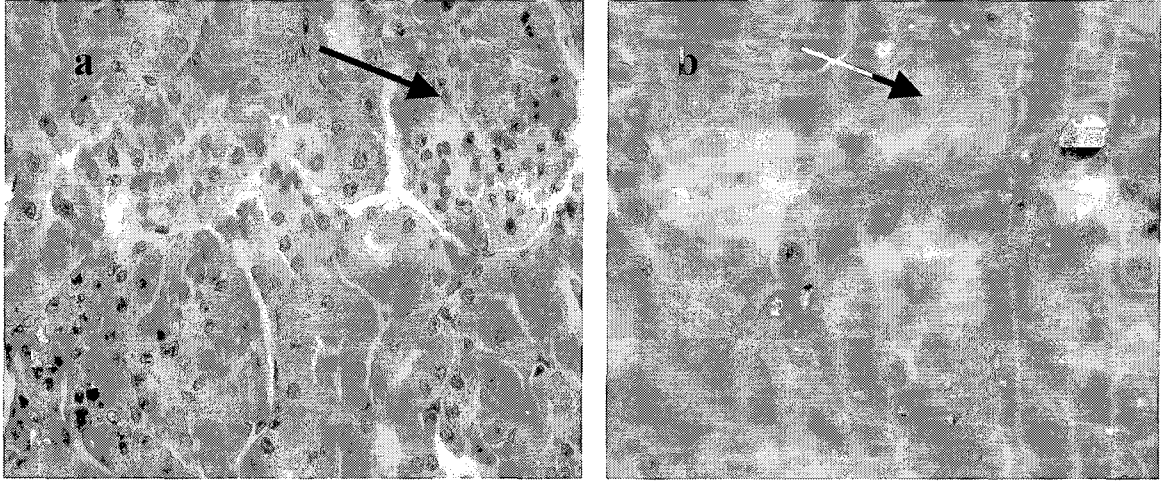
Çizelge 4.10. Grupların XO Aktivitelerinin İstatistiki Açından Değerlendirilmesi

Gruplar	P Değeri
I. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
II. Grup / IV. Grup	$P > 0,05$
III. Grup / IV. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / II. Grup	$P < 0,05$
II Grup / III. Grup	$P < 0,05$
I. Grup / III. Grup	$P < 0,05$

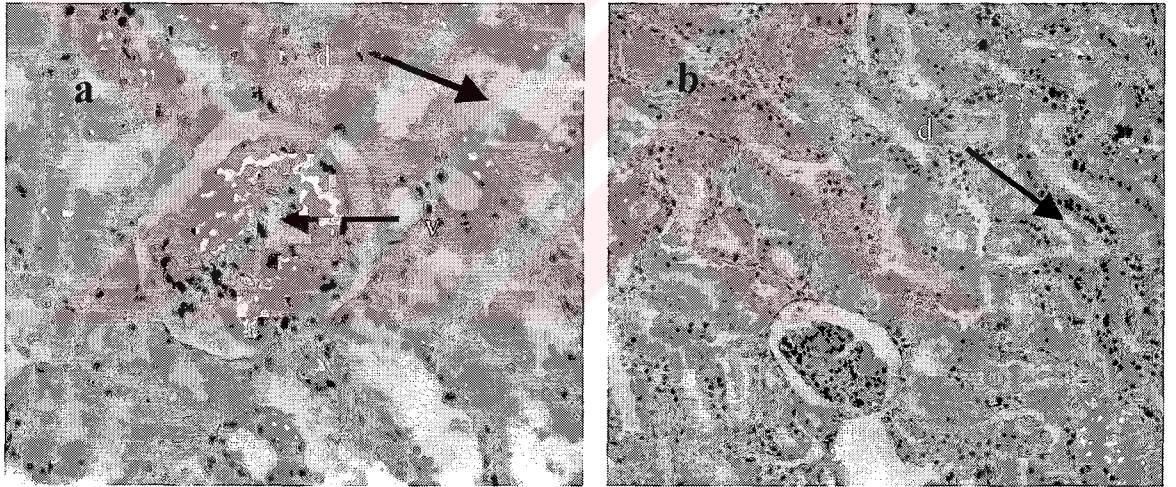


Şekil 4.5. Kontrol, alkol, sigara ve sigara+alkol grubu böbrek XO aktiviteleri.

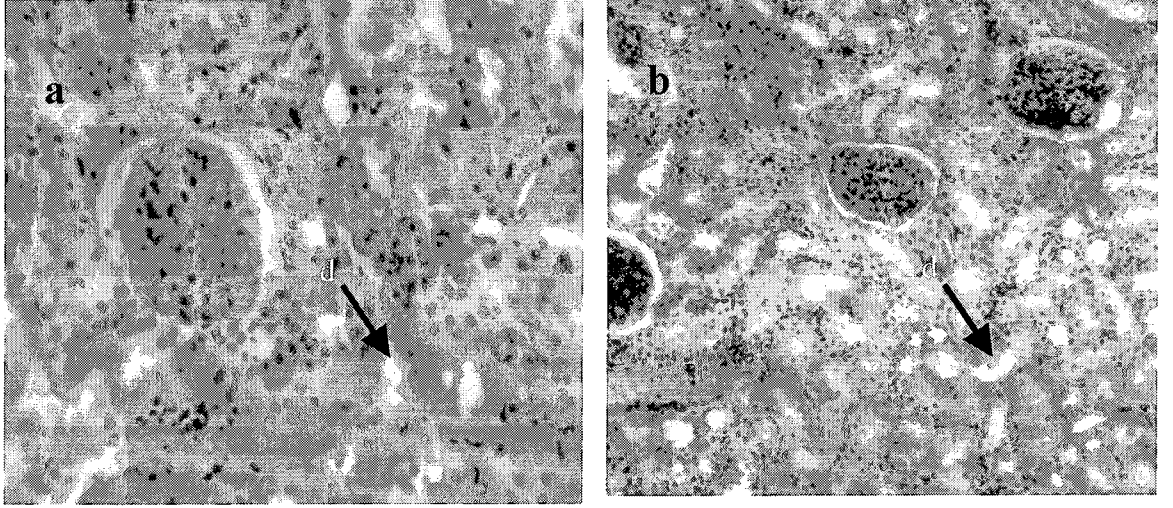
4.6. Böbrek Dokularının Histopatolojik Sonuçları



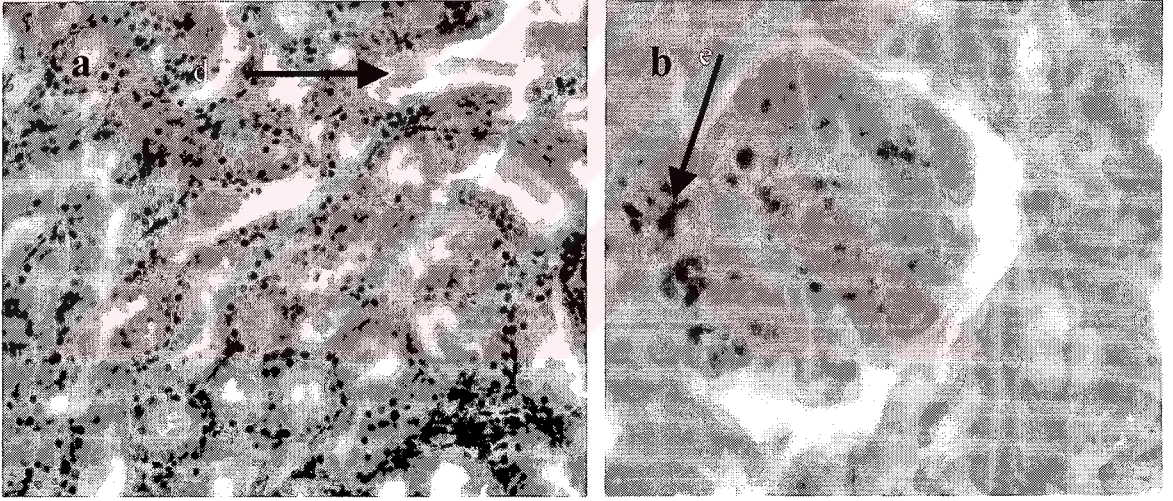
Şekil 4.6. Kontrol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü; normal glomeruluslar (a410X) ve tübüller (b800X).



Şekil 4.7. Alkol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü; tübüllerde dejenerasyon (d) (a365X) ve glomeruluslarda vakuolleşme (v) (++) (b170X).



Şekil 4.8. Sigara grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü; tübüllerde dejenerasyon (+) (d) (a290X, b160X).



Şekil 4.9. Sigara+alkol grubu böbrek dokusunun histopatolojik görünümü; tübüllerde dejenerasyon (d) (a245X) ve glomerulus bazal membranında erime (e) (+++) (b675X).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde sigara ve alkol kullanım yaşının oldukça düşmüş olması, gençler tarafından sigara ve alkolün çok kolay bir biçimde elde edilebilmesi ve toplumda sigara ve alkolün zararlı etkilerinin yeterince anlatılamaması bu araştırmamızın önemini bir kat daha artırmaktadır. Tezin giriş kısmında da ifade ettiğimiz gibi sigara ve alkol kaynaklı ölümler, önlenemez ölümlerdir. Vücutta bu iki etkenin zararları, tetikleyebilecekleri mekanizmalardan ve aynı zamanda bizatihi kendilerinden kaynaklanmaktadır. Gerek alkolün kendisi ve gerekse de metabolitleri, aynı zamanda sigaranın nikotin'i ve metaboliti kotinin'i, yüksek derecede lipofilik özellik göstermesi nedeni ile çok kısa sürede vücudun bütün doku ve hücrelerine kolaylıkla ulaşabilir. Bu nedenle, alkol ve sigaranın zararlı etkisi tek bir kullanımda dahi meydana gelebilir.

Özellikle sigara ve alkolün organizmaya olan zararları, aşırı miktarda ROT oluşturarak meydana gelmektedir. ROT, membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitleri içine alan bir çok molekülde oksidatif hasara neden olmaktadır. Bu türlerin zararlı etkileri hücresel antioksidan savunma sistemi ile kontrol edilmektedir. Toksik maddelerin bir çoğunun zararlı etkisi, memeli organizmalarda biyotransformasyonları boyunca oluşan reaktif ürünlerinden kaynaklanmaktadır. Oksijen kaynaklı radikallerin hücreler üzerinde sitotoksik etkiler meydana getirdiği bilinmektedir. Oksidatif stres boyunca oluşan OH[•] ve ¹O₂ radikali gibi ROT'lar, membran lipidleri gibi hücre bileşenlerinde geniş bir hasarlanmaya neden olabilirler ve peroksidatif zincir reaksiyonlarını başlatabilirler.

İn vivo olarak ROT'un aşırı üretimi, lipid peroksidasyonuna neden olur. Ortadan kaldırılmayan ROT'un etkisi, lipidlerin oksidasyonu ile sonuçlanır. ROT, kronik alkol ve sigara kaynaklı hasarda başlıca sorumlu olarak görülmektedir [60].

Etanolün ilk metaboliti olan asetaldehit, proteinlere kovalent bağlanarak proteinlerin biyolojik aktive ve fonksiyonlarını bozarak hasara neden olabilir. Alkolü metabolize eden, alkol dehidrogenaz, katalaz ve mikrozomal oksitleyici sistemin indüklenmesinin bir sonucu olarak O₂⁻ radikal oluşumu ve hidroksietil serbest radikal oluşumunda da bir artma görülür [41]. Sigara kullanımı ise beraberinde serbest radikallerin oldukça fazla miktarda organizmaya girişine neden olur.

Organizmada toksik metabolitleri inaktive eden ve yakalayabilen koruyucu sistemler vardır ve böylece dokularda bu metabolitlerin birikimi ve toksisiteyi önlenmiş olmaktadır. GSH, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı hücresel

savunma sisteminde önemli bir rol oynar. GSH düzeyinin azalması, toksik bileşiklere karşı hücre savunmasını bozmakla kalmaz, hem de oksidatif strese karşı dokuları hasara daha duyarlı hale getirebilir. Oksidatif stres, oksidanların oluşumu ve antioksidan sistemlerin aktivitesi arasındaki dengenin bozulmasıdır.

Sigara ve alkolün ROT oluşturma kapasiteleri göz önüne alındığında, bütün dikkatler özellikle antioksidan sistem üzerine yoğunlaşmaktadır. Savunma sistemindeki bozulmanın ortaya konulması, dış kaynaklı organizma hasarında ne yapabileceğimiz açısından bizlere yol gösterici olacaktır. Bu düşünceden hareketle bu konu üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların özet bilgisi aşağıda sıralanmış ve bulgularımızla karşılaştırılmıştır.

Kronik rat modeli oluşturulan bir çalışmada, 6 ay boyunca alkol uygulamasının karaciğer ve böbrek GSH seviyesini oldukça düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu çalışmada, uzun süre alkol kullanımının antioksidan sistemde bozulmalara yol açarak, organizmada peroksidasyonu artırabileceği ve bunun sonucunda da oksidatif hasar oluşabileceği sonucuna varılmıştır [52].

Vina ve ark. [97], karaciğerden izole edilerek yapılan hepatosit kültürünü 60 dakika boyunca etanol ile muamele ettiklerinde, etanol uygulanan gruptaki hepatositlerin GSH seviyelerinin önemli derecede düştüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca hepatositlere etanol yerine asetaldehit uyguladıklarında, etanolün etkisinden daha fazla bir GSH düşmesi olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar, etanolün esas etkisinin, kendinden daha çok metaboliti olan asetaldehitten kaynaklanabileceğine karar vermişlerdir.

Speisky ve ark. [105], dişi Sprague-Dawley ratlara 4 gr/kg vucut ağırlığı oranında %20'lik alkol uygulayarak yaptıkları akut etanol toksikasyon çalışmasında, alkol uygulamasının 5. saatinde dahi hepatik GSH içeriğinin düştüğünü tespit etmişlerdir.

6 gr/kg konsantrasyonunda tek doz etanolün erkek farelere intraperitoneal olarak verildiği bir başka çalışmada, tek doz etanolün bile karaciğer GSH düzeyini önemli derecede azalttığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada, uygulanan etanolün konsantrasyonuna bağlı olarak, karaciğer GSH'ının giderek düştüğü tespit edilmiştir [167].

Flora ve ark. [68], 6 hafta boyunca alkol uyguladıkları ratların, kan ve hepatik GSH seviyelerini azalmış olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar GSH azalmasının,

alkol metabolizması sonucu oluşan asetaldehitin GSH'la etkileşerek GSH'ı oksitlemesinden kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Acharya ve ark. [53], erkek ratlara 22 hafta boyunca alkol vererek, alkolün karaciğer total glutatyon seviyesine ve karaciğer histopatolojisine etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, alkol verilen grupta, karaciğer total glutatyon seviyesinin, kontrole göre anlamlı şekilde azaldığını, bu durumun etanolün, GSH sentezini inhibe etmesinden veya alkol detoksifikasyonu için GSH'ın karaciğerde hızla kullanılıyor olmasından kaynaklanabileceğini, bunun sonucunda da karaciğer dokusunda histopatolojik lezyonların meydana gelebileceğini öne sürmüşlerdir.

Akut egzersiz uygulanan ratlara, egzersiz sonrası %20'lik alkol verilmesiyle yapılan bir diğer deneysel çalışmada, %20'lik alkolün beyinde lipid peroksidasyonunu artırdığı tespit edilmiştir [168].

Novelli ve ark. [60], erkek ratlara 60, 120, 180, 240, 300 gün boyunca alkol uygulayarak alkolün üreme sistemindeki etkilerini inceledikleri araştırmada, alkolün rat seminal damarlarında, uygulanan alkol süresine bağlı olarak MDA seviyesini artırdığını gözlemişlerdir.

Ignazio ve ark. [104], kronik alkoliklerin plazma ve eritrosit MDA seviyelerinin arttığını, GSH konsantrasyonlarının ise oldukça düştüğünü bildirmişlerdir. Bu durumun etanol ile oluşan asetaldehitin dolaşıma katılarak, lipidlere ve hücre membranlarında direkt oksidatif etki yapmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Scott ve ark. [169], erkek ratlara 2, 4, 6 gr/kg oranlarında etanol uygulamışlar ve uygulamaların 1. saatinin sonunda ratlarda böbrek GSH seviyesinin, uygulanan doza bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığını, MDA seviyesinin ise 6 gr/kg dozda anormal derecede artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu grup 2, 4 gr/kg düzeyde etanol uygulanan ratlarda MDA düzeyinin değişmemiş olmasını, GSH seviyelerinin önemli derecede düşmemiş olmasına bağlamışlardır.

Yapılan bir diğer çalışmada ise etanolün hepatik GSH içeriğini azalttığı ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyonunu anormal derecede hızlandırdığı ortaya konulmuştur [170].

Bir başka çalışmada, kronik alkoliklerde kan GSH seviyesinin düştüğünü ve MDA düzeylerinin arttığını bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu durumun kronik alkol alımıyla oluşan oksidatif hasarın göstergesi olabileceği sonucuna varmışlardır [171].

Araştırmacılar deneysel, pasif sigara modelleri üzerinde, sigaranın etkilerini de incelemişlerdir. Yapılan böyle bir araştırmada, erkek ratlara 30 gün süreyle günde 3 kez

sigara içirilmiş ve böbrek GSH düzeyleri incelenmiştir. Araştırma sonunda, böbrek GSH düzeyi kontrol grubunda 4,75 nmol/mg protein ve sigara grubunda ise 4,26 nmol/mg protein olarak tespit edilmiştir. Ancak gruplar arası GSH farkı istatistiki açıdan anlamlı olarak bulunmamıştır [85].

Kaleli ve arkadaşlarının [172,173], sigara içen kişilerde yaptıkları iki ayrı çalışmada eritrosit ve serum lipid peroksit düzeylerinin artmış olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun sigara kaynaklı oksidatif hasar nedeniyle meydana gelmiş olabileceğini ifade etmişlerdir.

Kalra ve ark. [86], yaptıkları çalışmada, sigara içenlerin kan ve serum MDA içeriklerinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumun sigara içenlerin polimorf nükleer lökositlerinin aktive olarak aşırı derecede serbest radikal üretmeleri nedeniyle ortaya çıkmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Morrow ve ark. [174], sigara içenlerde yaptıkları çalışmada plazma lipid peroksidasyonu ürünlerinin (F₂-isoprostan) önemli derecede artmış olduğunu bulmuşlardır ve isoprostanların lipid peroksidasyonunun diğer bir indeksi olabileceğini bildirmişlerdir.

Sigara kullanımıyla beslenme durumu ve antioksidan statüsünün incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, sigara içenlerin plazmalarında içmeyenlere göre yüksek lipid peroksidasyonu ürünleri tespit edilmiştir. Araştırmacılar sigara içenlerin plazmalarındaki lipid peroksidasyon ürünlerindeki artışın sigara içimiyle, azalan total antioksidan kapasiteden ve artan oksidatif stresten kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, sigarayla birlikte alkol kullananlarda bu peroksidasyonun daha da arttığı rapor edilmiştir [175].

Anand ve ark. [94], 3 ay süreyle pasif sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda yaptıkları çalışmada, böbrek dokusunun GSH ve MDA düzeylerini ölçerek, oksidan/antioksidan dengesi incelemiştir. Sonuçta, kontrol grubu ratlarda GSH seviyesi 3,71 µmol/gr yaş doku olarak bulunurken, sigara grubunda 2,74 µmol/gr yaş doku olarak tespit etmişlerdir ve GSH düşmesinin istatistiki açıdan anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. MDA seviyesini kontrolde 0,09 nmol/mg protein, sigara içen grupta 0,21 nmol/mg protein olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar, sigara dumanına maruz kalmanın böbrek dokusunda oksidan/antioksidan dengesi oksidanların lehine bozarak doku hasarlanması meydana getirebileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Husain ve ark. [4], 6,5 hafta boyunca ratlara %20'lik etanol, deri altı nikotin, nikotin+etanol uygulayarak yaptıkları çalışmada karaciğer, böbrek, akciğer ve testis

dokularında GSH düzeylerini incelemişlerdir. Böbrek GSH'ında grupların hiçbirinde anlamlı değişme bulmazken, karaciğer, testis ve akciğer GSH seviyesinin bütün gruplarda azaldığı, karaciğer MDA düzeyinin bütün gruplarda arttığı, böbrek MDA düzeyinin etanol ve etanol+sigara gruplarında anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar GSH seviyesinin diğer dokularda düşerken, böbrek dokusunda değişmeden kalmasının, böbrekte GSH turnoverinin hızlı olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Bir başka araştırmada, kronik böbrek yetmezliği olan kişilerin serum MDA düzeylerinin 2,25 $\mu\text{mol/L}$, sağlıklı insanların MDA düzeylerinin ise 1,01 $\mu\text{mol/L}$ olduğu bildirilmiş ve bu sonuç kronik böbrek hasarlanmalarında lipid peroksidasyonunun arttığı şeklinde yorumlanmıştır [109].

Bizim araştırmamızda; böbrek GSH düzeyi kontrolde 1,579 \pm 0,06 $\mu\text{mol/gr.yaş}$ doku (g.y.d), alkol grubunda 0,910 \pm 0,06 $\mu\text{mol/g.y.d}$, sigara grubunda 1,141 \pm 0,06 $\mu\text{mol/g.y.d}$ ve sigara+alkol grubunda ise 0,818 \pm 0,04 $\mu\text{mol/g.y.d}$ olarak tespit edildi. Kontrole göre bütün gruplarda böbrek GSH seviyesi anlamlı şekilde düşmüştü ($P<0,05$). Böbrek MDA düzeyi ise kontrolde 40,14 \pm 3,4 nmol/g.y.d, alkol grubunda 71,4 \pm 2,8 nmol/g.y.d, sigara grubunda 64 \pm 3,6 nmol/g.y.d ve sigara+alkol grubunda ise 76,5 \pm 4,3 nmol/g.y.d olarak bulundu. Kontrole göre bütün gruplarda böbrek MDA seviyesi anlamlı şekilde artmıştı ($P<0,05$). Bizim sonuçlarımız aynı konuda yapılmış araştırma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

ROT, yalnızca patolojik bir neden olarak karşımıza çıkmaz, fizyolojik şartlar altında ROT'un düşük konsantrasyonları hücrenin ve organ fonksiyonunun normal işleyişinde önemli bir rol oynar. ROT, vasküler kasılmanın kontrolünde işe katılmakta ve O_2^- radikali ve NO'nun etkileşimi kardiovasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli mekanizmalardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. O_2^- radikali, NO'yu inhibe etmektedir. Bu nedenle asetilkolin veya diğer endotel kaynaklı vasodilatörler indirgenmektedir. O_2^- radikalinin üretimi veya ortadan kalkması vasküler duvarda NO seviyesinin ve aktivitesini tamamıyla etkilemektedir. NO ve O_2^- arasındaki bu etkileşim endotelial fonksiyonun düzenlenmesinde ve böylece vasküler kasılmanın kontrol edilmesinde önemlidir. Oksidatif stresin hipertansiyonun patogenezinde ve ona bağlı vasküler hastalıkların gelişiminde kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir [32].

Çeşitli biyolojik şartlar altında NO ve ROT oluşabilir. Çeşitli biyolojik moleküller ile NO ve ROT'un biyolojik ve kimyasal etkileşimi farklı immünolojik ve

patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olur [123]. NO, böbrek hemodinamisini ve tübüler yapıları etkileyerek böbrek fonksiyonlarını düzenleyen güçlü bir modulatör moleküldür.

Köpekler ve ratlarda, böbrek NOS aktivitesinin inhibe edilmesinin, sodyum ve su tutulmasına yol açtığı bildirilmiştir. NOS inhibisyonu, böbrek boşaltım yeteneğinde azalmaya, pre ve post glomerular vasküler dirençte artmaya ve sonrasında da böbrek kan akışı ve glomerular süzme oranında azalmaya neden olabilmektedir [176].

Endotel kaynaklı gevşemenin, esansiyel hipertansiyonlu hastalarda azaldığı tespit edilmiştir. Bu hastalarda NO üretilmemesi nedeniyle vazokonstriksiyon ve sonuçta hipertansiyon oluşabileceği ve böylece geri dönüşümsüz glomerular hasarın ortaya çıkabileceği bildirilmiştir [122].

Alkol toksisitesi sonrası, NO'nun inhibisyonu, merkezi sinir sisteminin baskılanmasına ve alkolün anestezik etkisinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu durum, alkolün yüksek dozlarında ortaya çıkar ve alkol intoksikasyonu olarak adlandırılır [177].

Etanol, serebellar NOS'u inaktive etmektedir. Bu inaktivasyon, NOS'un substratı olan L-arjinin ile ve kofaktör olan tetrahidrobiopterin verilmesiyle önlenmektedir. Araştırmacılar etanol indüklü NOS inhibisyonunun, etanolün; enzimin konformasyonunu değiştirmesinden ya da tetrahidrobiopterin ve/veya L-arjininin bağlanma bölgeleriyle etkileşiminden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Diğer önemli bir inhibisyon mekanizması ise etanolün protein kinazları aktive ederek NOS'un fosforilasyonunu sağladığı ve fosforilasyon sonrası NOS aktivitesinin ortadan kalktığı şeklinde açıklanmıştır [178].

Etanolün, hepatik Kuppfer ve endotel hücrelerinde NO sentezini inhibe ettiği bildirilmiştir [179].

Su ve ark. [75], endotel hücre kültürüne sigaradan elde edilen özütü 24 saat boyunca uygulamışlar ve eNOS enzim aktivitesine bakmışlardır. Sigara özütünün dozuna ve zamana bağlı olarak, eNOS aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, protein kinaz C-kaynaklı fosforilasyon ve eNOS aktivite kaybı arasındaki ilişkiden olabileceğini, ayrıca sigaranın içerdiği hidrojen peroksit, hidrojen siyanid, nitrojen oksitler ve akrolein gibi oksidanların eNOS ifadesini ve/veya aktivitesini azaltabileceğini, sigarada bulunan nitritin de eNOS inhibisyonuna neden olabileceği şeklinde açıklamışlardır.

Böbrekte NO kaynaklı vazodilatasyon oluşabilmesi, asetilkolin mevcudiyetine bağlıdır. Kronik sigara kullanıcılarında asetilkolinin azaldığı ve buna bağlı olarakta böbrekte vazodilatasyon mekanizmasında bozulma olduğu tespit edilmiştir [180].

Neunteufl ve ark. [77], kronik sigara kullanımı sonrası endotel bağımlı gevşemenin bozulduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, tetrahidrobiopterin uygulamasıyla bu durumun düzeldiğini ortaya koymuşlar ve endotel gevşemesinin bozulmasının, sigara içimiyle meydana gelen serbest radikal patlamasından ve aynı zamanda tetrahidrobiopterin eksikliğinden dolayı NOS'un inhibe olmasından kaynaklandığı sonucuna varmışlardır.

Masahiko ve ark. [181], sigara içenlerde vücut NO üretiminin bir indeksi olan plazma nitrat ve nitrit konsantrasyonlarının tek bir sigara içiminden sonra bile düştüğünü tespit etmişlerdir. Bu durumu, oksidan aracılı bir reaksiyonla endotel hücrelerinden NO'nun salınımının bozulmasına bağlamışlardır. Aynı zamanda plazma antioksidan enzimlerinin de azaldığını rapor etmişlerdir.

Wever ve ark. [89], sigara kullanan sağlıklı ve kronik böbrek rahatsızlığı olan hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada, kronik böbrek hastalığı olan grubun plazma arjinin seviyesi 71 $\mu\text{mol/L}$, kontrol ve sigara kullanan gruplarda ise sırasıyla 95 $\mu\text{mol/L}$, 92 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Kronik böbrek hastalarında plazmada NO düzeyi 0,13 $\mu\text{mol/L}$, kontrolde 0,23 $\mu\text{mol/L}$ olarak ve sigara içen grupta ise 0,22 $\mu\text{mol/L}$ olarak tespit edilmiştir. Kronik böbrek hastalarında NO üretimi kontrole göre anlamlı şekilde azalmışken, sigara içen grupta değişmemiştir.

Higman ve ark. [182], uzun süreli sigara kullanımının, damar endotel hücresine L-arjininin girişini azaltarak NO yapımını engellediği, bunun sonucu olarak damar tonusunu, düz kas hücre çoğalmasını ve trombosit birikimini arttırdığını açıkça göstermişlerdir. Araştırmacılar sigaranın bu etkilerinin, damar tıkanıklığının fizyopatolojisinde çok önemli bir mekanizma olduğunu ifade etmişlerdir.

Sigara içiminin koroner arterlere etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, araştırmacılar L-NAME'i ve bir damar dilatatörü olan asetil kolini tek başına veya beraberce vererek, L-NAME ile NOS'nun inhibe olmasının, asetil kolin etkisiyle damar endotelinde meydana gelecek damar genişlemesini bozduğunu ve buna bağlı olarak hem proksimal hem de distal koroner arterlerde damar çapında daralma meydana geldiğini ortaya koymuşlar ve sigara içimiyle meydana gelebilecek NO metabolizması

bozukluklarıyla koroner arter hastalığı oluşum riskinin artabileceğine dikkat çekmişlerdir [183].

Bizim araştırmamızda; böbrek total nitrit düzeyleri kontrolde $347,73 \pm 8,1$ nmol/g.y.d, alkol grubunda $261,09 \pm 4,8$ nmol/g.y.d, sigara grubunda $329,76 \pm 5,6$ nmol/g.y.d ve sigara+alkol grubunda ise $254,15 \pm 3,8$ nmol/g.y.d tespit edildi. Kontrole göre, sigara grubu hariç diğer gruplarda böbrek total nitrit seviyesi anlamlı şekilde düşmüştü ($P < 0,05$). Sigara grubunda total nitrit düzeyinin değişmemesi, oluşturduğumuz modelde, sigaranın bu süre ve dozda ratlara uygulanmasının, böbrek total nitrit seviyesine önemli bir etki yapmamasından kaynaklanabilir. Diğer gruplardaki sonuçlarımız yukarıda tartıştığımız araştırmalar ile tamamen paralel olup, literatür bilgileri araştırmamızı destekler niteliktedir.

Miyeloperoksidaz, nötrofillerin azurofil granüllerinde yerleşmiş bir hemoproteindir ve dokulara nötrofil birikiminin bir indeksi olarak kullanılmaktadır [184]. Nötrofiller, hücre hasarının olduğu bölgeye kan yoluyla gelirler, burada O_2^- oluştururlar ve doku çevresine bırakırlar. Bu O_2^- ; H_2O_2 'ye ve diğer ROT'a dönüşebilir [43]. Nötrofiller yangının gelişiminde ve hasarda işe karışmaktadır. Yangı boyunca vasküler endotele nötrofil yapışması ve toplanması oluşmakta ve bu patolojik değişiklikler mukozal kan akımını tıkayabilmektedir. Aktive olan nötrofiller; O_2^- , H_2O_2 , MPO ve proteazlar gibi doku hasarlatıcı maddeleri hücre dışına boşaltırlar. Nötrofil birikimi, lökotrienler gibi bazı kemoatraktanları tetikleyebilmektedir. Sigara içiminin lökotrien B_4 sentezini, nötrofil birikimi ve aktivasyonunu indüklediği bildirilmiştir. Sigara içenlerin lavaj sıvıları daha fazla miktarda nötrofil içermektedir. Nötrofil birikimi gastrik hasarın nedenidir ve etanol indüklü hemorajik hasarın artışına neden olur [73].

Kronik böbrek bozukluklarında oksidanların rol oynadığı ve bu oksidanların başlıca kaynağı olarak ise özellikle üremik toksinler ile aktive olan dolaşımdaki polimorf nükleer nötrofiller ve monositler olduğu gösterilmiştir [185]. Ayrıca karaciğer iskemi/reperfüzyon kaynaklı doku hasarında nötrofillerin aktif rolü olduğu ortaya konmuştur. LDL'nin, MPO kaynaklı HOCl ile okside edilerek, LDL modifikasyonuna ve aterogeneze neden olduğu bildirilmiştir [140].

Ateroseklerotik lezyonlarda artan MPO aktivitesinin, miyeloperoksidaz- H_2O_2 - Cl^- sistemi ile proteinlerin oksidasyonu sonucu, aterosklerotik lezyonların oluşumuna katkıda bulunduğu öne sürülmüştür [186]. Ayrıca çeşitli nedenlerle oluşan vasküler lezyonlarda da MPO aktivitesinde bir artma olduğu bildirilmiştir [125].

Alkolün beyin dokusunda meydana getirdiği hasarın mekanizmasını anlamak için yapılan bir çalışmada, 6 ay boyunca kronik olarak alkole maruz bırakılan ratların parankimal beyin doku MPO aktivitesinin oldukça artmış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yine bu araştırmada, ratların beyin dokusuna 60 dakika süreyle etanol infüsyonu uygulanmış ve beyin dokusunda, etanolün dozuna bağlı olarak MPO aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, alkol kaynaklı oluşan serebral vasküler ve beyin hasarının lökositlerin beyin bölgesinde birikimiyle olabileceğini, dokuda artan MPO aktivitesinin de bunun göstergesi olduğunu rapor etmişlerdir [187].

Hillegas ve ark. [188], ratlara 15 mikrogram/gr vücut ağırlığı oranında koyun nefrotoksik IgG serumu uygulamışlar ve deneysel nefrit modeli oluşturmuşlardır. Bu modelde, böbrek doku MPO aktivitesini incelediklerinde, kontrolde enzim aktivitesini 0,020 İU/böbrek dokusu olarak bulurlarken, yangının oluşturulduğu deney grubunda ise 0,133 İU/böbrek dokusu olarak tespit etmişlerdir. Bu durumun, yangı gelişimi sırasında polimorfnükleer lökositlerin bu bölgeye toplanmasından kaynaklanmış olabileceğini ifade etmişlerdir.

Gentamisin gram negatif bakterilerin enfeksiyonunda kullanılan bir antibiyotiktir ve klinikte nefrotoksisitesi çok iyi bilinmektedir. Gentamisin nefrotoksisitesine karşı koruyucu bir rolü olduğu iddia edilen M40403 isimli bir maddenin bu koruyuculuk rolünün test edildiği bir araştırmada, 5 gün boyunca gentamisinin 100 mg/kg oranında uygulandığı ratlarda 5. gün sonunda, kontrol grubuna göre böbrek MDA ve MPO seviyelerinin oldukça artmış olduğunu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, gentamisin kaynaklı böbrek hasarında, gentamisin'in dokuda oksijen radikalleri oluşturarak yangı meydana getirdiğini ve böylece bölgeye nötrofillerin birikimini arttırdığını ve buna bağlı olarak nötrofillerinde bol miktarda radikal oluşturduklarını, artan MPO aktivitesinin ise bunun göstergesi olduğunu bildirmişlerdir [189].

Sigara içiminin immün sisteme olan etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; sağlıklı sigara içmeyen gönüllülerden alınan venöz kandan izole edilen ve forbol miristat asetat ile aktive edilen polimorfnükleer nötrofillere 30 dakika boyunca 5 ml ve 10 ml sigara ekstraktı uygulanmış ve MPO aktivitesi ölçülmüştür. Kontrol grubunda MPO aktivitesi $2,4 \pm 0,3$ U/mg protein, 5 ml sigara özütü uygulanan grupta $2,7 \pm 0,6$ U/mg protein ve 10 ml uygulanan grupta $2,2 \pm 0,3$ U/mg protein olarak bulunmuş ve aralarında herhangi bir fark olmadığı bildirilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda hücrel GSH içeriğini ölçtüklerinde sigara özütünün ilk uygulandığı anda, hücrel GSH'ın çok hızlı bir şekilde azalma gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu araştırmada;

sigaranın polimorf nükleer nötrofillerde nitrosatif stresi artırmadığı, nötrofil fonksiyonunu bozduğu, sigarada bulunan akrolein ve krotonaldehitler gibi aldehitlerin GSH ile veya diğer biyolojik -SH gruplarıyla reaksiyona girerek hücresel -SH'da bir azalma meydana getirdiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, sigaranın nötrofilde solunum patlamasına olan olumsuz etkisinin, azalan hücresel GSH ile yakından ilgili olduğu, nötrofil veya makrofaj NADPH oksidaz aktivitesinin sigara ile inhibe edilmesinin akrolein ve benzer aldehitlerden dolayı olabileceği bildirilmiştir [190].

Chow ve ark. [73], etanol ile birlikte sigara uygulanan ratların mukozal MPO aktivitesinin oldukça arttığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, sigara içiminin dokuya nötrofil birikimi ve aktivasyonunu artırdığını, buna bağlı olarak alkolle birlikte alınan sigaranın, gastrik mukozal hasarın oluşumunda artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim bulgularımız; böbrek MPO aktivitesi kontrolde $13,5 \pm 0,6$ U/gr protein, alkol grubunda $16,16 \pm 1,1$ U/gr protein, sigara grubunda $14,71 \pm 1,1$ U/gr protein ve sigara+alkol grubunda ise $23,75 \pm 0,9$ U/gr protein idi. Kontrole göre alkol ve sigara+alkol gruplarında MPO aktivitesindeki artış istatistiki olarak anlamlıydı ($P < 0,05$). Sigara grubunda ise fark anlamlı değildi. Sigara içiminin immün sistemi direkt olarak etkilediği ve sigara içenlerin solunum yollarında yangı hücrelerinde artışa neden olduğu bildirilirken, sigara içiminin fagosit veya makrofaj fonksiyonunu bozduğu da bildirilmiştir. Yine aynı araştırmacılar, sigaranın çeşitli bileşiklerinin nötrofil NADPH-oksidadz aktivitesini inhibe ederek nötrofil fonksiyonlarını ve nitrosatif stresi engellediğini ve böylece MPO aktivitesinde bir değişme olmadığını rapor etmişlerdir [190-192]. Bu literatürlerin ışığında, araştırmamızda ki sigara grubunun MPO aktivitesinde bir değişme olmayışının, sigaranın nötrofil fonksiyonunu bozmasından kaynaklanmış olabileceği, ayrıca bu kadar sürede ve bu oranda içilen sigaranın böbrek dokusuna nötrofil birikimini sağlayamayacağı yaklaşımlarını getirmek mümkün olabilir. Diğer bulgularımız, yukarıdaki tartışılan kaynaklarla uyum göstermektedir.

Fizyolojik şartlarda memelilerde bir dehidrogenaz olarak mevcut olan XDH, iskemi/reperfüzyon, hipoksi veya dış ve iç etkilerin neden olabileceği patolojik şartlarda oksijen radikalleri oluşturabilen XO'ya dönüşür [193]. XO ile oluşturulan serbest oksijen radikalleri, etanol ve sigara kaynaklı oksidatif hasara neden olabilmektedir.

Battelli ve ark. [155], izole edilmiş rat hepatosit hücre kültürüne etanol uygulamışlar ve XDH'nin, XO'ya dönüştüğünü tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu

durumun, etanol ile ortamda oluşturulan ROT türlerinin, ortamdaki XDH'yi XO'ya çevirmiş olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Abbondanza ve ark. [170], kronik alkolik rat modeli oluşturarak yaptıkları araştırmada, etanol uygulaması yapılan ratların karaciğer XDH aktivitesinin, XO aktivitesine dönüşüm oranının, kontrole göre 5,5 kat daha hızlı olduğunu ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar alkol'ün organizmada meydana getirdiği toksisite nedeniyle bu dönüşümün artmış olabileceğine karar vermişlerdir.

Yine diğer bir çalışmada ratlara akut etanol uygulamasının doz ve zamana bağlı olarak, plazma XDH aktivitesini, XO aktivitesine dönüştürdüğünü tespit etmişlerdir [194].

Deliconstantinos ve Villitou [195], yaptıkları araştırmada, tavşan beyin sinaptomlarını 3 saat boyunca sigaranın gaz fazı oksidanlarına maruz bırakmışlar ve sonuçta MDA ve XO seviyesinin sinaptomlarda oldukça artmış olduğunu bildirmişlerdir.

Rat karaciğer ve böbrek dokularının iskemi/reperfüze edilerek yapılan deneysel bir çalışmada, iskemik rat karaciğer ve böbrek dokusunda XO aktivitesinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. İskemi boyunca oluşan bu dönüşümün, proteolizden kaynaklanabileceği düşünülmüş ve bu proteolizin mekanizması, ATP eksikliğini takiben kalsiyum bağımlı bir proteazın aktive olduğu şeklinde açıklanmıştır. Yine aynı araştırmada, XO aktivitesindeki artışa paralel olarak karaciğer ve böbrek doku GSH'nın azalmış olduğu bildirilmiştir [30].

Gwinner ve ark. [196], ratlarda deneysel nefrit modeli oluşturarak yaptıkları bir çalışmada, nefritin 1 ve 12. saatlarında glomerular XO aktivitesinin önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, artan XO ile paralel bir O_2^- radikali üretim artışının, bu hasarlanmada işe karıştığı gösterilmiştir. Araştırmacılar O_2^- radikalindeki bu artışın, direkt XO aktivitesindeki artıştan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Aynı grubun yaptığı diğer bir denemede, XO aktivitesinin tungsten ile inhibisyonu sonucu, O_2^- radikali oluşumunda azalma, proteinüride düşme tespit edilmiş ve bu neticelerle, artan XO aktivitesinin, nefropati oluşumunda başlıca rol oynayan mekanizma olduğu sonucuna varılmıştır.

İnsan, rat, domuz ve tavşan kalbinin iskemi/reperfüzyonu sonucunda artan XO aktivitesinin, XDH'nin XO'ya dönüşümünden kaynaklandığı, artan XO aktivitesinin de oksidatif patlamaya yol açtığı ve buna bağlı olarak doku hasarlanmasının meydana geldiği bildirilmiştir [197].

Etanol indüklü gastrik mukozal hasar oluşturulan ratlarda, sigaranın mukozal lezyonları nasıl etkilediğini araştırmak için mukozal lezyonu bulunan hayvanlar, bir saat boyunca sigaraya maruz bırakılmışlar ve sürenin sonunda gastrik lezyonlarda, XO ve MPO aktivitelerinin artmış olduğu, ayrıca etanol ile birlikte sigara uygulamasının bu lezyonlarda enzimlerin aktivitesini daha da artırmış olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumu, alkol indüklü gastrik ülserlerde, sigara alımıyla birlikte artan XO aktivitesi nedeniyle, oksijen radikallerinin çok daha fazla üretilmesi ve oluşan radikallerin ise bölgeye nötrofilleri çekmesiyle meydana gelmiş olabileceğine bağlamışlardır [198].

Araştırmamız sonunda; böbrek XO aktivitesi kontrolde $2,77\pm 0,3$ U/gr protein, alkol grubunda $5,19\pm 0,3$ U/gr protein, sigara grubunda $3,22\pm 0,1$ U/gr protein ve sigara+alkol grubunda ise $7,59\pm 0,9$ U/gr protein olarak bulundu. Kontrole göre, alkol ve sigara+alkol gruplarında XO aktivitesindeki artış istatistiki olarak anlamlıydı ($P<0,05$). Yalnızca sigara grubu XO aktivitesinde anlamlı olmayan bir artış mevcuttu. Bu durum, bu kadar sürede ve bu oranda içilen sigaranın, böbrek dokusu XO aktivitesine herhangi bir etki yapmamasından kaynaklanabilir. Ayrıca, nikotin'in oksidatif stresi indükleyen metaboliti kotinin'e dönüşümünün başlıca karaciğerde olması nedeniyle sigara, böbrek XO aktivitesinde bir indüklenme meydana getirmemiş olabilir. Diğer sonuçlarımız yukarıda tartıştığımız literatür bilgileriyle paralellik göstermektedir.

Araştırmacılar, alkol ve sigaranın böbrek dokusunda meydana getirdiği histopatolojik bozukluklarında aşırı ROT oluşumundan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Aşırı miktarda serbest oksijen radikalinin oluşması ve antioksidan sistemlerin zayıflaması böbrekteki patolojik bozulmaların nedeni olarak görülmektedir [68]. Böbreklere alkolün direkt etkilerinden birisi de böbreklerin şeklini ve yapısını değiştirmesidir. Alkol kullanımıyla glomerulus'ların bazal membranı anormal derecede incelmektedir. Ayrıca böbrek tübül hücrelerinde genişleme ve değişimler görülmektedir. Ayrıca alkol protein, yağ ve su miktarını artırarak hücreleri genişletmektedir. Klinik olarak alkoliklerde böbrek genişlemesi (nefromegali) olduğu ve bunun sebebinin de hücresel genişleme ve hücrelerin çoğalmasından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür [10]. Kronik alkol kullanımı genelde böbrekte tübüler bozukluklara neden olabilmektedir [44,54,70].

22 hafta boyunca alkol uygulaması yapılan ratların böbreklerinin histopatolojik incelemeleri, rat böbrek glomerulus'larında vakuol oluşumunun, bowman kapsülü'nün

bazal membranında bozulmanın, epitel hücrelerinde sinsityum durumunun oluştuğunu ortaya koymuştur [53].

Yine Acharya ve ark. [69], ratlara 10 hafta boyunca t-butil alkol ve trikloroasetik asit uygulayarak yaptıkları araştırmanın histopatolojik bulgularını, alkolün karaciğerde sentrolobüler nekrozlara, hepatositlerde vakuolasyona ve hepatik mimaride bozulma gibi değişikliklere yol açtığı, böbrekte ise bowman kapsülü'nün bazal membranında dejenerasyon ve glomerulus'larda vakuolleşmeye ve böbrek tübüler epitel hücrelerinin membranlarında erimelere neden olduğu şeklinde rapor etmişlerdir.

6 hafta boyunca ratlara etanol uygulanarak yapılan diğer bir araştırmanın histopatolojik bulguları, etanolün karaciğer hepatositlerinde vakuolar dejenerasyona, sentrolobüler nekroza neden olduğunu, böbrekte ise orta seviyeli kanamaya, böbrek tıkanıklığına ve glomerulus genişlemesine yol açtığını ortaya koymuştur [68].

Sigara içenlerde proksimal tübüler hasarın oluştuğu, deneysel hayvan modellerinde ise sigaranın tübülointerstitial hasar meydana getirdiği gösterilmiştir [93]. Ayrıca kronik sigara kullanımının böbrek endotelinde hasarlanma meydana getirebildiği de ifade edilmiştir [76].

Çalışmamızda bütün grupların histopatolojik incelemesi yapıldığında sigara grubunun böbrek tübüllerinde, alkol ve sigara+alkol grubuna nazaran daha az bir dejenerasyon olduğu, alkol grubunda glomerulus'ta vakuolleşme ve tübüllerde bozulmalar meydana geldiği, sigara+alkol grubunda tübüllerdeki bozulmanın daha aşırı düzeyde olduğu ve glomerulus bazal membranında erime meydana geldiği görüldü. Histopatolojik sonuçlarımız tartışılan literatür sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Kronik alkol ve sigara kullanımının erkek ratların böbrek dokusu histopatolojisi, GSH, MDA, total nitrit düzeyleri ve MPO, XO aktivitelerine etkisinin incelenmesi amacıyla yapmış olduğumuz bu araştırmada;

1- Böbrek GSH düzeyi kontrolde $1,579 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/gr.yaş doku (g.y.d)}$, alkol grubunda $0,910 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g.y.d}$, sigara grubunda $1,141 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g.y.d}$ ve sigara+alkol grubunda ise $0,818 \pm 0,04$ $\mu\text{mol/g.y.d}$ olarak tespit edildi. Kontrole göre bütün gruplarda böbrek GSH seviyesi anlamlı şekilde düşmüştü ($P < 0,05$).

2- Böbrek MDA düzeyi kontrolde $40,14 \pm 3,4$ nmol/g.y.d , alkol grubunda $71,4 \pm 2,8$ nmol/g.y.d , sigara grubunda $64 \pm 3,6$ nmol/g.y.d ve sigara+alkol grubunda ise $76,5 \pm 4,3$ nmol/g.y.d olarak bulundu. Kontrole göre bütün gruplarda böbrek MDA seviyesi anlamlı şekilde artmıştı ($P < 0,05$).

3- Böbrek total nitrit düzeyi kontrolde $347,73 \pm 8,1$ nmol/g.y.d, alkol grubunda $261,09 \pm 4,8$ nmol/g.y.d, sigara grubunda $329,76 \pm 5,6$ nmol/g.y.d ve sigara+alkol grubunda ise $254,15 \pm 3,8$ nmol/g.y.d olarak tespit edildi. Kontrole göre yalnızca sigara grubundaki total nitrit azalması anlamsızken, diğer bütün gruplarda böbrek total nitrit seviyesi anlamlı şekilde düşmüştü ($P < 0,05$).

4- Böbrek MPO aktivitesi kontrolde $13,5 \pm 0,6$ U/gr protein, alkol grubunda $16,16 \pm 1,1$ U/gr protein, sigara grubunda $14,71 \pm 1,1$ U/gr protein ve sigara+alkol grubunda ise $23,75 \pm 0,9$ U/gr protein olarak bulundu. Kontrole göre alkol ve sigara+alkol gruplarının MPO aktivitesindeki artış istatistiki olarak anlamlıyken ($P < 0,05$), sigara grubundaki MPO artışı anlamsızdı.

5- Böbrek XO aktivitesi kontrolde $2,77 \pm 0,3$ U/gr protein, alkol grubunda $5,19 \pm 0,3$ U/gr protein, sigara grubunda $3,22 \pm 0,1$ U/gr protein ve sigara+alkol grubunda ise $7,59 \pm 0,9$ U/gr protein idi. Kontrole göre alkol ve sigara+alkol gruplarının XO aktivitesindeki artış istatistiki olarak anlamlıydı ($P < 0,05$), ancak sigara grubundaki artma anlamlı değildi.

6- Bütün grupların histopatolojik verileri karşılaştırıldığında sigara grubunun böbrek tübüllerinde, alkol ve sigara+alkol grubuna nazaran daha az bir dejenerasyon görüldü. Alkol grubunda glomerulus'ta vakuolleşme ve tübüllerde bozulmalar mevcut iken, sigara+alkol grubunda tübüllerin aşırı derecede dejenere olduğu, glomerulus bazal membranında erimeler meydana geldiği görüldü.

Bu verilerin ışığında şu bilimsel yorumlar getirilebilir;

1-Kronik sigara ve alkol kullanımıyla azalan böbrek GSH'ı;

Muhtemelen etanolün metabolize ürünü olan asetaldehitin GSH'a bağlanmasından ve etanol kaynaklı lipid peroksitler ile GSH'ın oksitlenmesinden veya sigara ve alkol kaynaklı oluşan ROT ile ya da alkol ve sigaranın etkisiyle aşırı aktive olan böbrek sitokrom P450 sisteminin ürettiği ROT'a bağlı olarak GSH'ın oksitlenmesinden kaynaklanmış olabilir. Ayrıca böbrek hücresinde alkol metabolizmasıyla oluşan asetaldehit, GSH sentezinin bir substratı olan sistein'i bağlayarak GSH sentezini azaltmış olabilir. Hücre içi GSH sentezini azaltan diğer bir mekanizmada, alkol ve sigaranın aşırı derecede radikal üretimine neden olarak dokuda $ONOO^-$ oluşumunun artması ve oluşan $ONOO^-$ 'in detoksifikasyonu sırasında bol miktarda GSH'ın harcanması şeklinde açıklanabilir.

2-Kronik sigara ve alkol kullanımıyla artan lipid peroksidasyonu;

Özellikle hücre içi enzimatik olmayan antioksidan mekanizmalarından olan GSH'ın önemli derecede azalmış olması, ROT'un detoksifikasyonunu da azaltır. Bunun sonucunda lipidlerin peroksidasyonu hızlanmış olabilir. Alkol ve sigarayla vücuda alınan yüksek miktardaki serbest radikallerin ve asetaldehidin direkt oksidatif etkisiyle hücrenin membran ve diğer lipidlerinin peroksidasyonu artmış olabilir. Lipid peroksidasyonunu artıran diğer bir etki de, alkol ve sigara kullanımıyla böbrek hücresinde oluşan radikallerin kemotaktik etkisiyle bu bölgeye nötrofillerin birikimi ve aktivasyonu sonucu oluşan aşırı miktardaki ROT'un membran lipidlerini peroksidasyona uğratmasından dolayı olabilir.

3- Kronik sigara ve alkol kullanımıyla azalan böbrek total nitrit düzeyi;

Alkol ve sigaranın etkisi ile oluşan aşırı miktardaki O_2^- radikalinin NO'ya yüksek bir affinite ile bağlanarak ONOO⁻'ya dönüşümünden, etanolün NOS enziminin konformasyonunu değiştirerek enzimi inhibe etmesinden ya da etanolün ve sigaranın hücre içi protein kinazları aktive ederek NOS'u fosforile forma dönüştürerek inaktive etmesinden dolayı dokularda total nitrit düzeyleri azalmış olabilir. Diğer önemli bir mekanizma da, kronik alkol ve sigaranın etkisiyle hücre içine L-arjinin alımının azalması ve enzimin kofaktörü olan tetrahidrobiopterin sentezinin baskılanması şeklinde açıklanabilir.

4- Kronik sigara ve alkol kullanımıyla artan MPO aktivitesi;

Kronik alkol ve sigara kullanımına bağlı olarak dokuda aşırı oluşan ROT'un kemotaktik etkisi sonucu bölgeye bol miktarda monosit ve nötrofillerin birikiminden dolayı olabilir. Ayrıca, gerek nötrofil içi gerekse nötrofil dışında MPO-Fe(III)-NO kompleksinin oluşumu sonucunda MPO aktivitesi inhibe olur. Araştırmamızda gözlediğimiz düşük böbrek NO seviyesi nedeniyle, MPO-Fe(III)-NO kompleks oluşumunun azalmasına bağlı olarak MPO aktivitesi artmış olabilir [199].

5- Kronik sigara ve alkol kullanımıyla artan XO aktivitesi;

Alkol ve sigara kaynaklı artan ROT oluşumu XDH'nin, XO'ya dönüşümünü hızlandırmış olabilir. Ayrıca asetaldehidin, XDH'nin serbest sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek XDH'yi, XO'ya çevirmesinden ya da alkol ve sigaradan dolayı meydana gelebilecek doku hipoksisi sonucu aktive olan proteolitik enzimlerin XDH'yi parçalayarak, XO'ya dönüştürmüş olmasından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca araştırmamızda gözlenen düşük NO düzeyleri, muhtemelen ONOO⁻ oluşumunun

hızlanmasından kaynaklanmaktadır. Böbrek dokusunda artan ONOO⁻ ise XDH'nin, XO'ya dönüşümünü artırmış olabilir [200].

6- Kronik sigara ve alkol kullanımının böbrek dokusunda meydana getirdiği histopatolojik değişiklikler;

Alkol ve sigara kullanımına bağlı olarak GSH miktarının azalması, XO aktivitesinin artması, sitokrom P450 sisteminin indüklenmesi tam anlamıyla bir oksidatif strese, yani oksidan/antioksidan dengenin bozulmasına yol açacaktır. Bunun sonucunda detoksifiye edilemeyen radikaller (OH[•] ve ¹O₂) hücrenin membran lipidleri ve diğer komponentlerinin oksidasyonuna yol açacaktır. Bu olayların kronik şekilde devam etmesi, önemli histopatolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olacaktır.

Bütün bu verilerin ışığı altında sonuç olarak; sigara ve alkolün tek başına veya birlikte uzun süreli kullanımının böbrekte doku hasarlanmaları ve işlev bozukluklarına yol açacağı, sigara ve alkol kullananlarda genellikle bir beslenme bozukluğunun bulunduğu da dikkate alındığında, alkol ve sigaranın bu zararlı etkilerinin engellenmesi ve vücut homeostasinin sürdürülmesi amacıyla günlük yeterli miktarda melatonin, vitamin A, C ve E gibi antioksidan etkili maddelerin alınması gerektiği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] N.M. Elsayed and A. Bendich, *Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke*, **Nutr. Res.**, 21 (2001) 551-567.
- [2] J. Harris, D. Best, L.H. Man, S. Welch, M. Gossop and J. Strang, *Changes in cigarette smoking among alcohol and drug misuses during inpatient detoxification*, **Addict. Biol.**, 5 (2000) 443-450.
- [3] A.A. Lorimer, *Alcohol, Wine, and Health*, **Am. J. Surg.**, 180 (2000) 357-361.
- [4] K. Husain, B.R. Scott, S.K. Reddy and S.M. Somani, *Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system*, **Alcohol**, 25 (2001) 89-97.
- [5] D.F. Church and W.A. Pryor, *Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications*, **Environ. Health Persp.**, 64 (1985) 111-126.
- [6] L. Björkman, M. Svartengren and M. Nordberg, *Individual differences in activity of glutathione peroxidase and catalase studied in monozygotic twins discordant for smoking*, **Hum. Exp. Toxicol.**, 11 (1992) 341-346.
- [7] J. Hilbert and V. Mohsenin, *Adaptation of lung antioxidants to cigarette smoking in humans*, **Chest**, 110 (1996) 916-920.
- [8] A.D. Bolzan, M.S. Bianchi and N.O. Bianchi, *Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking*, **Clin. Biochem.**, 30 (1997) 449-454.
- [9] G.G. Duthie, J.R. Arthur and W. Philip, *Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status*, **Am. J. Clin. Nutr.**, 53 (1991) 1061-1063.
- [10] M. Epstein, *Alcohol's impact on kidney function*, **Alcohol Health Res. World**, 21 (1997) 84-91.
- [11] A. Erkoçak, *Özel histoloji*, Baskı ajans-Türk matbaası, Ankara, 1973, 119-121.
- [12] M.H. Ross, L.J. Romrell, and G.I. Kaye, *Histology a text and atlas*, Williams & Wilkins, Maryland USA, 1995, 559-578.
- [13] A. Noyan, *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*, Meteksan, Ankara, 1998, 606-657.
- [14] M.C. Wood, *Structure and function of the human body*, J.B Lippincott company, Philadelphia, 1995, 230.
- [15] A.P Southorn, and G. Powis, *Free radicals in medicine. I. chemical nature and biologic reactions*, **Mayo Clin. Proc.**, 63 (1988) 381-389.
- [16] T. Shinya, *Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology*, **Pathol. Int.**, 49 (1999) 91-102.
- [17] K. Kılınc, *Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri*, **Biyokimya Dergisi**, X (1985) 60-89.
- [18] A. Boveris, *Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria*, **Method. Enzymol.**, 105 (1984) 429-435.
- [19] M. Markert, P.C. Andrews and B.M. Babior, *Measurement of O_2^- production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils*, **Method. Enzymol.**, 105 (1984) 358-365.
- [20] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease : an overview*, **Method. Enzymol.**, 186 (1990) 1-85.
- [21] J. Lunec, *Free radicals : their involvement in disease processes*, **Ann. Clin. Biochem.**, 27 (1990) 173-182.
- [22] B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, Transition Metals and Disease*, **Biochem. J.**, 219 (1984) 1-14.
- [23] L.L. Zwart, J.H.N. Meerman, J.N.M. Commandeur and N.P.E. Vermeulen, *Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans*, **Free Radical Bio. Med.**, 26 (1999) 202-226.

- [24] I. Fridowich, *The superoxide radical is an agent of oxygen toxicity; superoxide dismutases provide an important defense*, **Science**, 201 (1978) 875-880.
- [25] J. Nordberg and E.S.J. Arner, *Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system*, **Free Radical Bio. Med.**, 31 (2001) 1287-1312.
- [26] E. Özbek, Y. Türköz, E. Şahna, M. Özbek and B. Mızrak, *The protective effect of caffeic acid phenethyl ester on the gentamicin nephrotoxicity*, **Int. Med. J. Washington**, 7 (2000) 215-217.
- [27] E. Özbek, M. Çekmen and Y. Türköz, *The effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin nephrotoxicity: Increase antioxidant enzyme activity in kidney*, **Int. Med. J. Washington**, 7 (2000) 129-131.
- [28] E. Özbek, Y. Türköz, E. Şahna, F. Özüğürlü, B. Mızrak and M. Özbek., *Melatonin administration prevents the nephrotoxicity induced by gentamicin*, **BJU. Int.**, 85 (2000) 742-746.
- [29] R. Rodrigo and G. Rivera, *Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine*, **Free Radical Biol. Med.**, 33 (2002) 409-422.
- [30] T.G. McKelvey, M.E. Höllwarth, D.N. Granger, T.D. Engerson, U. Landler and H.P. Jones, *Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney*, **Am. J. Phys.**, 254 (1988) 753-760.
- [31] D.A. Parks, K.A. Skinner, H.B. Skinner and S. Tan, *Multiple organ dysfunction syndrome: role of xanthine oxidase and nitric oxide*, *Pathophysiology*, 5 (1998) 49-66.
- [32] A.P. Zou, N. Li and A.W. Cowley, *Production and actions of superoxide in the renal medulla*, **Hypertension**, 37 (2001) 547-553.
- [33] E.L. Rhoden, M.L. Lucas, L.P. Lima, C.R. Rhoden and C.A.V. Souto, *Effects of L-arginine on the kidney levels on malondialdehyde in rats to renal ischaemia-reperfusion*, **BJU. Int.**, 88 (2001) 273-277.
- [34] S. Watanabe, Y. Yoshimura and T. Fukui, *Contribution of glutathione peroxidase and nitric oxide to potassium bromate-induced oxidative stress and kidney damage in mice*, **J. Health Sci.**, 47 (2001) 565-570.
- [35] A.J. Augustin and J. Lutz, *Intestinal, hepatic and renal production of thiobarbituric acid reactive substances and myeloperoxidase activity after temporary aortic occlusion and reperfusion*, **Life Sci.**, 49 (1991) 961-968.
- [36] L. Baud and R. Ardaillou, *Involvement of reactive oxygen species in kidney damage*, **Brit. Med. Bull.**, 49 (1993) 621-629.
- [37] A. Rehan, K.J. Johnson and R.C. Wiggins, *Evidence for the role of oxygen radicals acute nephrotoxic nephritis*, **Lab. Invest.**, 51 (1984) 396-403.
- [38] M. Orellana, J. Araya, V. Guajardo and R. Rodrigo, *Modulation of cytochrome P450 activity in the kidney of rats following long-term red wine exposure*, **Comp Biochem. Phys. Part C**, 132 (2002) 399-405.
- [39] Y. Amet, E.P. Gautier, F. Bertham, F. Adas and S.W. French, *Adaptation chronic ethanol administration emphasized by fatty acid hydroxylations in rat liver and kidney microsomes*, **Eur. J. Nutr.**, 33 (2000) 270-276.
- [40] J. Thome, P. Foley, W. Gsell, E. Davids, N. Wodarz, G.A. Wiesbeck, J. Böning and P. Rieder, *Increased concentrations of manganese superoxide dismutase in serum of alcohol-dependent patients*, **Alcohol Alcoholism**, 32 (1997) 65-69.
- [41] H. Krisztina, B. Anna, L. Gabriella, K. Ibolya and F. Janos, *Oxidative damage in alcoholic liver disease*, **Eur. J. Gastroen. Hepat.**, 13 (2001) 49-53.
- [42] R.M. Wright, J.L. McManaman and J.E. Repine, *Alcohol-induced breast cancer. A proposed mechanism*, **Free Radical Bio. Med.**, 26 (1999) 348-354.

- [43] J.C. Fernandez-checa, N. Kaplowitz, A. Colell and C. Garcia-ruiz, *Oxidative stress and alcoholic liver disease*, **Alcohol Health Res. World**, 21 (1997) 321-324.
- [44] M. Orellana, E. Valdes, J. Fernandez and R. Rodrigo, *Effects of chronic ethanol consumption on extramitochondrial fatty acid oxidation and ethanol metabolism by rat kidney*, **Gen. Pharmacol.**, 30 (1998) 719-723.
- [45] A.I. Cederbaum, *Introduction-serial review: alcohol, oxidative stress and cell injury*, **Free Radical Bio. Med.**, 31 (2001) 1524-1526.
- [46] A.R. Eiser., *The effects of alcohol on renal function and excretion*, **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 11 (1987) 127-138.
- [47] V.R. Preedy, M. Fibioli, M.E. Reilly, V.B. Patel, P.J. Richardson and T.J. Peters, *Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and whole body*, **Nutrition**, 15 (1999) 604-608.
- [48] V.R. Preedy, P. Duane and T.J. Peters, *Biological effects of chronic ethanol consumption: A reappraisal of the lieber-de carli liquid-diet model with reference to skeletal muscle*, **Alcohol Alcohol.**, 23 (1988) 151-154.
- [49] H.W. Sampson, *Alcohol's harmful effects on bone*, **Alcohol Health Res. World**, 22 (1998) 190-194.
- [50] J. Nishida, G.L. Baker and R.S. McCuskey, *Protective role of nitric oxide in the TNF- α -mediated hepatic microvascular inflammatory response following acute ethanol ingestion*, **Hepatol. Res.**, 16 (2000) 98-111.
- [51] S.J.S. Flora and S.K. Tandon, *Effect of combined exposure to lead and ethanol some biochemical indices in rat*, **Biochem. Pharmacol.**, 36 (1987) 537-541.
- [52] R. Roig, E. Cascon, L. Arola, C. Blade and M.J. Salvado, *Effects of chronic wine and alcohol intake on glutathione and malondialdehyde levels in rats*, **Nutr. Res.**, 20 (2000) 1547-1555.
- [53] S. Acharya, K. Mehta, S. Krishnan and C.V. Rao, *A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male wistar rats*, **Alcohol**, 23 (2001) 99-108.
- [54] A. Heidland, W.H. Hörl, R.M. Schaefer, M. Teschner, J. Weipert and E. Heidbreder, *Role of alcohol in clinical nephrology*, **Klin. Wochen.**, 63 (1985) 948-958.
- [55] Z. Gottesfeld, *Sympathetic neuronal response to immune signals involves nitric oxide: effects of exposure to alcohol in utero*, **Alcohol**, 16 (1998) 177-181.
- [56] H. Sun and W.G. Mayhan, *Superoxide dismutase ameliorates impaired nitric oxide synthase-dependent dilatation of the basilar artery during chronic alcohol consumption*, **Brain Res.**, 891 (2001) 116-122.
- [57] S. Worrall, P.J. Richardson and V.R. Preedy, *Experimental heart muscle damage in alcohol feeding is associated with increased amounts of reduced-and unreduced-acetaldehyde and malondialdehyde-acetaldehyde protein adducts*, **Addict. Biol.**, 5 (2000) 421-427.
- [58] M.O. Berman, B. Shagrin, D.L. Evert and C. Epstein, *Impairments of brain and behavior the neurological effects of alcohol*, **Alcohol Health Res. World**, 21 (1997) 65-75.
- [59] C. Gianoulakis, *Alcohol-seeking behavior the roles of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the endogenous opioid system*, **Alcohol Health Res. World**, 22 (1998) 202-210.
- [60] E.L.B. Novelli, N.L. Rodrigues, B.O. Ribas and J.L. Filho, *Toxicity of chronic ethanol ingestion and superoxide radical formation on seminal vesicles of rats*, **Food Chem. Toxicol.**, 34 (1996) 1003-1007.
- [61] N. Emanuele and M.A. Emanuele, *The endocrine system alcohol alter critical hormonal balance*, **Alcohol Health Res. World**, 21 (1997) 53-64.

- [62] M.A. Emanuele and N. Emanuele, *Alcohol's Effects on Male Reproduction*, **Alcohol Health Res. World**, 22 (1998) 195-201.
- [63] W.L. Dees, J.K. Hiney and V. Srivastava, *Alcohol's effects on female puberty*, **Alcohol Health Res. World**, 22 (1998) 165-169.
- [64] D.L. Davis and C. Muir, *Estimating avoidable causes of cancer*, **Environ. Health Persp.**, 103 (1995) 301-306.
- [65] M. Mincis, J.M. Chebli, S.T. Khouri and R. Mincis, *Ethanol and the gastrointestinal tract*, **Arch. Gastro.**, 32 (1995) 131-139.
- [66] C.L. Vecchia, S. Franceschi, A. Favero, R. Talamini, E. Negri, K. Cheng and C. Cummins, *Alcohol intake and cancer of the upper digestive tract*, **Brit. Med. J.**, 318 (1999) 1289.
- [67] S.A. Glynn, D. Albanes, P. Pientinen, C.C. Brown, M. Rautalahti, J.A. Tangrea and E.W. Gunter, *Colorectal cancer and folate status: a nested case-control study among male smokers*, **Cancer Epidem. Biomar.**, 5 (1996) 487-494.
- [68] S.J.S. Flora, S.C. Pant, P.R. Malhotra and G.M. Kannan, *Biochemical and histopathological changes in arsenic-intoxicated rats coexposed to ethanol*, **Alcohol**, 14 (1997) 563-568.
- [69] S. Acharya, K. Mehta, S. Rodriguez, J. Pereira, S. Krishnan and C.V. Rao, *A histopathological study of liver and kidney in male wistar rats treated with subtoxic doses of t-butyl alcohol and trichloroacetic acid*, **Exp. Toxicol. Pathol.**, 49 (1997) 369-373.
- [70] M. Ishigami, T. Ohnishi, M. Eguchi, S. Mizuiri and A. Hasegawa, *Renal effects of alcohol withdrawal in five-week alcohol treated rats*, **J. Stud. Alcohol**, 58 (1997) 392-396.
- [71] H.K. Cho, F.L. Yang and J.T. Snook, *Effect of chronic ethanol consumption on selenium status and utilization in rats*, **Alcohol**, 8 (1991) 91-96.
- [72] N. Chang, E. Kim and S.Y. Kim, *Nutritional state of vitamin B in elderly with alcoholism and cigarette smoking in rural areas of Korea*, **Nutr. Res.**, 21 (2001) 597-606.
- [73] J.Y.C. Chow, L. Ma and C.H. Cho, *Effect of cigarette smoke on ethanol-induced gastric mucosal lesions: the role of nitric oxide and neutrophils*, **Eur. J. Pharmacol.**, 342 (1998) 253-260.
- [74] Ö. Aşut, *Sigara ve hekim*, Türk Tabipleri Birliği Yayınları, Ankara, 1993, 1-123.
- [75] Y. Su, W. Han, C. Giraldo, Y.D. Li and E.R. Block, *Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells*, **Am. J. Resp. Cell. Mol.**, 19 (1998) 819-825.
- [76] G. Remuzzi, *Cigarette smoking and renal function impairment*, **Am. J. Kidney Dis.**, 33 (1999) 807-813.
- [77] T. Neunteufl, S. Heher, K. Kostner, G. Mitulović, S. Lehr, G. Khoschoru, R.W. Schmid, G. Mauer and T. Stefenelli, *Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers*, **J. Am. Coll. Cardiol.**, 39 (2002) 251-256.
- [78] A.H. Sayar ve S. Baran, *Sigaranın serumdaki çinko ve bakır seviyeleri üzerine etkisi*, **C.Ü. Fen Bil. Derg.**, 21 (1999) 17-30.
- [79] S. Brasche, G. Winkler and J. Heinrich, *Dietary intake and smoking-results from a dietary survey in erfurt in 1991/92*, **Z. Ernährungswiss**, 37 (1998) 211-214.
- [80] M. Urberg, R. Shamma and K. Rajdev, *The effects of cigarette smoking on glycosylated hemoglobin in nondiabetic individuals*, **J. Fam. Practice**, 28 (1989) 529-531.

- [81] B.V. Sastry, M.B. Chance, G. Singh, J.L. Hom and V.E. Janson, *Distribution and retention of nicotine and its metabolite, cotinine, in the rats as a function of time*, **Pharmacology**, 50 (1995) 128-136.
- [82] I. Uslu, E. Tanker and M.L. Aksu, *Radioactivity in cigarette*, **Turkish J. Nucl. Sci.**, 25 (1998) 61-70.
- [83] K. Panda, R. Chattopadhyay, D. Chattopadhyay and I.B. Chatterjee, *Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C*, **Toxicol. Lett.**, 123 (2001) 21-32.
- [84] E. M. Alvarez, R. S. Otero and I. S. Sellero, *In vitro inhibition of catalase activity by cigarette smoke: relevance for oxidative stress*, **J. Appl. Toxicol.**, 18 (1998) 443-448.
- [85] E.M. Park, Y.M. Park and Y.S. Gwak, *Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke*, **Free Radical Bio. Med.**, 25 (1998) 79-86.
- [86] J. Kalra, A.K. Chaudhary and K. Prasad, *Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers*, **Int. J. Exp. Pathol.**, 72 (1991) 1-7.
- [87] K. McCusker and J. Hoidal, *Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters*, **Am. Rev. Respir. Dis.**, 141 (1990) 678-682.
- [88] K.M. Toth, E.M. Berger, C.J. Beehler and J.E. Repine, *Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers*, **Am. Rev. Respir. Dis.**, 134 (1986) 281-284.
- [89] R. Wever, P. Boer, M. Hijmering, E. Stores, M. Verhaar, J. Kastelein, K. Versluis and et al., *Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure*, **Arterioscl. Throm. Vas. Biol.**, 19 (1999) 1168-1172.
- [90] J. Grote, P. Dall, K. Oltmanns and W. Stolp, *The effect of increased blood carbon monoxide levels on the hemoglobin oxygen affinity during pregnancy*, *Oxygen Transport to Tissue XV*. Edited, Plenum Press, New York, 1994, 145-150.
- [91] N. Rietbrock, S. Kunkel, W. Wörner and P. Eyer, *Oxygen-dissociation kinetics in the blood of smokers and non-smokers: interaction between oxygen and carbon monoxide at the hemoglobin molecule*, **Arch. Pharm.**, 345 (1992) 123-128.
- [92] A. Giustino, R. Cagiano, M.R. Carratu, M.A. DeSalvia, M.A. Panaro, E. Jirillo and V. Cuomo, *Immunological changes produced in rats by prenatal exposure to carbon monoxide*, **Pharmacol. Toxicol.**, 73 (1993) 274-278.
- [93] S.R. Orth, *Smoking-a renal risk factor*, **Nephron**, 86 (2000) 12-26.
- [94] C.V. Anand, U. Anand and R. Agarwal, *Anti-oxidant enzymes, gamma-glutamyl transpeptidase and lipid peroxidation in kidney of rats exposed to cigarette smoke*, **Indian J. Exp. Biol.**, 34 (1996) 486-488.
- [95] E. Ritz, U. Benck, E. Franek, C. Keller, M. Seyfarth and J. Clorius, *Effects of smoking on renal hemodynamics in healthy volunteers and in patients with glomerular disease*, **J. Am. Soc. Nephrol.**, 9 (1998) 1798-1804.
- [96] P. Therond, D.B. Rousselot, A.D. Spraul, M. Conti and A. Legrand, *Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach*, **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, 3 (2000) 373-384.
- [97] J. Vina, J.M. Estrela, C. Guerri and F.J. Romero, *Effect of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes*, **Biochem J.**, 188 (1980) 549-552.
- [98] J. Callans, L.S. Wacker and M.C. Mitchell, *Effects of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in the rat*, **Hepatology**, 7 (1987) 496-501.

Laval, J. Coc
regulation a
159-187.
l cells synthes

J. Biol. Che

y, New Engl

de: insights
Free Radical

nous nitric o
and effect, An

: oxide and

l B.A. Free
s for endotr
90) 1620-16
hemistry of
, 276 (1999)

Krishna, A. J
s by nitric o
51.

, Inducible

ey Int., 48

lar memor.
Phys., 276

ia, G.R. Sei
laxation in

ic oxide s
damage i

dase and

robial ac

hydroxyl

inding ca
20-9427.

. MacPhe
yelopero:

[99] S. Skrzydlewska and R. Farbiszewski, *Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication*, **Arch. Toxicol.**, 71 (1997) 741-745.

[100] N. Yan and A. Meister, *Amino acid sequence of rat kidney γ -glutamylcysteine synthetase*, **J. Biol. Chem.**, 265 (1990) 1588-1593.

[101] O.W. Griffith, *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*, **Free Radical Bio. Med.**, 27 (1999) 922-935.

[102] C. Louercio and A. Federico, *Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis*, **Free Radical Biol. Med.**, 34 (2003) 1-10.

[103] S. Luperchio, S. Tamir and S.R Tannenbaum, *NO-induced oxidative stress and glutathione metabolism in rodent and human cells*, **Free Radical Bio. Med.**, 21 (1996) 513-519.

[104] G. Ignazio, V. Giangluigi, S. Carlo, B. Paolo and A. Emanuele, *Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xanthine oxidase*, **J. Hepatol.**, 25 (1996) 28-36.

[105] H. Speisky, A. Macdonald, G. Giles, H. Orrego and Y. Israel, *Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration*, **Biochem. J.**, 225 (1985) 565-572.

[106] J.C.F. Checa, M. Ookhtens and N. Kaplowitz, *Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol*, **J. Clin. Invest.**, 80 (1987) 57-62.

[107] G. Kanbak, M. İnal and C. Bayçu, *Ethanol induced hepatotoxicity and protective effect of betaine*, **Cell Biochem. Funct.**, 19 (2001) 281-285.

[108] M. Sare, D. Hamamci, I. Yilmaz, M. Birincioglu, B.B. Menten, M. Özmen and Ö. Yesilada, *Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radical formation in lung and liver tissues*, **Surg. Endosc.**, 16 (2002) 188-192.

[109] W. Wasowicz, J. Neve and A. Peretz, *Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage*, **Clin. Chem.**, 39 (1993) 2522-2526.

[110] A. Seven ve G. Candan, *Radikal ve lipid peroksid düzeyini artıran etkenler*, **Biyokimya Dergisi**, XX (1995) 43-56.

[111] F.T Slater, *Free radical mechanisms in tissue injury*, **Biochem. J.**, 222 (1984) 1-15.

[112] J.M. Lawrance and B. Adrienne, *Free radical tissue damage : protective role of antioxidant nutrients*, **FASEB. J.**, 1 (1987) 441-445.

[113] H.R. Griffiths, L. Moller, G. Bartosz, A. Bast, C.B. Freddari, A. Collins, M. Cooke, S. Coolen and et al., *Biomarkers*, **Mol. Aspect. Med.**, 23 (2002) 101-208.

[114] S. Doğanay, Y. Türköz, C. Evereklioglu, H. Er, and et al., *Use of caffeic acid phenethyl ester to prevent sodium pre-selenite-induced cataract in rat eyes*, **J. Cataract Restruct. Surg.**, 28 (2002) 1457-1462.

[115] F.O.Sale and D. Gramigna, *Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption*, **Neurochem. Res.**, 22 (1997) 577-582.

[116] R. Nordmann, C. Ribiere and H. Rouach, *Ethanol induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues*, **Alcohol Alcohol.**, 25 (1990) 231-237.

[117] S. Moncada, R.M.J. Palmer and A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, Pathophysiology, and pharmacology*, **Pharmacol. Rev.**, 43 (1991) 109-142.

[118] Y. Türköz ve E. Özerol, *Nitrik oksitin etkileri ve patolojik rolleri*, **J Turgut Özal Med. Cen.**, 4 (1997) 453-461.

- [119] D.A. Wink, I. Hanbauer, M.B. Grisham, F. Laval, R.W. Nims, J. Laval, J. Cook, R. Pacelli, J. Liebmann and et al., *Chemical biology of nitric oxide: regulation and protective and toxic mechanisms*, **Curr. Topp. Cell. Regul.**, 34 (1996) 159-187.
- [120] R.M.J. Palmer, D.S. Aston and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*, **Nature**, 333 (1988) 664-666.
- [121] M.A. Marletta, *Nitric oxide synthase structure and mechanism*, **J. Biol. Chem.**, 268 (1993) 12231-12234.
- [122] S. Moncada and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*, **New Engl. J. Med.**, 329 (1993) 2002-2012.
- [123] D.A. Wink and J.B. Mitchell, *Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide*, **Free Radical Bio. Med.**, 25 (1998) 434-456.
- [124] N. Gaudiot, C. Ribiere, A.M. Jaebert and Y. Giudicelli, *Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect*, **Am. J. Phys.**, 279 (2000) 1603-1610.
- [125] V.B. O'donnell and B.A. Freeman, *Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways*, **Circ. Res.**, 88 (2001) 12-21.
- [126] J.S. Beckman, T.W. Beckman, J. Chen, P.A. Marshall and B.A. Freeman, *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87 (1990) 1620-1624.
- [127] M.B. Grisham, D. Jour'heuil and D.A. Wink, *Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation*, **Am. J. Phys.**, 276 (1999) 315-321.
- [128] D.A. Wink, J.A. Cook, S.Y. Kim, Y. Vodovtz, R. Pacelli, M.C. Krishna, A. Russo and et al., *Superoxide modulates the oxidation and nitrosation of thiols by nitric oxide-derived reactive intermediates*, **J. Biol. Chem.**, 272 (1997) 11147-11151.
- [129] D.L. Mattson, C.Y. Maeda, T.D. Bachman and A.W. Cowley, *Inducible nitric oxide synthase and blood pressure*, **Hypertension**, 31 (1998) 15-20.
- [130] L. Raji and C. Baylis, *Glomerular actions of nitric oxide*, **Kidney Int.**, 48 (1995) 20-32.
- [131] X.Z. Zhang and C. Baylis, *Endothelin mediates renal vascular memory of a transient rise in perfusion pressure due to NOS inhibition*, **Am. J. Phys.**, 276 (1999) 629-634.
- [132] J.A. Freischlag, D. Johnson, M.M. Farooq, J. Doty, R.A. Cambria, G.R. Seabreak, and J.B. Tawne, *Cigarette smoke impairs endothelium-dependent relaxation in rabbit superficial femoral veins*, **J. Surg. Res.**, 81 (1999) 77-80.
- [133] B.S. Qiu, C.J. Pfeiffer and C.H. Cho, *Effects of chronic nitric oxide synthase inhibition in cold-restraint and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats*, **Digestion**, 57 (1996) 60-66.
- [134] P.C. Andrews and N.I. Krinsky, *Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase*, **Method Enzymol.**, 132 (1986) 369-370.
- [135] S.J. Klebanoff, A.M. Waltersdorff and H. Rosen, *Anti-microbial activity of myeloperoxidase*, **Method Enzymol.**, 105 (1984) 399-403.
- [136] A.J. Kettle and C.C. Winterbourn, *Superoxide dependent hydroxylation by myeloperoxidase*, **J. Biol. Chem.**, 269 (1994) 17146-17151.
- [137] R.A. Clark and D.W. Pearson, *Inactivation of transferrin iron binding capacity by the neutrophil myeloperoxidase system*, **J. Biol. Chem.**, 264 (1989) 9420-9427.
- [138] S.L. Hazen, R. Zhang, Z. Shen, W. Wu, E.A. Podrez, J.C. MacPherson, D. Schmitt and et al, *Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes*, **Circ. Res.**, 85 (1999) 950-958.

- [139] I.C. Davis, S. Zhu, J.B. Sampson, J.P. Crow, and S. Matalon, *Inhibition of human surfactant protein a function by oxidation intermediates of nitrite*, **Free Radical Biol. Med.**, 33 (2002) 1703-1713.
- [140] A.C. Carr, M.R. McCall and B. Frei, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species reaction pathways and antioxidant protection*, **Arterioscl. Throm. Vas. Biol.**, 20 (2000) 1716-1723.
- [141] P. Williams, H. Lopez, B. Deborah, C. Christine, E. Alan, and H. Rod, *Characterization of renal ischemia/reperfusion injury rat*, **J. Pharmacol. Toxicol. Meth.**, 37 (1997) 1-7.
- [142] N. Sucu, A. Unlu, L. Tamer, B. Aytacıoğlu, B. Coşkun, R. Bilgin, B. Ercan, A. Gul, and et al., *Effects of trimetazidin on tissue damage in kidney after hindlimb ischemia-reperfusion*, **Pharmacol. Res.**, 46 (2002) 345-349.
- [143] P.W. Ludwig and J.R. Hoidal, *Alterations in leukocyte oxidative metabolism in cigarette smokers*, **Am. Rev. Respir. Dis.**, 126 (1982) 977-982.
- [144] D. Lerouet, V.B. Berhat, B. Palmier, M. Plothine, and I. Margail, *Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rat*, **Brain Res.**, 958 (2002) 166-175.
- [145] R. Marti, E. Varela, C. Pascual and R.M. Segura, *Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions*, **Clin. Chim. Acta**, 303 (2001) 117-125.
- [146] N. Linder, J. Rapola and K.O. Raivio, *Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues*, **Lab. Invest.**, 79 (1999) 967-974.
- [147] L.S. Terada, J.A. Leff and J.E. Repine, *Measurement of xanthine oxidase in biological tissues*, **Method. Enzymol.**, 186 (1990) 651-656.
- [148] C.A. Pritsos, *Cellular distribution, metabolism and regulation of xanthine oxidoreductase enzyme system*, **Chem. Biol. Int.**, 129 (2000) 195-208.
- [149] Y. Amaya, K.I. Yamazaki, M. Sato, K. Noda and T. Nishino, T. Nishino, *Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type*, **J. Biol. Chem.**, 265:24 (1990) 14170-14175.
- [150] C. Kisker, H. Schindelin and D.C. Rees, *Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanisms*, **Annu. Rev. Biochem.**, 66 (1997) 233-267.
- [151] M.G. Battelli, E.D. Corte and F. Stirpe, *Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat*, **Biochem J.**, 126 (1972) 747-749.
- [152] W. Waud and K.V. Rajagopalan, *The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O)*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 172 (1976) 365-379.
- [153] C. Lee, X. Liu and J.L. Zweier, *Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite*, **J. Biol. Chem.**, 275 (2000) 9369-9376.
- [154] H.Y. Chung, B.S. Baek, S.H. Song, M.S. Kim, J.I. Huh, K.H. Shim, K.W. Kim and K.H. Lee, *Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress*, **Age**, 20 (1997) 127-140.
- [155] M. Battelli, A. Abbondanza and F. Stirpe, *Effects of hypoxia and ethanol on xanthine oxidase of isolated rat hepatocytes: conversion from D to O form and leakage from cells*, **Chem. Biol. Int.**, 83 (1992) 73-84.
- [156] L.G. Sultatos, *Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in the rat*, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 246:3 (1988) 946-949.
- [157] H.Y. Wang, L. Ma, Y. Li and C.H. Cho, *Exposure to cigarette smoke increases apoptosis in the rat gastric mucosa through a reactive oxygen species-mediated and p53-independent pathway*, **Free Radical Biol. Med.**, 28 (2000) 1125-1131.

- [158] T. Uzbay and S.O. Kayaalp, *A modified liquid diet of chronic ethanol administration : validation by ethanol withdrawal syndrome in rats*, **Pharmacol. Res.**, 31 (1995) 37-42.
- [159] B. Zhu, Y. Sun, R.E. Sivers, J.L. Shuman, S.A. Glents, K. Chatterjec, and et al., *L-arginine decreases infarct size in rats exposed to environmental tobacco smoke*, **Am. Heart J.**, 132 (1996) 91-100.
- [160] G.L. Ellman, *Tissue sulphydryl groups*, **Arch. Biochem. Biophys.**, 82 (1959) 70-77.
- [161] H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi, *Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction*, **Anal. Biochem.**, 95 (1979) 351-358.
- [162] N.K. Cortas and N.W. Wakid, *Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method*, **Clin. Chem.**, 36 (1990) 1440-1443.
- [163] J.A. Navarro-Gonzalves, C. Garcia-Benayas and J. Arenas, *Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids*, **Clin. Chem.**, 44 (1998) 679-681.
- [164] H. Wei and K. Frenkel, *In vivo formation of oxidized DNA bases tumor promoter-treated mouse skin*, **Cancer Res.**, 51 (1991) 4443-4449.
- [165] R. Eisenthal, and M.J. Danson, *Enzyme assays*, Oxford University Press, 1998, 330.
- [166] N. Prajda and G. Weber, *Malign transformation linked imbalance decreased XO activity in hepatomas*, **FEBS Lett.**, 59 (1975) 245-249.
- [167] C.M. Macdonald, J. Dow and M.R. Moore, *A possible protective role for sulphydryl compounds in acute alcoholic liver injury*, **Biochem. Pharmacol.**, 26 (1977) 1529-1531.
- [168] S.M. Somani, K. Husain, L.D. Phillips, D.J. Lanzotti, K.R. Kareti and G.L. Trammell, *Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat*, **Alcohol**, 13 (1996) 603-610.
- [169] R.B. Scott, K.S. Reddy, K. Husain, E.C. Schlorff, L.P. Rybak and S.M. Somani, *Dose response ethanol on antioxidant defense system of liver, lung, and kidney in rat*, **Pathophysiology**, 7 (2000) 25-32.
- [170] A. Abbondanza, M.G. Battelli, M. Soffritti and C. Cessi, *Xanthine oxidase status in ethanol-intoxicated rat liver*, **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 13 (1989) 841-844.
- [171] M. Van De Castele, Z. Zaman, M. Zeegers, R. Servaes, J. Fevery and F. Nevens, *Blood antioxidant levels in patients with alcoholic liver disease correlate with the degree of liver impairment and are not specific to alcoholic liver injury itself*, **Aliment. Pharm. Therap.**, 16 (2002) 985-992.
- [172] S. Kaleli, M. Ay, O. Çağlayan, A. Akkaya ve F. Gültekin, *Sigara içen ve içmeyen kişilerde serum lipid peroksid ve lipid parametrelerinin karşılaştırılması*, **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 3 (1996) 17-19.
- [173] S. Kaleli, M. Ay, O. Çağlayan, H. Vural ve M. Aköz, *Sigara içen ve içmeyen sağlıklı kişilerde eritrosit lipid peroksiti, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinin araştırılması*, **S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.**, 3 (1996) 63-65.
- [174] J.D. Morrow, B. Frei, A.W. Longmire, J.M. Gaziano, S.M. Lynch, Y. Shyr, W.E. Strauss and et al., *Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers*, **New Engl. J. Med.**, 332 (1995) 1198-1203.
- [175] P. Rust, P. Lehner and I. Elmadfa, *Relationship dietary intake, antioxidant status and smoking habits in female Austrian smokers*, **Eur. J. Nutr.**, 40 (2001) 78-83.
- [176] F.W.F. Park, A.W. Cowley and D.L. Mattson, *Quantification of nitric oxide synthase activity in microdissected segments of the rat kidney*, **Am. J. Phys.**, 276 (1999) 874-881.

- [177] M.L. Adams, and T.J. Cicero, *Alcohol intoxication and withdrawal: the role of nitric oxide*, **Alcohol**, 16 (1998) 153-158.
- [178] V. Fataccioli, M. Gentil, R. Nordmann and H. Rouach, *Inactivation of cerebellar nitric oxide synthase by ethanol in vitro*, **Alcohol Alcohol.**, 32 (1997) 683-691.
- [179] X. Zhao, O. Jie, H. Li, J. Xie, T.D. Giles and S.S. Greenberg, *Ethanol inhibits inducible nitric oxide synthase transcription and post-transcriptional processes in vivo*, **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 21 (1997) 1246-1256.
- [180] J.M. Halimi, C. Philippon and A. Mimran, *Contrasting renal effects of nicotine in smokers and non-smokers*, **Nephrol. Dial. Transpl.**, 13 (1998) 940-944.
- [181] T. Masahiko, A. Akira, K. Emiko, S. Eisuke, S. Mitsuo and I. Masayasu, *Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma*, **Circulation**, 105 (2002) 1155-1157.
- [182] D.J. Higman, R.M. Greenhalgh and J.T. Powell, *Smoking impairs endothelium dependent relaxation of saphanous vein*, **Brit. J. Surg.**, 80 (1993) 1242-1245.
- [183] K. Kugiyama, H. Yasue, M. Ohgusi, T. Motoyama, H. Kawano, Y. Inobe and O. Hirashima, *Deficiency in nitric oxide bioactivity in epicardial coronary arteries of cigarette smokers*, **J. Am. Coll. Cardiol.**, 28 (1996) 1161-1167.
- [184] D. Salvemini, D.P. Riley, P.J. Lennon, Z.Q. Wang, M.G. Currie, H. Macarthur and T.P. Misko, *Protective effects of a superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite decomposition catalysts in endotoxin-induced intestinal damage*, **Brit. J. Pharmacol.**, 127 (1999) 685-692.
- [185] B.D. Latscha and V.W. Sarsat, *Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure*, **Kidney Int.**, 59 (2001) 108-113.
- [186] S.L. Hazen and J.W. Heinecke, *3-Chlotrotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from atherosclerotic intima*, **J. Clin. Invest.**, 99 (1997) 2075-2081.
- [187] B.M. Altura, A. Gebrewold, A. Zhang and B.T. Altura, *Role of leukocytes in ethanol induced microvascular injury in the rat brain in situ: potential role in alcohol brain pathology and stroke*, **Eur. J. Pharmacol.**, 448 (2002) 89-94.
- [188] L.M. Hillegas, D.E. Griswold, B. Brickson and C.A. Winslow, *Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney*, **J. Pharmacol. Method.**, 24 (1990) 285-295.
- [189] S. Cuzzocrea, E. Mazzon, L. Dugo, I. Serraino, R. Paola, D. Britti, A. Sarro, S. Pierpaoli, and et al., *A role for superoxide gentamicin mediated nephropathy in rats*, **Eur. J. Pharmacol.**, 450 (2002) 67-76.
- [190] H. Nguyen, E. Finkelstein, A. Reznick, C. Cross and A. Vliett, *Cigarette smoke impairs neutrophil respiratory burst activation by aldehyde-induced thiol modifications*, **Toxicology**, 160 (2001) 207-217.
- [191] K.M. Braun, T. Cornish, A. Valm, J. Cundiff, J.L. Pauly and S. Fan, *Immunotoxicology of cigarette smoke condensates: suppression macrophage responsiveness to interferon γ* , **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 149 (1998) 136-143.
- [192] W.G. Siems, E. Capuozzo, D. Verginelli, C. Salerno, C. Crifo and C. Grüne, *Inhibition of NADPH-oxidase mediated superoxide radical formation in PMA stimulated human neutrophils by 4-hydroxynonenal binding to -SH and -NH₂ groups*, **Free Rad. Res.**, 27 (1997) 353-358.
- [193] A. Haberland, T. Rootwelt, O.D. Saugstad and I. Schimke, *Modulation of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase ratio by reaction of malondialdehyde with NH₂-groups*, **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, 32 (1994) 267-272.

- [194] T. Zima, L. Novak and S. Stipek, *Plasma xanthine oxidase level and alcohol administration*, **Alcohol Alcohol.**, 28 (1993) 693-694,
- [195] G. Deliconstantinos and V. Villiotou, *Gas phase oxidants of cigarette smoke increase nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of rabbit brain synaptosomes*, **Neurochem. Res.**, 25 (2000) 769-774.
- [196] W. Gwinner, J. Plasger, R.P. Brandes, B. Kubat, M. Schulze, H. Regele, D. Kerjaschki and et al, *Role of xanthine oxidase in passive Heymann nephritis in rats*, **J. Am. Soc. Nephrol.**, 10 (1999) 538-544.
- [197] M. Muxfeld and V. Schaper, *The activity of xanthine oxidase in heart of pigs, rabbit, rats and humans*, **Basic Res. Cardiol.**, 82 (1987) 486-492.
- [198] JYC, Chow, L. Ma, C.H. Cho, *Involvement of free radicals and histamine in the potentiating action of cigarette smoke exposure on ethanol-induced gastric mucosal damage in rats*, **Free Radical Biol. Med.**, 24 (1998) 1285-1293.
- [199] H.M. Abu-soud and S.L. Hazen, *Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases*, **J. Biol. Chem.**, 275 (2000) 37524-37532.
- [200] S. Sakuma, Y. Fujimoto, Y. Sakamoto, T. Uchiyama, K. Yoshioka, H. Nishida and T. Fujita, *Peroxynitrite induces the conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in rabbit liver*, **Biochem. Bioph. Res. Co.**, 230 (1997) 476-479.



ÖZGEÇMİŞ

20.06.1972 tarihinde Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kayseri’de tamamladıktan sonra 1990 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 1994 yılında aynı bölümden mezun oldu. 1995 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı. Aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladı. 1998 yılında yüksek lisansını tamamlayarak Bilim Uzmanı oldu. Yine aynı yıl İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktoraya başladı.

