



T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

**RATLARDA DENEYSEL OLUŞTURULAN TIKANMA
SARILIĞINDA OLUŞAN BÖBREK YETMEZLİĞİNDE;
DİLTİAZEM, ENALAPRİL VE E VİTAMİNİNİN BÖBREK
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

DR. HAKKI ÇOŞKUN
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

SIVAS
2019



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA DENEYSEL OLUŞTURULAN TIKANMA
SARILIĞINDA OLUŞAN BÖBREK YETMEZLİĞİNDE;
DİLTİAZEM, ENALAPRİL VE E VİTAMİNİNİN BÖBREK
FONKSİYONLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

**DR. HAKKI ÇOŞKUN
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**DOÇ. DR. SİNAN SOYLU
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ**

**SIVAS
2019**

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalı'nda uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. Namık ÖZKAN

Üye: Doç. Dr. Atilla KURT

Üye: Doç. Dr. Sinan SOYLU (Danışman)

Bu tez,tarih vesayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. İlhan ÇETİN
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkıda bulunan danışman hocalarım Doç. Dr. Sinan SOYLU ve Doç. Dr. Atilla KURT'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, değerli hocalarım Prof. Dr. Ö. TOPÇU, Prof. Dr. E. KİSLİ, Prof. Dr. C. YILDIRIR, Prof. Dr. M. ŞEN'e;

Tez çalışmam sırasında tecrübe ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Biyokimya Anabilim Dalından Dr.Öğr.Üyesi Halef Okan DOĞAN'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Dr.Öğr.Üyesi Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN'a, biyoistatistik uzmanı Dr. Selim ÇAM'a ve hayvan deneyi laboratuvarı çalışanlarına;

Uzmanlık eğitimim boyunca cerrahinin yoğun çalışma şartlarında yardımlarını esirgemeyen Asistan arkadaşlarıma, Cerrahi servisimizin kıymetli hemşirelerine, Ameliyathane hemşire, personel ve çalışanlarına;

Eğitim hayatım boyunca maddi, manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime;

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her konuda destek olan sevgili eşime;

Varlığıyla bütün zorlukları kolaylaştıran canım oğluma;

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr.Hakkı ÇOŞKUN

ÖZET

Amaç. Tıkanma ikteri nedeniyle oluşan renal hasarın mekanizmasının ortaya koyulması ve tedavide yeni alternatiflerin geliştirilmesi klinik açıdan önemlidir. Bu nedenle yaptığımız bu çalışmada ratlarda tıkanma ikteri modeli kullanılarak, ikter sonrası oluşacak böbrek hasarını önlemede; efferent arteriola etkili enalapril, afferent arteriola etkili diltiazem ve antioksidan olan E vitamininin etkisini araştırmayı hedefledik.

Materyal-method. Çalışmada 56 adet Wistar albino dişi ratlar rastgele ayrılarak 7 ayrı grup oluşturuldu (kontrol, sham, enalapril, diltiazem, E vitamini, diltiazem+E vitamini, enalapril+E vitamini). Çalışma gruplarında laparotomi yapıldıktan sonra koledok bağlanarak tıkanma sarılığı oluşturuldu. Kontrol grubunda ise sadece laparotomi yapıldı, koledok bağlanmadan batin kapatıldı. Gruplara 7 gün boyunca 30 mg/kg/gün diltiazem, 10mg/kg/gün enalapril ve 50mg/kg/gün E vitamini verildi. Ratlardan 3. ve 7. gün kan alınarak simetrik dimetil arjinin (SDMA) ve kreatinin düzeyleri çalışıldı. 7. günün sonunda sakrifiye edilerek böbrek dokuları histopatoloji için alındı. Gruplardan elde edilen patoloji örneklerine H&E boyama ile patolojik skorlama yapıldı. İmmunhistokimyasal boyama ile endotelin 1(ET1) düzeyi semikantitatif skorlama yapılarak değerlendirildi.

Bulgular. Histopatolojik skor, SDMA, kreatinin ve endotelin 1 sonuçları açısından bakıldığında tedavi gruplarında en iyi sonuç enalapril+ E vitamini grubunda, en kötü sonuç E vitamini grubunda ve iyiden kötüye doğru sırasıyla diltiazem+E vitamini, enalapril ve diltiazem gruplarında bulundu.

Sonuçlar. Çalışmamızın sonucunda E vitamini ile kombine edilen enalapril'in hem histolojik olarak hem de biyokimyasal olarak sinerjik etki oluşturarak bilirubin yüksekliğine bağlı gelişen renal hasarı azalttığını tespit ettik.

Anahtar Kelimeler. tıkanma sarılığı, diltiazem, enalapril, E vitamini, kreatinin, Simetrik dimetil arjinin, endotelin-1, safra nefropatisi

ABSTRACT

Aim. It is clinically important to establish the mechanism of renal damage caused by obstructive jaundice and to develop new alternatives in treatment. In this study, obstructive icter model was used in rats. We aimed to investigate the effects of enalapril which is effective on efferent arterioli, diltiazem which is effective on afferent arterioli and vitamin E which is an antioxidant to prevent renal damage after obstruction.

Material Methods. In this study, 56 Wistar albino female rats were randomly divided into 7 groups (control, sham, enalapril, diltiazem, E vitamin, diltiazem+E vitamin, enalapril+E vitamin). After laparotomy in the study groups, bile duct ligation was performed and obstructive jaundice was formed. In the control group, only laparotomy was performed and the abdomen was closed before ligation of the common bile duct. Diltiazem 30 mg / kg / day, enalapril 10 mg / kg / day and vitamin E 50 mg / kg / day were given to the study groups for 7 days. Blood was taken from the rats on the 3rd and 7th days and their creatinine and symmetric dimethylarginine (SDMA) levels were studied. At the end of the 7th day, rats were sacrificed and kidney tissues were taken for histopathology. Pathological scoring was performed by H&E staining. Endothelin 1 (ET1) levels were evaluated by immunohistochemical staining by semiquantitative scoring.

Results. When the histopathological score, creatinine and endothelin 1 results were evaluated, the best results were found in the enalapril + vitamin E group, the worst result in the vitamin E group and diltiazem + vitamin E, enalapril and diltiazem groups, respectively.

Conclusion. As a result of this study, we found that enalapril combined with vitamin E reduces renal damage due to bilirubin elevation both histologically and biochemically.

Key words. obstructive jaundice, diltiazem, enalapril, E vitamin, creatinine, symmetric dimethylarginine, endothelin-1, bile cast nephropathy.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
GRAFİKLER LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ.....	xi
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI.....	2
2.1.1. Böbreğin Temel Fonksiyonları:.....	3
2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ(SOR) VE BÖBREK.....	4
2.3. SERBEST RADİKALLER	4
2.3.1. Serbest Radikallerin Etkileri.....	6
2.3.2. Membran Lipitlerine Etkileri.....	6
2.3.3. Proteinlere Etkileri.....	7
2.3.4. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri.....	7
2.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI.....	7
2.5. TIKANMA SARILIĞI.....	8
2.5.1. Tıkanma Sarılığı Fizyopatolojisi	8
2.5.2. Tıkanma Sarılığında Biyokimyasal Parametreler:.....	8
2.6. ENALAPRİL.....	9
2.7. DİLTİAZEM	10
2.8. E VİTAMİNİ.....	11
2.9.ENDOTELİN 1:.....	12
3. MATERYAL - METOD.....	13
3.1. CERRAHİ PROSEDÜR:	14
3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	18
3.2.1. Işık Mikroskopi	18
3.2.2. İmmünofloresan Boyama Protokolü.....	18
3.3. BİYOKİMYASAL İNCELEME.....	20

3.4. İSTATİKSEL İNCELEME.....	20
4. BULGULAR.....	22
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	22
4.2. İSTATİKSEL BULGULAR	32
5. TARTIŞMA – SONUÇ	40
KAYNAKLAR	42



KISALTMALAR

ATN	: akut tübüler nekroz
GFR	: glomerüler filtrasyon hızı
cm	: santimetre
gr	: gram
mg	: miligram
kg	: kilogram
mmHg	: milimetre civa
SOR	: serbest oksijen radikalleri
SOD	: süperoksit dismutaz
H₂O₂	: hidrojen peroksit
Fe	: demir
ALT	: alanin aminotransferaz
AST	: aspartat aminotransferaz
GGT	: gama glutamil transferaz
ADE	: anjyotensin dönüştürücü enzim
C_{max}	: plazma pik konsantrasyonu
O₂⁻	: süperoksit radikali
ET-1	: endotelin-1
H&E	: hemotoksilen-eozin
SDMA	: Simetrik dimetil arjinin

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Böbrek Hasarının H&E Boyamaya Göre Skorlama Tablosu	18
Tablo 2: Endotelin-1 İmmünreaktivite Skorlama Tablosu	20
Tablo 3: H&E Boyamaya Göre Böbrek Cisimciğinin Düzeni, Glomerül Büyüklüğü, Bowman Aralığı, Proksimal Tübül, Distal Tübül Ve Kanama Oranına ve Endotelin-1'e Göre Semi-Kantitatif Skorlama Tablosu	22
Tablo 4: Toplam histopatolojik skor İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları	33
Tablo 5: 3. Gün Kreatinin Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları	34
Tablo 6: 7. Gün Kreatinin Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları	35
Tablo 7: 3. Gün SDMA Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları ...	36
Tablo 8: 7. Gün SDMA Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları ...	37
Tablo 9 : Gruplardan elde edilen immunhistokimyasal değerlendirme ile Endotelin 1 sonuçları	39

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1: Toplam histopatolojik skor grafiği.....	33
Grafik 2: Graplardan elde edilen 3. ve 7. gün kreatinin deđer grafiği	35
Grafik 3: Graplardan elde edilen 3. ve 7. gün SDMA deđer grafiği.....	37
Grafik 4: Endotelin 1 grafiği	39



RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Ksifoid altından orta hatta yapılan insizyon	15
Resim 2: mide-pilor takip edilerek duodenumun bulunması ve duodenumun öne-aşağı çekilerek koledok'un bulunması	15
Resim 3: koledok'un posteriordan görünüşü	16
Resim 4: koledok'un askıya alınması	16
Resim 5: Koledok'un 4/0 ipekle askıya alınması ve bağlanması.....	17
Resim 6: Koledok'un bağlanıp kesilmesi	17
Resim 7: Grupların 40x Endotelin 1 cy3 lokalizasyonunu gösteren immünfloran boyama	24
Resim 8: Kontrol grubu böbrek dokusu H&E 10X.....	25
Resim 9: Kontrol grubu böbrek dokusu H&E 40x.....	25
Resim 10: Sham grubu böbrek dokusu H&E 10x.....	26
Resim11: Sham grubu böbrek dokusu H&E 40x:.....	26
Resim 12: E Vitamini Grubu (10x):.....	27
Resim 13: E Vitamini Grubu (40x):.....	27
Resim 14: Enalapril Grubu (10x):.....	28
Resim 15: Enalapril Grubu (40x):.....	28
Resim 16: Diltiazem Grubu (10x):	29
Resim 17: Diltiazem Grubu (40x):.....	29
Resim 18: Enalapril + E Vitamini Grubu (10x):.....	30
Resim 19: Enalapril + E Vitamini Grubu (40x):.....	30
Resim 20: Diltiazem + E Vitamini Grubu (10x):.....	31
Resim 21: Diltiazem + E Vitamini Grubu (40x):.....	31

1.GİRİŞ

Tıkanma sarılığı nedeni ile oluşan akut böbrek yetmezliği, hastalığın fizyopatolojisi ve tedavisi hala klinik önemini koruyan, ciddi bir tablodur. Safra akımında meydana gelen obstrüksiyonun fizyopatolojik etkileri, temeldeki etyolojiden bağımsız olarak iki genel sonucu ortaya çıkarmaktadır. Bunlar safranin bağırsağa geçememesi ve bunun sonucunda sistemik dolaşıma katılmasıdır.

Bilier ağacın obstrüksiyonu ve safra akışının engellenmesi başta safra tuzları ve bilirubin olmak üzere birçok sistemik toksik etkisi olan maddenin birikimine yol açmaktadır (1). Bu sistemik toksik etkilerin görüldüğü organlardan biri de böbreklerdir. Birçok klinik çalışmada tıkanma sarılığı ile birlikte renal fonksiyon bozukluğu insidansında artış olduğu gösterilmiştir (2,3). Tıkanma sarılığı ile böbrek yetmezliği arasındaki ilişki daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olmasına rağmen (2,5) tam olarak insidansı ve altta yatan patoloji açığa kavuşturulamamıştır (6). Altta yatan patolojiler ile ilgili etkili olan faktörler; renal iskemi (7), bilirubin ve safra tuzu toksisitesi (8), endotoksemi (9,10), azalmış retiküloendotelial aktivite (11), myokard depresyonudur (12). Tıkanma sarılıklı hastaların yaklaşık %8'inde akut tübüler nekroz (ATN) görülmektedir (6). Mekanizma multifaktöryeldir; azalmış kardiyak output, azalmış periferel vazokonstrüksiyon, hipovolemi, renal vazokonstrüksiyonun artması glomerül filtrasyon hızını azaltır (14).

Bu çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel tıkanma sarılığı modelinde böbrek kan akımını artırdığı bilinen; böbrek afferent arteriolünde L tipi Ca^{+2} kanallarına etki ederek dilatasyon yapan ve böylelikle GFR yi artıran Ca^{+2} kanal blokörü olan diltiazem, afferent arteriol ile birlikte daha çok efferent arteriolde dilatasyon yaparak GFR yi artıran ACE inhibitörü olan enalapril(15) ve moleküler-hücresele etkileri; zarlara veya proteinlere zarar vermelerini önlemek amacıyla spesifik olarak reaktif oksijen türlerini ve nitrik oksiti temizlemek, sadece bir antioksidan olarak etki etmek(4) ya da spesifik enzimler ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek ve onları düzenleyerek, zarlar ve lipit kısımları gibi hücresele yapıları korumak (8) olan E vitamini kullanımının ratlardaki bozulmuş böbrek fonksiyonlarının üzerine etkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. BÖBREĞİN YAPISI VE FONKSİYONLARI

Böbrekler vertebral kolonun her iki tarafında, renal fasianın (Gerota fasiyası) ön ve arka yapraklarının arasındaki retroperitoneal boşlukta yer alan organlardır. Erişkin böbreği 10–14 cm uzunluğunda, 5–7 cm genişliğinde ve 2,5–3 cm kalınlığındadır. Ağırlığı kadınlarda yaklaşık 135 gr, erkeklerde 150 gr'dır. Her böbreğin medial kesiminde renal hilus denilen ve içinden renal arter, renal ven, renal pelvis, üreter, lenfatik ve sinirlerin geçtiği bir yapı bulunur. Renal hilus içinde renal arterler ve sinirler girerken, renal venler, lenfatikler ve üreter böbreği buradan terkeder. Her bir böbrek aortadan köken alan renal arterler ile kanlanır. Böbreğin kan akımı normalde kalp debisinin %22'si kadar veya yaklaşık dakikada 1100 ml'dir. Renal arter hilustan böbreğe girdikten sonra önce interlobar daha sonra arkuat arterlere ayrılır. Arkuat arterlerden dik olarak interlobüler arterler çıkar. Bu arterlerden glomerüle giden afferent arterioller köken alır. Glomerülü oluşturan kapillerler birleşerek efferent arteriollerini oluşturur. Efferent arterioller daha sonra dallanarak tübülüsleri saran, böbrekteki 2. kapiller ağ sistemi olan peritübüler kapiller ağ oluşturur. Peritübüler kapillerlerden gelen kan venöz sisteme dökülür. Oradan sırası ile arteriyel sistemle paralel olarak interlobüler ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal veni takip eder. Renal venler vena kava inferiora drene olurlar(16).

Böbrek sagittal olarak kesildiğinde dışta korteks, içte medulla olmak üzere 2 kısımdan oluşur. Medulla, medüller piramit ismi verilen 10–18 adet piramidal yapıdan oluşur. Piramitlerin tabanları kortikomedüller bölgede bulunurken, tepe kısımları kaliks içine kadar uzanır. Kaliks içine açılan bu kısımlara papilla ismi verilir. Korteks böbreğin dış kısmının yanı sıra medüller piramitler arasında da yer alır ve bu kısma Bertini'nin böbrek kolonları denir(16). Böbrekte idrar oluşumunu sağlayan en küçük yapısal ve anatomik birim nefrondur. Her bir böbrekte, her birinin idrar yapabilme fonksiyonu olan yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Gelişimini tamamlayan bir böbrekte yeni nefron yapılamaz. Bu nedenle yaşlanma, böbrek hastalıkları veya travma nedeniyle kaybedilen nefronların yerine yenileri yapılamaz. Yaşlanma ile %10–40 arasında nefron kaybedilir ama geride kalan nefronlar bu eksikliği kompanse edebilir(16). Her bir nefron sıvının kandan filtre edildiği bir glomerül ve filtre edilmiş sıvının sonunda idrara

dönüştüğü uzun ve yer yer kıvrıntılı tübülden oluşur. Glomerül, diğer kapiller ağlar ile karşılaştırıldığında, daha yüksek hidrostatik basınca (60 mmHg kadar) sahip, dallanan ve anastomoz yapan kapiller bir ağdan oluşmuştur. Glomerül kapillerleri, epitel hücreleri ile örtülmüştür ve tüm glomerül Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Tübülüsler ise filtre edilen sıvının idrara dönüştüğü proksimal ve distal tübülsler, Henle kulpu ile toplayıcı kanallardan oluşan kısımdır. Glomerüller, proksimal ve distal tübülsler ve dış korteksteki nefronların Henle kulpları kortekste; toplayıcı kanallar, Henle kulpları ve vasa rectalar medüllada bulunur. Nefronlar böbrek dokusunda ilerledikleri derinliğe göre, kortikal ve jukstaglomerüler olmak üzere 2 tiptir. Glomerülden filtre edilen sıvı sırasıyla proksimal tübül, Henle kulpu, distal tübül ve toplayıcı kanallardan geçer, renal papillaların içinden böbrek pelvisine boşalırlar. Her böbrekte her biri 4000 nefrondan idrar toplayan 250 kadar çok geniş toplayıcı kanal vardır(16). Nefronların temel işlevi istenmeyen maddeleri plazmadan temizlemektir. Bunun için kullanılan mekanizmalar glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorpsiyon ve tübüler sekresyondur. Glomerüler filtrasyon mekanizmasıyla glomerüldeki kanın plazmasının bir bölümü (yaklaşık 1/5'i) glomerüler membrandan filtre edilir. Tübüler reabsorpsiyon ile filtre edilen sıvı, tübüllerde ilerlerken su ve diğer gerekli maddeler reabsorbe edilir. İstenmeyen maddeler geri emilmez ve idrar oluşumuna katkıda bulunur. Tübüler sekresyon ile de plazmadaki bazı maddeler tübülleri döşeyen epitel hücreleri tarafından doğrudan tübüler sıvı içine sekrete edilir(16, 17).

2.1.1. Böbreğin Temel Fonksiyonları:

1) Ekskretuar fonksiyonlar;

- İdrar oluşumu, artık maddelerin eliminasyonu: Metabolik artık maddeler (üre, ürik asit gibi), Ekzojen maddeler (ilaçlar, toksinler ve metabolitleri).
- Su dengesinin korunması: Total vücut suyunun korunması, plasma osmolalitesinin korunması.
- Elektrolit ve asit baz dengesinin korunması: Sodyum, klorür, kalsiyum, fosfat, potasyum, magnezyum ve asit-baz dengesinin korunması.

2) Metabolik Fonksiyonlar

- Hormonlar ve benzeri maddelerin sentezi: Renin, D vitamini, eritropoetin, prostoglandinler, kallikrein-kinin, büyüme faktörleri.
- Peptid yapılı hormonların yıkımı ve katabolizması: İnsülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin, gastrointestinal hormonlar.
- Düşük molekül ağırlıklı proteinlerin katabolizması: Hafif zincirler, mikroglobulin.
- Diğer metabolik fonksiyonlar: Glukoneogenez, lipid metabolizması(16).

2.2. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ(SOR) VE BÖBREK

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında serbest oksijen radikallerinin, İ/R hasarı ve böbrek allogreft rejeksiyon patogeneğinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Siklosporin gibi immünsupresif ilaçlar, nitrik oksit inhibisyonu aracılığıyla dolaylı vazokonstriksiyon etki göstererek böbrekte oksidatif strese yol açarlar. Böbrek İ/R ve nefrotoksisite sırasında SOR üretiminde yer alan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılammıştır. Deneysel renal allogreft ve rejeksiyon çalışmalarında Nikotinamid Adenin Dinükleotid Hidroksifosfat (NADPH) ve özellikle ksantin oksiredüktaz faaliyetleri, SOR üretimi bulguları ile birlikte arttığı gösterilmiştir. İ/R ve nefrotoksisite hayvan modellerinde, antioksidan özelliği olan çeşitli ajanların SOR azalttığı ve aynı zamanda antioksidan enzimleri koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.(18).

2.3. SERBEST RADİKALLER

Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden yüklü veya yüksüz olabilen atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Bu bileşikler organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında olduğu gibi, çeşitli dış etkenlerin etkisiyle de oluşabilmektedir. Biyolojik sistemde serbest radikaller en fazla elektron transferi

sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan oksijen radikalleri sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyonlar için gereklidirler(19-22). Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, eşleşmemiş 2 tane elektronu ile biyolojik sistemlerdeki önemli bir serbest radikaldir. Oksijenin bu 2 tane elektronu nedeniyle diğer serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girer.

En önemli serbest oksijen radikalleri; oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikaldir(20-22). Süperoksid radikali (O_2^-) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Süperoksid, zayıf etkili bir serbest radikaldir. Asıl önemi, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali, SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilir.(20, 21, 23) H_2O_2 , süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
 $O_2^- + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ $O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ SOD 10 Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan hidrojen peroksit, dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınır (20, 22, 23).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin dismutasyonu ile olur. Bu reaksiyon, spontan gerçekleşir ya da SOD enzimi tarafından katalizlenir. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak H_2O_2 ve moleküler oksijeni oluştururlar. H_2O_2 bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir oynar. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında oluşan reaksiyon, süperoksit radikalinin varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur(20, 22). Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali büyük olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, karbonhidrat, lipitler ve proteinler gibi moleküller ile reaksiyona girer. Bu yapılarda oksidatif hasara yol açar(19, 22, 24).

2.3.1. Serbest Radikallerin Etkileri

İnsan vücudunda enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı, ozon ve azot dioksit, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisi ile daha fazla serbest oksijen radikali üretilmektedir. Bunun sonucunda, vücuttaki hücre sistemlerinde fonksiyonel, metabolik ve yapısal bozukluklar olur. Bunun sonucunda hücre hasarı ya da ölümü gerçekleşebilir. Serbest radikallerden başlıca lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi hücrenel komponentler etkilenir(20, 25). Süperoksit radikali ve hidroksil radikali sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesiyle membran permeabilitesinde artış olur. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer aminoasit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin ve serbest $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + OH \cdot + O_2^- + H_2O_2 \rightarrow 1O_2 + OH \cdot + OH$ radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır(20, 25).

2.3.2. Membran Lipitlerine Etkileri

Serbest radikallerin en önemli etkisi lipitler üzerine olan etkidir ve lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır. Hücre membranları poliansatüre yağ asitlerinden ve kolesterolden zengin olduğundan dolayı kolaylıkla oksidan radikallerden etkilenirler. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağlarının serbest radikallerle reaksiyona girmesiyle peroksidasyon ürünleri oluşur. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına neden olur(19-22, 24).

2.3.3. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha dirençlidir. Serbest radikallerin proteinlerde yaptığı hasarın büyüklüğü; aminoasit kompozisyonların protein konformasyonuna, aminoasitlerin lokalizasyonuna ve hasar gören proteinin tamir yeteneğine bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein harabiyetinin boyutları değişebilir(19-21, 24).

2.3.4. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri

DNA yapısında oksidatif hasara sebep olan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu, ksantin oksidaz ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna yol açarak direkt hasara veya DNA tamir enzimlerini etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar(19-22, 24).

2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI

Organizmada reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı engellemek için birtakım koruyucu mekanizmalar mevcuttur. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılır. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılırlar. Antioksidanlar, hücrenin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler.

Antioksidanlar farklı şekillerde etki edebilirler. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterirler. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle

dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. A vitamini ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler. Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler. Etkilerini serbest radikallerin oluşturdukları hasarı onararak göstermelerine ise onarıcı etki denir(20).

2.5. TIKANMA SARILIĞI

2.5.1. Tıkanma Sarılığı Fizyopatolojisi

Safra asitleri ve konjuge bilirubin hem iskemik etkiyle, hem de direkt toksik etkiyle tübüler nekroz yapar (27). İdrar atımı, fraksiyonel sodyum ve potasyum atılımı artar (28). Ortak safra yolu bağlanan yani tıkanma sarılığı modeli oluşturulan hayvanlarda 12 gün sonra su alınımında 60%, kreatinin klirensi ve total vücut sıvısında 15%, ekstrasellüler sıvıda 24%, plazma volümünde 15% oranında azalma gösterilmiştir (29). Geçmişte vazoaktif mediatörlerin; renin-anjiyotensin (30,31) ve prostaglandin sentezindeki (26,30) etkileri üzerinde durulurken, son zamanlardaki çalışmalar atrial natriüretik peptid (32), nitrik oksit (33), tromboksan ve endotelin 21 sistemlerinin (34,35) tıkanma sarılığında meydana gelen bozulmuş böbrek fonksiyonlarının patogeneğinde rol oynadığına işaret etmektedir. Bu etkilerini su ve elektrolit değişikliklerine sebep olarak oluşturdukları düşünülmektedir.

2.5.2. Tıkanma Sarılığında Biyokimyasal Parametreler:

Herhangi bir sebeple safra akışında oluşan tıkanıklık sonucu bazı biyokimyasal parametrelerde değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan en belirgin olanları serum total ve direkt bilirubin, alkalin fosfataz (ALP), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve gama glutamil transferaz (GGT) değerleridir. Özellikle malign tıkanıklıklarda bilirubin değerleri progresif olarak artarken, serum transaminazları AST ve ALT normalin 2-3 katı, ALP'da normalin 10 katı kadar artış

izlenebilmektedir. Tıkanma ve kolestatik sarılıklarda da ALT ve AST normalin 3-5 katı kadar yükselebilmektedir.

Gama glutamil transferaz başta böbrek, safra yolları, pankreas, karaciğer, dalak, kalp, beyin ve seminal vezikül olmak üzere birçok dokunun hücre membranında bulunmaktadır(36). Hücre membranından aminoasit geçişi ve lökotrien metabolizmasında yer almaktadır(37,38). Karaciğer hastalıklarında oldukça spesifik ve duyarlı bir enzimdir. Hepatobiliyer fonksiyon bozukluğunu çok iyi yansıtmaktadır. Gama glutamil transferaz karaciğer ve böbrekte yüksek konsantrasyonda bulunur. Hepatoselüler hasarlanmalarda, safra yolu maligniteleri, kolanjit olgularında GGT düzeyleri yüksek seyretmektedir(36,39).

Alkalen fosfataz organizmada birçok dokuda, özellikle kemik, barsak, karaciğer, plasenta ve böbrekte bulunur. Alkalen fosfataz bir enzim değil izoenzim topluluğudur. Normal serumda bulunan alkalen fosfataz karaciğer kaynaklıdır. Kemik ve barsak fraksiyonunun artması bu dokularda yapımın arttığını göstermektedir. Kolestatik sarılıklarda, hepatosellüler yetmezlik olgularından daha da yüksek düzeylere ulaşabilmektedir.

2.6. ENALAPRİL

Enalapril anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörüdür. Enalapril hipertansiyon tedavisi, konjestif kalp yetmezliği, post-miyokard infarktüsü, konjestif kalp yetmezliği gibi endikasyonlar için kullanılır (40). Enalapril'in kendisi zayıf bir ADE inhibitörüdür ama karaciğerde aktif metaboliti olana enalaprilata dönüşür. Enalaprilat ADE inhibitörü olan enalaprilden 10-20 kat daha etkindir. Enalapril genellikle tek doz uygulamadan sonra daha 24 saat etkilidir. Enalaprilin tek doz alımında kan basıncında azalma 0,5-4 saat içinde gerçekleşir ve bu durum 12- 24 saat arası sürer. Aktif metabolitin yarılanma süresi 30-50 saattir (40). Enalapril diğer ADE inhibitörleri gibi hipertansif hastaların tedavisinde kalsiyum kanal veya beta-adrenoseptör antagonistlerine göre inme, pnömoni riskini azaltan ADE inhibitörüdür (40). Enalaprilin oral formu plazma düzeyinde 30-90 dakika içinde emilimi gerçekleşir. Aktif metabolitin plazma düzeyinde 3-4 saat içinde emilimi gerçekleşmektedir. Atılım

hem enalapril hem de enalaprilat için başlıca böbrekler yoluylaadır. Enalaprilat sirkülasyondan hemodiyalizle uzaklaştırılabilir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin olumsuz etkileri öksürük, döküntü, eozinofili, anemi ve trombosit değerlerinde azalmazdır. Ayrıca bu ajanlar hipotansiyon, taşikardi, anjina, perikardite neden olabilir. Diğer ortak yan etkiler hiperkalemi, hipertermi, hipoglisemi, hiponatremi, insülin duyarlılığı ve çinko eksikliği bulunmaktadır (40).

Enalapril maleatın etki mekanizması, anjiotensin I'in kuvvetli bir vazokonstriktör olan, aldosteron salımını uyaran, anjiotensin II'ye dönüşümünü sağlayan, anjiotensin dönüştürücü enzimi (ADE) inhibe etmesine dayanmaktadır. ADE'in inhibisyonu plazma anjiyotensin II düzeyini düşürerek vazopresör aktivitenin ve aldosteron sekresyonunun azalmasına neden olur. Normal dozlarda hastaların büyük kısmında antihipertansif etki 24 saate kadar devam edebilir. Ancak maksimum terapötik etkiye birkaç hafta sonra ulaşılabilir (41).

2.7. DİLTİAZEM

Diltiazem, benzodiazepin türevi bir kalsiyum kanal blokeridir. Angina pectoris, hipertansiyon ve supraventriküler aritmilerin tedavisinde kullanılır. Arteriyollerde damar tonüsü ve periferik damar rezistansını azaltarak vazodilatasyona yol açar ve antihipertansif etki gösterir(42,43). Diltiazem yavaş kalsiyum kanallarını inhibe ederek vasküler düz kas ve miyokard hücrelerine kalsiyum girişini engeller; böylece koroner ve periferik arteriyollerdeki tonusu azaltır(43,44). Diltiazem'in yan etkileri genellikle iyi tolere edilebilir ve yan etki insidansı %2'den azdır. En çok rastlanan yan etkiler Diltiazem'in vazodilatör etkilerinden kaynaklanan etkilerdir ve bunlar yüz damarlarındaki genişlemeyle oluşan yüzde kızarıklık (flushing), baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, sinüs bradikardisi, konstipasyon, birinci derece A-V bloğu, ayak bileği ödemi, hipotansiyondur. Diltiazem oral alımdan sonra hemen hemen tamamen absorbe olur. Diltiazem önemli derecede ilk geçiş metabolizmasına uğrar ve oral biyoyararlanımı yalnızca %40 civarındadır. Hızlı salınım yapan formülasyonlarında plazma pik konsantrasyonuna (Cmax) 1,5 saatte ulaşır. Diltiazem %80-90 civarında plazma proteinlerine ve genellikle de albumine bağlanır. Diltiazem büyük oranda CYP3A4 enzimi tarafından metabolize edilir. Diltiazem'in %70'i idrarla, %17'si feçesle

atılır. Diltiazem'in ortalama yarılanma ömrü 4,5 saattir (2 saat ile 11 saat arasında değişmektedir). Diltiazem diğer ilaçlarla birlikte oral uygulandığında, metabolizması inhibe olabilir ve eliminasyonu uzayabilir ve bundan dolayı da Diltiazem ve metabolitleri vücutta birikebilir(43, 45).

2.8. E VİTAMİNİ

E vitamini terimi, sadece bitkiler tarafından üretilen ve benzer yapılara sahip olan 8 farklı vitamin formunu kapsamaktadır. Bunlar trimetil (α), dimetil (β veya γ) ve monometil (δ) tokoferol ve her birine karşılık gelen tokotrienollerdir(46). E vitamini diyetle alındıktan sonra bağırsak hücreleri tarafından emilir ve şilomikronlar içinde dolaşıma salınırlar. Vitaminler şilomikron artıkları vasıtasıyla karaciğere ulaşır. Karaciğerde spesifik bir protein olan α -tokoferol transfer protein, seçici olarak α -tokoferol'u hedefler ve onu çok düşük dansiteli lipoproteinler içine taşır. α -Tokoferol haricindeki diğer tokoferoller ve tokotrienoller karaciğer tarafından alikonularak safra ve idrar yoluyla karboksietil-hidroksikromanlar halinde atılırlar(48). α -Tokotrienol yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu normal hücrel reaksiyonlara müdahale ettiği için, yüksek yapılı organizmalarda sadece α -tokoferol kullanılır(47).

E vitamini Buğday tohumu yağı, Ay çekirdeği, Badem, Ayçiçek yağı, Fındık, Yer fıstığı, Mısır yağı, Brokoli, Soya yağı, Kivi, Mango, Domates, Ispanakta bol miktarda bulunur.

Vitaminler, su ve lipit hücre bileşenlerini oksidatif reaksiyonlar sırasında üretilen reaktif oksijen radikallerinin saldırısından direkt olarak korurlar veya süperoksit dismutaz/ glutatyon peroksidaz sistemi tarafından bu radikallerin eliminasyonu arttırılır(51). Günümüzde E vitamininin moleküler ve hücrel etkileri; zarlara veya proteinlere zarar vermelerini önlemek amacıyla spesifik olarak reaktif oksijen türlerini ve nitrik oksiti temizlemek, sadece bir antioksidan olarak etki etmek(52) ya da spesifik enzimler ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek ve onları düzenleyerek, zarlar ve lipit kısımları gibi hücrel yapıları korumak (53) şeklinde açıklanmıştır.

E vitamininin en önemli etkisi doku rejenerasyonudur(56). E vitamini büyüme, üreme, çeşitli hastalıkların önlenmesi ve dokuların bütünlüğünün korunması gibi vücut

fonksiyonları için gereklidir. E vitamini ile ilgili yoğun araştırmalar, serbest radikal kaynaklı doku hasarını ve sonuç olarak bazı dejeneratif ve yangısal hastalıkların gelişimini önleyebilen ya da geciktirebilen bir antioksidan olarak E vitamininin güçlü rolünü göstermiştir(55).

Her ne kadar tıkanma ikterinde gelişen nefropatinin patofizyolojisi net olarak tespit edilmemişse de safra tuzlarının nefronlarda çökmesi ve tübüler obstrüksiyona neden olduğu düşünülmektedir. Bir diğeri suçlanan mekanizma da ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ile renal hücrelerde hasar oluşmasıdır.(49,50,54) Bu çalışmada E vitamini verilerek tıkanma ikterinde ortaya çıkan nefropati üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmak istenmiştir.

2.9.ENDOTELİN 1:

Endotelin (ET) -1, hem normal böbrek fizyolojisi hem de patolojiyle yakından dahil olan pro-inflamatuar, mitojenik ve pro-fibrotik özelliklere sahip güçlü bir vazokonstriktör peptiddir. ET-1, kortikal ve medüller damarların daralması, mezanjiyal hücre kasılması, hücre dışı matris üretiminin uyarılması ve toplama kanalı boyunca sodyum ve su geri emiliminin inhibisyonu dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik etkiler gösterir. Yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar ET sisteminin bir dizi böbrek bozukluğuna karıştığını göstermektedir(57). Bunlar, diyabetik ve hipertansif nefropati, glomerülonefrit dahil, ilerleyici glomerüler ve tubulointerstisyel fibroz ile ilişkili kronik proteinürik durumları içerir. Ek olarak, ET-1, akut iskemik böbrek yetmezliği, kalsinörin inhibitörü toksisitesi, endotoksemi, hepatorenal sendrom ve diğeri dahil olmak üzere artmış renal vasküler direnç ile karakterize edilen renal bozukluklara nedensel olarak bağlıdır(58). Ayrıca, ET sisteminin bozulması, uygun olmayan sodyum ve su tutma ile ilişkili koşullara dahil olabilir.

3. MATERYAL - METOD

Bu deneysel çalışma, T.C Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 65202830-050.04.04-244 sayı ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi izinleri alınarak, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analizler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi biyokimya anabilim dalında gerçekleştirilmiştir

Çalışmamızda; genç erişkin 24-26 haftalık, 200-220 gram ağırlığında 56 adet Dişi Wistar albino rat kullanıldı. Ratlar rastgele olarak her bir grupta 8 rat olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Deney öncesinde ve deney süresince her hayvan ortalama 22°C sıcaklıkta, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlıkta, standart laboratuvar yemi ve suya rahatça ulaşabilecekleri kafeste ve her kafeste 1 adet rat olacak şekilde barındırıldı. Bu ratlar basit randomizasyonla, her bir grupta 8 adet rat olacak şekilde 7 gruba randomize edildi.

Gruplar:

Grup I: Kontrol grubu; Laparotomi yapıp, koledok bağlanmayıp, herhangi bir tedavi almayan grup

Grup II: Sham grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, oral yoldan distile su verilen grup.

Grup III: Diltiazem grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, herbir rat'a oral yoldan 30mg/kg/gün Diltiazem verilen grup

Grup IV: Enalapril grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, herbir rat'a oral yoldan 10mg/kg/gün Enalapril verilen grup

Grup V: E vitamini grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, herbir rat'a intramuskuler yoldan 50mg/kg/gün E vitamini verilen grup

Grup VI: Diltiazem + E vitamini grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, 30mg/kg/gün(p.o.) Diltiazem + 50mg/kg/gün (i.m.) E vitamini verilen grup

Grup VII: Enalapril + E vitamini grubu; Laparotomi sonrası koledok bağlanıp, 10mg/kg/gün(p.o.) Enalapril + 50mg/kg/gün(i.m.) E vitamini verilen grup

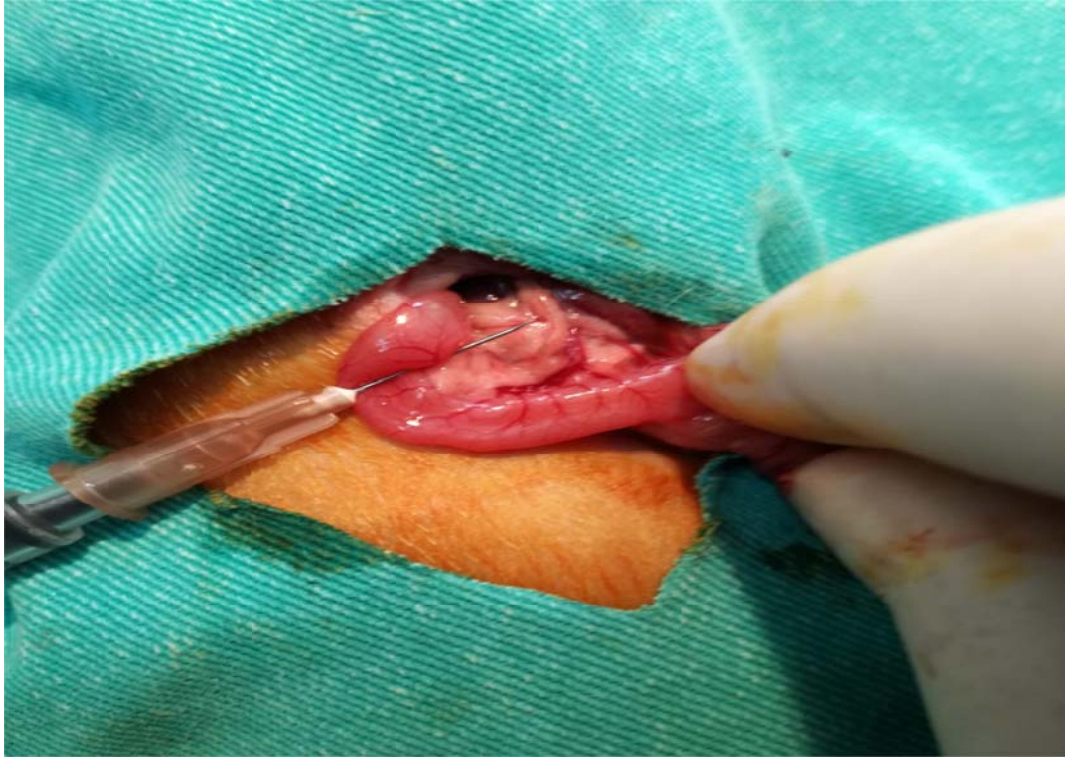
3.1. CERRAHİ PROSEDÜR:

Ratlara subkütan ketamine (90mg/kg) ve xylazine (3mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi uygulanmasını takiben, steril şartlarda cerrahi girişim yeri tıraşlandıktan ve temizlendikten sonra abdomen bölgesi povidon iyot ile silindi. Deney sırasında ratların spontan solumaları sağlandı ve vücut sıcaklıkları 37°C da tutmak için masa lambası kullanıldı. Steril delikli yeşil örtüldükten sonra, karında ksifoid çıkıntidan aşağıya doğru uzanan yaklaşık 2 cm'lik bir orta hat kesisi yapıldı. Mide ve pilor takip edilerek duodenum bulundu. Duodenum hafifçe öne ve aşağıya doğru çekilip, karaciğer hilusundan duodenuma doğru uzanan ve ince bir tubuler yapı olarak izlenen ana safra kanalı görüldü. Ana safra kanalı, çevresindeki yağlı dokulardan tutularak asıldı ve ucu ince olan bir hemostat, dissektör veya makas ile disseke edilerek çıplaklaştırıldı. Ana safra kanalı proksimalinden ve distalinden 4/0 ipek ile bağlanıp ve kesildi. Karın kasları 3/0 veya 4/0 polipropilen dikiş ile devamlı tarzda kapatıldı. Cilt 3/0 veya 4/0 polipropilen dikiş ile tek tek kapatılarak işleme son verildi.

Ratlarda tıkanma ikteri oluşturulduktan sonra kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı, Sham grubuna gavaj yöntemi ile 1ml distile su verildi, Diltiazem grubuna 30 mg/kg/gün, Enalapril grubuna 10mg/kg/gün, E vitamini grubuna 50mg/kg/gün, Diltiazem ve E vitamini grubuna aynı dozlarda, enalapril ve E vitamini grubuna aynı dozlarda gavaj yöntemi ile ilaçlar verildi. Tüm ratlardan işlemden 3. ve 7. gün sonunda kan alınarak SDMA ve kreatinin düzeyleri bakıldı. 7. Gün sonunda aynı zamanda ratlar sakrifiye edilerek böbrek dokuları histopatolojik olarak incelendi.



Resim1: Ksifoid altından orta hatta yapılan insizyon



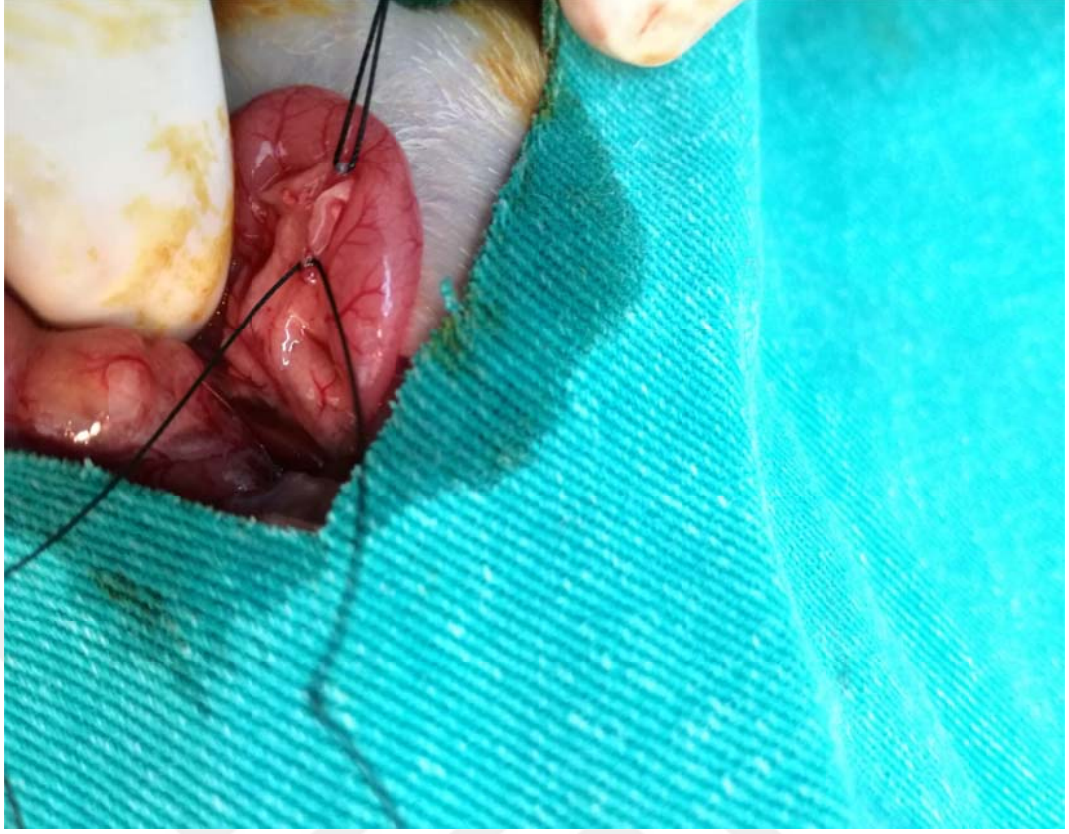
Resim 2: mide-pilor takip edilerek duodenumun bulunması ve duodenumun öne-aşağı çekilerek koledok'un bulunması



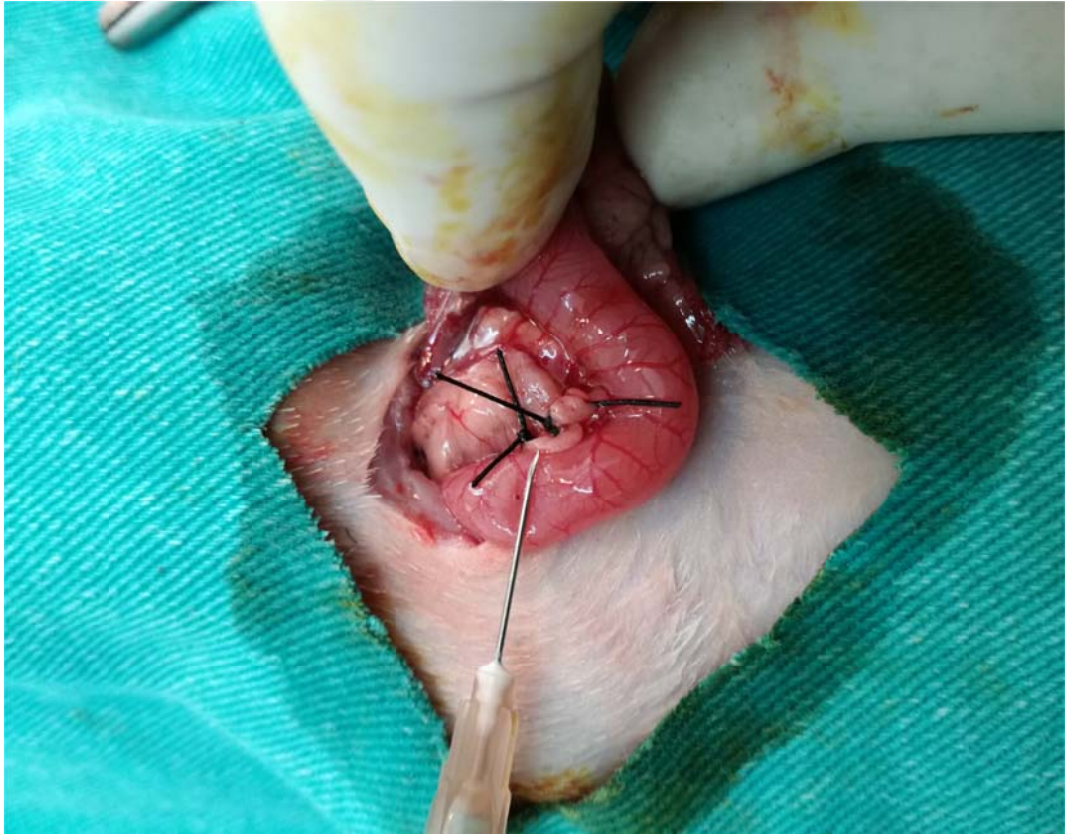
Resim3: koledok'un posteriordan görünüşü



Resim4: koledok'un askıya alınması



Resim5: Koledok'un 4/0 ipekle askıya alınması ve bağlanması



Resim6: Koledok'un bağlanıp kesilmesi

3.2. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Ötenazi sonrası alınan böbrek dokuları histopatolojik inceleme için %10 luk nötral formalinde 48 saat fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular, doku takip cihazı ile (Leica, Germany) artan dereceli etil alkollerden geçirilerek (%70, 80, 95, 100) dehidratasyon ve ksilol ile şeffaflandırma işlemi yapıldı. Doku takip işlemi sonrasında dokular parafine gömülerek mikrotomla (Leica, Germany) 4 µm kesitler alındı.

3.2.1. Işık Mikroskopi

Işık mikroskobik incelemeler yapmak için parafine gömülen doku örneklerinden mikrotom (Leica RM2125RT) ile 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Genel morfolojiyi göstermek amacıyla alınan kesitler hemotoksilen-eozin boyandı ve Olympus BX51 (Tokyo,Japan) mikroskopu ile görüntüler alındı ve histopatolojik skorlama yapıldı (Tablo1).

Tablo 1: Böbrek Hasarının H&E Boyamaya Göre Skorlama Tablosu

	ÇOK	ORTA	AZ	ÇOK AZ
Böbrek Glomerül Çapının Genişlemesi	4	3	2	1
Proksimal Tübül Çapının Daralması	4	3	2	1
Distal Tübül Çapının Daralması	4	3	2	1
Kanama Miktarı	4	3	2	1

3.2.2. İmmüno Floresan Boyama Protokolü

Parafine gömülen doku örneklerinden alınan 4 µm'lik seri kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

- Ksilolde deparafinizasyon.....(2 saat)

- % 100'lük alkol...(2 dk)
- %95'lik alkol.....(2 dk)
- %80'lik alkol.....(2 dk)
- %70'lik alkol.....(2 dk)
- Distile suda 5 dk yıkandı.
- Mikrodalga fırında 5 dk 600W'da 10 Mm sodyum sitrat tamponu (pH=6) içerisinde epitoplara açığa çıkması için kaynatıldı.
- Kesitler yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 2 kez 5'er dakika yıkandı.
- Örnekler Pappen (Daido Sangyo Co.,Ltd.Tokyo,Japan) ile çizildi.
- Kesitlerin immünoglobulinin nonspesifik bağlanmasını engellemek için Superblock (Sky Tech Lab, USA) çözeltisinde oda ısısında nemli karanlık ortamda 20 dakika inkübe edildi. (Serum Bloklama)
- Örnekler yıkanmadan üzerlerine primer antikor damlatılarak +4 derecede nemli karanlık ortamda gece boyu inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve seyreltme oranları şu şekildedir;
 - Endothelin 1 (1:50)
 - Primer antikorlar antibody diluent reagent (ThermoFisher,USA) ile sulandırıldı.
- Örnekler yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- Sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında karanlık nemli ortamda 30 dakika inkübe edildi.
- Çalışmada kullanılan sekonder antikorlar ve seyreltme oranları şu şekildedir;
 - Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor 568 : ab175473 abcam) (1:250)
 - Sekonder antikorlar antibody diluent reagent (ThermoFisher,USA) ile sulandırıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 0.5 µg/ml DAPI (Sigma,USA) ile oda sıcaklığında karanlık nemli ortamda 5 dakika çekirdek boyaması yapıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- Kurutma yapmadan kapatma medyumunu (ThermoFisher,USA) ile karanlık ortamda kapatma yapıldı.

Tüm grupların ışık mikroskop bulguları ve immünoflorasan bulguları ışık mikroskopta (Olympus BX51, Japan) incelendi ve semi-kantitatif skorlama yapılarak değerlendirildi(tablo2).

Tablo 2: Endotelin-1 İmmünreaktivite Skorlama Tablosu

İMMÜNREAKTİVİTE	SKOR
Hiç immünreaktivite göstermemiş	0
Çok az immünreaktivite göstermiş	1
Az immünreaktivite göstermiş	2
Orta immünreaktivite göstermiş	3
Yüksek immünreaktivite göstermiş	4

3.3. BİYOKİMYASAL İNCELEME

Çalışmadaki tüm ratlardan alınan kan örnekleri kırmızı kapaklı biyokimya tüplerine (Becton Dickinson,UK) alındı. Serum tüpleri santrifüj edilmeden önce pıhtılaşmaya bırakıldı. 4 °C de 15 dakika boyunca 3500 devirde santrifüj edildi ve hemen -80 °C de donduruldu.(WiseCryo, Güney Kore). Spectrofotometrik metod ile kreatinin düzeyleri ölçüldü. (Roche Cobas 801, Almanya). SDMA düzeyleri ELİSA kiti (Andy gene, USA) kullanılarak ölçüldü.

3.4. İSTATİKSEL İNCELEME

Çalışmamızda elde edilen veriler SPSS 22.0 programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde parametrik test varsayımları yerine getirildiğinde (Kolmogorov-Simironov) bağımsız ikiden fazla gruptan elde edilmiş ölçümler karşılaştırılırken varyans analizi, analiz sonucunda önemlilik kararı verildiğinde farklılık yapan grup ya da grupları bulabilmek için Tukey testi, parametrik test varsayımları yerine getirilemediğinde bağımsız ikiden fazla gruptan elde edilen ölçümler karşılaştırılırken Kruskal-Wallis testi, analiz sonucunda önemlilik kararı verildiğinde farklılık yapan grup

ya da grupları bulmak için Man Whitney U testi, sayımla elde edilmiş verilerin değerlendirilmesinde Khi-kare testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.



4. BULGULAR

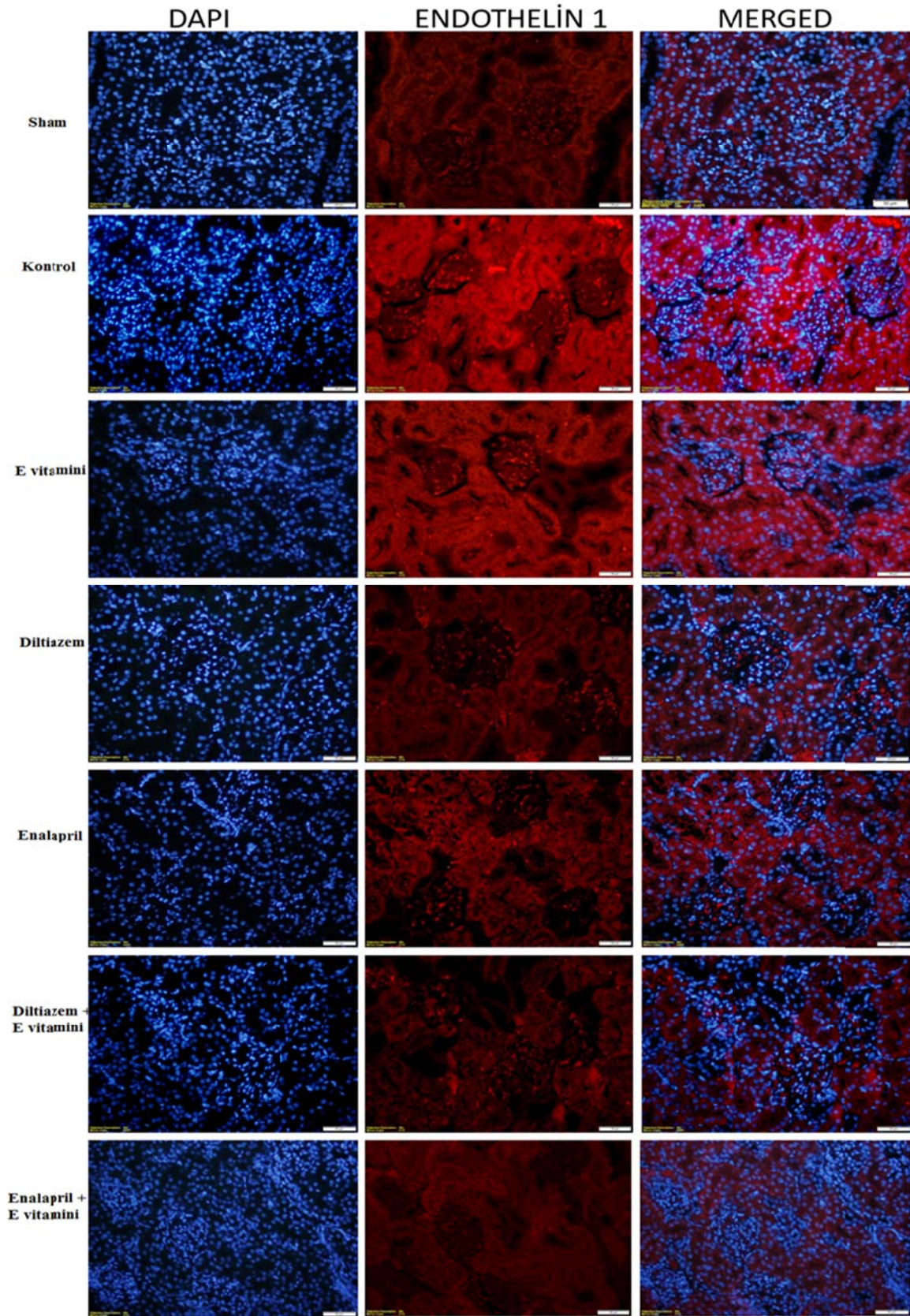
4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Gruplardan elde edilen patoloji örneklerine H&E boyama ve immunhistokimyasal boyama yapıldı. Tüm grupların ışık mikroskop bulguları ve immünoflorasan bulguları ışık mikroskopta (Olympus BX51, Japan) incelendi ve semi-kantitatif skorlama yapılarak değerlendirildi. sonuçlar tablo3 de gösterilmiştir.

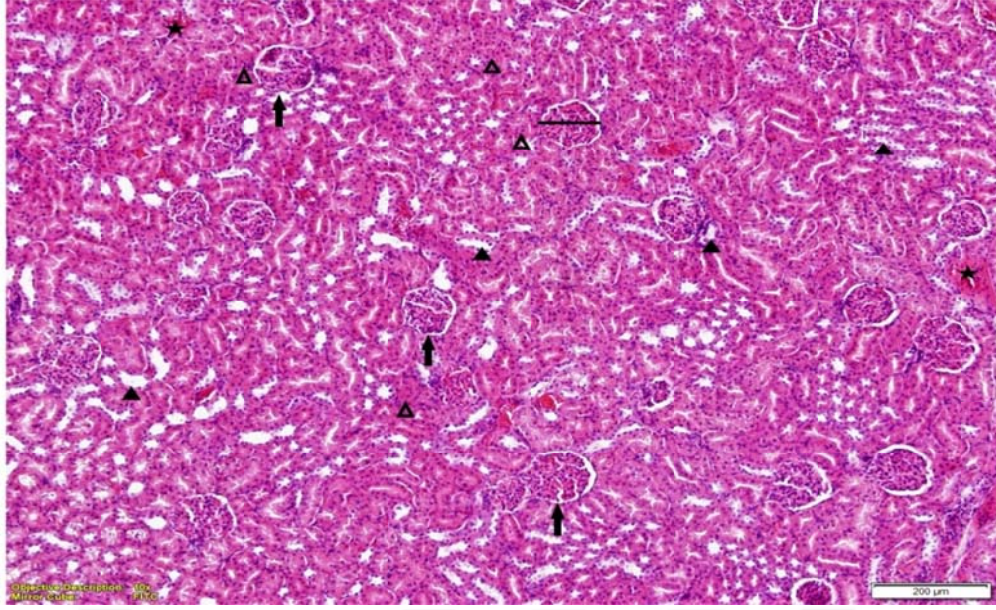
Tablo 3: H&E Boyamaya Göre Böbrek Cisimciğinin Düzeni, Glomerül Büyüklüğü, Bowman Aralığı, Proksimal Tübül, Distal Tübül Ve Kanama Oranına ve Endotelin-1'e Göre Semi-Kantitatif Skorlama Tablosu

Gruplar	Hayvan Sayıları	Böbrek Cisimciğinin Yapısı, Glomerül Çapının Küçülmesi ve Bowman Aralığının Artması	Proksimal Tübül Çapının Genişliği	Distal Tübül Çapının Genişliği	Kanama Miktarı	Endotelin 1
Kontrol Grubu	1.	1	1	1	0	1
	2.	0	1	2	1	2
	3.	2	1	1	1	1
	4.	0	0	1	0	2
	5.	1	2	1	1	2
	6.	0	1	1	0	1
	7.	1	2	2	0	2
	8.	1	1	1	1	1
Sham Grubu	1	3	3	2	3	4
	2.	4	3	3	3	3
	3.	2	4	3	2	3
	4.	4	3	3	3	4
	5.	4	3	1	2	4
	6.	4	3	3	2	4
	7.	3	3	2	3	3
	8.	2	4	3	1	3
E Vitamini Grubu	1.	3	2	3	2	3
	2.	2	3	2	3	2
	3.	2	3	2	3	4
	4.	4	4	2	2	2

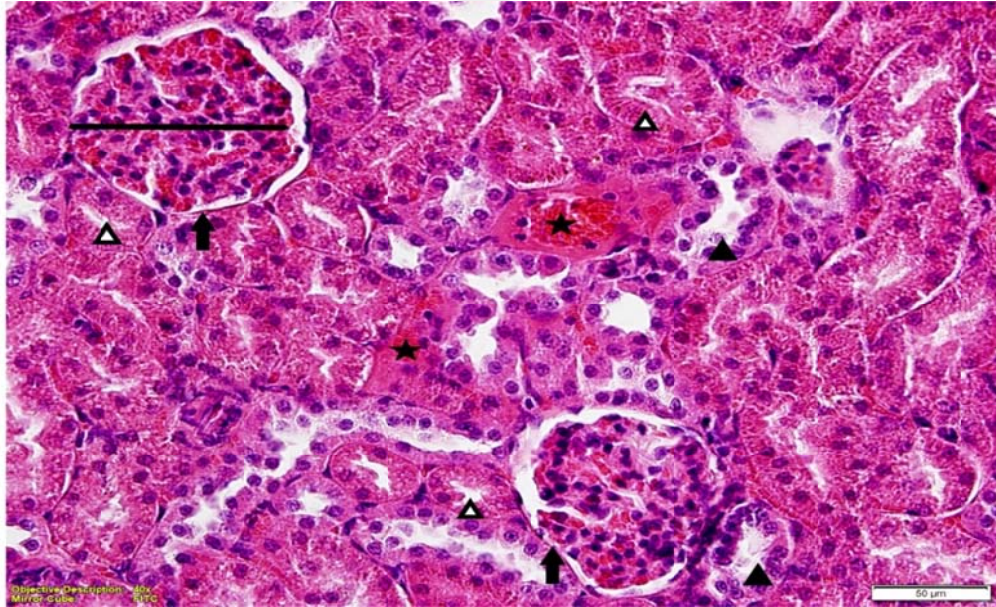
	5.	3	2	2	2	3
	6.	4	2	2	2	3
	7.	4	3	2	2	2
	8.	2	3	2	1	4
Diltiazem Grubu	1.	3	4	2	3	2
	2.	2	3	2	2	3
	3.	2	3	1	1	2
	4.	2	2	4	2	3
	5.	2	2	3	1	1
	6.	2	2	2	1	2
	7.	3	3	3	2	3
	8.	3	2	2	1	1
Enalapril Grubu	1.	1	3	2	1	2
	2.	1	2	3	2	2
	3.	2	2	2	1	3
	4.	3	1	1	3	2
	5.	3	3	3	1	2
	6.	3	2	1	1	3
	7.	2	3	2	2	2
	8.	2	2	2	2	2
Diltiazem + E Vitamini Grubu	1.	2	3	1	1	2
	2.	2	2	2	2	1
	3.	3	2	2	1	3
	4.	2	3	1	2	2
	5.	1	1	3	2	1
	6.	3	2	1	2	2
	7.	3	2	2	1	1
	8.	2	2	2	1	2
Enalapril + E Vitamini Grubu	1.	1	2	3	2	1
	2.	1	1	1	1	1
	3.	2	2	1	1	2
	4.	3	1	1	1	1
	5.	1	1	1	1	1
	6.	1	1	1	1	1
	7.	2	2	2	1	1
	8.	2	1	1	1	1



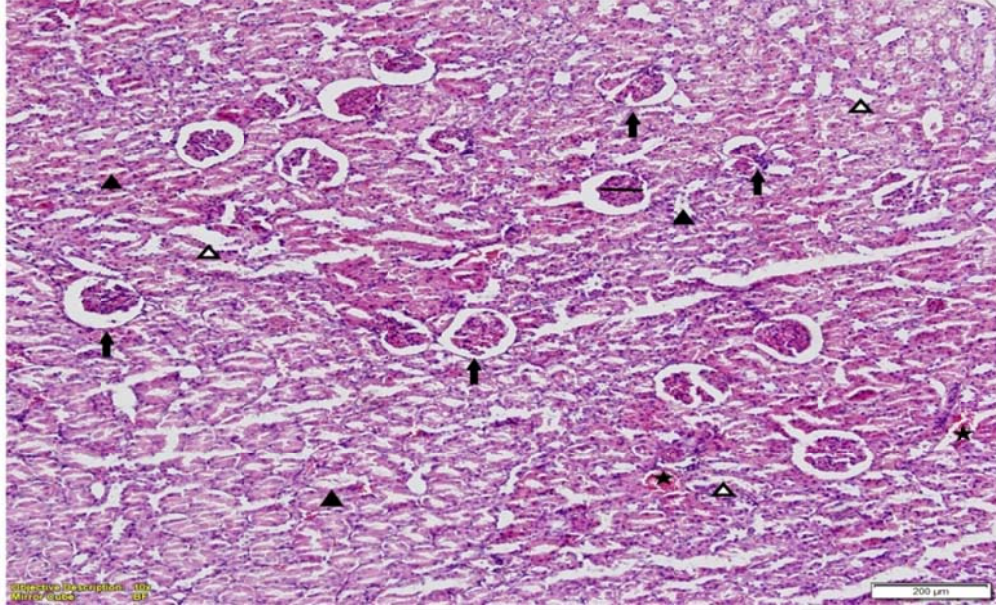
Resim 7: Grupların 40x Endotelin 1 cy3 lokalizasyonunu gösteren immünflorasan boyama (cy3 sekonder antikor ile işaretlenmiş olduğundan kırmızı endotelin işaretli alanlar var, özellikle proksimal tübül epitelinde ve glomerüllerde pozitiflik izleniyor)



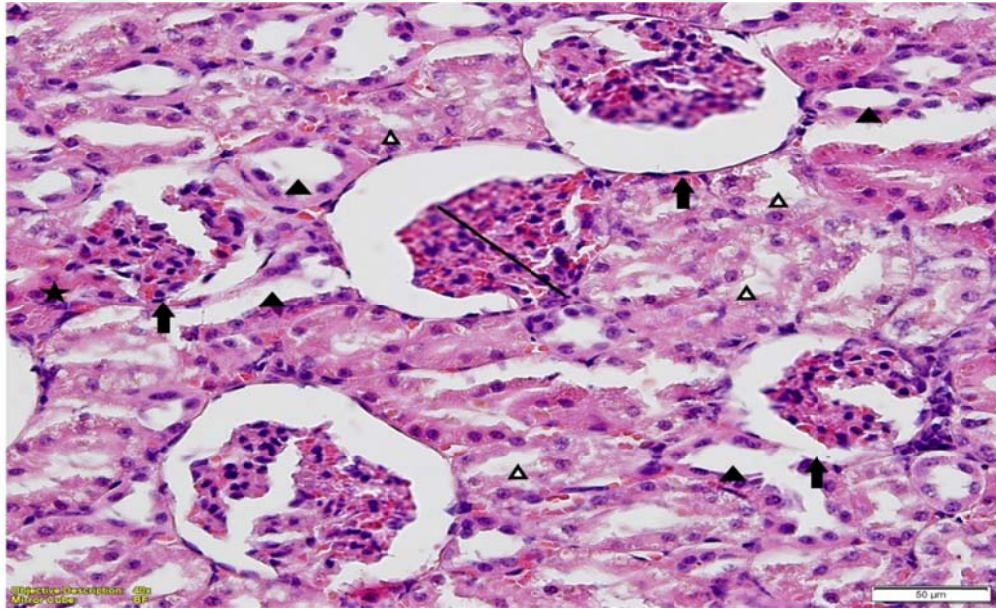
Resim 8: Kontrol grubu böbrek dokusu H&E 10X: böbrek korteksinde, normal çapta glomerül (-) ve bowman aralığına sahip böbrek cisimcikleri (ok) izlenmektedir. Ayrıca kortekste düzenli yerleşimli proksimal tübüller (ok başı) ve distal tübüller (siyah ok başı), kan damarları (yıldız) görülmektedir.



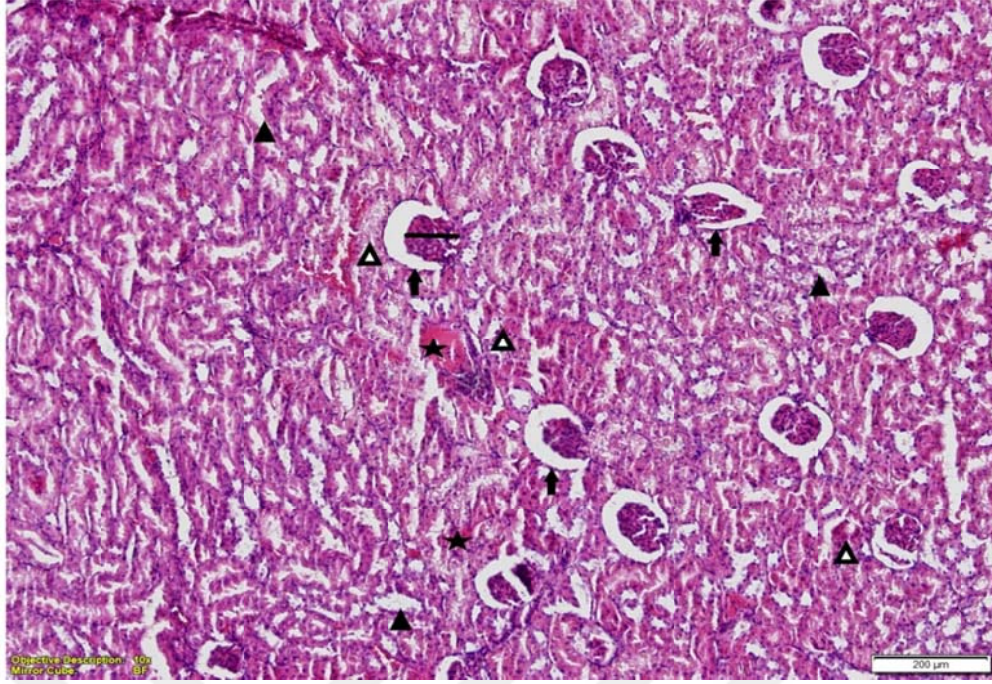
Resim 9: Kontrol grubu böbrek dokusu H&E 40x: böbrek korteksinde normal çapta glomerül (-) ve bowman aralığına sahip böbrek cisimcikleri (ok) izlenmektedir. Ayrıca kortekste düzenli yerleşimli proksimal tübüller (ok başı) ve distal tübüller (siyah ok başı) görülmektedir.



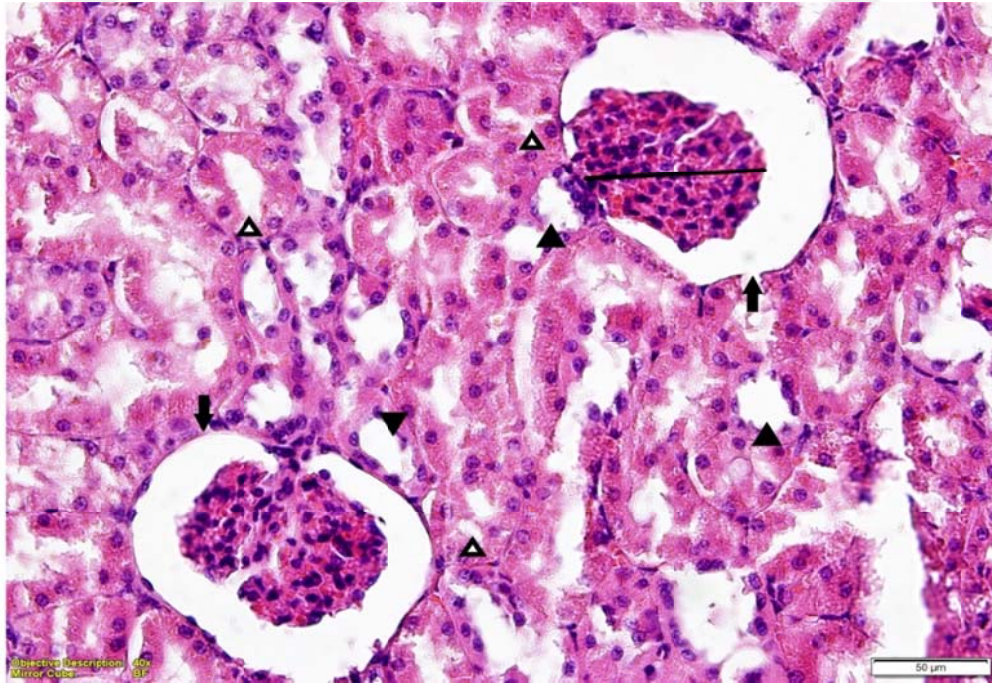
Resim 10: Sham grubu böbrek dokusu H&E 10x: böbrek korteksinde, çapları küçülmüş ve düzensiz glomerüller (-), geniş bowman aralığına sahip böbrek cisimcikleri (ok) yoğun şekilde izlenmektedir. Ayrıca kortekste çapı genişlemiş, tübül epitelizeasyonu bozulmuş proksimal tübüller (ok başı) ve distal tübüller (siyah ok başı), kan damarları (yıldız) görülmektedir.



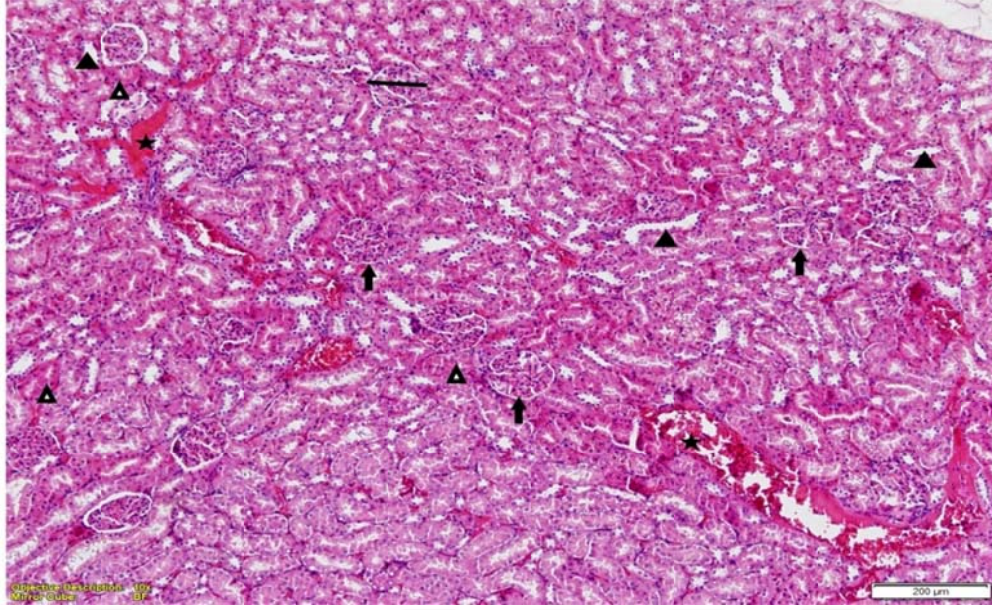
Resim11: Sham grubu böbrek dokusu H&E 40x: böbrek korteksinde, çapları küçülmüş ve düzensiz glomerüller (-), geniş bowman aralığına sahip böbrek cisimcikleri (ok) yoğun şekilde izlenmektedir. Ayrıca kortekste çapı genişlemiş, tübül epitelizeasyonu bozulmuş proksimal tübüller (ok başı) ve distal tübüller (siyah ok başı) görülmektedir



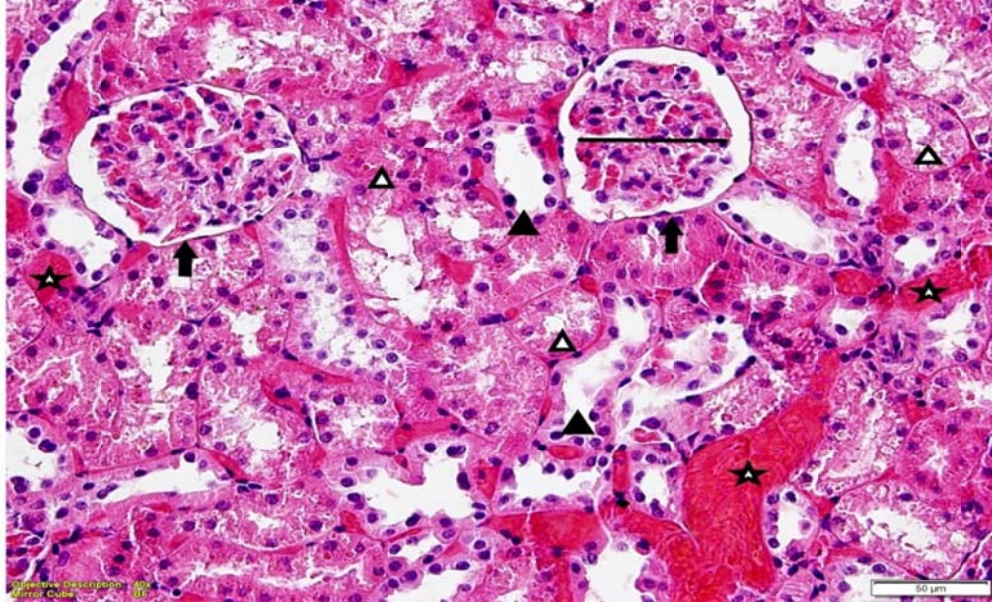
Resim 12: E Vitamini Grubu (10x): Böbrek Korteksinde Düzensizleşmiş Ve Çapı Küçülmüş Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Genişlemiş Bowman Aralığı, Lümeni Genişlemiş Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı), Genişlemiş Kan Damarları (Yıldız) İzlenmektedir.



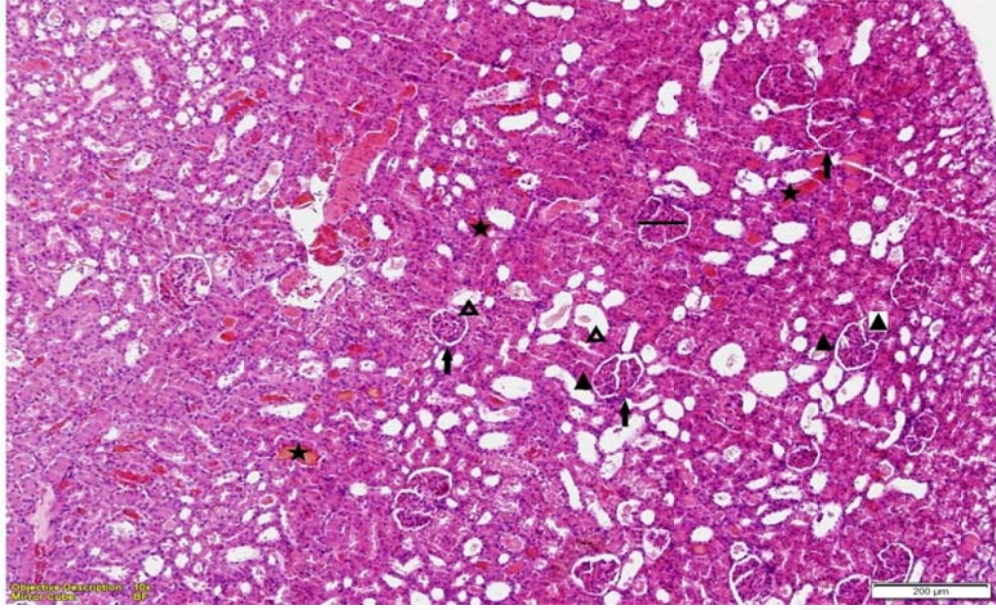
Resim 13: E Vitamini Grubu (40x): Böbrek Korteksinde Düzensizleşmiş Ve Çapı Küçülmüş Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Genişlemiş Bowman Aralığı, Lümeni Genişlemiş Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir.



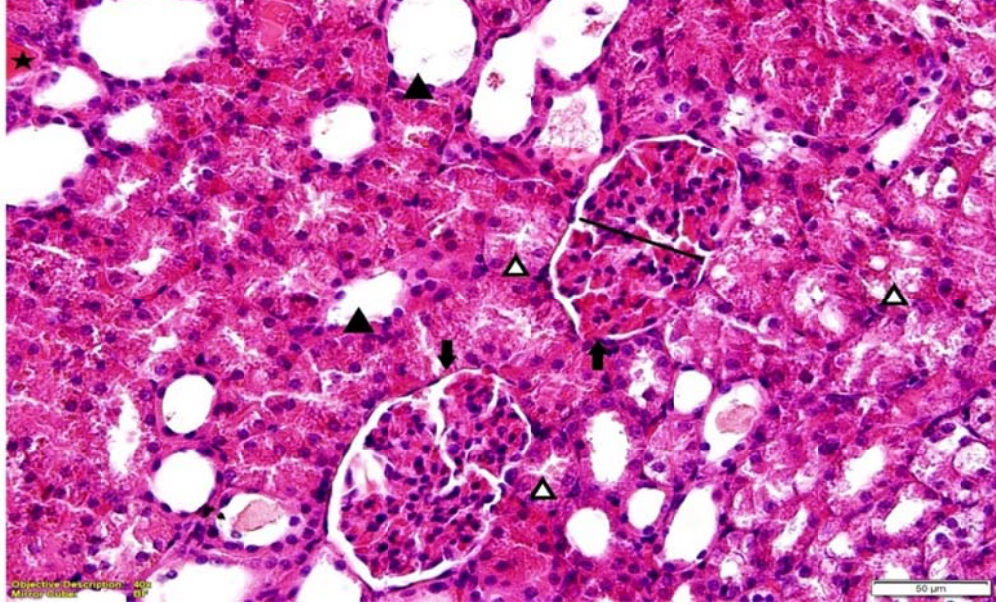
Resim 14: Enalapril Grubu (10x): Böbrek Korteksinde Düzensizleşmiş Ve Çapı Pozitif Kontrol Ve E Vitamini Gruplarına Kıyasla Daha Az Küçük Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Daha Dar Bowman Aralığı, Lümeni Daha Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı), Kan Damarları (Yıldız) İzlenmektedir.



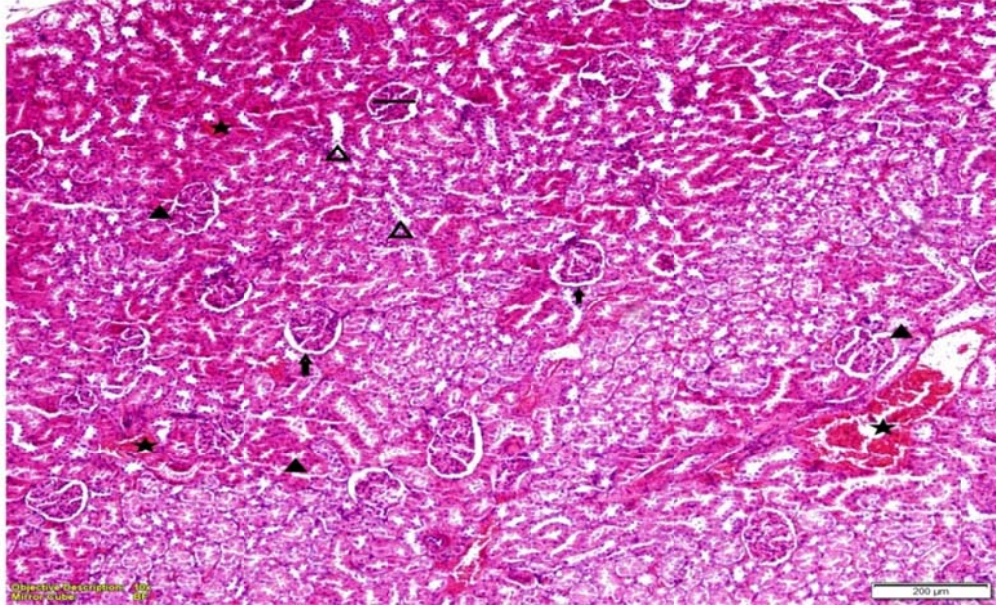
Resim 15: Enalapril Grubu (40x): Böbrek Korteksinde Düzensizleşmiş Ve Çapı Pozitif Kontrol Ve E Vitamini Gruplarına Kıyasla Daha Az Küçük Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Daha Dar Bowman Aralığı, Lümeni Daha Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir.



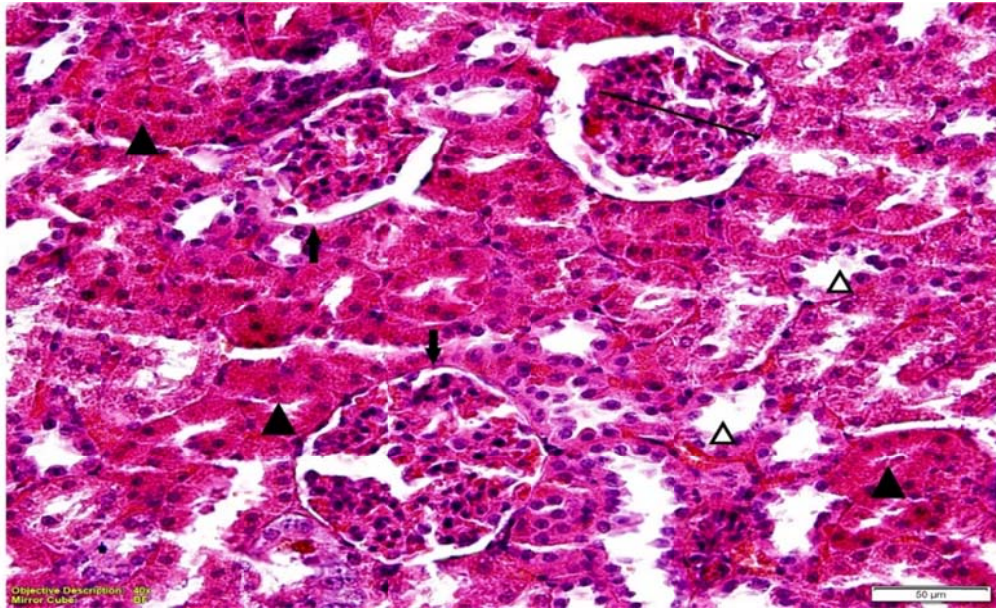
Resim 16: Diltiazem Grubu (10x): Böbrek Korteksinde Daha Düzenli Ve Çapı Pozitif Kontrol, E Vitamini Gruplarına Kıyasla Daha Az Küçük Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Daha Dar Bowman Aralığı, Lümeni Daha Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı), Kan Damarları (Yıldız) İzlenmektedir.



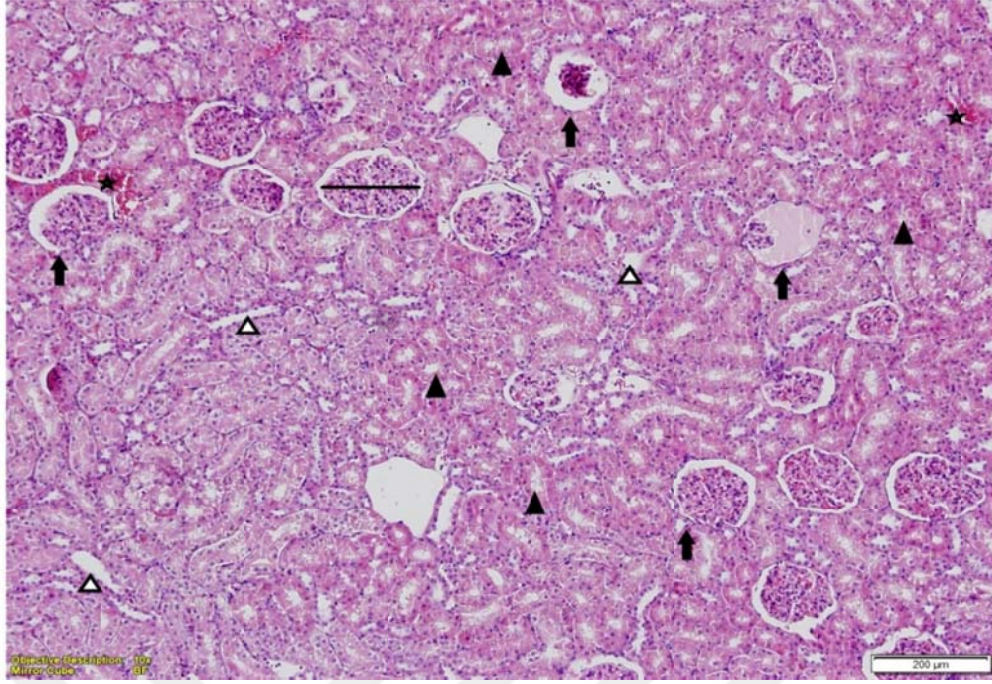
Resim 17: Diltiazem Grubu (40x): Böbrek Korteksinde Daha Düzenli Ve Çapı Pozitif Kontrol, E Vitamini Gruplarına Kıyasla Daha Az Küçük Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Daha Dar Bowman Aralığı, Lümeni Daha Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir.



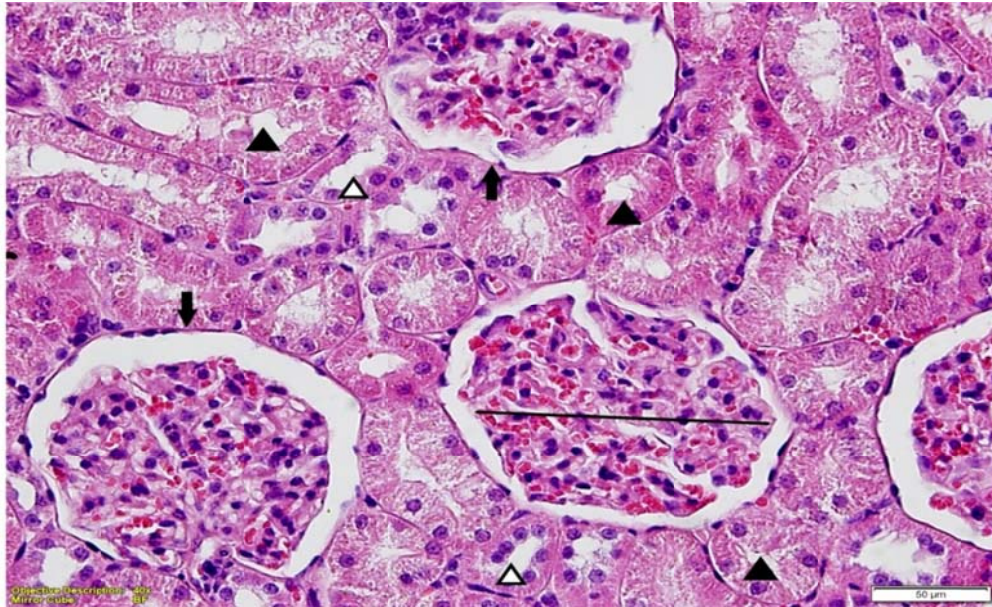
Resim 18: Enalapril + E Vitamini Grubu (10x): Böbrek Korteksinde Diğer Gruplardan Çok Daha Düzenli Ve Çapı Normal Böbrek Dokusuna Yakın Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Normal Aralıkta Bowman Aralığı, Lümeni Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı), Kan Damarları (Yıldız) İzlenmektedir.



Resim 19: Enalapril + E Vitamini Grubu (40x): Böbrek Korteksinde Diğer Gruplardan Çok Daha Düzenli Ve Çapı Normal Böbrek Dokusuna Yakın Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Normal Aralıkta Bowman Aralığı, Lümeni Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir.



Resim 20: Diltiazem + E Vitamini Grubu (10x): Böbrek Korteksinde Diğer Gruplardan Daha Düzenli Ve Çapı Normal Böbrek Dokusuna Yakın Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Normal Aralıkta Bowman Aralığı, Lümeni Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir



Resim 21: Diltiazem + E Vitamini Grubu (40x): Böbrek Korteksinde Diğer Gruplardan Daha Düzenli Ve Çapı Normal Böbrek Dokusuna Yakın Glomerüller (-), Böbrek Cisimciğinde (Ok) Normal Aralıkta Bowman Aralığı, Lümeni Düzenli Ve Dar Olan Proksimal Tübüller (Ok Başı) Ve Distal Tübüller (Siyah Ok Başı) İzlenmektedir.

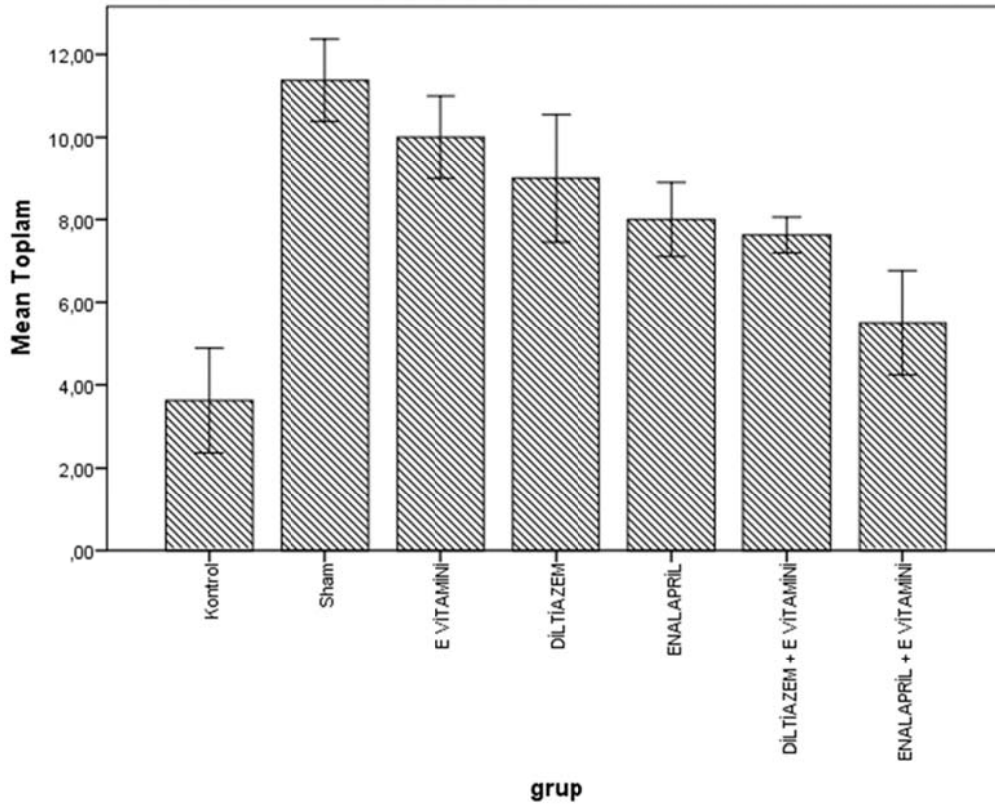
4.2. İSTATİKSEL BULGULAR

Rat gruplarına göre yapılan deneylerden elde edilen sayısal değerler aşağıdaki tablolarda gösterilmektedir. Gerek histo-patolojik ölçümler ile elde edilen gerekse kan değerlerinden ortaya çıkan sonuçlar, deney gruplarına göre test edilmiştir.

Toplam histopatolojik skor sonuçları Tablo 4'te yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Enalapril + E Vitamini grup ortalaması dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Aynı zamanda Sham ve E Vitamini gruplarının ortalamalarının Enalapril + E Vitamini grup ortalamasından yüksek olduğu istatistiksel olarak ispat edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4: Toplam histopatolojik skor İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları

Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
Toplam	Kontrol	1,00	5,00	3,63	1,51	<0,001
	Sham	10,00	13,00	11,38	1,19	
	E VİTAMİNİ	8,00	12,00	10,00	1,20	
	DİLTİAZEM	7,00	12,00	9,00	1,85	
	ENALAPRİL	7,00	10,00	8,00	1,07	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	7,00	8,00	7,63	0,52	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	4,00	8,00	5,50	1,51	



Grafik 1: Toplam histopatolojik skor grafiği

3. Gün Kreatinin değeri sonuçları Tablo5'te yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Diltiazem + E Vitamini ve Enalapril + E Vitamini grup ortalamaları dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Sham grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Aynı zamanda E Vitamini grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Ek olarak Diltiazem grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir.

Tablo 5: 3. Gün Kreatinin Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları

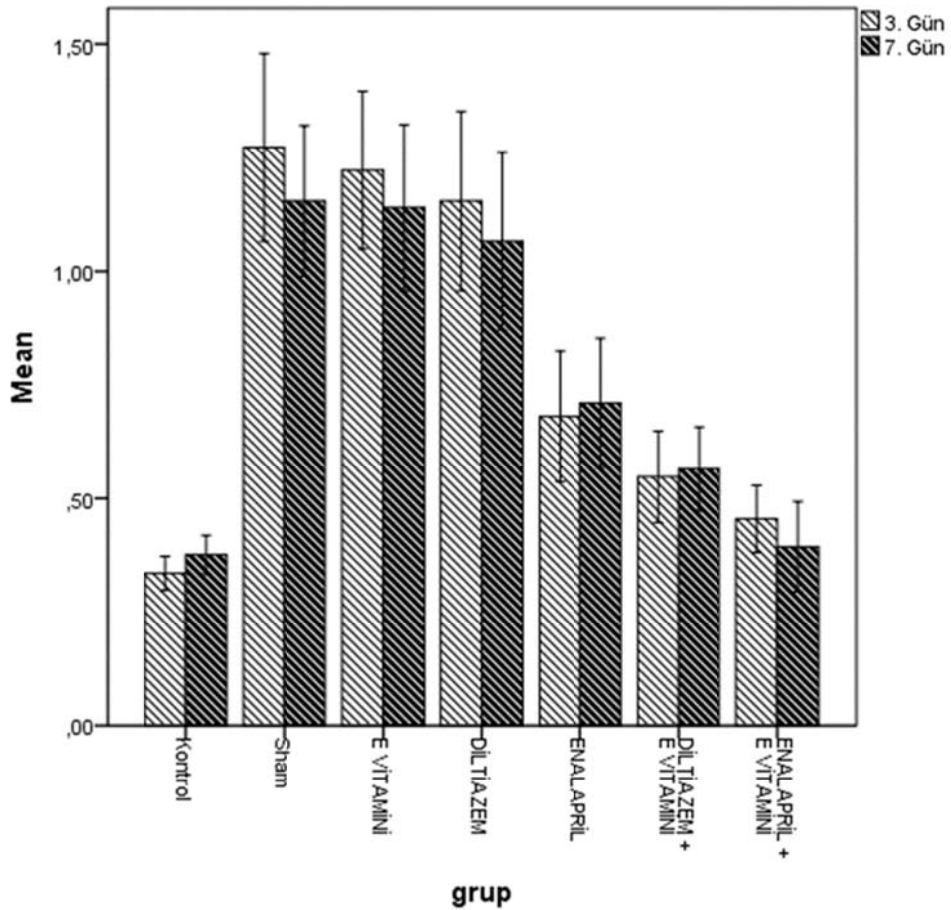
Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
gün3	Kontrol	0,30	0,44	0,34	0,05	<0,001
	Sham	0,91	1,70	1,27	0,25	
	E VİTAMİNİ	0,92	1,48	1,22	0,21	
	DİLTİAZEM	0,73	1,46	1,16	0,24	
	ENALAPRİL	0,40	0,89	0,68	0,17	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	0,42	0,74	0,55	0,12	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	0,34	0,60	0,46	0,09	

7. Gün Kreatinin değeri sonuçları Tablo 6'da yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Diltiazem + E Vitamini ve Enalapril + E Vitamini grup ortalamaları dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Sham grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Aynı zamanda E Vitamini grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu hesaplanmıştır. Ek olarak Diltiazem grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E

Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bir diğer farklılık olarak, Enalapril grup ortalamasının Enalapril + E Vitamini grup ortalamasından yüksek olduğu hesaplanmıştır ($p=0,008$).

Tablo 6: 7. Gün Kreatinin Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları

Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
gün7	Kontrol	0,29	0,47	0,38	0,05	<0,001
	Sham	0,90	1,47	1,16	0,20	
	E VİTAMİNİ	0,90	1,41	1,14	0,22	
	DİLTİAZEM	0,74	1,39	1,07	0,23	
	ENALAPRİL	0,44	0,85	0,71	0,17	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	0,41	0,70	0,57	0,11	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	0,32	0,68	0,39	0,12	



Grafik 2: Graplardan elde edilen 3. ve 7. gün kreatinin değeri grafiği

3. Gün Simetrik Dimetil Arjinin(SDMA) değeri sonuçları Tablo7'de yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Diltiazem + E Vitamini ve Enalapril + E Vitamini grup ortalamaları dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Sham grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Aynı zamanda E Vitamini grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Ek olarak Diltiazem grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir.

Tablo 7: 3. Gün SDMA Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları

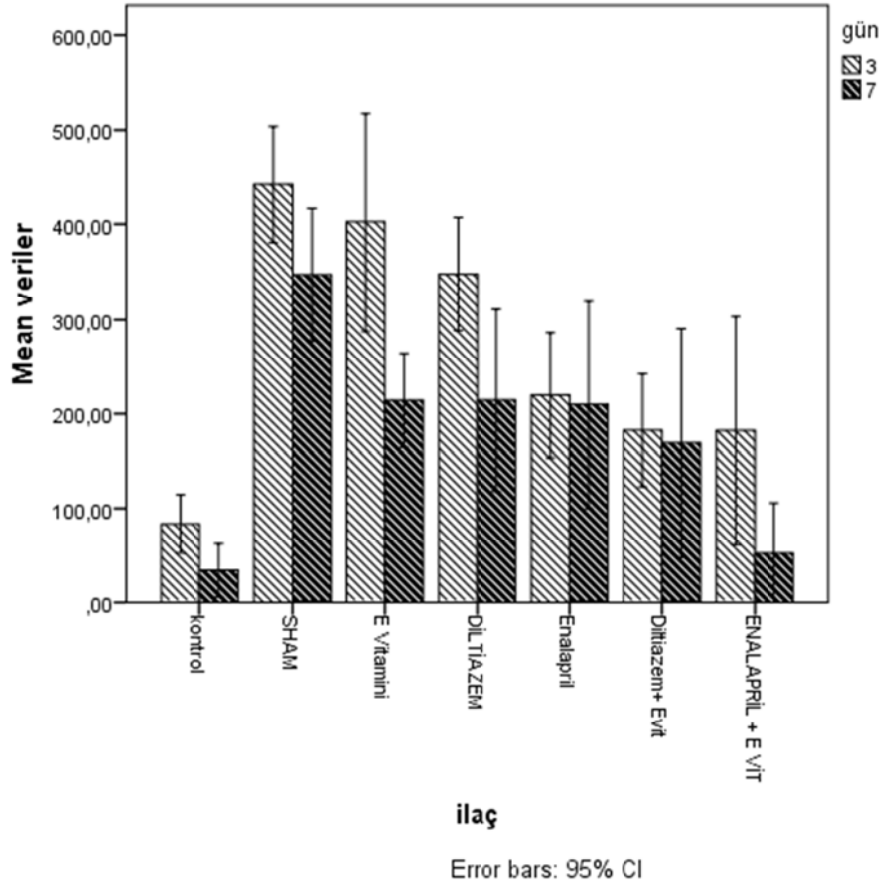
Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
gün3	Kontrol	58,79	101,25	83,42	19,46	<0,001
	Sham	404,83	484,83	442,14	38,72	
	E VİTAMİNİ	297,47	457,66	402,47	72,26	
	DİLTİAZEM	305,77	384,26	347,61	37,31	
	ENALAPRİL	187,28	275,96	219,88	41,70	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	152,19	229,55	182,66	37,50	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	118,23	276,34	182,52	75,91	

7. Gün Simetrik Dimetil Arjinin(SDMA) değeri sonuçları Tablo 8'de yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Diltiazem + E Vitamini ve Enalapril + E Vitamini grup ortalamaları dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Sham grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir. Aynı zamanda E Vitamini grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu hesaplanmıştır. Ek

olarak Diltiazem grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$) ve Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Bir diğer farklılık olarak, Enalapril grup ortalamasının Enalapril + E Vitamini grup ortalamasından yüksek olduğu hesaplanmıştır ($p=0,008$).

Tablo 8: 7. Gün SDMA Değeri Tanımlayıcı İstatistikleri ve Fark Analizi Sonuçları

Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
gün7	Kontrol	9,92	51,06	34,26	17,77	<0,001
	Sham	301,06	405,02	347,00	43,68	
	E VİTAMİNİ	175,21	251,62	214,41	31,31	
	DİLTİAZEM	160,49	275,40	214,64	60,77	
	ENALAPRİL	141,81	280,49	209,92	69,15	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	111,81	276,72	169,27	76,23	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	3,51	74,64	52,52	33,56	



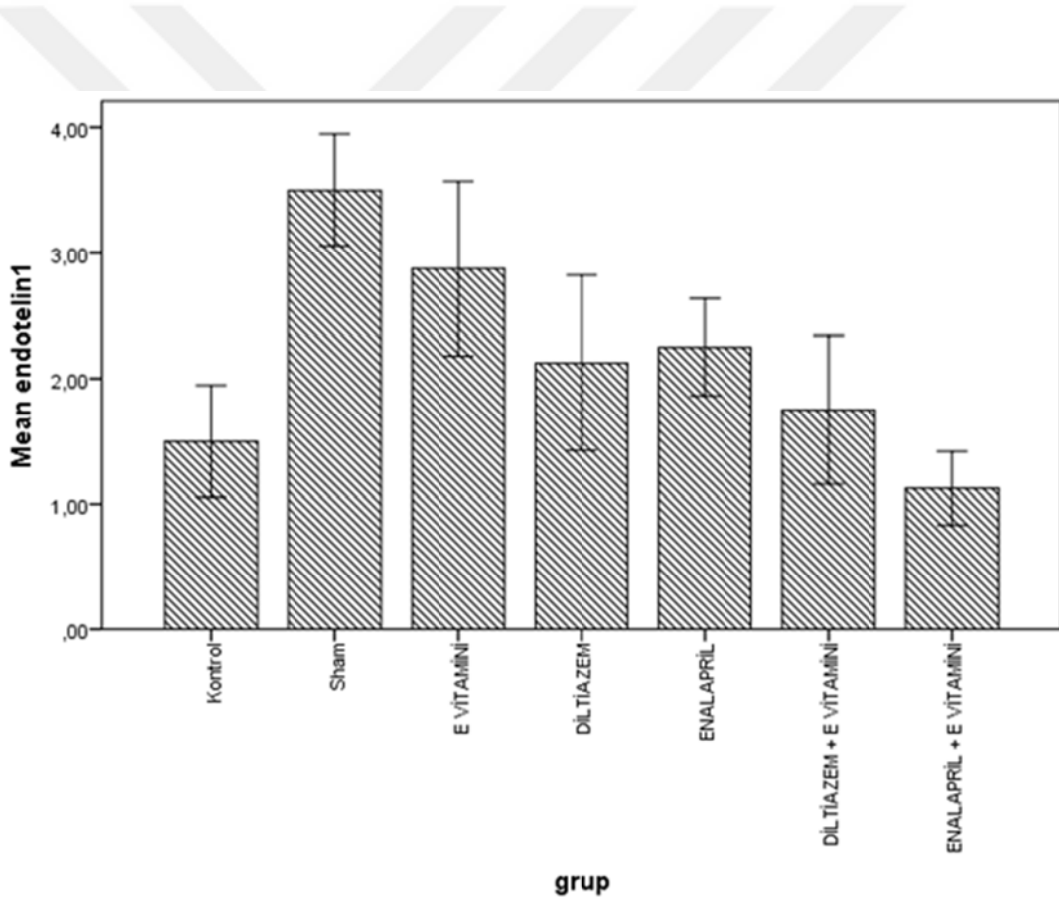
Grafik 3: Gruplardan elde edilen 3. ve 7. gün SDMA değeri grafiği

Entotelin 1 semikantitatif ölçüm sonuçları Tablo 7’de yer almaktadır. Sonuçlar incelendiğinde deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Farklılığın kaynağı olan grupları bulmak amacıyla yapılan analizde; kontrol grup ortalamasının Enalapril + E Vitamini grup ortalaması dışında diğer tüm grupların ortalama değerinden küçük olduğu hesaplanmıştır ($p<0,05$). Sham grup ortalamasının Enalapril ($p<0,001$), Diltiazem + E Vitamini ($p<0,001$), Enalapril + E Vitamini ($p<0,001$) diltizem ($p<0,001$), enalapril($p<0,001$) ve E vitamini($p>0,001$) grup ortalamalarından daha yüksek olduğu ispat edilmiştir.



Tablo 9 : Graplardan elde edilen immunhistokimyasal değerlendirme ile Endotelin 1 sonuçları

Değişken	Grup	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p
endotelin1	Kontrol	1,00	2,00	1,50	0,53	<0,001
	Sham	3,00	4,00	3,50	0,53	
	E VİTAMİNİ	2,00	4,00	2,88	0,83	
	DİLTİAZEM	1,00	3,00	2,13	0,83	
	ENALAPRİL	2,00	3,00	2,25	0,46	
	DİLTİAZEM + E VİTAMİNİ	1,00	3,00	1,75	0,71	
	ENALAPRİL + E VİTAMİNİ	1,00	2,00	1,13	0,35	



Grafik 4: Endotelin 1 grafiği

5. TARTIŞMA – SONUÇ

Biliyer tıkanmanın temel sonuçlarından biri, hastanın morbidite ve mortalitesini belirgin şekilde artıran böbrek fonksiyonu üzerine olan etkisidir. Bu çalışmamızda ratlarda oluşturulan deneysel tıkanma sarılığı modelinde böbrek kan akımını artırdığı bilinen; diltiazem, enalapril ve antioksidan etkisi olan E vitamini kullanımının ratlardaki bozulmuş böbrek fonksiyonları üzerine etkisini araştırdık. Bu çalışma tıkanma sarılığına bağlı renal hasarda enalapril, diltiazem ve E vitaminin etkilerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır.

Safra nefropatisine bağlı akut böbrek hasarı , genellikle enfeksiyonlar / sepsisin eşlik etmesiyle ortalama sağkalımı 2 haftada % 50 civarında olup, yüksek mortaliteye sahiptir(60). Bu mortalite oranlarını düşürmek tıkanma sarılığına bağlı böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda alttı yatan hastalığın gerek cerrahi gerekse tıbbi tedavisi için zaman kazandırır. Bu çalışmada afferent arteriola etkili diltiazem, efferent arteriola etkili enalapril ilaçları kullanılarak böbrek kan akımını değiştirerek tıkanma sarılığında oluşturulmuş böbrek hasarına olan etkilerini karşılaştırmayı hedefledik. Aynı zamanda oluşturulmuş olan böbrek hasarına kuvvetli antioksidan olduğu bilinen E vitamini tedaviye ekleyerek bu hasarın azaltılmasını öngördük.

Temiz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, bakır nefrotoksisitesinde E vitaminin antioksidan savunma mekanizmalarını güçlendirerek BUN ve kreatin düzeylerini etkili olarak düşürdüğünü ve böbrek için potansiyel koruyucu olabileceğini bulmuşlardır(61). Bizim çalışmamızda E vitamini tek başına kullanıldığında böbrek fonksiyonu ve histopatolojik incelemeye göre iyileşme sağlamasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi($p>0,005$) fakat Diltiazem ve Enalapril ile kombine kullanıldığında iyileştirici etkilerini artırıcı olarak bulunmuştur($p<0,005$).

Becker ve Ark. yaptıkları çalışmada renal iskemi modelinde tacrolimusa bağlı oluşan nefrotoksisitede diltiazemin koruyucu etkisine baktıkları ve diltiazemin oluşmuş tübüler lezyonlarda histolojik olarak iyileşme sağladığını ancak böbrek fonksiyonlarında düzelme olmadığını saptamışlardır. Oluşan tübüler hasarın; hücre içine patolojik Ca^{+2} salınımına bağlı olduğu, diltiazemin de koruyucu etkisini bu patolojik Ca^{+2} salınımı engelleyerek oluşturduğunu düşünmüşlerdir. Bu çalışmada ayrıca böbrek kanlanmasını değiştirerek böbrek fonksiyonlarının düzeltilemediği

vurgulanmıştır(62). Bizim çalışmamızda da oluşturulan hepato-renal sendromda afferent arteriole etkili diltiazemin böbrek fonksiyonlarını istatistiksel olarak anlamlı olarak düzeltmediği($p>0.005$), ancak renal hasarda anlamlı derecede iyileşme sağladığı görülmüştür($p<0.005$). Bu sonuç Becker ve ark. Yaptığı çalışmada vurguladıkları gibi diltiazemin arterial kan akımındaki değişiklikten çok Ca^{+2} kanallarını bloke ederek hücre içine patolojik Ca^{+2} akımını engelleyerek tübüler hasarı azalttığı savını desteklemektedir. Literatürde her ne kadar Safra nefropatisine enalapril in etkisi ile ilgili çalışma olmasa da diyabetik nefropatide enalapril tedavisinin etkili olduğunu gösteren çalışmalar vardır(63, 64).

Bizim çalışmamızda efferent arteriol üzerine vazodilatatör etkili enalaprilin; hem renal fonksiyonları hem de renal hasarı diltiazeme göre anlamlı derecede daha etkili olarak azalttığı saptanmıştır($p<0.005$). Ayrıca tedavide antioksidan özelliği çok kuvvetli olan E vitamini ile kombine edildiğinde gruplar arasında en etkin tedavi sonuçlarını vermiştir. Kombine uygulandığındaki bu etkinin sinerji oluşturmasında enalaprilin diğer etkilerinin yanında antioksidan etkisinin de rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Kramer ve arkadaşların tıkanma sarılığında plazma ve idrar endotelinde de papiller ET(ET-1) sentezinde artış olduğunu bulmuşlardır. ET_A / ET_B reseptör engelleyici bosentan'ın GFR'yi ve renal konsantrasyon yeteneğini düzelttiğini bulmuşlar(65).

Bizim çalışmamızda tedavi gruplarında endotelin I düzeyleri düşük olarak bulundu. En etkili düşüş enalapril + E vitamini grubunda bulundu($p>0,005$). E vitamini tedavisi verilen grupta tedavisiz gruba kıyasla düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi($p>0,005$). Diğer tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş mevcuttu.

Sonuç olarak safra nefropatisinde afferent arteriola etkili diltiazem ve efferent arteriole etkili olan enalapril renal hasarı azaltmıştır. Bu azalma E vitamini ile kombine tedavi edilen gruplarda daha da fazla olmuştur. Safra nefropatisinde en iyi iyileşme enalapril ile E vitamini kombine tedavisinde sağlanmıştır. Yüksek mortalite ile seyreden safra nefropatisinde bu yapılan deneysel çalışma sonucunda umut verici sonuçlar elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Rege RV. Adverse effects of biliary obstruction: implications for treatment of patients with obstructive jaundice. *AJR* 1995;164:287.
2. Dawson JL. The incidence of postoperative renal failure in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1965;52:663.
3. Armstrong CP, Dixon JM, Taylor TV, Davies GC. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg* 1984;71:234.
4. Traber MG, Atkinson J: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43:4-15.
5. Pitt HA, Cameron JL, Postier RG, Gadacz TR. Factors affecting mortality in biliary tract surgery. *Am J Surg* 1981; 141: 66.
6. Fogarty BJ, Parks RW, Rowlands BJ, Diamond T. Renal dysfunction in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1995; 82:877–884.
7. Dawson JL. Post-operative renal function in obstructive jaundice: effect of mannitol diuresis. *BMJ* 1965;1:82
8. Baum M, Stirlin GA, Dawson JL. Further study into obstructive jaundice and ischaemic renal damage. *B M J* 1969; 2: 229.
9. Bailey ME. Endotoxin, bile salts and renal function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1976;63:774.
10. Dawiskiba J. The role of endotoxaemia in the development of renal disorders in experimental obstructive jaundice in rats. *HPB Surg* 1996;10:7.
11. Tanaka N, Ryden S, Bergqvist L, Christensen P, Bengmark S. Reticulo-endothelial function in rats with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1985;72:946.
12. Green J, Beyar R, Sideman S, Mordehovitz D, Better OS. The “jaundiced heart”: a possible explanation for postoperative shock in obstructive jaundice. *Surgery* 1986;100:14.
13. Zingg JM, Azzi A: Non-antioxidant activities of vitamin E. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11:1113-1133.
14. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, et al. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radical Biol Med*. 1996; 20:351–359.

15. Feng, M. G., Li, M., & Navar, L. G. (2004). T-type calcium channels in the regulation of afferent and efferent arterioles in rats. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 286(2), F331-F337.
16. Guyton A. Böbrekler ve Vücut Sıvıları, Fizyoloji, Ed. A Kazancıgil, Güven Kitabevi Yayınları. 1978; 1: 349-50.
17. Tisher C. Structure and Function of Kidneys: Cecil Textbook of Medicine. Yirmibirinci baskı. Goldman L, Bennet JC (ed). WB Saunders Company Philadelphia, Pennsylvania 2000, S. 532-539.
18. Araujo M, Welch W. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2006; 15(1): 72.
19. Erden M. Serbest Radikaller. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1992; 12: 201-7.
20. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, Konya. 1995.
21. Valko M, Leibfritz D, Moncol J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39(1): 44-84.
22. McCord J. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000; 108(8): 652-9.
23. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Veterinerlik Fakültesi Dergisi*. 2004; 15: 91-6.
24. Kavas G. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 1989; 9: 1-8.
25. Cuzzocrea S, Riley D, Caputi A. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacological reviews*. 2001; 53(1): 135.
26. O'Neill PA, Wait RB, Kahng KU. Obstructive jaundice and renal failure in the rat: the role of renal prostaglandins and the renin angiotensin system. *Surgery* 1990;108:356.
27. Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice-mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Societ Nephrolog* 1995;5:1853-1871.66
28. Alon U, Berant M, Mordechovitz D, et al. Effect of isolated cholaemia on systemic haemodynamics and kidney function in conscious dogs. *Clin Sci* 1982; 63:59-64.

29. Martinez-Rodenas F, Oms LM, Carulla X, et al. Measurement of body water compartments after ligation of the common bile duct in the rabbit. *Br J Surg* 1989; 76:461–464.
30. Uemura M, Tsujii T, Fukui H, Kita K, Takaya A, Tsukamoto N et al. Urinary prostaglandins and renal function in chronic liver diseases. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:75.
31. Poo JL, Estanes A, Pedraza-Chaverri J, Cruz C, Pérez C, Huberman A et al. Chronology of portal hypertension, decreased sodium excretion, and activation of the renin-angiotensin system in experimental biliary cirrhosis. *Rev Invest Clin* 1997;49:15
32. Martínez-Ródenas F, Pereira JA, Jiménez W, Gubern JM, Sitges-Serra A. Circulating bile is the main factor responsible for atrial natriuretic peptide release in experimental obstructive jaundice. *Br J Surg* 1998;85:480
33. Inan M, Sayek I, Tel BC, Sahin-Erdemli I. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1997;84:943.
34. Kramer HJ. Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron* 1997;77
35. Kramer HJ, Schwarting K, Backer A, Meyer-Lehnert H. Renal endothelin system in obstructive jaundice: its role in impaired renal function of bile-duct ligated rats. *Clin Sci Colch* 1997;92:579.)
36. Goldberg DM (1980). "Structural, functional and clinical aspects of gammaglutamyltransferase". *Crit Rev Clin Lab Sci* 12 (1): 1–58.
37. Meister A (August 1974). "The gamma-glutamyl cycle. Diseases associated with specific enzyme deficiencies". *Ann. Intern. Med.* 81 (2): 247–53.
38. Raulf M, Stüning M, König W (May 1985). "Metabolism of leukotrienes by L-gamma-glutamyl-transpeptidase and dipeptidase from human polymorphonuclear granulocytes". *Immunology* 55 (1): 135–47. 69
39. Batman F, Arslan S: Karaciğer fizyolojisi. Sayek İ.(ed). *Temel cerrahi* 1996;cilt 2:1205
40. Hutchison, T.A., Shahan, D.R. (Ed.),2003, *DRUGDEXW System*, Edition Electronic Version. MICROMEDEX, Greenwood Village,
41. Üstünes, L. (Ed.) (2009). *RxMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.CO.*
42. Aronson JK. Calcium channel blockers. In: Aronson JK, editor. *Meyler's Side Effects of Cardiovascular Drugs*. Oxford, United Kingdom; 2009. p. 99-104.

43. Buckley M, Grant S, Goa K, McTavish D, Sorkin E. Diltiazem a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*. 1990; 39(5): 757-806.
44. Varis T, Backman J, Kivistö K. Diltiazem and mibefradil increase the plasma concentrations and greatly enhance the adrenal-suppressant effect of oral methylprednisolone&ast. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2000; 67(3): 215-21.
45. Buckley M, Grant S, Goa K. Diltiazem a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*. 1990; 39(5): 757-806.
46. Traber MG, Arai H: Molecular mechanism of vitamin E transport. *Annual Review of Nutrition*. 1999;19:343-355.
47. Zingg JM: Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007;28:400-422.
48. Singh U, Devaraj S, Jialal I: Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*. 2005;25:151-174.
49. Patel J, Walayat S, Kalva N, Palmer-Hill S, Dhillon S. Bile cast nephropathy: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2016;22:6328–34.
50. Wu B, Gong D, Ji D, Xu B, Liu Z. Clearance of myoglobin by high cutoff continuous veno-venous hemodialysis in a patient with rhabdomyolysis: A case report. *Hemodial Int*. 2015;19:135–40.
51. Ortuno J, Esteban MA, Cuesta A, Meseguer J: Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001;79:167-180.
52. Traber MG, Atkinson J: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43:4-15.
53. Zingg JM, Azzi A: Non-antioxidant activities of vitamin E. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11:1113-1133.
54. Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes. *Hepatology*. 1993;17:869–81.
55. Baldi A: Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science*. 2005;98:117-122.
56. McDowell LR, Williams SN, Hidiroglou N, et al.: Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science Technology*. 1996;60:273-296
57. Neuhofer, W., & Pittrow, D. (2006). Role of endothelin and endothelin receptor antagonists in renal disease. *European journal of clinical investigation*, 36, 78-88.

58. Brooks, D. P. (1996). Role of endothelin in renal function and dysfunction. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 23(4), 345-348.
59. Chen, Y., Di, C., Zhang, X at al. (2019). Transforming growth factor β signaling pathway: A promising therapeutic target for cancer. *Journal of Cellular Physiology*.
60. Nayak, S. L., Kumar, M., Bihari, C., & Rastogi, A. (2017). Bile cast nephropathy in patients with acute kidney injury due to hepatorenal syndrome: a postmortem kidney biopsy study. *Journal of clinical and translational hepatology*, 5(2), 92.
61. Temiz, M. A., & Temur, A. Bakır Nefrotoksisitesinde Melatonin ve E Vitamini'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(3), 347-354.
62. Becker, G., Witzke, O., Baltés, A., Hamar, P., Philipp, T., & Heemann, U. (1996). Diltiazem minimizes tubular damage due to FK506-mediated nephrotoxicity following ischemia and reperfusion in rats. *Transplant immunology*, 4(1), 68-71.
63. Coppey, L. J., Davidson, E. P., Rinehart, T. W., Gellett, J. S., Oltman, C. L., Lund, D. D., & Yorek, M. A. (2006). ACE inhibitor or angiotensin II receptor antagonist attenuates diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, 55(2), 341-348.
64. KULOĞLU, T., & KOCAMAN, N. Enalapril Uygulanan Diyabetik Sıçan Böbrek Dokularında TRPM2 Kanal İmmunreaktivitelerinin Belirlenmesi.
65. Kramer, H. J. (1997). Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron*, 77(1), 1-12.